PENGARUH PEMBERIAN L-ARGININ TERHADAP RESPON IMUNITAS SELULER MENCIT BALB/c YANG DIINOKULASI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

The effects of L-arginine on cellular immunity against *Salmonella typhimurium* in BALB/c mice

TESIS

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik

HERMINA SUKMANINGTYAS
NIM. G4A 099006

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
JULI 2003

PENGARUH PEMBERIAN L-ARGININ TERHADAP RESPON IMUNITAS SELULER MENCIT BALB/c YANG DIINOKULASI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

The effects of L-arginine on cellular immunity against Salmonella typhimurium in Balb/c mice

Disusun oleh:

HERMINA SUKMANINGTYAS
NIM. G 4A 099006

Telah dipertahankan didepan dewan penguji pada tanggal 8 Juli 2003
dan dinyatakan telah lulus memenuhi syarat

Pembimbing Utama	Pembimbing Anggota
dr. Edi Dharmana, MSc.PhD	Prof.Dr.dr. Susilo Wibowo, MS Med,Sp.And
NIP. 130 529 451	NIP. 130 881 984

Mengetahui
Ketua Program Magister Ilmu Biomedik
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro

Prof.dr. H. Soebowo, Sp.PA
NIP. 130 352 549

UPT-PUSTAK-UNDIP
No. Daft: 2416/T/MIB/04
Tgl. : 8 Maret 2004

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Semarang, Juni 2003

Hermina Sukmaningtyas

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap dan gelar	: dr. Hermina Sukmaningtyas
Tempat/ tanggal lahir	: Purworejo, 20 Juni 1967
Jenis Kelamin	: Perempuan
Status	: Menikah
Pekerjaan	: Staf Pengajar FK UNDIP
Gol/Pangkat/NIP	: III B/ Penata Muda Tk I/ 132 205 006
Jabatan Fungsional	: Asisten Ahli

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. SD Negeri Srondol Wetan I Semarang	1974-1980
2. SMP Negeri 21 Semarang	1980-1983
3. SMA Negeri I Semarang	1983-1986
4. FK UNDIP, dokter	1986-1993
5. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP	1999-2003

RIWAYAT PEKERJAAN

1. Dokter PTT di Puskesmas Pembantu Jangli Kodia Semarang 1993-1996
2. Staf Pengajar Fisika Medik FK UNDIP 1998 - sekarang

KATA PENGANTAR

Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh L-Arginin terhadap respon imunitas seluler mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium.* Alasan penelitian ini dilakukan adalah L-arginin merupakan asam amino yang telah diketahui mempunyai efek imunomodulator pada keadaan depresi imun akibat trauma maupun penyakit-penyakit kritis. Diharapkan efek imunomodulator ini dapat dimanfaatkan untuk mengatasi respon imun yang tertekan akibat infeksi bakteri intraseluler *Salmonella typhimurium.*

Pada kesempatan ini pertamakali penulis panjatkan rasa syukur ke hadirat Allah Swt atas berkah, rahmat dan karunianya sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Dalam kesempatan ini pula penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Prof.dr. Soebowo, SpPA sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP beserta seluruh staf yang telah membimbing saya selama menimba ilmu di Program Studi Ilmu Biomedik, dr. Edi Dharmana, MSc.PhD dan Prof.Dr.dr. Susilo Wibowo, MS Med, SpAnd selaku pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu dan senantiasa memberi pengarahan serta membuka cakrawala baru untuk maju, Prof.Dr.dr. RRJ Sri Djokomoeljanto, SpPD KE dan dr. Winarto, DMM,SpM, SpMK sebagai narasumber yang telah memberikan masukan-masukan yang sangat berharga. Terima kasih yang setinggi-tingginya penulis sampaikan pula kepada tim penguji. Rasa terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada dr. Neni S, MSi sebagai konsultan penelitian dibidang imunologi yang dengan

penuh rasa ikhlas dan kesabaran selalu membimbing pelaksanaan penelitian laboratoris. Terima kasih pula kepada Dekan FK UNDIP, dr. Mardi Yanto, SpS selaku Ketua Bagian Fisika Medik dan staf yang telah membantu dan memberi pengarahan dan kesempatan untuk melanjutkan Program Magister Ilmu Biomedik, Pimpinan dan staf Laboratorium Bioteknologi Kedokteran FK UNDIP dan Kepala Balai Laboratorium Kesehatan Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk memanfaatkan fasilitas laboratorium dalam pelaksanaan penelitian tesis. Terima kasih pula saya sampaikan kepada dr.Hardian yang telah banyak memberi masukan dalam bidang statistik. Kepada seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Biomedik, rekan-rekan seperjuangan dan semua pihak yang telah memberi dukungan dan bantuan selama pendidikan dan penelitian hingga selesainya penulisan ini saya sampaikan terima kasih.

Akhir kata dengan segala kerendahan hati dan rasa hormat, saya ucapkan terima kasih kepada Ayah dan Ibu, serta Ibu Mertua Tercinta atas doa restunya. Kepada suami dan anak-anak tercinta saya ucapkan terima kasih atas pengertian, dorongan dan kerelaannya selama saya menempuh pendidikan. Semoga Allah Swt memberikan balasan dan karunia yang tak terbatas. Amin.

Semoga tesis ini bermanfaat dan dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya.

Semarang, Juni 2003

Penulis.

DAFTAR ISI

Halaman Judul		i
Halaman Pengesahan		ii
Halaman Pernyataan		iii
Daftar Riwayat Hidup		v
Kata Pengantar		v
Daftar Isi		viii
Daftar Tabel		ix
Daftar Gambar		x
Daftar Lampiran		xi
Abstrak		xii
Abstract		xiii
BAB 1	PENDAHULUAN	1
	Latar Belakang	1
	Perumusan Masalah	6
	Tujuan Penelitian	7
	Manfaat Penelitian	9
		10
BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA	10
	Asam Amino	10
	L-arginin	12
	Respon Imunitas Tubuh	17
	Salmonella typhimurium	26
	Landasan Teori	37
	Kerangka Teori	39
	Kerangka Konsep	40
	Keterbatasan Penelitian	40
	Hipotesis	40
BAB 3	METODOLOGI PENELITIAN	43
	Rancangan Penelitian	43
	Populasi dan Sampel	45
	Variabel Penelitian	48
	Bahan/Materi	50
	Alat/Instrumentasi Penelitian	51
	Tempat dan Waktu Penelitian	51
	Prosedur Pengumpulan Data	52
	Alur Kerja	55
	Pemeriksaan	56
	Pemeriksaan Respon Proliferasi Limfosit	56
	Prosedur Pemeriksaan Fagositosis Makrofag Dengan *Latex Beads*	58
	Prosedur Pemeriksaan Produksi NO	59
	Prosedur Pemeriksaan ROI dengan Cara Reduksi NBT	61

Pemeriksaan Kultur Kuman Organ Hepar..... 62
Pemeriksaan Survival..... 62
Analisis Data..... 63

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN..... 65
Hasil..... 65
Pembahasan..... 82

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN..... 88
BAB 6 RINGKASAN..... 90
DAFTAR PUSTAKA..... 95
LAMPIRAN..... 101

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Proporsi Jenis-jenis Sel Limfoid Pada Jaringan Manusia Normal.. 24
Tabel 2. Taksonomi *Salmonella* dengan serogrup dan serovar 27
Tabel 3. Hasil Analisis Berat Limpa.....65
Tabel 4. Hasil Analisis Jumlah Limfosit.....67
Tabel 5. Hasil Uji Mann Whitney Jumlah Limfosit.....68
Tabel 6. Hasil Analisis Jumlah Relatif Limfoblas.....69
Tabel 7. Hasil Uji Mann Whitney Jumlah Relatif Limfoblas.....71
Tabel 8. Hasil Analisis Kemampuan Fagositosis.....71
Tabel 9. Hasil Uji Mann Whitney Kemampuan Fagositosis..... 73
Tabel 10. Hasil Analisis Produksi NO.....73
Tabel 11. Hasil Uji Mann Whitney Produksi NO... 75
Tabel 12. Hasil Analisis Produksi ROI.....76
Tabel 13. Hasil Uji Mann Whitney Produksi ROI.....77
Tabel 14. Analisis Hitung Kuman dari Kultur Organ Hepar.....78
Tabel 15. Hasil Uji Mann Whitney Hitung Kuman dari Kultur Organ Hepar.....79
Tabel 16. Survival (%) pada hari ke 21.....80
Tabel 17. Hasil Uji Logrank Survival.....82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Jalur Sintesis Asam Amino Nonesensial.....11
Gambar 2. Fungsi Metabolik Arginin 13
Gambar 3. Langkah Aktifasi Sel T dengan Kostimulator Pada APC 20
Gambar 4. Fungsi Sel Th1.....23
Gambar 5. Perubahan Biokimiawi dan Morfologi Pada Aktifasi Limfosit.....26
Gambar 6. Pembentukan ROI.....31
Gambar 7. Pembentukan NO Dalam Pembunuhan Bakteri 32
Gambar 8. Beberapa Kemungkinan Reaksi Interaksi Antara ROI dan RNI 33
Gambar 9. Grafik Boxplot Berat Limpa.....66
Gambar 10. Grafik Boxplot Jumlah Limfosit.....67
Gambar 11. Grafik Boxplot Jumlah Relatif Limfoblas.....70
Gambar 12. Grafik Boxplot Kemampuan Fagositosis.....72
Gambar 13. Grafik Boxplot Produksi NO.....74
Gambar 14. Grafik Boxplot Produksi ROI.....76
Gambar 15. Grafik Boxplot Hitung Kuman Organ Hepar.....78
Gambar 16. Kurva Survival.....80
Gambar 17. Kurva Survival Kaplan Meier.....81

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Respon Proliferasi Limfosit di Limpa (Limfosit dan Limfoblas)...101
Lampiran 2. Foto Fagositosis Makrofag.....102
Lampiran 3. Foto Produksi ROI Makrofag.....105
Lampiran 4. Foto Kultur Kuman Organ Hepar di Media Mc Conkey.....107
Lampiran 5. Data Penelitian.....108
Lampiran 6. Hasil Analisis Statistik.....111

PENGARUH PEMBERIAN L-ARGININ TERHADAP RESPON IMUNITAS SELULER MENCIT BALB/c YANG DIINOKULASI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

ABSTRAK

Latar belakang: Infeksi *Salmonella typhi* dapat menekan respon imunitas seluler. Oleh karena itu dalam strategi terapi pada demam tifoid, perlu dipikirkan terapi pendamping dengan imunostimulan. L-arginin, asam amino yang dikenal sebagai prekursor NO dapat meningkatkan respon imun, melalui Growth Hormone maupun poliamin.

Tujuan: Untuk mengetahui pengaruh pemberian L-arginin terhadap respon imunitas seluler mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*.

Metoda: Eksperimental sesungguhnya dengan rancangan *the post test only control group design* pada mencit BALB/c jantan, sehat, umur 8-10 minggu, berat badan 30-40 gram, diberi makan dan minum *adlibitum*. Sebanyak 102 ekor mencit setelah diadaptasi 1 minggu dibagi secara acak menjadi 42 ekor untuk pemeriksaan respon imunitas seluler dan 60 ekor untuk pengamatan survival. Empat puluh dua ekor dibagi acak menjadi 7 kelompok perlakuan: A) Kontrol tanpa perlakuan K (-); B) Diinfeksi *Salmonella typhimurium* (Kontrol+); C) Diberi L-arginin HCl 7 hari tanpa infeksi; D) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi kontinyu sebelum infeksi (P2); E) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi selang-seling (P3); F) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi kontinyu dan pasca infeksi kontinyu 3 hari (P4); G) Diberi L-arginin selama 7 hari, sehari pasca infeksi (P5). L-arginin diberikan dalam air minum dengan kadar 1,2% (w/v). Sedang Salmonella typhimurium yang disuntikkan sebanyak 10^6 intraperitoneal. Kelompok K(+), P2, P3 dan P4 diinfeksi pada hari ke 8 dan hari ke 11 dibunuh, sedangkan kelompok P5 diinfeksi hari ke 2 dan dibunuh hari ke 8.Kelompok K(-) dan P1 dibunuh pada hari ke 8. Setelah dibunuh dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit (dilihat dari berat limpa, jumlah limfosit di limpa dan jumlah relatif limboblas di limpa), kemampuan fagositosis dengan partikel lateks, produksi ROI dengan metode NBT, NO makrofag dengan metode Griess. Hepar diambil dan dilakukan kultur untuk menghitung jumlah kuman yang hidup. Sedangkan survival diamati pada kelompok perlakuan K(+), P2, P3, P4 dan P5 selama 21 hari dengan metode Kaplan Meier. Dosis *Salmonella typhimurium* yang digunakan untuk pengamatan survival adalah 10^7 intraperitoneal. Respon imunitas seluler diuji dengan ANOVA dan Kruskal Wallis. Survival ditentukan dengan metoda Kaplan Meier dan diuji dengan Logrank

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan jumlah limfosit (p=0,037; p=0,037; p=0,010), jumlah relatif limfoblas (p= 0,006; p= 0,053; p= 0,004) secara bermakna, tetapi tidak meningkatkan berat limpa (p=0,277). Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi meningkatkan fagositosis (p=0,010, p=0,004), produksi NO (p=0,037, p=0,010), ROI (p=0,016, p=0,030), menurunkan hitung kuman (p=0,004, p=0,006) dan meningkatkan survival (p= 0,011; p=0,012) secara bermakna.

Kesimpulan: Pemberian L-arginin dapat meningkatkan respon imunitas seluler yang sejalan dengan penurunan hitung kuman dan peningkatan survival. L-arginin dapat digunakan sebagai imunostimulan pada infeksi salmonella

Kata kunci: L-arginin, respon proliferasi limfosit, fagositosis, NO, ROI, hitung kuman, survival, Salmonella typhimurium.

THE EFFECTS OF L-ARGININE SUPPLEMENTATION ON CELLULAR IMMUNITY AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN BALB/c MICE

ABSTRACT

Background: *Salmonella typhi* infection can suppress cellular mediated immunity. Approriate therapeutic strategy is needed to improve this condition, by means of combining antibiotic and immunostimulatory agent. L-Arginine, an amino acid as NO precursor, can act as immunomodulator, through GH and polyamine.

Objective: This research was aimed to examine effects of L-Arginine on cellular mediated immunity of BALB/c mice were inoculated with *Salmonella typhimurium*.

Method: An animal experimental study was carried out, using *the post test only control group design* in BALB/c mice. A total of 102 healthy male mice, 8-10 weeks, 30-40 g then divided randomly, 42 mice divided into 7 group. The first group K(-) was without treatment; second group K(+) was inoculated with Salmonella typhimurium; the third P1 was given L-arginine HCl 1,2% 7 days in drinking water, and without infection; the fourth P2 was given L-arginine HCl 1,2% 7 days in drinking water as continuous preatreatment then on day 8^{th} was inoculated with *Salmonella typhimurium;* the fifth P3 as intermitten type pretreatment was given L-arginine HCl 1,2% 7 days intermitten in drinking water then was inoculated with *Salmonella typhimurium;* the sixth P4 as pre/posttreatment was given L-arginine HCl 1,2% 7 days before infection and continued until sacrified. Mice were sacrified on day 3^{rd} of infection. The seventh P5 as postreatment was given L-arginine HCl 1,2% 7 days after infection, then were sacrified. The dosage of *Salmonella typhimurium* was 10^6. After being sacrified, then was examined lymphocyte proliferation response, phagocytosis by using latex beads, NO production in plasma and supernatant of cultured peritoneal macrophage by the Griess method, and ROI production was measured in phorbol myristate acetate-stimulated macrophage (NBT method), and bacterial growth. Survival examination used 60 mice divided 5 group K(+), P2, P3, P4, P5 for 21 days. It was used 10^7 Salmonella typhimurium. Cellular immunity were analyzed by using ANOVA and Kruskal Wallis test. Survival rate was determined by using Kaplan Meier method and analyzed by using Logrank test

Result: The results showed that L-arginine as continuous pretreatment, intermitten type pretreatment dan pre/posttreatment significantly increased the count of lymphocyte (p=0,037; p=0,037; p=0,010). L-arginine as continuous pretreatment, intermitten type pretreatment ,dan pre/posttreatment significantly increased relative count of limphoblast (p= 0,006; p=0,053; p=0,004), but not spleen weight p=0,277. L-arginine as continuous pretreatment and continuous pre/posttreatment significantly increased phagocytosis (p=0,010; p=0,004), NO production (p=0,037; p=0,010), ROI production (p= 0,016; p=0,030), significantly decreased bacterial count (p=0,004; p=0,006) and significantly increased survival rate (p=0,011; p=0,012).

Conclusion: L-arginine supplementation can increase cellular immune response that was consistent with decreasing of bacterial count and increasing of survival rate. It suggests that L-arginine might be useful as immunostimulant against *salmonella* infection.

Key words: L-arginine, lymphocyte proliferation response, phagocytosis, NO, ROI, bacterial count, survival, *Salmonella typhimurium*

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Penyakit demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius di daerah tropis terutama di negara-negara berkembang. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi bakteri *Salmonella typhi*. Hasil survei rumah sakit di Indonesia menunjukkan bahwa jumlah penderita yang dirawat dengan diagnosis demam tifoid merupakan urutan kedua setelah gastroenteritis pada daftar sepuluh penyakit menular terbanyak. Di RS dr. Kariadi, penderita penyakit demam tifoid yang dirawat menduduki tempat teratas (3.264), disusul gastroenteritis (2.559) dan hepatitis (690).[1] Tidak jarang penyakit ini juga berkembang menjadi hepatitis, meningitis, nefritis, miokarditis, bronkhitis, pnemonia, arthritis, osteomielitis, parotitis dan orkhitis, bahkan dapat terjadi perdarahan dan perforasi usus. Tetapi kejadian komplikasi ini dapat dikurangi dengan pemakaian antibiotika yang tepat, kecuali yang relaps dan resisten antibiotika, yang prevalensi meningkat di beberapa negara endemis. Sekitar 3-5% penderita biasanya menjadi karier asimtomatik dalam jangka waktu yang lama.[2]

Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara *host* dan mikroba.[3] *Salmonella typhi,* sebagai penyebab demam tifoid merupakan kuman berbentuk batang, gram negatif dan bersifat fakultatif intraseluler. Sistem imunitas tubuh yang berperan dalam membunuh bakteri ini adalah sistem imunitas

UPT-PUSTAK-UNDIP

seluler. Sel-sel yang terlibat dalam imunitas seluler adalah sel fagosit polimorfonuklear (granulosit), sel NK, makrofag dan limfosit T. Cara sel-sel imunokompeten membunuh bakteri ini dengan dua cara yaitu : (1) dengan fagositosis dan "*killing*" oleh makrofag dan (2) dengan cara lisis sel yang terinfeksi oleh sel T sitolitik atau sel NK.[3, 4, 5]

Selama infeksi, kuman *Salmonella* terutama dijumpai pada fagosit mononuklear dan hepatosit Dari penelitian-penelitian yang telah dilakukan, terbukti bahwa fagosit polimorfonuklear dan mononuklear memegang peranan penting dalam menghambat replikasi bakteri. Sitokin-sitokin seperti TNF-α, IFN-γ, IL-12 dan IL-18 sangat berperan dalam menghambat berkembangnya bakteri selama infeksi Salmonella dan memacu aktifasi makrofag yang nantinya berfungsi sebagai efektor terhadap Salmonella. Tetapi bagaimana mekanisme efektor oleh fagosit mononuklear membunuh patogen intraseluler belum sepenuhnya diketahui.[6,7] Diduga kuat bahwa gugus radikal yang dibentuk oleh NADPH oksidase dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dari makrofag yang teraktifasi berperan sebagai efektor terhadap bakteri Salmonella. NADPH oksidase dibutuhkan dalam *killing* beberapa jam pertama setelah fagositosis, sedangkan iNOS berperan dalam fase awal dan fase berikutnya pada aktifitas antibakterial. Selain itu INF-γ berperan secara simultan dalam meningkatkan aktifitas antibakteri dengan meningkatkan produksi *Nitric Oxide* (NO). [6,7]

NADPH oksidase akan mengkatalisis molekul oksigen menjadi O_2^- (superoksida) yang dapat dimetabolisir menjadi *Reactive Oxigen Intermediates* (ROI) seperti H_2O_2 yang sangat toksik. Dikatakan bahwa molekul ini berperan sangat penting dalam *bacterial killing* oleh makrofag terhadap *Salmonella* karena bersifat bakterisid.[6,7] Dilain pihak iNOS akan mengkatalisis L-arginin menjadi sitrulin dan membentuk NO yang selanjutnya dapat dimetabolisir menjadi *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI). Derivat NO berperan sebagai antimikroba yang bersifat bakteriostatik dan berperan dalam mengontrol proliferasi mikroba. NOS dalam membentuk NO membutuhkan NADPH, O_2 dan L-arginin. Molekul lain hasil autooksidasi NO seperti NO_2^-, N_2O_3, dan S-nitrosotiol dapat meningkatkan toksisitas terhadap *Salmonella*.[6,7] NO merupakan antimikroba yang penting terhadap *Salmonella*. Hal ini dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan Mac Farlane dkk dengan menghambat pembentukan NO menggunakan aminoguanidin, suatu inhibitor iNOS, ternyata akan meningkatkan koloni kuman dan menurunkan survival mencit.[8]

NADPH oksidase dan iNOS, keduanya dapat bersinergi membentuk molekul antimikroba yang potensial. NO dan O_2^- dapat bereaksi membentuk $ONOO^-$ (peroksinitrit), suatu oksidan yang dapat meningkatkan daya bunuh terhadap *Salmonella*.[6,7] NO juga mempunyai fungsi lain dalam imunitas alamiah dan adaptif yaitu memodulasi respon sitokin limfosit dan mengatur apoptosis sel imun yang terinfeksi.[9]

Kemampuan bakteri untuk berkembang dalam makrofag ditentukan oleh resistensi kuman terhadap daya bunuh makrofag dan sel T yang teraktifasi, yang

dikontrol secara genetik.[2] Kemampuan bakteri *Salmonella* beradaptasi dalam sel mononuklear *host,* dijelaskan oleh Eriksson dkk yang menyatakan bahwa Salmonella mempunyai kemampuan mutasi dengan berbagai jalan, diantaranya dengan menghambat aktifitas iNOS.[10]

Infeksi *Salmonella* akan merangsang dengan kuat respon imunitas seluler yang merupakan poros dalam mengontrol infeksi. Setelah infeksi, sebagian besar T $CD4^+$ dan T $CD8^+$ akan teraktifasi. Akan tetapi ternyata dalam penelitian yang dilakukan oleh Mittrucker dkk didapatkan bahwa proliferasi sel T $CD4^+$ dan T $CD8^+$ in vivo serta ekspansinya hanya meningkat sedikit. Demikian juga meskipun banyak populasi sel T $CD4^+$ dan T $CD8^+$ yang teraktifasi dan berpotensi dalam mensekresi IFN-γ, tetapi tampaknya aktifasi ini tidak sebanding dengan ekspansi substansi populasi dari sel T $CD4^+$ dan T $CD8^+$ tersebut.[11] Bahkan dalam penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Matsui dkk dilaporkan bahwa mencit yang diinfeksi oleh *Salmonella* dapat menekan proliferasi sel T yang diduga berkorelasi dengan meningkatnya ekspresi rantai alfa reseptor IL-2.[12]

L-arginin merupakan asam amino semiesensial yang telah lama diketahui memiliki peranan penting dalam berbagai proses fisiologi, biologi dan imunologi. Berbagai proses yang melibatkan L-arginin adalah sintesa protein, aktifasi nukleotida, sekresi hormon, sintesa poliamin, sintesa urea, pembentukan ATP, dan NO. Selain itu L-arginin juga diperlukan dalam sintesa kolagen dalam penyembuhan luka.[13,14,15] L-arginin berperan penting dalam imunitas seluler. L-arginin merupakan

imunomodulator karena memiliki kemampuan mengatur fungsi makrofag sebagai anti tumor, anti bakteri dan berperan dalam imunitas spesifik. Fungsi ini terkait erat dengan produksi NO sebagai molekul yang mempunyai fungsi penting sebagai pengatur dan mediator berbagai proses fisiologi dan patofisiologi.[14] NO yang merupakan produk metabolisme L-arginin dapat menginduksi vasodilatasi dan adhesi sel endotel dengan lekosit.[15] Disamping berperan dalam pembentukan NO, L-arginin juga mempunyai potensi dalam membangkitkan produksi ROI melalui induksi *Growth Hormon* (GH), dimana hal ini telah dibuktikan bahwa pemberian GH akan meningkatkan ROI pada makrofag yang teraktifasi setelah diinfeksi *Salmonella typhimurium*. L-arginin yang diberikan secara parentral maupun oral dapat menginduksi sekresi GH, dimana GH juga mempunyai potensi dalam imunitas baik berpengaruh secara langsung ataupun melalui *Insulin- like Growth Factor-1* (IGF-1).[13,15,16]

L-arginin juga berperan dalam mengaktifasi limfosit. Hal ini dibuktikan dalam penelitian bahwa suplementasi dengan asam amino L- arginin dapat meningkatkan imunitas seluler dan respon proliferasi limfosit T terhadap stimulasi mitogenik invitro baik limfosit dari timus atau yang diukur dari limfosit darah tepi.[13,14,15,17] Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan diyakini bahwa L-arginin mempunyai manfaat yang besar sebagai imunostimulator dalam keadaan depresi imun akibat trauma atau penyakit-penyakit kritis. [15,18,19] L-arginin juga meningkatkan sitotoksisitas sel NK dan sel T sitotoksik. [15]

Dalam kondisi normal, kebutuhan arginin pada orang dewasa dapat dipenuhi secara endogen, tetapi dalam keadaan stress dan sakit khususnya penyakit-penyakit kritis, dan sepsis maka kebutuhan arginin harus dipenuhi dari luar. [15,20]

Walaupun telah banyak dilakukan penelitian tentang peran L-arginin dalam meningkatkan respon imunitas seluler yang tertekan akibat trauma dan penyakit-penyakit kritis, tetapi sampai sejauh ini belum banyak digali pengaruh pemberian L-arginin sebagai imunostimulator pada infeksi bakteri intraseluler seperti *Salmonella typhimurium*, bila diberikan dengan jadwal pemberian yang berbeda-beda secara *invivo*.

Dengan melihat tinjauan diatas, maka penelitian ini dimaksudkan untuk membuktikan pengaruh pemberian L-arginin dalam meningkatkan respon imunitas seluler yang dinilai dari respon proliferasi limfosit lien, daya bunuh makrofag teraktifasi yang dinilai dari kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO serta tingkat proliferasi bakteri dan kelangsungan hidup (survival) mencit bila diinfeksi kuman *Salmonella typhimurium.* Selain itu juga untuk mengetahui adanya perbedaan respon imunitas seluler pada pemberian L-arginin dengan jadwal pemberian yang berbeda (bila diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi) bila diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan L-arginin. Dalam penelitian ini tidak digunakan *Salmonella typhi* untuk menginduksi demam tifoid pada manusia karena alasan etik. *Salmonella typhimurium* merupakan agen yang menyebabkan salmonellosis pada mencit yang analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhimurium* pada manusia.[21]

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Apakah L-arginin invivo yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi berpengaruh terhadap peningkatan respon imunitas seluler pada infeksi *Salmonella typhimurium* berupa peningkatan respon proliferasi limfosit, peningkatan kemampuan fagositosis makrofag, peningkatan produksi NO dan ROI makrofag teraktifasi, penurunan hitung kuman kultur hepar serta peningkatan persentase kumulatif survival?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dapat meningkatkan respon imunitas seluler mencit yang diinokulasi bakteri *Salmonella typhimurium*.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam meningkatkan respon proliferasi limfosit lien (dilihat dari berat limpa, jumlah limfosit, dan jumlah relatif limfoblas) pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin.

2. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin.
3. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam meningkatkan produksi NO dari makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin
4. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam meningkatkan produksi ROI dari makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin.
5. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam menurunkan proliferasi bakteri dari hasil hitung kuman dari kultur organ hepar pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin.
6. Menganalisis adanya pengaruh L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi, pasca infeksi dalam meningkatkan kelangsungan hidup (survival) mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak diberi L-arginin.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi akan peranan L-arginin sebagai nutrisi untuk meningkatkan imunitas seluler yang dapat digunakan sebagai terapi nutrisi pada penyakit infeksi oleh kuman patogen instraseluler, dan mempercepat penyembuhan. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat memberikan landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

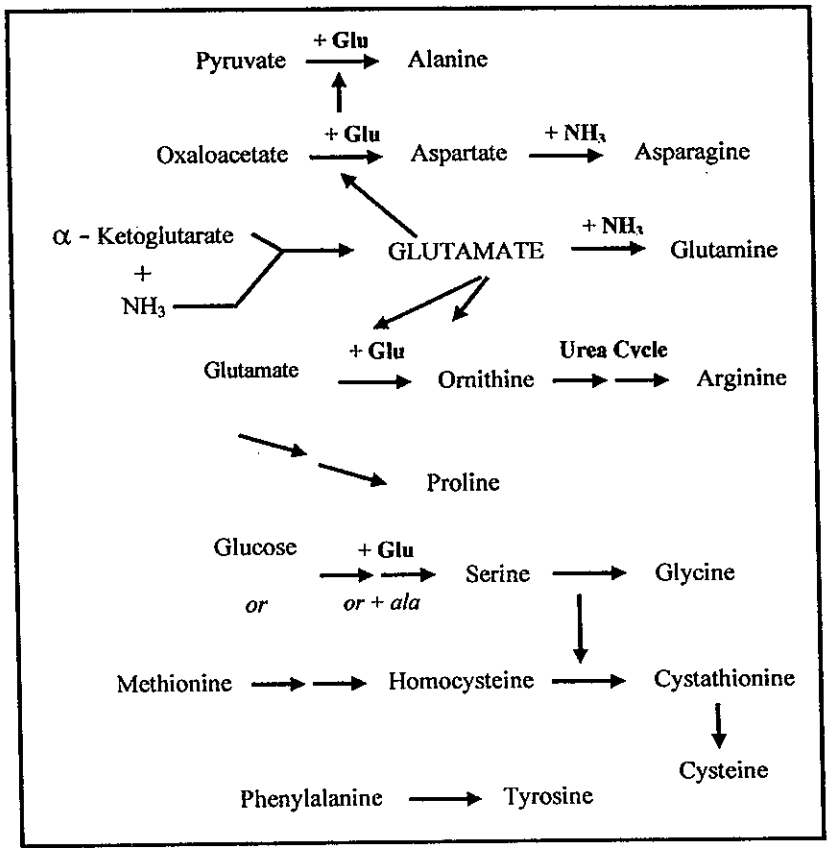
2.1. ASAM AMINO

Asam amino merupakan unit monomer untuk membangun rantai polipeptida protein. Sebagian besar protein mengandung 20 asam amino L-α yang sama dalam proporsi yang bervariasi. Asam amino L-α merupakan asam amino dengan konfigurasi absolut L-gliseraldehid, dimana gugus amino dan karbohidrat melekat pada atom karbon yang sama dan mempunyai aktifitas optis (kesanggupaan memutar bidang cahaya yang terpolarisasi) kekiri/*levorotaric*. Diet manusia harus mengandung sepuluh asam amino L-α karena manusia tidak dapat mensintesis asam amino tersebut. Dalam bentuk protein, asam amino akan mendasari berbagai fungsi antara lain: struktural, hormonal dan katalitik yang esensial bagi kehidupan. Asam amino dan derivatnya turut serta dalam berbagai macam fungsi intraseluler seperti transmisi syaraf (neurotansmiter), pengaturan pertumbuhan sel dan biosintesis porfirin, purin, pirimidin, serta ureum. Dalam peptida yang berbobot molekul rendah juga berfungsi sebagai prekursor hormon.[22]

Berdasarkan kepentingan nutrisi, asam amino dapat dibedakan menjadi asam amino esensial dan non esensial. Asam amino esensial artinya asam amino yang tidak dapat disintesis tubuh oleh karena itu harus dipenuhi dari diet. Sedangkan asam amino non esensial dibedakan menjadi dua berdasarkan sintesisnya dalam tubuh, yaitu : (1). Asam amino yang disintesis dari pemindahan nitrogen ke kerangka karbon yang berasal dari siklus TCA (*Tricarboxylic Acid*) atau dari glikolisis glukosa dan (2) asam amino yang disintesis dari asam amino

yang lain. Kelompok kedua sangat tergantung pada ketersediaan asam amino spesifik. Dengan demikian sangat mungkin menjadi esensial jika diet sebagai sumber asam amino berkurang atau terbatas, misalnya dalam keadaan infeksi, trauma, luka bakar atau dalam keadaan katabolik lainnya.

Arginin termasuk asam amino nonesensial kelompok dua atau kadang disebut sebagai asam amino semiesensial dengan rumus kimia $C_6H_{14}O_2N_4$. Jalur sintesis asam amino non esensial tersaji dalam gambar 1 dibawah ini.[15,22]



Gambar 1. Jalur Sintesis Asam Amino Nonesensial

(Diambil dari Maurice E. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Maryland Baltimore Lippicott & Wilkins, 1999 : 19)

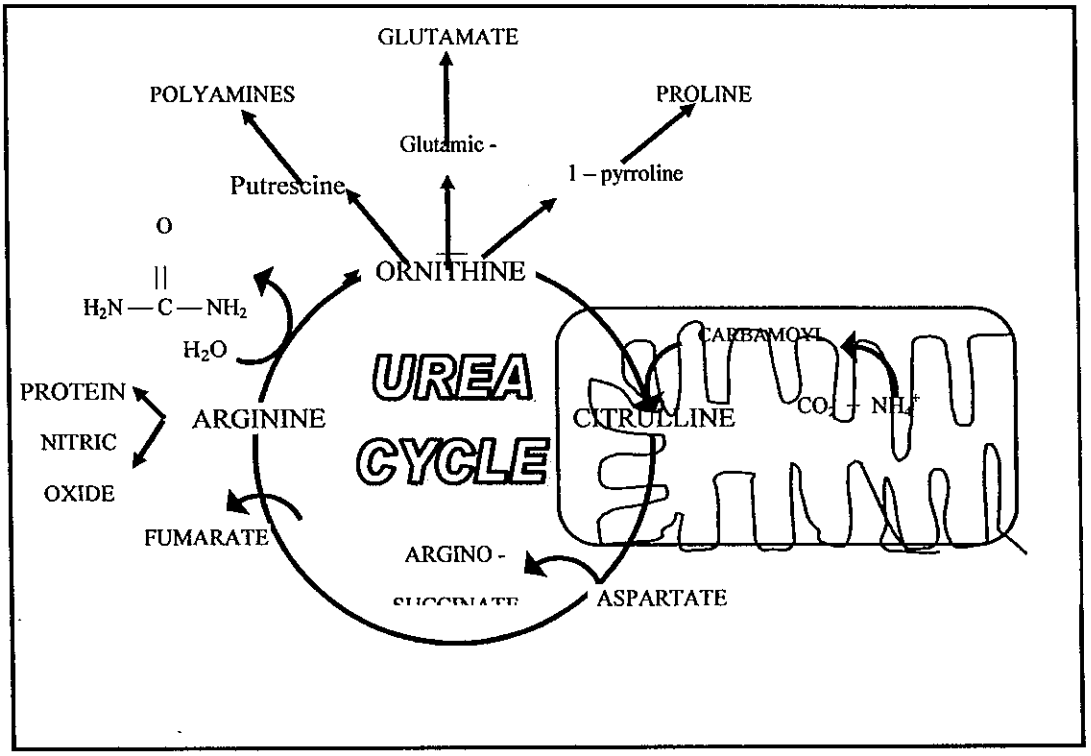
2.2. L-ARGININ

2.2.1. Metabolisme dan Peranan L-Arginin

Tahap akhir hidrolisis protein menjadi dipeptida dan asam amino, serta absorbsinya berlangsung di jejenum dan ileum. Selanjutnya dipeptida dan tripeptida akan ditransport ke dalam sel dengan proses transport aktif seperti transport glukosa.[23] Didalam tubuh arginin mempunyai peran penting dalam metabolisme nitrogen, sebagai perantara dalam siklus urea, dan diperlukan dalam detoksifikasi ammonia. Di dalam sitoplasma arginin dihidrolisis oleh arginase menjadi urea dan ornitin. Ornitin ditransport ke dalam mitokondria dan bersama karbomoil fosfat akan membentuk sitrulin.[15]

Disamping berfungsi dalam sintesis protein dan perantara siklus urea, arginin merupakan substrat pembentukan NO dan sintesis fosfokreatin, juga sebagai prekusor glutamat, prolin dan putresin melalui pembentukan ornitin. Ornitin digunakan dalam pembentukan poliamin yang diperlukan dalam proliferasi sel. Arginin dapat pula bertindak sebagai produk perantara berbagai proses metabolik. Untuk jelasnya dapat dilihat pada gambar 2.[15]

Peranan terpenting dari L-arginin adalah sebagai substrat pembentukan NO. Molekul ini merupakan mediator yang berperan besar pada proses-proses biologi, fisiologi dan imunologi. Karena efek vasodilatasi dan antioksidan yang dimilikinya, menyebabkan NO dianggap sebagai molekul penting dalam mengatasi hipertensi, disfungsi miokardial dan proteksi terhadap kerusakan oleh oksidan radikal bebas.[15]



Gambar 2. Fungsi Metabolik Arginin

(Diambil dari Maurice E. *Modern Nutrition In Health and Disease*.9th ed. Maryland Baltimore, Lippicott Williams & Wilkins, 1999 : 565).

Arginin juga mempunyai efek memperbaiki mukosa usus setelah trauma atau reseksi usus. Pada tikus, arginin meningkatkan perbaikan mukosa pada iskemi usus dan menurunkan kerusakan mukosa selama ulserasi yang dilindungi oleh endotelin. Brzozowski dkk mengemukakan bahwa injeksi arginin intragastik juga dapat mempercepat penyembuhan tukak lambung.[24] Suplementasi arginin dalam diet juga dapat meningkatkan penyembuhan luka. Arginin meningkatkan sintesis kolagen, dengan berperan sebagai substrat untuk sintesis prolin.[18] Penyembuhan ini terjadi lebih cepat kemungkinan juga distimulasi oleh

peningkatan sekresi *Growth Hormon* (GH). Pemberian arginin akan mempengaruhi sistem pituitary dan adrenal. Arginin akan memacu pelepasan katekolamin, insulin glukagon, *growth hormon* dan prolaktin. Pada pasien tua, pemberian arginin dapat meningkatkan *insulin-like growth factor-1* ((IGF-1)[15] Regulasi sekresi GH diduga berkait dengan molekul NO yang berfungsi sebagai *neurotransmitter* dalam sistem neuroendokrin.[25]

Dalam keadaan katabolik, kebutuhan L-arginin dapat menjadi esensial. Hal ini dapat terjadi pada kondisi dimana laju degradasi arginin meningkat, *intake* yang kurang, gangguan absorpsi diusus, serta sintesis sitrulin diusus yang menurun. Dalam kondisi normal, kebutuhan arginin pada orang dewasa dapat dipenuhi secara endogen, tetapi dalam keadaan stress dan sakit khususnya penyakit-penyakit kritis, dan sepsis maka kebutuhan arginin harus dipenuhi dari luar. [15,20]

2.2.2. Pengaruh Arginin Terhadap Imunitas

L-arginin merupakan salah satu komponen penting dalam regulasi fungsi makrofag sebagai antibakteri dan antitumor. L-arginin merupakan sumber NO yang mempunyai aktifitas antimikroba, karena bersifat toksik terhadap bakteri. NO adalah molekul regulator dan mediator terpenting dalam berbagai proses fisiologi dan patofisiologi. Peran NO dalam patogenesis berbagai keadaan patologis telah banyak dilakukan, misalnya pada infeksi oleh *Salmonella, Candida albican* dan *Chlamydia.* Aktifitas tumorisidial dari makrofag yang teraktifasi, juga membutuhkan L-arginin. NO yang dihasilkan oleh makrofag dan

sel fagosit lain yang teraktifasi akan berperan sebagai mediator yang toksik dan bertugas mengeliminasi bakteri pada fase efektor. [18,26,27,28]

Pada sel mononuklear yang terinfeksi oleh *Salmonella typhimurium*, NO juga memperantarai efek antiapoptosis yang bersifat sitoprotektif.[29] Selain itu NO yang dihasilkan dari L-arginin juga berperan dalam aktifitas tumorisidal pada makrofag yang diaktifasi Lipopolisakarida (LPS) dan IFN-γ.[14] NO yang merupakan produk metabolisme L-arginin juga dapat menginduksi vasodilatasi dan dapat mempengaruhi adhesi sel endotel dengan lekosit. [15]

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Fu dkk, pemberian L-arginin 1% dalam diet pada tikus jantan Sprague-Dawley selama 4 minggu, akan memperbesar efek siklosporin terhadap pertumbuhan gingiva. Disini diduga NO mempunyai peran penting.[30] Pemberian L-arginin invitro dalam jumlah yang tepat ternyata akan meningkatkan aktifasi fungsi makrofag lain yaitu kemampuan fagositosis. L-arginin invitro juga memperbesar kemampuan fagositosis polimorfonuklear (PMN) netrofil.[15] Pada keadaan sepsis oleh bakteri gram negatif, suplementasi arginin terbukti mampu meningkatkan histon dan protein fase akut yang dibutuhkan sebagai respon *host* terhadap sepsis dan stress.[31] Depresi imun akibat trauma dan pendarahan tampaknya dapat diperbaiki dengan pemberian arginin, sebagaimana dilakukan oleh Angele, dkk. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa L-arginin meningkatkan fungsi sel pada lokal luka dengan menurunkan respon inflamasi di sekitar luka.[32] Suatu meta analisis yang dipublikasi pada majalah JAMA menyebutkan bahwa penelitian dengan suplementasi formula yang mengandung arginin kadar tinggi berkorelasi dengan

penurunan komplikasi infeksi dan kematian dibandingkan formula lain, bila diberikan pada penyakit-penyakit berat.[19]

Pemberian L-arginin secara intravena maupun oral dapat menginduksi GH. Dalam berbagai penelitian dijelaskan bahwa GH dapat memperantarai pembentukan ROI oleh makrofag yang teraktifasi dan netrofil yang berfungsi sebagai bakterisid. Reseptor GH terdapat pada sistem imun, yaitu di permukaan lekosit. Selain itu GH juga dapat memacu granulosit untuk memproduksi peroksida (H_2O_2) dan superoksida yang juga merupakan agen bakterisid kelompok ROI.[16,33] Bahkan arginin juga disebutkan sebagai zat yang biasanya digunakan untuk mengevaluasi kecukupan GH.[34] Pengaruh GH yang dapat diinduksi oleh L-arginin, baik secara langsung atau melalui induksi oleh IGF-1 juga dapat menstimulasi proliferasi limfosit T yang teraktifasi.[35,36]

L-arginin dapat berperan sebagai metabolik perantara terbentuknya poliamin. Poliamin sendiri berperan dalam pertumbuhan atau proliferasi sel, termasuk limfosit.[15] Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Barbul dkk, bahwa penambahan L-arginin HCL 1% dalam diet pada tikus akan meningkatkan berat timus dan total limfosit T di timus.[17] Demikian juga pada orang sehat dan pasien dengan penyakit berat penambahan L-arginin 30 g/hari selama 2 minggu akan meningkatkan jumlah limfosit darah tepi terhadap respon mitogenik.[14]

2.3. RESPON IMUNITAS TUBUH

Imunitas adalah suatu mekanisme yang bersifat faali yang melengkapi binatang dan manusia dengan kemampuan untuk mengenal suatu zat asing terhadap dirinya. Selanjutnya tubuh akan mengadakan tindakan dalam bentuk netralisasi, melenyapkan atau memasukkan ke dalam proses metabolisme dengan akibat menguntungkan dirinya atau menimbukan kerusakan jaringan tubuh sendiri. Sel-sel yang bertanggung jawab terhadap bentuk imunitas disebut sistem imunitas. Secara bersama-sama sistem yang terkoordinasi ini yang bekerja untuk menghadapi masuknya benda asing disebut respon imun.[37] Imunitas tubuh dapat berupa imunitas alamiah dan adaptif. Imunitas alamiah (*innate immunity*) adalah imunitas yang selalu siap mengadakan reaksi yang bersifat umum, sedangkan imunitas adaptif (*adaptive immunity*) bersifat spesifik dan memerlukan waktu untuk mengadakan reaksi penuh.[24]

Respon imun tubuh dapat dibedakan menjadi 2 macam yaitu : (1) Respon seluler yang terdiri dari komponen seluler dan (2) Respon imun humoral yang terutama menghasilkan antibodi terhadap konfigurasi asing tersebut.[24,37]

Sedangkan proses untuk mencapai imunitas tubuh melalui 3 fase yaitu :(1) Langkah Pengenalan terhadap konfigurasi asing yang masuk kedalam tubuh, (2) Langkah Aktifasi, pada fase ini terjadi mobilisasi komponen imunitas, (3) Langkah Pelaksanaan Efektor, yaitu saat reaksi imunitas tubuh dilaksanakan. [3]

2.3.1 LANGKAH PENGENALAN (*RECOGNITION*)

Limfosit B dapat mengenali antigen tanpa bantuan sel lain, karena memiliki molekul antibodi pada permukaannya yang dapat mengikat protein, polisakarida, atau lipid. Sedangkan limfosit T akan menanggapi sel asing apabila disajikan oleh sel pelengkap (*accessories cells*). Sel-sel pelengkap tersebut antara lain : Sel Penyaji Antigen (*Antigen Presenting Cell* = APC) yaitu makrofag, sel dendritik dalam jaringan limfoid, sel limfosit B, sel Langerhans di kulit. Limfosit T hanya akan mengenal peptida yang berkaitan dengan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) pada permukaan sel penyaji. Respon imun diawali dengan peristiwa masuknya imunogen dan penyajian imunogen ke reseptor limfosit.[3]

Ada dua kelas yang berbeda untuk protein MHC, yang masing-masing akan dikenali oleh 2 subset limfosit T. MHC kelas I akan diekspresikan oleh seluruh sel-sel tubuh dan digunakan untuk menyajikan substansi-substansi ke sel T CD8+ yang bersifat sitotoksik. Semua sel tubuh dapat mempresentasikan ke sel T sitotoksik dan menyajikan sebagai target respon sitotoksik. MHC kelas II hanya diekspresikan oleh makrofag dan beberapa tipe sel lain dan mempresentasikan antigen ke sel T CD4+, yang berfungsi sebagai sel helper. Karena aktifasi sel helper dibutuhkan untuk keseluruhan respon imun, maka APC yang memiliki MHC kelas II merupakan poros dalam pengaturan respon ini.[3]

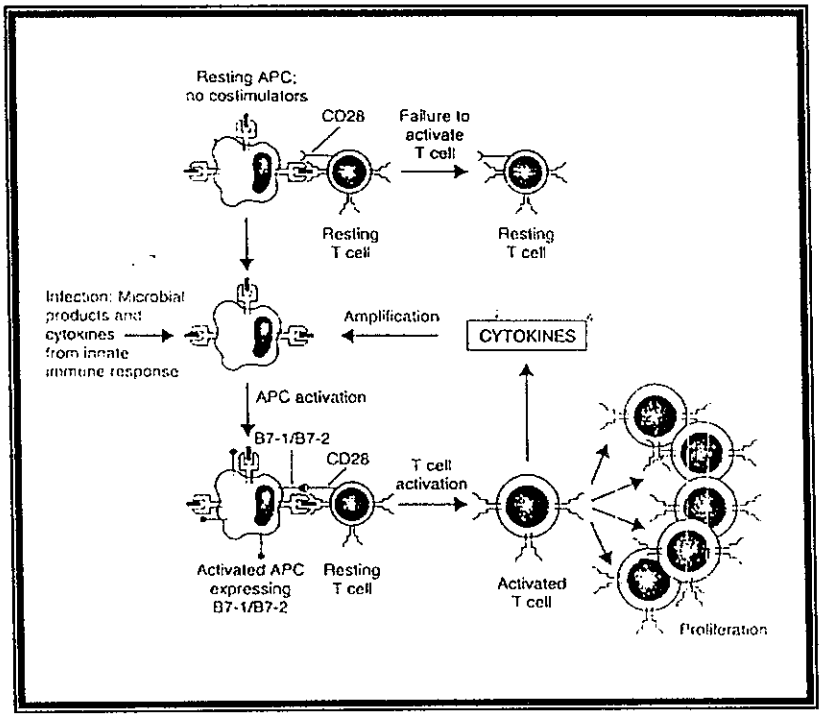
2.3.2 LANGKAH AKTIFASI

Pada fase ini terjadi respon biologi sel limfosit T sehingga akan teraktifasi sebagai konsekuensi dari pengenalan terhadap imunogen spesifik. Pertama limfosit T berproliferasi sehingga jumlahnya bertambah, kedua limfosit berdiferensiasi menjadi sel yang berfungsi mengeliminasi imunogen asing. Untuk memulai langkah aktifasi dibutuhkan signal pertama yaitu ikatan antara antigen dengan reseptor antigen dan signal kedua yaitu aktifasi sel T oleh molekul-molekul kostimulator. Salah satu yang terpenting dan merupakan jalur khusus untuk aktifasi sel T, akan melibatkan molekul permukaan CD28 yang kemudian berikatan dengan kostimulator B7-1 (CD80) dan B7-2 (CD86) yang diekspresikan oleh sel APC. CD28 mengirimkan signal yang meningkatkan respon sel T terhadap antigen (gambar 3). Setelah limfosit T teraktifasi kemudian berfungsi biologis yang memungkinkan mengadakan respon misalnya dengan mengeluarkan sitogen sehingga menghancurkan sel sasaran (*Target Cell*) yang memiliki antigen yang dituju.[3,38]

Interaksi makrofag yang menyajikan imunogen dengan limfosit T spesifik mengakibatkan makrofag mensekresikan IL-1 yang menstimulasi sel limfosit T helper (Th) menghasilkan sitokin IL-2, yang bersifat autokrin sehingga akan menstimulasi sel Th berproliferasi. Limfosit Th ini juga menghasilkan faktor pertumbuhan bagi limfosit lain (berfungsi sebagai parakrin) yaitu IL-2 dan IL-4. Sitokin ini dapat menginduksi sel-sel lain yaitu sel B, makrofag, prekursor sel T sitotoksik dan sel endotel. Beberapa sel T ini kemudian berkembang

menjadi sel T pengingat antigen spesifik (*Antigen-Specific Memory T Cell*). Dengan demikian aktifasi limfosit terdiri dari 5 langkah yaitu :[3]

1. Penyampaian sinyal / isyarat awal.
2. Aktifasi transkripsi gen
3. Timbulnya molekul permukaan sel yang baru.
4. Sekresi sitokin
5. Induksi aktifitas mitosis



Gambar 3. Langkah Aktifasi Sel T dengan Kostimulator Pada APC

(Diambil dari Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia. WB Saunders Co. 1997 : 156)[3]

2.3.4 LANGKAH PELAKSANAAN EFEKTOR

Fungsi biologis respon imun spesifik adalah mengeliminasi antigen. Setelah aktifasi sel T, maka dimulailah langkah pelaksanaan efektor yang merupakan interaksi antara sistem imun alamiah dan imunitas spesifik. Langkah pelaksanaan efektor ini meliputi :[3,38]

a. Produksi sitokin oleh Limfosit T dan beberapa sel-sel non limfoid yang merupakan "*soluble mediator*" pada imunitas alami dan imunitas spesifik.
b. Kehadiran sel-sel efektor imunitas seluler termasuk Limfosit T, makrofag dan sel NK, yang ikut serta dalam reaksi inflamasi karena fungsinya sebagai pertahanan pertama terhadap bakteri intraseluler. Makrofag sebagai sel efektor akan teraktifasi untuk melakukan pembunuhan (*killing*) dengan melakukan fagositosis, memproduksi ROI dan RNI yang bersifat bakterisidal ataupun bakteriostatik serta memproduksi enzim degradasi terhadap bakteri yang telah dibunuh.
c. Bekerjanya sistem komplemen.
d. Reaksi khusus yang berhubungan dengan imunitas humoral.

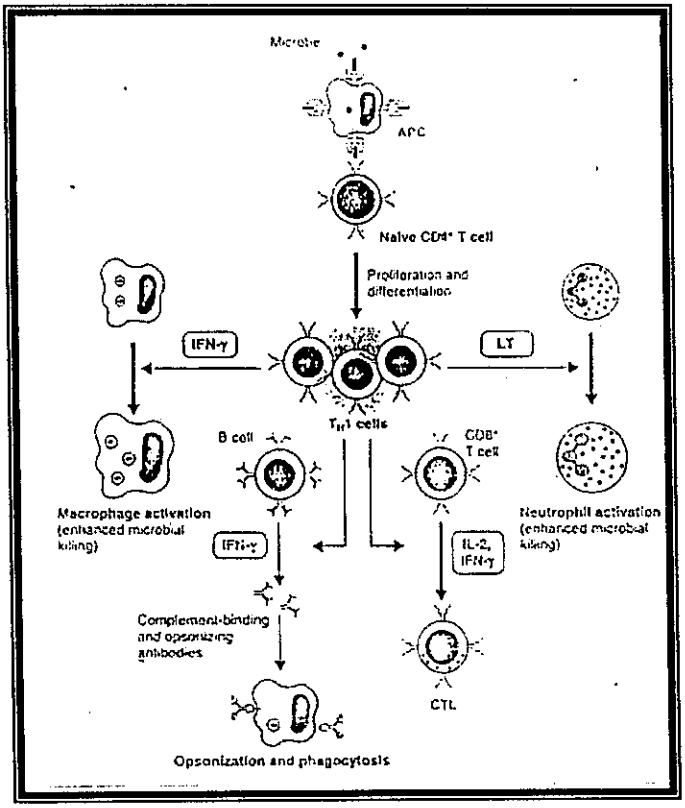
2.3.5. FUNGSI DAN PERTUMBUHAN SUBSET SEL T

Sel T CD4+ yang telah teraktifasi akan berdiferensiasi. Diferensiasi sel T CD4+ menjadi Th 1 atau Th2 tergantung sitokin yang diproduksi pada saat merespon bakteri yang memacu reaksi imunitas. Sitokin terpenting yang dihasilkan oleh sel Th1 pada fase efektor adalah IFN-γ yang akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba oleh sel-sel fagosit dengan meningkatkan

destruksi intrasel pada bakteri yang difagositosis. Sel Th1 juga mengeluarkan IL-2 yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin dan parakrin dengan memacu proliferasi dan diferensiasi sel T CD8+. Jadi sel Th1 berfungsi sebagai pembantu (helper) untuk pertumbuhan sel limfosit T sitotoksik yang juga meningkatkan imunitas terhadap bakteri intraseluler. Sel-sel Th1 memproduksi limfotoksin (LT) yang disebut juga TNF-β. Sitokin ini berfungsi meningkatkan pengambilan dan aktifasi netrofil (gambar 4).[3]

Sedangkan sel Th2 merupakan mediator untuk alergi dan pertahanan terhadap investasi parasit dan artropoda. Karakteristik sitokin yang dihasilkan sel Th2 adalah L-4 dan IL-5. Sitokin lain yang dihasilkan oleh Th2 adalah IL-3 dan IL-10 yang bersifat antagonis sebagai regulator fisiologis pada respon imun untuk menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1.[3,38]

Beberapa bakteri intraseluler seperti *Listeria, Mycobacterium, Salmonella* dan beberapa parasit seperti *Leishmania* menginfeksi makrofag dan makrofag merespon dengan mengeluarkan IL-12. Mikroba lain mungkin memacu IL-12 secara tidak langsung. Misalnya virus dan beberapa parasit memacu sel NK untuk memproduksi IFN-γ yang selanjutnya akan memacu makrofag mengeluarkan IL-12. IL-12 akan berikatan dengan sel T CD4+ dan memacu sel T menjadi sel Th1. IL-12 juga meningkatkan produksi IFN-γ dan aktifitas sitolitik yang dilakukan oleh sel T sitotoksik (CTL) dan sel NK sehingga memacu imunitas seluler.[3]



Gambar 4. Fungsi sel Th1

(Diambil dari Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, Cellular and Molecular Immunilogy. Philadelphia : WB saunders Co. 1997:272) [3]

2.4. ORGAN LIMFOID

Timus dan sumsum tulang merupakan organ limfoid primer karena merupakan tempat penting dalam limfopoiesis yaitu produksi permulaan limfosit dari sel-sel progenitor. Timus dan sumsum tulang memproduksi kira-kira 10^9 limfosit matur setiap hari yang kemudian dilepas dalam sirkulasi. Limfosit ini dalam keadaan *"virgin"* atau "*naïve*". Limfosit ini kemudian bermigrasi ke organ limfoid sekunder / perifer yaitu lien, limfonodi atau tonsil. Fungsi organ limfoid

sekunder adalah untuk memaksimalkan pertemuan antara limfosit yang teraktifasi dengan substansi asing dan dari sinilah sebagian besar respon imun dibentuk. Lien merupakan organ penting dalam pertahanan host terhadap infeksi, sebab merupakan filter fagositik untuk aliran darah dan organ penting untuk memproduksi sel T dan B pada respon imun. Untuk mudahnya memahami jenis sel limfoid maka secara ringkas disajikan dalam tabel 2.[39]

Tabel 1. Proporsi Jenis-jenis Sel Limfoid Pada Jaringan Manusia Normal.[39]

	Perkiraan (%)		
Jaringan	Sel T	Sel B	Sel NK
Darah sapi	70-80	10-15	10-15
Sumsum Tulang	5-10	80-90	5-10
Timus	99	<1	<1
Limfonodi	70-80	20-30	<1
Lien	30-40	50-60	1-5

Sumber : Parslow TG. Lymphocytes & Lymphoid Tissues. In : Medical Immunology, 9th ed. Prentice Hall, New Jersey, 1997 : 44

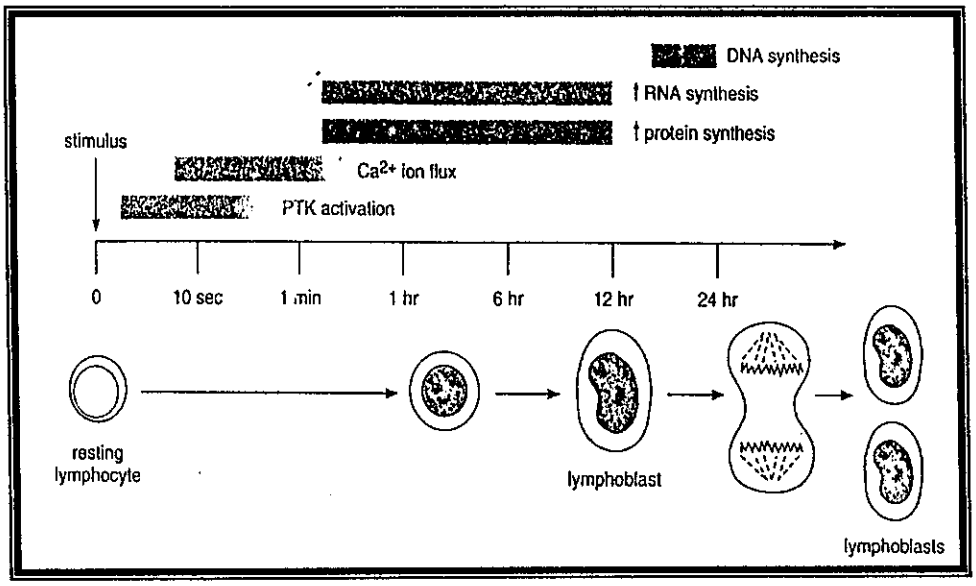
Sebagian besar limfosit *naïve* mempunyai siklus hidup yang pendek dan akan mengalami program kematian sel dalam beberapa hari, setelah meninggalkan timus atau sumsum tulang. Tetapi apabila limfosit tersebut menerima sinyal adanya partikel asing atau patogen, maka limfosit akan mengalami aktifasi yaitu dengan mengadakan proliferasi dan diferensiasi. [39] Istilah proliferasi limfosit dapat

dibedakan menjadi 2 yaitu: (1) menunjukkan limfopoiesis yang terjadi di sumsum tulang dan timus yang menghasilkan limfosit *virgin* atau *naïve* yang kemudian dilepaskan ke aliran perifer, (2) menunjukkan adanya replikasi limfosit yang terjadi di jaringan limfoid sekunder atau perifer yang terjadi ketika limfosit teraktifasi sebagai bagian dari respon imun. Aktifasi limfosit di jaringan limfoid sekunder adalah serangkaian proses yang terjadi pada limfosit *naïve* yang terstimulasi untuk membelah dan berdiferensiasi, yang diantaranya menjadi sel efektor. Respon aktifasi limfosit yang lengkap meliputi induksi proliferasi sel (mitogenesis) dan ekspresi fungsi imunitas.[39]

Dalam jam pertama setelah stimulasi oleh antigen, terjadi peningkatan metabolisme oksidatif dan peningkatan sintesis RNA dan protein di limfosit, siap untuk bermitosis. Setelah 2-4 jam protein spesifik yang mengatur proliferasi sel seperti *c myc* dapat terdeteksi dalam nukleus. Sejalan dengan proses biokimiawi tersebut, limfosit akan mengalami perubahan morfologi yang disebut sebagai *blast transformation*. Dalam 8-12 jam limfosit telah berubah sebagai limfoblas. Sintesis DNA terjadi setelah 18-24 jam setelah stimulasi. Pembelahan sel pertama terjadi 2-4 jam sesudahnya dan, tergantung pada kondisi pembelahan dapat terjadi lima kali atau lebih dengan selang sedikitnya 6jam. (lihat gambar 5)[39]

Sel efektor dihasilkan dari tiap pembelahan matang yang lengkap dalam beberapa hari dan mengekspresikan fungsi imunitas sesuai asalnya dalam beberapa hari sesudahnya.[39]

UPT-PUSTAK-UNDIP



Gambar 5. Perubahan Biokimiawi dan Morfologi Pada Aktifasi Limfosit

(Diambil dari Parslow TG. Lymphocytes & Lymphoid Tissues. In : Medical Immunology, 9th ed. Prentice Hall, New Jersey, 1997 : 50) [39]

2.5. *SALMONELLA TYPHI*

2.5.1 Aspek Bakteriologi

Salmonella typhi adalah kuman berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob serta fakultatif instraseluler yang secara khas meragikan glukosa dan manosa, tidak meragikan laktosa dan sukrosa. Kuman ini sering bersifat patogen pada manusia dan binatang bila masuk melalui mulut. Kuman ini termasuk Enterobacteriacea dan secara signifikan menyebabkan penyakit enterik.[2,4]

Klasifikasi *Salmonella* yang terbaru berdasarkan keterkaitan susunan DNA adalah sebagai berikut :[2]

Tabel 2. Taksonomi genus Salmonella

Taksonomi genus Salmonella dengan Serogrup dan Serovar			
Spesies	Subspesies	Serogrup	Serovar
S. enterica	(I) Enterica	A	paratyphi A
		B	typhimunium, agona, derby
		C	chloraesuis, infantis, virchow
		D	dublin, enteritidis typhi
		E	anatum
	(II) Salmae		
	(IIIa) Arizonae		
	(IIIb) Diarizonae		
	(IV) Houtenae		
	(VI) Indica		
S. bongori*			

* Sebelumnya subspesies (V) S. enterica

2.5.2 Epidemiologi

Demam tifoid ditularkan melalui air atau makanan yang terkontaminasi yang biasanya dibawa oleh karier kronik. Penyebaran penyakit ini terkait erat dengan sanitasi lingkungan.[2] Di negara maju dan sanitasi lingkungan telah sangat baik, insiden penyakit demam tifoid sangat rendah. Di Eropa Barat, Jepang dan Amerika Serikat angka kejadian demam tifoid berkisar antara 0,24 – 3,7 kasus per 100.000 penduduk per tahun. Tetapi di negara yang sedang berkembang dimana status ekonominya masih rendah dan sanitasi lingkungan yang belum baik, penyakit demam tifoid masih masih merupakan masalah kesehatan yang serius. Di Indonesia insiden penyakit deman tifoid masih sulit ditentukan besarnya, karena tidak adanya data dasar survei komunitas. Hasil survei rumah sakit di Indonesia menunjukkan bahwa jumlah penderita yang dirawat dengan diagnosa demam tifoid merupakan urutan kedua setelah gastroenteritis pada daftar sepuluh penyakit

menular terbanyak. Di RS Dr. Kariadi, penderita demam tifoid yang dirawat menduduki tempat teratas (3.264), disusul gastroenteritis (2.559) dan hepatitis (690). Penderita demam tifoid yang dirawat di rumah sakit cenderung meningkat dari tahun ke tahun.[1]

Saat ini juga sudah ditentukan adanya wilayah yang dikenal sebagi *hotspot* demam tifoid di dunia yaitu Peru, Alexandria, Jakarta, India, Pakistan dan Nepal.

2.5.3. Mekanisme Respon Imun Terhadap *Salmonella Typhi.*

Salmonella typhi memiliki beberapa antigen yaitu antigen O (berasal dari somatik polisakarida) dan antigen H yang berasal dari protein flagel. Beberapa Salmonella sp. mempunyai antigen simpai (kapsul) Vi, yang dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan berhubungkan dengan virulensi. Kapsul yang dimiliki oleh *Salmonella* ini tidak dapat dihancurkan oleh antibodi. Tetapi sebaliknya Salmonella yang diopsonisasi akan dihancurkan oleh netrofil. Fagositosis dengan opsonisasi ini dibatasi oleh polisakarida kapsul Vi pada *Salmonella typhi*, yang akan meningkatkan resistensi terhadap aktifasi komplemen dan lisis bakteri oleh jalur alternatif sebagaimana *killing* oleh peroksida. Antigen H juga menentukan interaksi antara *host* dan mikroba. Antigen flagel tipe H1-j yang hanya dijumpai pada infeksi di Indonesia ternyata hanya mempengaruhi individu dewasa dan hanya menunjukkan gejala penyakit yang lebih ringan dibandingkan tipe H1-d.[2, 40,41]

Apabila *Salmonella* masuk ke tubuh *host* maka pertama kali respon imun yang bekerja adalah respon imun alami (*innate*), dimana sel-sel fagosit polimorfonuklear/sel-sel granulosit sangat berperan dalam fase ini. Akan tetapi

peran fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisen terhadap enzim-enzim lisosom fagosit.[3,4] Selanjutnya respon imun spesifik akan teraktifasi oleh antigen *Salmonella.* Pada fase ini limfosit T akan mengaktifasi makrofag, sel NK dan sel T sitolitik untuk menghancurkan bakteri. Antigen bakteri ini mengaktifasi sel NK secara langsung atau melalui stimulasi oleh IL-12 yang diproduksi makrofag. Sel NK juga akan memproduksi IFN-γ yang akan mengaktifasi makrofag dan meningkatkan degradasi bakteri yang difagosit.[3,4]

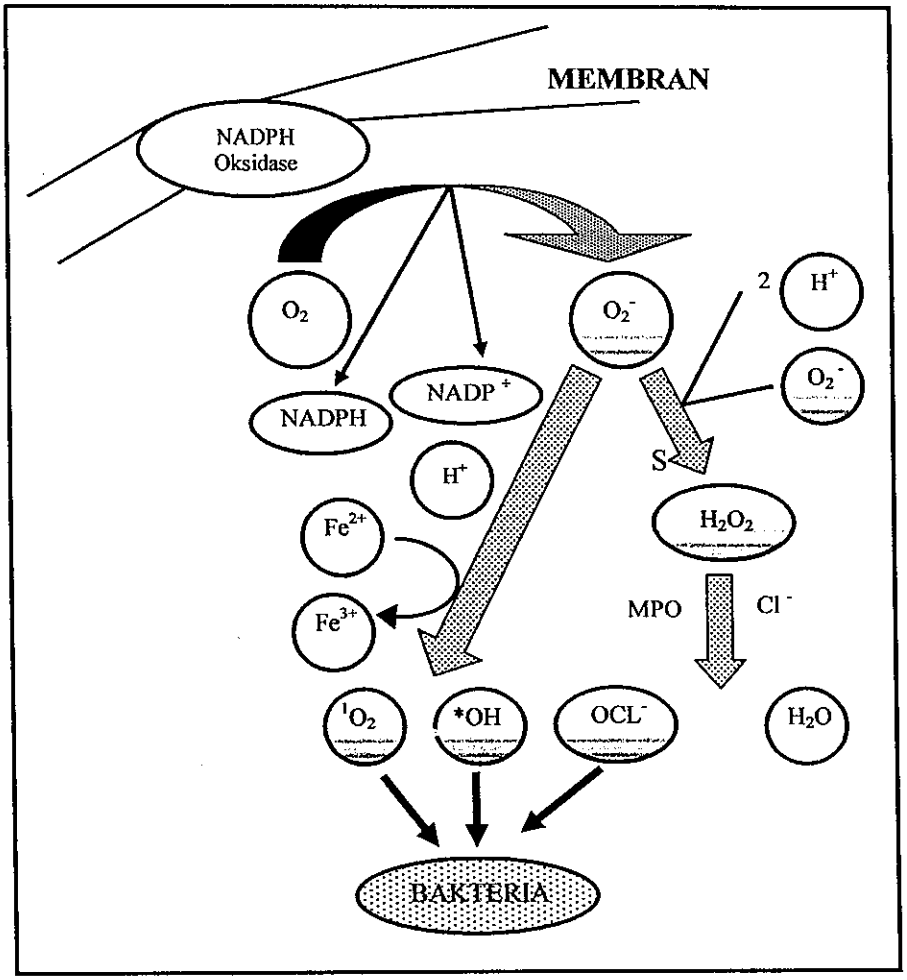
Respon imun protektif terhadap bakteri intraseluler adalah imunitas seluler (cell-mediated immunity). Dalam imunitas seluler ini dijumpai 2 reaksi yaitu :

(1). Penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktifasi oleh sitokin-sitokin yang diproduksi limfosit T dan (2) lisis terhadap sel yang terinfeksi oleh sel T $CD8^+$ (CTL_S) dan sel NK. [4,5]

Bila sel yang terinfeksi telah dilisis, maka bakteria dapat berikatan dengan antibodi dalam plasma. Kompleks antigen-antibodi akan mengaktifkan komplemen sehingga dapat membunuh bakteri tersebut.[3, 4, 5]

Kemampuan makrofag membunuh bakteri tergantung pada senyawa *oxygen dependent (hydrogen peroxide, singlet oxygen, hydroxyl radicals)* dan senyawa *oxygen independent (lisosome, lactoferin, cationic protein).*[38] Makrofag yang teraktifasi akan memproduksi *Reactive Oxigen Intermediates* (ROI) dan *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI) dan enzim-enzim yang akan membunuh bakteri yang difagosit sebagai sel efektor.[3,38]

Yang termasuk ROI adalah radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan *singlet* oksigen. ROI sangat reaktif sehingga dapat membunuh bakteri dan menghancurkan sel-selnya. Dalam proses tersebut kebutuhan oksigen dapat meningkat sampai 100 kali, sehingga prosesnya disebut *respiratory burst* (letupan respirator). Bakteri masuk ke dalam fagosom, menyatu dengan lisosom membentuk fagolisosom. Disini terjadi dua proses yaitu *respiratory burst* dan digesti oleh enzim lisosom. *Respiratory burst* dimulai dari perubahan O_2 menjadi O_2^- oleh NADPH oksidase. Dalam reaksi yang dikatalisis oleh Superoksida Dismutase (SOD), dua molekul H^+ dan O_2^- akan membentuk H_2O_2. Sedangkan di netrofil H_2O_2 tersebut akan dikonversi membentuk molekul-molekul bakterisidal oleh enzim Mieloperoksidase (MPO). MPO sendiri akan mengkatalisis oksigenasi dari ion halida (contohnya: Cl^-)untuk membentuk hipoklorida yang bersifat bakterisidal kuat. Dengan adanya Fe^{2+} maka O_2^- dan H_2O_2 bereaksi membentuk OH dan $^*O_2$ (*singlet* oksigen) yang sangat reaktif sebagai bakterisid. Enzim lisosom bertugas mencerna fragmen-fragmennya, setelah sel bakteri mengalami disintegrasi (gambar 6). Daya bunuh makrofag dengan ROI merupakan aktifitas antimikroba yang dilakukan beberapa jam pertama sesudah fagositosis.[38,42] *Respiratory burst* mempunyai peran yang esensial dalam membunuh *Salmonella* yang virulen.[6,7]

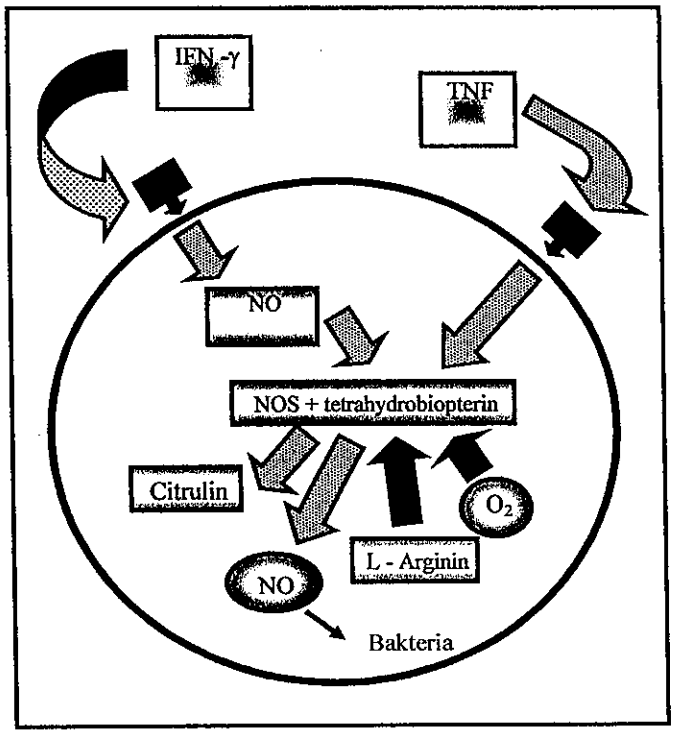


Gambar 6. Pembentukan ROI

(Diambil dari Mc. Kee T, Mc.Kee JR. Biochemistry, USA : Wim. C. Brown Publisher, 1996)

Dilain pihak RNI akan berperan pada fase awal dan berikutnya pada aktifitas antibakteri makrofag. Yang termasuk RNI adalah NO, nitrat dan nitrit.[43] Makrofag mencit yang teraktifasi oleh sitokin IFNγ. TNFα, IL-1, IL-2 dan lipid A dari lipopolisakarida (LPS) bakteri dengan bantuan *inducible nitrit oxide synthase* (iNOS) akan terinduksi untuk membentuk NO dari prekursor L-arginin.[27,44]

NOS akan berikatan dengan molekul kofaktor tetrahidrobiopterin. Dengan bantuan O_2 ikatan NOS dan kofaktor ini akan mengubah L-arginin menjadi sitrulin dan NO (gambar 7).[38] NO inilah yang bersifat toksik pada bakteri dan sel-sel tumor, serta dapat menghambat replikasi virus.

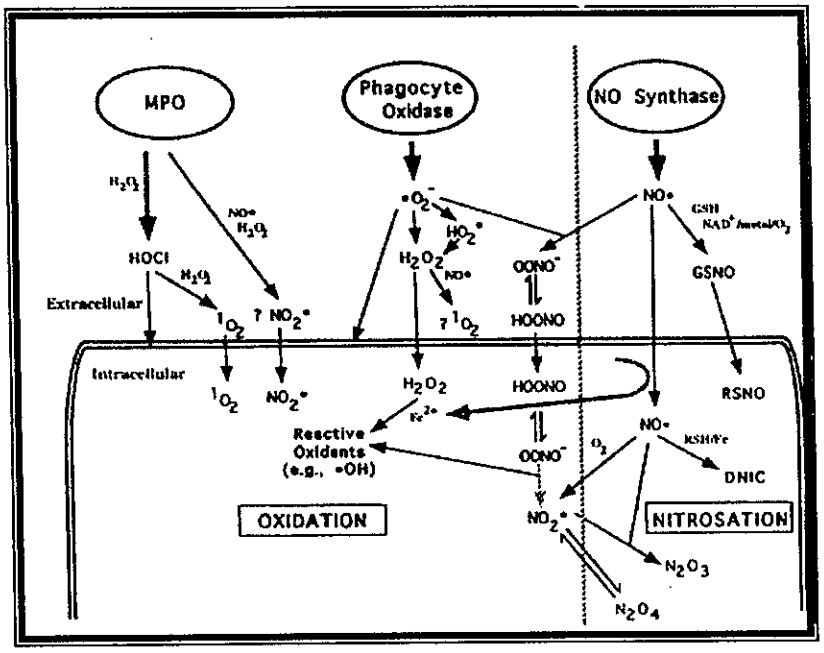


Gambar 7. Pembentukan NO Dalam Pembunuhan Bakteri
(Diambil dari Roitt I, Brostoff J. Male D. Immunology. Barcelona. Spain : Mosby, 1998 : 17.6).

NO mempunyai aktifitas antimikroba yang penting terhadap *Salmonella.* Beberapa penelitian menggunakan inhibitor NOS menunjukkan peningkatan koloni bakteri dan menurunkan survival. Penelitian menggunakan aminoguanidin (inhibitor NOS) menunjukkan peran iNOS dalam mengatur infiltrasi sel inflamasi

dalam jaringan. NO sendiri terutama berperan terhadap bakteri intraseluler. Respon imun Th1 yang didominasi oleh IFNγ, TNFα dan IL-12 bersama NO merupakan efektor terhadap *Salmonella typhimurium*. Disebutkan pula bahwa hasil autooksidasi NO seperti NO2, N2O3 dan S-nitrosotiol juga akan meningkatkan potensi sitotoksisitas. [7,8,44]

Selain reaksi diatas, sinergi ROI dengan RNI dapat membentuk spesies antimikroba yang lebih toksik. Sebagai contoh NO yang bereaksi dengan *singlet* O_2 membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) suatu oksidan yang dapat merusak lipid, protein dan DNA bakteri. Peroksinitrit ini dapat meningkatkan daya bunuh makrofag terhadap *Salmonella* (gambar 3)[27]



Gambar 8. Beberapa kemungkinan reaksi interaksi antara ROI dan RNI

(Diambil dari Fang FC. Mechanism of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. J Clin Invest 1997; 90 (12) : 2818 – 1825)

Disamping sebagai antimikroba NO mempunyai fungsi sitoprotektif dan imunoregulasi. Efek sitoprotektif diperlihatkan dalam penelitian oleh Alam dkk, bahwa sel host yang terinfeksi terlindungi melalui efek NO sebagai anti apoptosis. Hal ini tampak pada gambaran histopatologis hepar pada mencit yang mengalami defisiensi iNOS yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* menunjukkan kerusakan berat, seperti apoptosis hepatoseluler difus serta peningkatan sebukan netrofil. Sedangkan pada mencit jenis *wild type* yang diinfeksi kuman yang sama menunjukkan jumlah mikroabses yang terbatas, yang terdiri dari sebukan sel PMN dan makrofag, serta perubahan apoptosis yang rendah.[28] Meskipun pada penelitian sebelumnya oleh Cerquetti dkk menyebutkan bahwa infeksi oleh *Salmonella enteridis* yang dilemahkan akan menginduksi iNOS yang berkorelasi dengan peningkatan apoptosis sel yang terinfeksi. Dengan demikian bakteri di dalam makrofag ikut mati, sehingga penyebaran bakteri menjadi terhambat.[9]

Pertumbuhan bakteri selama infeksi subletal *Salmonella* dalam sistem retikuloendotelial dihambat oleh IFN-γ. TNF-α, IL-12 dan IL-18. Sitokin ini juga dibutuhkan dalam pembentukan granuloma untuk melokalisir bakteri.[7] IL-18 dihasilkan oleh sel mononuklear yang teraktifasi dan sel epidermal, sebagai respon terhadap rangsang bakteri dan inflamasi. Interleukin ini berperan dalam menginduksi IFN-γ dari sel NK dan sel Th1, meningkatkan sitotoksisitas sel NK, sel Th. Bersama IL-12 bersinergi menginduksi IFN-γ dari sel T. Selain itu juga dapat menginduksi TNF-α dari sel T & NK.[44]

Kemampuan bakteri bertahan dan berkembang dalam sel mononuklear tergantung pada dua faktor yaitu produk mikroba yang dapat meningkatkan

resistensi terhadap daya bunuh dan pada limfosit T spesifik yang teraktifasi, yang merupakan bagian mekanisme imun seluler yang dikontrol secara genetik.[2] Dalam penelitiannya, Erikkson dkk mengemukakan bahwa *Salmonella typhimurium* dapat beradaptasi dalam sel host dengan bermutasi dengan beberapa cara yang berbeda untuk meningkatkan ketahanannya didalam sel *host* dengan menghambat aktifitas iNOS.[10]

Mencit yang diinfeksi *Salmonella* akan menginduksi respon imunitas seluler dengan kuat. Setelah infeksi maka $CD4^+$ dan $CD8^+$ splenosit akan teraktifasi dan memproduksi IFN-γ. Akan tetapi ekspansi kedua populasi sel T tersebut hanya taraf sedang. Dengan menggunakan *BromodeoxyUridin* (BrdU) dibuktikan bahwa tidak ada atau hanya sedikit peningkatan proliferasi invivo sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$. Hal ini mengindikasikan meskipun sel T $CD4^+$ dan $CD8^+$ teraktifasi dan berpotensi mensekresi IFN-γ tetapi jumlahnya tidak sebanding dengan ekspansi substansial dari kedua sel T tesebut.[11] Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa infeksi *Salmonella* menginduksi supresi proliferasi sel T yang ditandai dengan peningkatan ekspresi IL-2R alpha.[12]

2.5.4. Fase-fase Infeksi *Salmonella typhimurium* Secara Eksperimental

Infeksi *Salmonella typhimurium* secara sistemik pada tikus diperkirakan melalui fase-fase berikut :

1. Fase pertama infeksi intravena atau intraperitoneal hanya memerlukan waktu beberapa jam, dimana terjadi distribusi mikroorganisme ke berbagai tempat.

Mikroorganisme akan ditemukan di hati dan limpa sekitar 3 dan 8 jam setelah infeksi.

2. Fase kedua. Pada fase ini selama hari pertama infeksi disebut sebagai tahap pertumbuhan eksponensial dan terjadi sebelum respon imun natural. Pada fase in faktor genetik host memegang peran penting. Netrofil sangat penting pada tahap ini. Netrofil sebagai pertahanan yang efektif melawan infeksi *Salmonella,* akan menghambat pertumbuhan *Salmonella.*
3. Fase ketiga. Setelah 3-7 hari, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hati dan limpa kemudian pertumbuhannya menetap (*latent*) di bawah pengaruh makrofag teraktifasi yang memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi. Pada fase ini tampaknya limfosit tidak begitu berperan penting. Disini makrofag lebih berperan dalam meningkatkan daya bunuh bakteri intrasel oleh sel lain (sel NK atau granulosit) dengan cara memproduksi sitokin-sitokin. Fase ini juga disebut sebagai "*plateau phase*".
4. Fase pembersihan. Fase ini terjadi selama seminggu ketiga infeksi yang melibatkan aktifitas limfosit. Pada fase ini sel T $CD4^+$ memperantarai terjadinya pembersihan *Salmonella* di hati dan limpa. Sitokin yang terlibat adalah IFN-γ, yang diekspresikan oleh T $CD4^+$ dan sel NK.[45]

2.6. LANDASAN TEORI

Bakteri intraseluler (*Salmonella typhimurium*) sebagai imunogen akan merangsang respon imun tubuh. Respon imun tersebut dapat berupa respon imun alamiah dan respon imun spesifik. Respon imun yang berperan terhadap bakteri intraseluler adalah respon imun seluler yang dilakukan oleh makrofag teraktifasi, sel limfosit T sitotoksik (T $CD8^+$), dan sel NK yang akan melakukan *killing* dan mengeliminasi bakteri. Kemampuan bakteri untuk berkembang dalam makrofag ditentukan oleh resistensi kuman terhadap daya bunuh makrofag dan sel T teraktifasi, yang dikontrol secara genetik. Kemampuan *Salmonella* beradaptasi dalam sel mononuklear *host* dilakukan dengan kemampuannya bermutasi, diantaranya dengan menghambat aktifitas iNOS. Infeksi *Salmonella* juga dapat mensupresi proliferasi sel T.

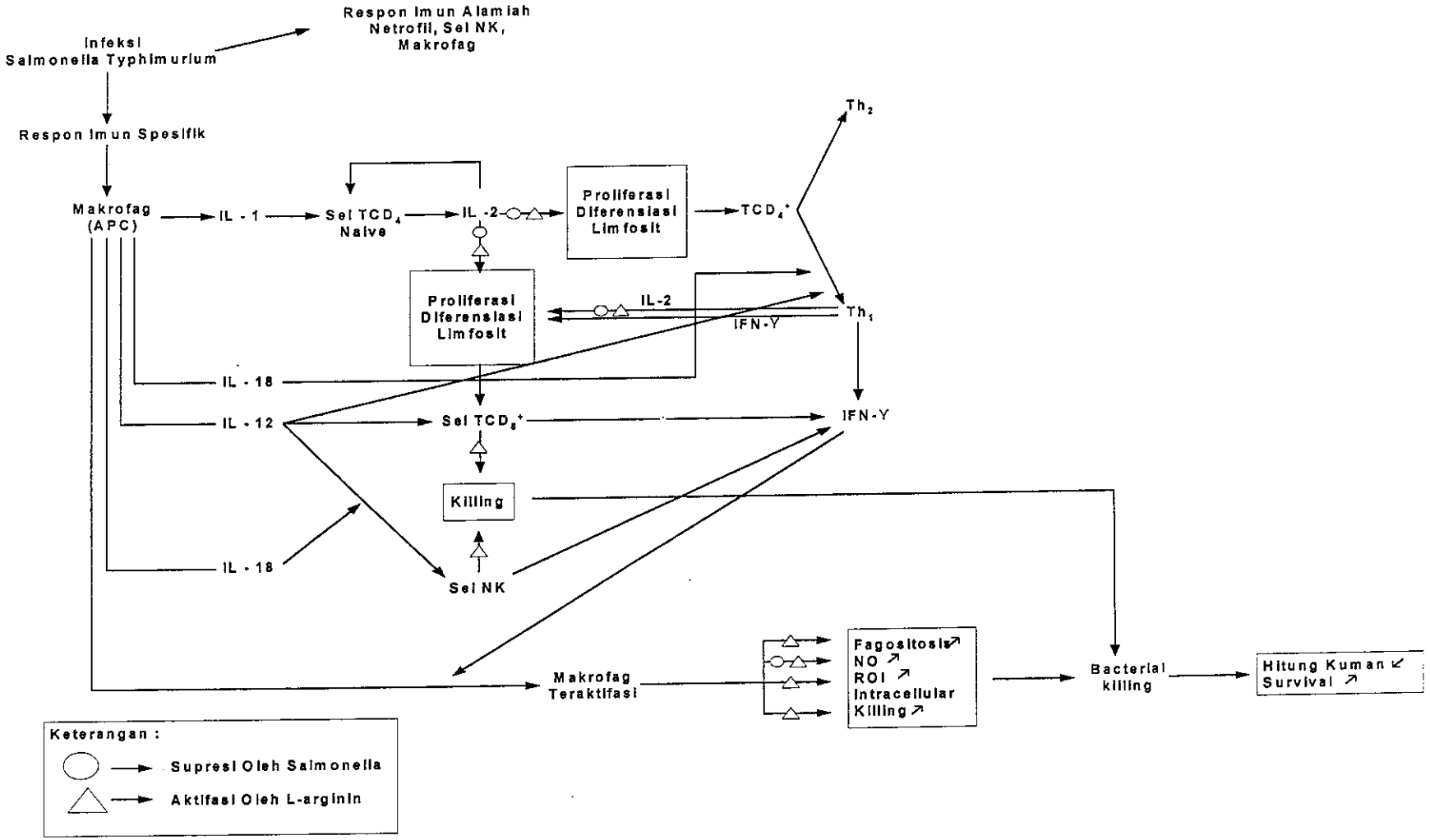
Salmonella typhimurium yang masuk kedalam tubuh akan difagosit oleh makrofag. Makrofag berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) yaitu sel yang memproses dan menampilkan fragmen dari mikroorganisme dalam bentuk berikatan dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II ke permukaan sel yang akan dikenali oleh limfosit T. Interaksi ini menyebabkan limfosit mensekresi IL-2 yang akan memacu proliferasi dan diferensiasi limfosit menjadi sel T $CD4^+$ (*Autocrine Growth Factor*). Sel T $CD4^+$ akan mensekresi IL-2 yang berfungsi sebagai parakrin, yang akan membantu proliferasi dan diferensiasi sel T menjadi sel $TCD8^+$ dan mensekresi IFN-γ yang memacu aktifasi makrofag dalam mengeliminir bakteri. Bakteri intraseluler juga akan menstimuli makrofag untuk memproduksi IL-12 yang akan mengaktifkan sel NK,

menstimuli perkembangan sel TH1 dan mengaktifkan sel $TCD8^{+}$. Ketiga jenis sel yang teraktifkan ini akan mensekresikan IFN-γ yang akan mengaktifkan makrofag.

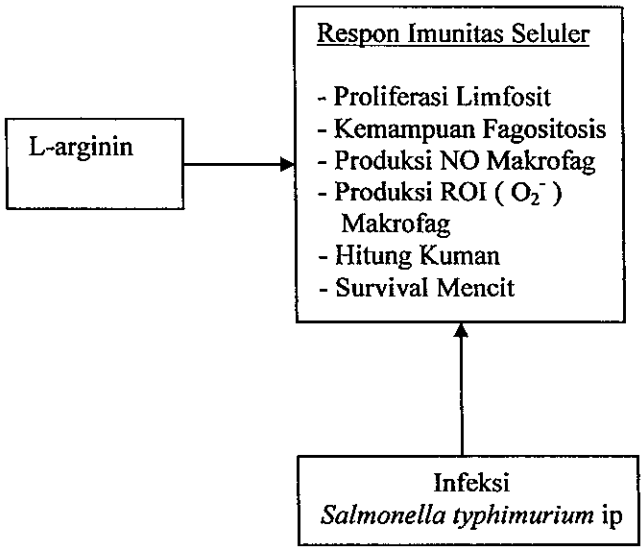
Makrofag yang teraktifasi ditandai dengan peningkatan kemampuan fagositosis, membentuk ROI dan NO yang toksik dalam proses *killing* terhadap mikroorganisme, juga peningkatan kemampuan *killing* intraseluler. Faktor ini diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri serta meningkatkan survival host.

L-Arginin sebagai prekursor NO yang berfungsi sebagai *messenger molecul* mempunyai titik tangkap meningkatkan proliferasi limfosit, melalui jalur GH dan poliamin, meningkatkan kemampuan fagositosis dan aktifitas *killing* makrofag melalui peningkatan produksi NO dan ROI, sebagai zat toksik yang berperan dalam pembunuhan bakteri.

2.7. KERANGKA TEORI/KONSEP DAN HIPOTESIS
2.7.1. KERANGKA TEORI



2.7.2. KERANGKA KONSEP



2.7.3 KETERBATASAN PENELITIAN

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan terhadap kadar IFN-γ yang merupakan aktifator makrofag, IL-12, perforin dari sel T $CD8^+$ dan aktifitas sel NK karena reagen yang diperlukan harus didatangkan dari luar dan memerlukan dana yang tidak sedikit, sedangkan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, produksi NO, ROI, fagositosis makrofag, hitung kuman dan pengamatan survival sudah menggambarkan respon imunitas seluler.

2.7.4 HIPOTESIS PENELITIAN

1. Terdapat peningkatan respon proliferasi limfosit pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin, yang dilihat dari:

a. Adanya peningkatan berat limpa pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.

b. Adanya peningkatan jumlah limfosit pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* yang diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.

c. Adanya peningkatan jumlah relatif limfoblas pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.

2. Terdapat peningkatan kemampuan fagositosis makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pra infeksi selang-seling, pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.
3. Terdapat peningkatan produksi NO makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonela typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi bandingkan dengan yang diberi L-arginin pra infeksi selang-seling, pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.
4. Terdapat peningkatan produksi ROI makrofag yang teraktifasi pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra

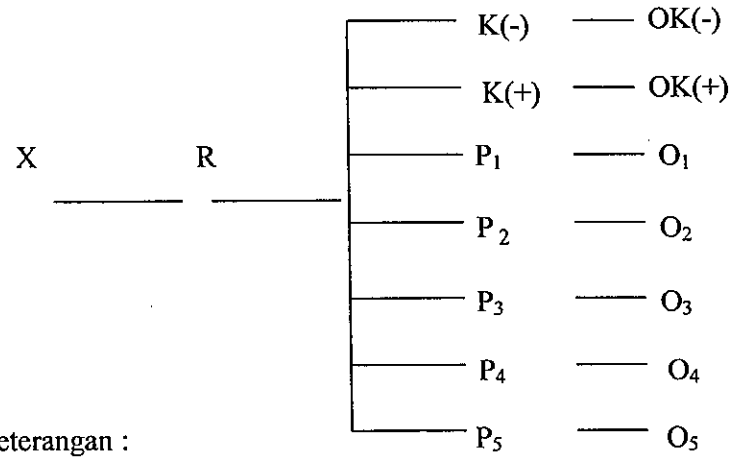
infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pra infeksi selang-seling, pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.

5. Terdapat penurunan hasil hitung kuman dari kultur organ hepar pada mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin yang diberikan pra infeksi selang-seling, pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.
6. Terdapat peningkatan survival mencit BALB/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dan diberi L-arginin pra infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi dibandingkan dengan yang diberi L-arginin pra infeksi selang-seling, pasca infeksi dan yang tidak diberi L-arginin.

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test - Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.



Keterangan :

X ⟶ R : Masa Adaptasi I minggu

R : Randomisasi

K (-) : Kontrol negatif, sebagai pembanding mencit hanya mendapatkan diet standar tanpa perlakuan selama7hari.

K (+) : Kontrol positif, sebagai pembanding mencit mendapatkan diet standar selama 7 hari, pada hari ke 8 diinfeksi 10^6 *Salmonella typhimurium*

P1 : Mencit selain mendapatkan diet standar juga diberikan 1,2 % L-arginin HCl dalam air minum selama 7 hari.

P2 : Perlakuan pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, mencit selain mendapatkan diet standar juga diberikan 1,2% L-arginin HCl dalam air minum selama 7 hari, kemudian pada hari ke 8 diinfeksi 10^6 *Salmonella typhimurium.*

P3 : Perlakuan pemberian L-arginin pra infeksi selang-seling, mencit selain mendapat diet standar juga diberikan 1,2% L-arginin HCL dalam air minum selama 7 hari selang-seling (pulse type), kemudian pada hari ke 8 diinfeksi 10^6 *Salmonella typhimurium*

P4 : Perlakuan pemberian L-arginin pra-pasca infeksi, mencit selain mendapat diet standar juga diberikan 1,2% L- arginin HCl dalam air minum selama 7 hari, kemudian pada hari ke 8 diinfeksi 10^6 *Salmonella typhimurium* dan tetap diberi L-arginin HCl sesudahnya

P5 : Perlakuan pemberian L-arginin pasca infeksi, mencit selain mendapat diet standar juga diberikan 1,2% L-arginin HCl selama 7 hari, setelah 24 jam diinfeksi 10^6 *Salmonella typhimurium*

OK(-) : Pengamatan pada mencit kelompok Kontrol (-)

OK(+) : Pengamatan pada mencit kelompok Kontrol (+)

P1 : Pengamatan pada mencit kelompok P1

P2 : Pengamatan pada mencit kelompok P2

P3 : Pengamatan pada mencit kelompok P3

P4 : Pengamatan pada mencit kelompok P4

P5 : Pengamatan pada mencit kelompok P5

3.2.1 POPULASI DAN SAMPEL

3.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit jantan strain BALB/c berusia 8-10 minggu, berat 30-40 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomis dan telah menjalani adaptasi selama 1 minggu. Strain yang dipilih adalah BALB/c sebab strain ini pada yang berumur antara 6-12 minggu telah dilaporkan dapat menimbulkan respon imunitas seluler apabila mencit diinokulasi dengan *Salmonella typhimurium* hidup. Mencit strain BALB/c juga suseptibel terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*.[46] Sedangkan penentuan jenis kelamin mencit pada penelitian ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron dan testoteron dapat mempengaruhi respon imunitas.[47] Pada mencit yang berumur 7 minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antara mencit satu dan lainnya, sehingga rasio kadar estrogen dan progesteron pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian itu dipilih mencit jantan.

Pemilihan kuman *Salmonella typhimurium* disebabkan kuman ini merupakan imunogen yang bersifat fakultatif intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Karena hidupnya intraseluler, maka antibodi, komplemen dan sel granulosit tidak dapat mencapai mereka. Walaupun antibodi mungkin memainkan peranan dalam pencegahan infeksi, tetapi jelas bahwa makrofaglah yang

merupakan pertahanan utama terhadap bakteri ini. Mekanisme imun yang berperan dalam menghadapi infeksi *Salmonella typhimurium* adalah *T cell-mediated immunity*. Selain itu infeksi kuman ini analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh Salmonella typhi yang masih banyak menimbulkan gangguan intestinal di Indonesia. *Salmonella typhimurium* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain salmonella virulen (*phage type 510*) dengan dosis LD_{50} 10^6. Sehingga 10^6 organisme *Salmonella typhimurium* hidup dapat menginduksi respon imunitas seluler. Sedangkan untuk pengamatan survival digunakan dosis 10^7. Kunci utama mekanisme ini adalah fase aktifasi sel T dan pelaksanaan efektor oleh makrofag yang teraktifasi.

3.2.2 SAMPEL

3.2 2.1. Cara Pengambilan Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah mencit. Untuk menghindari bias dalam penelitian maka hal-hal berikut harus dikontrol. Hal-hal yang dikontrol adalah:

1. Faktor keturunan mencit, diambil dari mencit yang secara genetis sifatnya sama, yait mencit jenis BALB/c
2. Umur mencit, diambil yang berusia 8-10 minggu
3. Jenis kelamin, diambil mencit dengan jenis kelamin jantan
4. Berat badan sebelum perlakuan, dipilih mencit dengan berat badan 30-40 gram.
5. Penempatan kandang, ditempatkan pada tempat yang sama, (di laboratorium Biokima)

r = 1 + 15/(7-1)

r = 3,5 dibulatkan menjadi 4.

Pada penelitian ini digunakan 6 ekor mencit per kelompok untuk menambah kekuatan penelitian.

Dengan demikian penelitian ini menggunakan sampel 6 ekor mencit setiap kelompok, sehingga jumlah seluruh mencit yang diperlukan adalah 42 ekor mencit.

Untuk mengamati survival yang dibandingkan adalah kelompok mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dengan kelompok mencit diberi diet L-arginin dengan berbagai macam jadwal pemberian dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Masing-masing kelompok terdiri dari 12 mencit, sehingga untuk pengamatan survival membutuhkan sampel 60 ekor mencit. Keseluruhan sampel berjumlah 102 ekor.

3.3. VARIABEL PENELITIAN

Variabel bebas :

Sebagai variabel bebas adalah pemberian L-arginin

L-arginin yang digunakan dalam penelitian ini adalah L-arginin hidroklorida produksi Sigma Aldrich dengan nomor katalog A5131 tahun 2002/2003. Dosis yang diberikan sebesar 1,2% (w/v) sebagai air minum selama 7 hari. Dosis yang digunakan berdasarkan dosis yang digunakan pada penelitian oleh Kirk, dkk (1992)[48]

Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung adalah :

- Respon Proliferasi Limfosit yang dihitung dari jumlah limfosit lien dan jumlah relatif limfoblas dari lien yang dihitung tiap 200 sel (limfosit + limfoblas).[49]
- Kemampuan fagositosis makrofag teraktifasi yang diperiksa dengan menggunakan partikel latex, dihitung jumlah latex yang difagosit dalam 200 makrofag.[50]
- Produksi NO makrofag teraktifasi, yang diukur dari jumlah NO yang dihasilkan dengan reagens Griess dengan metode modifikasi Griess dari Green dkk (1982) dan Ding dkk (1988).[51] Hasil reaksinya dibaca dengan spektrofotometer/Elisa reader, dengan satuan µM
- Produksi ROI makrofag teraktifasi, diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction assay.* [50] Dengan adanya anion superoksid / O_2^- pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat formazan yang hasilnya dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan diukur prosentase dan derajatnya/50 makrofag
- Kultur kuman dihitung dalam CFU (*Colony Forming Unit*) / gram.[52]
- *Survival* mencit yang diamati berapa mencit yang mati selama 21 hari pengamatan, dinyatakan dalam % *survival.*

3.4. BAHAN DAN MATERI

- Mencit jantan strain BALB/c umur 8-10 minggu diperoleh dari UPHP FKH UGM
- Hepar dan Lien mencit strain BALB/c.
- *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit strain BALB/c
- L-arginin dari Sigma Aldrich
- *Salmonella typhimurium* yang diperoleh dari RS Telogorejo Semarang
- *Foetal Bovine Serum* (FBS)
- Larutan NaCl 0,9%
- Metanol, larutan Giemsa
- *N-(-1-naphthyl) ethyilenediamine dihydrochlorid*, NAD
- Penicillin
- Reagen Chromogenic (Reagen Griess)
- Standar nitrit
- *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA)
- *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) dilarutkan dengan aquibides 1 mg/ml)
- *Neutral Red sol* 2%
- *Latex beads* dari Sigma
- *Royal Park Memorial Institute* (RPMI) 1640
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Canada Balsam
- Medium kultur *Mc Conkey*

UPT-PUSTAK-UNDIP

3.5. ALAT / INSTRUMEN PENELITIAN

- Mikroskop
- Spuit disposable 1 cc, 10 cc
- Timbangan
- Kaca benda
- Tabung reaksi
- Cawan petri
- Plate 24 dan 96 well dasar rata
- Kandang hewan coba individual
- Alat sentrifugasi sigma 310 AK yang dilengkapi pengatur suhu.
- Bilik hitung *Neuebaeur Improve*
- Pipet *pasteur*, pipet *eppendorf*
- *Yellow* dan *Blue tip*
- Alat Sentrifugasi dilengkapi pengatur suhu
- Inkubator buatan Schwabach
- Termometer
- Tabung reaksi alas datar
- Kaca benda
- Pinset, gunting
- Coverslip bulat diameter 12 mm
- Gunting, saringan
- Autoclav
- *Laminar flow*
- *Colony counter*
- *Elisa reader*

3.6. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di:

- Laboratorium Biokimia dan Histoliogi Fakultas Kedokteran Undip pada bulan Desember 2002
- Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Undip pada bulan Desember 2002 sampai Januari 2003.
- Balai Laboratorium Kesehatan Semarang pada bulan Januari 2003

3.7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 102 ekor mencit jantan strain BALB/c, umur 8-10 minggu diaklimatisasikan di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama 1 minggu secara *ad libitum*.
- 102 ekor dibagi menjadi 2 kelompok besar pengamatan masing-masing 42 ekor untuk kelompok pemeriksaan respon imunitas seluler, dan 60 ekor untuk kelompok pengamatan survival.
- 42 ekor mencit selanjutnya dibagi menjadi 7 kelompok perlakuan, masing-masing 6 ekor yang ditentukan secara acak, masing-masing kelompok dikandangkan secara individual. Sedangkan 60 ekor dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing 12 ekor yang dilakukan secara acak untuk pengamatan survival.
- Masing-masing kelompok mendapatkan pakan standar yang sama dan berat badannya ditimbang sebelum perlakuan.

Kelompok Pemeriksaan Imunitas Seluler dibagi menjadi:

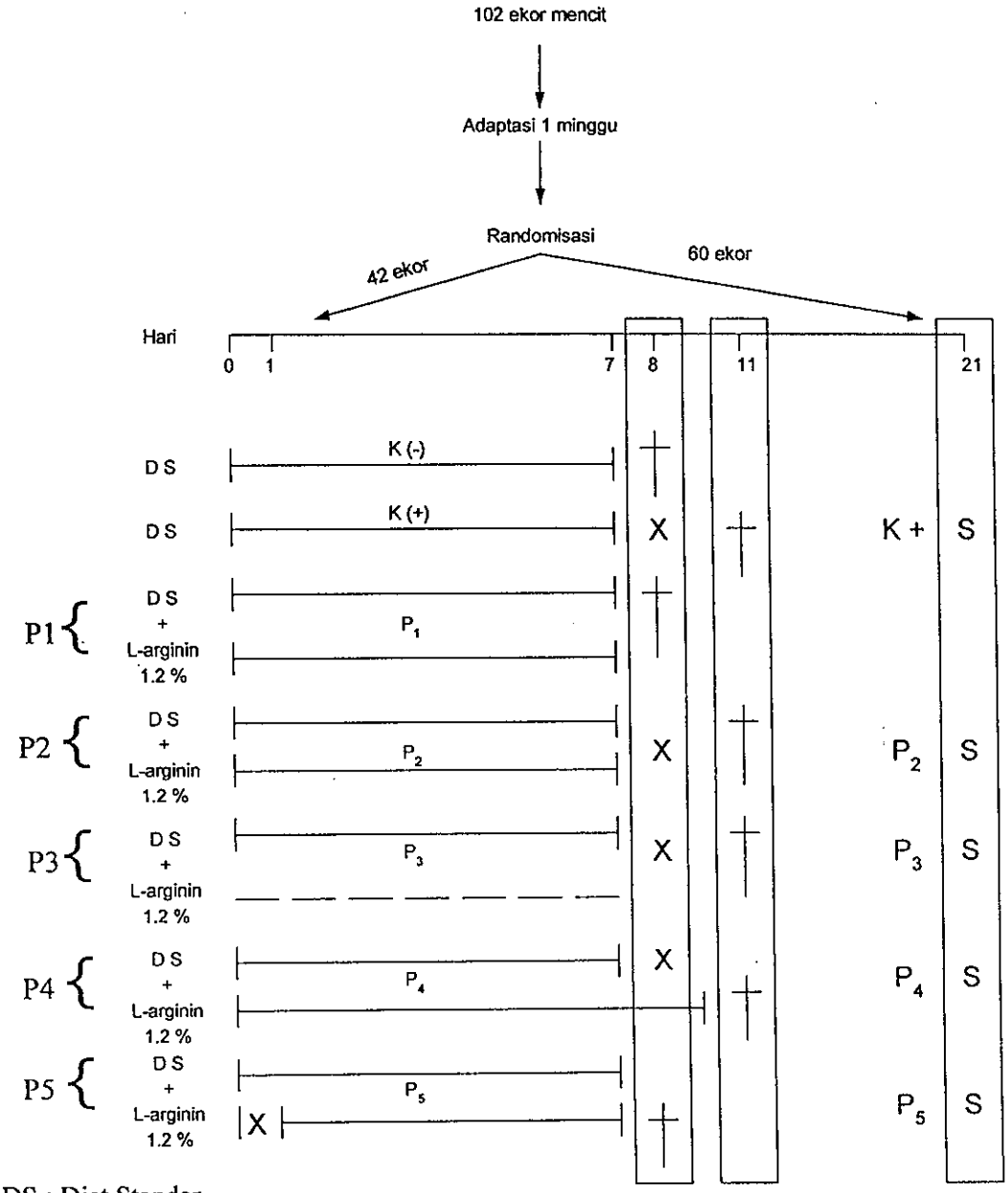
- Kelompok Kontrol (-) mendapatkan pakan standar selama 7 hari.
- Kelompok Kontrol (+) mendapatkan pakan standar 7 hari, kemudian pada hari ke 8 diinfeksi *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal, kemudian pada hari ke 11 mencit dibunuh dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.
- Kelompok P1 mendapatkan pakan standar serta diberi 1,2% L-Arginin HCl sebagai air minum selama 7 hari. Pada ke 8 mencit dibunuh dan dilakukan

pengambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.

- Kelompok P2 mendapatkan pakan standar dan 1,2% L-Arginin HCl sebagai air selama 7 hari, pada hari ke 8 mendapatkan suntikan *Salmonella typhimurium* intraperitoneal. Kemudian pada hari ke 11 dibunuh dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.
- Kelompok P3 disamping mendapatkan pakan standar juga mendapatkan 1,2%L-arginin HCl dalam air minum selama 7 hari selang-seling. Pada hari ke 8 disuntikkan *Salmonella typhimurium* secara intraperitoneal, kemudian pada hari ke 11 mencit dibunuh dan dilakukan pegambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.
- Kelompok P4 disamping mendapatkan pakan standar juga mendapatkan L-arginin HCl 1,2% dalam air minum selama 7 hari sebelum infeksi dan 3 hari setelah infeksi. Pada hari ke 8 diberi suntikan *Salmonella typhimurium* intraperitoneal. Pada hari ke 11 mencit dibunuh dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.

- Kelompok P5 disamping mendapatkan pakan standar juga mendapatkan 1,2% L-arginin HCl dalam air minum selama 7 hari, 1 hari setelah diinfeksi *Salmonella typhimurium.* Pada hari ke 8 mencit dibunuh dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respon proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis produksi ROI dan NO makrofag, hitung kuman dari kultur organ hepar.
- Kelompok Pengamatan Survival dibagi menjadi menjadi 5 kelompok pengamatan masing-masing 12 ekor dengan perlakuan sama seperti kelompok K(+), P2, P3, P4, P5. Pengamatan dilakukan selama 21 hari setelah inokulasi *Salmonella typhimurium.*

3.8. ALUR KERJA



DS : Diet Standar

X : Inokulasi *Salmonella typhimurium*

: Dibunuh → Diperiksa :

- Respon Proliferasi Limfosit
- Fagositosis Makrofag
- Produksi NO Makrofag
- Produksi ROI Makrofag
- Hitung Kuman dari Hepar

S : Pengamatan Survival

K (-) : Kontrol tanpa Perlakuan

K (+) : Kontrol dengan Infeksi Salmonella typhimurium

P_1 : Kelompok yang mendapat L-arginin 1,2% 7 hari

P_2 : Kelompok yang mendapat L-arginin 1,2% prainfeksi kontinyu

P_3 : Kelompok yang mendapat L-arginin 1,2% prainfeksi Selang-seling

P_4 : Kelompok yang mendapat L-arginin 1,2% pra / pasca infeksi

P_5 : Kelompok yang mendapat L-arginin 1,2% pasca infeksi

3.9. PEMERIKSAAN

3.9.1. PEMERIKSAAN RESPON PROLIFERASI LIMFOSIT DI LIEN [49]

Respon proliferasi limfosit mencit dapat dinilai berdasarkan parameter makroskopis dan mikroskopis. Respon secara makroskopis dilihat dari penambahan berat lien, sedangkan parameter mikroskopis berupa jumlah limfosit di lien dan jumlah relatif sel limfosit muda (Limfoblas)

Untuk melihat parameter tersebut, hewan coba dimatikan dengan cara dislokasi leher, dibaringkan terlentang, dan seluruh permukaan ventral disiram alkohol 70% untuk mengurangi kemungkinan pencemaran ke ruangan atau kontaminasi selama pembedahan. Dibuat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Kulit dirobek dengan pinset kearah kepala dan ekor mencit sehingga kulit terkelupas, dan tampak peritoneum. Lien diidentifikasi terletak sisi kiri atas, berwarna merah tua dan berbentuk memanjang. Kemudian lien diangkat dan dibersihkan dari jaringan ikat maupun pembuluh darah yang masih melekat. Lien diletakkan di cawan petri berisi larutan PBS. Berat lien diukur menggunakan timbangan elektronik dalam satuan milligram. Sedangkan penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Lien diletakkan diatas saringan stainless-steel kemudian dihancurkan dan menjadi cair. Kotoran pada substrat dibersihkan, selanjutnya dilakukan pengenceran dengan PBS. Eritrosit dilisiskan dengan NH_4Cl, kemudian dicuci dengan PBS lagi sebanyak 2 kali. Jumlah limfosit dihitung dengan bilik hitung Neuebauer Improve.

Untuk penghitungan jumlah relatif limfoblas, pemeriksaan dilakukan pada sediaan apus substrat lien dengan menggunakan pengecatan Giemsa dan dihitung per 200 sel (limfosit+limfoblas). Cara pembuatan sediaan apus adalah sebagai berikut :

- Setetes substrat lien diambil dan dibuat preparat apus diatas gelas sediaan.
- Dilakukan fiksasi dengan methanol dan dikeringkan
- Dicat dengan pewarna Giemsa
- Jumlah sel limfoblas dihitung dari 200 sel diarea homogen menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 X. limfoblas diidentifikasikan sebagai sel yang besar dengan inti yang bernukleolus, kromatin belum padat (warna lebih muda) dan masih terlihat adanya sitoplasma. Sedangkan limfosit ukuran selnya lebih kecil dengan inti bulat berkromatin padat (warna lebih tua) tidak ada nukleolus dan hampir tidak terlihat sitoplasma.

3.9.2. PEMERIKSAAN KEMAMPUAN FAGOSITOSIS, PRODUKSI ROI(O_2^-) DAN NO MAKROFAG

3.9.2.1. Prosedur Isolasi Makrofag Mencit [50]

Prosedur dibawah ini dilakukan untuk mendapatkan 5 x 10^5 sel /ml.

Mencit dimatikan dengan dislokasi cervix. Mencit diletakkan dalam posisi terlentang, kulit bagian perut dibuka dan selubung peritoneumnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Kemudian diinjeksi 10 cc larutan RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum. Peritoneum dipijat pelan untuk mendapatkan makrofag yang cukup banyak. Setelah itu cairan disedot kembali sampai habis dan dimasukkan

dalam tabung. Cairan kemudian disentrifus 1200 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah sel dicuci dengan PBS sampai bersih.

Setelah supernatan dibuang, ditambahkan 3 ml medium RPMI komplit yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10% ditambah penicillin pada pellet yang didapat. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam acetat untuk melisiskan sel darah merah, kemudian diresuspesikan lagi dengan medium komplit RPMI sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan 2,5 x 10^6 /ml. Setelah itu kultur sel dalam medium komplit di dalam *microplate* 24 sumuran yang bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (coverslip), setiap sumuran 200 µl (kepadatan 5 x 10^5 sel/ml). Kemudian diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu 37° C selama 30 menit, selanjutnya ditambahkan medium RPMI komplit 1ml tiap sumuran dan diinkubasikan lagi selama 2 jam. Setelah itu sel dicuci RPMI 2 kali dan ditambahkan medium komplit 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

3.9.2.2. Prosedur Pemeriksaan Fagositosis Makrofag Dengan *Latex Beads* [50]

- Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada mikroplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200 µl ($5x10^5$ sel), inkubasikan dalam inkubator CO_2 5% 37^0 selama 30 menit.
- Tambahkan medium komplit 1ml/sumuran, inkubasikan selama 2 jam
- Sel dicuci dengan RPMI 2x, kemudian tambahkan medium komplit 1ml/sumuran, inkubasikan selama 24 jam
- Makrofag yang telah dikultur sehari sebelumnya dicuci dengan RPMI 2x
- *Latex beads* diresuspensikan sehingga mendapakan konsentrasi $2,5x10^7$/ml

- Tambahkan suspensi latex 200 µl/sumuran, inkubasi selama 60 menit pada inkubator CO_2 5% 37^0
- Cuci 3x dengan PBS untuk menghilangkan partikel yang tidak difagosit,
- Keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan methanol absolute
- Setelah kering, coverslip dipulas dengan Giemsa 20% selama 30 menit
- Cuci dengan aquadest, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar
- Setelah kering dimounting pada *object glass*
- Kemampuan fagositosis dihitung dari jumlah *latex beads* yang difagosit oleh 200 sel makrofag dihitung 3x.

3.9.2.3.Prosedur Pemeriksaan Produksi NO [51]

Untuk memeriksa produksi nitrit digunakan 96 sumuran *microplate ELISA* dengan dasar rata. Adapun caranya adalah sebagai berikut :

- Masukkan 100 µl reagen Griess (reagen *chromogenic)* dalam setiap sumuran
- Pipet 100 µl supernatan yang hendak dites atau standar NaNO dalam plate dengan duplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko.
- Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan *chromophore* dan stabilisasi.
- Ukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan automated microplate reader (misal Bio-Tek model EL312)
- Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana / simpel dari pembacaan standar NaNO. Hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurva

standar atau rumus regresi. Bila tidak tersedia *microplate reader*, dapat digunakan spektrofotometer konvensional.

- Campur reagen Griess dengan supernatan atau standar NaNO dalam volume yang sama
- Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan warna
- Ukur absorbansi pada 550 nm (540-550nm)
- Buat kurva standar dan hitung konsentrasi nitrit seperti diatas.

Adapun cara pembuatan reagen *chromogenic* dan standar sebagai berikut:

Reagen chromogenic

Merupakan campuran 1 volume Reagen I dan 1 volume Reagen II sebagai berikut:

Reagen I: N-(--naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1 gram dilarutkan dalam 100 cc air suling

Reagen II: Sulfanilic Acid 0,2 gram dilarutkan dalam 100 ml HCl 4N

Reagen I dan II tersebut harus disimpan didalam lemari pendingin, ruangan gelap dan digunakan sebelum 6 minggu/ sebelum reagen berubah warna menjadi gelap. Setiap kali pemeriksaan harus disiapkan fresh (segar).

Standar

Larutkan 69 mg $NaNO_2$ dalam 500 ml air suling (stok 2mM)

Buat pengenceran bertingkat dari 0-200 µM dengan cara melarutkan larutan stok dengan medium yang sama dengan medium kultur

3.9.2.4 Prosedur Pemeriksaan ROI (O_2^-) dengan Cara Reduksi NBT [50]

Prinsip :

Makrofag distimulasi dengan PMA sehingga mensekresi Anion Superoksid (O_2) yang akan mengoksidasi NBT menjadi presipitat formazan (tidak larut) dengan pewarnaan Neutral Red tampak butir-butir biru dilihat dengan mikroskop cahaya

Cara pemeriksaan sebagai berikut :

- Suspensi makrofag yang telah dihitung dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200µL (5 x 10^5 sel), diinkubasikan dalam inkubator CO_2 5% 37°C selama 30 menit.
- Tambahan medium komplet 1 ml/ sumuran, diinkubasikan selama 2 jam.
- Sel dicuci dengan RPMI 2 x , kemudian tambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran diinkubasikan 24 jam.
- Setelah itu tambahkan 500 µL larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja.
- Inkubasikan dalam inkubator $CO_2$5% 37°C selama 60 menit
- Sel dicuci dengan PBS 3 x, dikeringkan pada suhu kamar.
- Fiksasi dengan methanol absolut selama 2-3 menit
- Setelah kering warnai dengan 2 % Neutral Red Sol. selama 15 menit, cuci dengan aquades keringkan pada suhu kamar.
- Coverslip dimounting pada kaca obyek dengan canada balsam atau DPX
- Sel dengan reduksi NBT (biru) dihitung persentasi dan derajatnya. Derajat presipitat didasarkan pada persentase luas presipitat tiap sel, dengan kriteria sebagai berikut:

Derajat 1 : luas presipitat < 25%

Derajat 2 : luas presipitat 25-50%

Derajat 3 : luas presipitat 50-75%

Derajat 4 : luas presipitat > 75%

Masing-masing sediaan dibaca pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-rata.

3.9.3. PEMERIKSAAN HITUNG KUMAN DARI KULTUR ORGAN HEPAR [52]

- Ambil sebagian hepar pada tempat yang sama untuk masing-masing sampel kemudian ditimbang
- Hancurkan jaringan dalam mortir dengan menambahkan 1 cc NaCl fisiologis steril
- Siapkan 6 buah tabung untuk pengenceran bertingkat yang masing-masing berisi 4,5 ml NaCl fisiologis steril.
- Masukkan 0,5 ml larutan hepar yang telah dihancurkan kedalam tabung 1 dan homogenisasi dengan menggunakan vortex
- Ambil 0,5 ml larutan dari tabung 1 kemudian masukkan ke tabung 2 dan seterusnya dengan prosedur yangsama sampai tabung 6 sehingga telah dilakukan pengenceran 1:10 untuk tiap pengenceran. Pada tabung terakhir diambil 0,5 ml untuk dibuang. Semua proses ini dilakukan didalam laminar flow.
- Inokulasikan 0,1 ml dari masing-masing tabung pengenceran pada medium Mc Conkey dengan cara *surface spreading,* kemudian diinkubasikan dalam incubator 37^0 C selama 24 jam.

- Hitung jumlah koloni kuman pada masing-masing plate pengenceran yang berisi 30-300 Cfu
- Hitung *Colony forming unit* (Cfu)/gram jaringan dengan rumus sbb:

$$\frac{\textbf{Jumlah Cfu x Pengenceran x 10(karena inokulasinya hanya 0,1 ml/plate)}}{\textbf{Berat jaringan}}$$

3.9.4. PEMERIKSAAN SURVIVAL

Pengamatan dilakukan pada kelompok mencit yang mendapatkan pakan standar dan diinokulasi *S. typhimurium* hidup 10^7 (kelompok K (+)) dan kelompok perlakuan P2, P3, P4, dan P5. Pengamatan dilakukan sampai hari ke 21. Pengamatan dilakukan tiap hari dan dicatat kematiannya dan dihitung % survivalnya tiap hari pengamatan perkelompok.

3.10. ANALISIS DATA

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari tujuh kelompok perlakuan dianalisis normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Distribusi data berat limpa normal sehingga diuji dengan one way ANOVA. Pada penelitian ini didapatkan ada data yang distribusinya tidak normal yaitu pada pemeriksaan jumlah limfosit, jumlah relatif limfoblas, fagositosis, produksi NO, dan hitung kuman sehingga dilakukan analisis nonparametrik dengan uji *Kruskal Wallis* untuk melihat perbedaan pada keempat kelompok. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji Mann Whitney U. Demikian juga hasil pemeriksaan ROI, yang berupa data berskala ordinal sehingga dilakukan analisis non parametrik Kruskal Wallis

dilanjutkan uji Mann Whitney. Data survival dianalisis dengan metode Kaplan Meier, dan adanya perbedaan antar kelompok dianalisis dengan uji Logrank. Semua analisis statistic tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 10.0 for windows.* [53,54,55] Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila $p<0,05$.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL

4.1.1. Respon Proliferasi Limfosit

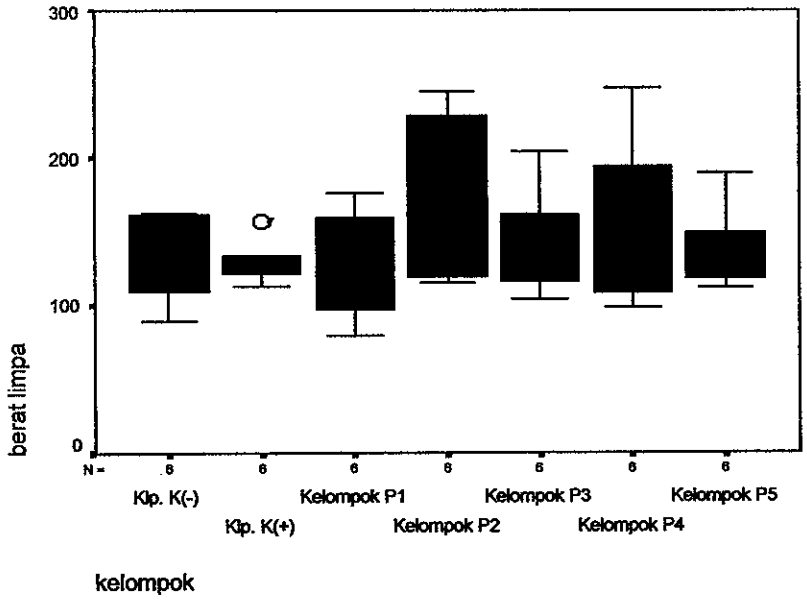
4.1.1.1 Berat Limpa

Berat limpa diukur dengan timbangan elektronik dalam satuan milligram (mg), hasil pengukuran dapat dilihat dalam tabel 3 dan gambar 9.

Tabel 3 . Hasil Analisis Berat Limpa

Kelompok	N	Rerata	Std Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
Kontrol (-)	6	126,1	3,0	1,2	9,5	157,8	89,4	163,0
Kontrol (+)	6	129,8	1,5	6,2	113,8	145,7	112,9	157,0
P1	6	126,3	3,7	1,5	8,8	164,8	78,8	176,0
P2	6	178,5	5,5	2,3	120,7	236,3	115,2	245,3
P3	6	140,5	3,7	1,5	101,5	179,5	104,0	203,9
P4	6	151,0	5,8	2,4	9,0	211,9	98,2	247,3
P5	6	136,1	2,9	1,2	105,2	167,0	111,7	190,0

Berat limpa yang paling tinggi dijumpai pada kelompok P2 yaitu kelompok yang mendapatkan pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu (P2) yaitu 178,47±5,51 mg. Berat limpa kelompok K(-) reratanya paling rendah yaitu126,13± 3,02 mg (Tabel 3).



Gambar 9. Grafik Boxplot Berat Limpa

Grafik *boxplot* menggambarkan bahwa median berat limpa kelompok K(-), K(+), P1, P3, P4, P5 hampir sama, sedangkan pada kelompok P2 tampak berbeda dengan kelompok lain.(gambar 9)

Dari uji normalitas, didapatkan distribusi data normal sehingga uji beda dilakukan dengan ANOVA. Dari uji tersebut terlihat bahwa meskipun berat limpa semua kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol K(+) yang reratanya 129,77±1,52 ternyata tidak didapatkan perbedaan bermakna berat limpa antara kelompok perlakuan dengan kontrol K(-), K(+) dengan $p > 0.05$ ($p=0,277$). Hal ini tidak sesuai dengan hipotesis.

4.1.1.2 Jumlah Limfosit di Limpa

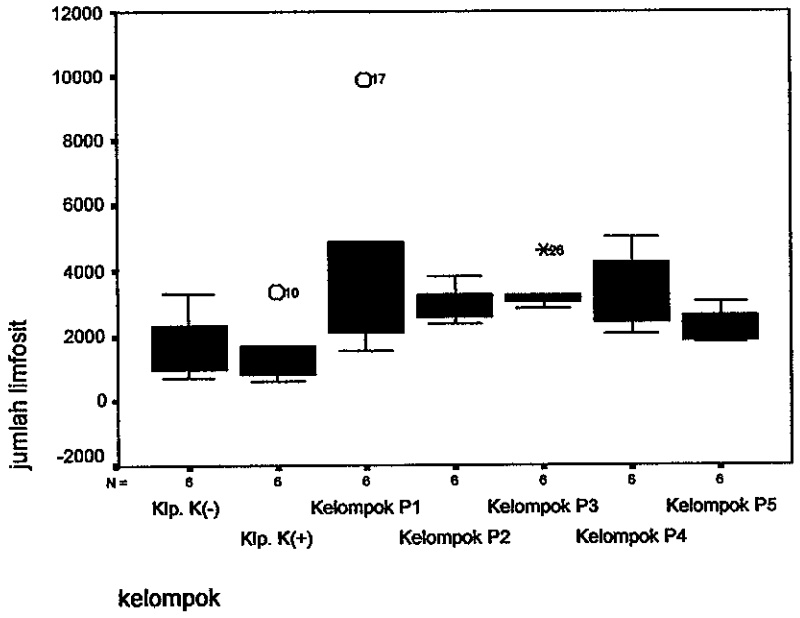
Jumlah limfosit dihitung dari jumlah limfosit dalam larutan limpa/cc. Hasil pengukuran dan analisisnya tampak dalam tabel 4 dan 5 serta gambar 10.

Jumlah limfosit tertinggi dijumpai pada kelompok P1 yaitu kelompok yang diberi L-arginin tanpa diinfeksi yaitu ($3998,5x10^4$)± ($3108,3\ x10^4$) sedangkan terendah pada kelompok kontrol K(+) yaitu ($1445,8x10^4$) ± ($1009,7\ x10^4$). (Tabel 4)

Tabel 4 . Hasil Analisis Jumlah Limfosit

Jumlah Limfosit ($x10^4$)

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
Kontrol (-)	6	1680,2	965,0	394,0	667,2	2692,9	720	3296
Kontrol (+)	6	1445,8	1009,7	412,2	286,2	2505,5	591	3354
P1	6	3998,5	3108,3	1268,9	736,5	7260,5	1563	9888
P2	6	3348,0	529,7	216,3	2523,4	3635,3	2388	3840
P3	6	3079,3	639,2	261,0	2677,2	4018,8	2816	4608
P4	6	3655,7	1142,4	466,4	2456,8	4854,6	2080	5040
P5	6	2256,3	500,7	204,4	1730,9	2781,7	1812	3072



Gambar 10. Grafik Boxplot Jumlah Limfosit

Gambaran pada grafik boxplot jelas tampak median kelompok P1, P2, P3, P4, dan P5 lebih tinggi dibandingkan kontrol baik K(-) maupun K(+). Median kelompok P1, P2, P3, P4, P5 tampak hampir sama. (Gambar 10)

Dari uji Kruskal Wallis didapatkan perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan (p=0,007), tampak bahwa kelompok yang diberi L-arginin jumlah limfositnya lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini dapat dilihat dari rerata jumlah limfosit semua kelompok yang diberi L-arginin lebih besar dibandingkan rerata kelompok kontrol K(-) dan K(+). Dari uji beda nyata terkecil Mann-Whitney, jumlah limfosit yang perbedaannya bermakna dibandingkan kelompok kontrol K(+) adalah kelompok P1 (p= 0,037), kelompok P2 (p=0,037), kelompok P3 (p=0,037) dan kelompok P4 (p=0,010). Sedangkan kelompok P5 terlihat adanya kecenderungan berbeda bermakna dibandingkan K(+) dengan p= 0,055.(Tabel 5) Dengan demikian hipotesis terbukti

Tabel 5. Uji Mann Whitney Terhadap Jumlah Limfosit di Limpa

	K(-)	K(+)	P1	P2	P3	P4	P5
K(-)		0,631	0,055	0,037*	0,037*	0,016*	0,200
K(+)	0,631		**0,037***	**0,037***	**0,037***	**0,010***	**0,055**
P1	0,055	**0,037***		0,631	0,631	0,631	0,262
P2	0,037*	**0,037***	0,631		0,688	0,262	0,025*
P3	0,037*	**0,037***	0,631	0,688		0,631	0,010*
P4	0,016*	**0,010***	0,631	0,262	0,631		0,037*
P5	0,200	**0,055**	0,262	0,010*	0,010*	0,037*	

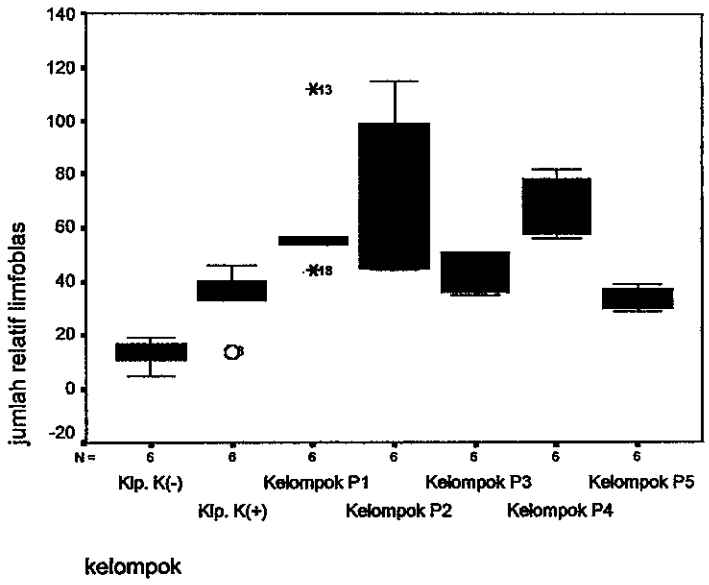
4.1.1.3 Jumlah Relatif Limfoblas

Jumlah relatif limfoblas dihitung dari preparat hapus splenosit dengan pengecatan Giemsa yang didapat dari perbandingan jumlah limfoblas dalam 200 sel (limfoblas+limfosit). Untuk jelasnya lihat lampiran gambar 1a&b. Data hasil pemeriksaan dan analisisnya tampak dalam tabel 6 dan 7 serta gambar 11.

Tabel 6 . Hasil Analisis Jumlah Relatif Limfoblas

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
Kontrol (-)	6	12,8	4,5	2,0	7,6	18,1	5,0	19,0
Kontrol (+)	6	33,6	10,8	4,4	22,4	45,0	14,0	46,0
P1	6	63,0	24,5	10,0	37,3	88,7	44,0	112,0
P2	6	76,2	30,4	12,4	44,3	108,1	44,0	115,0
P3	6	43,5	7,1	2,9	36,1	50,9	35,0	51,0
P4	6	68,0	11,3	4,6	56,1	79,9	56,0	82,0
P5	6	33,2	4,0	1,6	28,9	37,4	29,0	39,0

Dari tabel tampak bahwa rata-rata jumlah relatif limfoblas tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu P2 (76,2 ± 30,4) sedangkan yang terendah pada kelompok L-arginin yang diberikan pasca infeksi P5 (33,2 ± 4,0).(Tabel 6).



Gambar 11. Grafik Boxplot Jumlah Relatif Limfoblas

Grafik boxplot menunjukkan median kelompok P1, P2, P3 dan P4 lebih tinggi dari kelompok K(+), sedangkan median kelompok P5 hampir tidak berbeda dengan K(+). (Gambar 11)

Dari uji Kruskal Wallis didapatkan p=0,0001 dan uji Mann Whitney tampak bahwa jumlah relatif limfoblas pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kontrol K(-) maupun K(+). Dari semua kelompok yang diberi L-arginin seluruhnya berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol K(-), sedangkan yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok K(+) kelompok P1 (p= 0,006), kelompok P2 (p=0,006), dan kelompok P4 (p=0,004). Jumlah relatif limfoblas kelompok P3 cenderung berbeda bermakna dibanding K(+) dengan p=0,053. Sedangkan jumlah relatif limfoblas kelompok P5 meskipun lebih rendah dari kelompok K(+) tetapi tidak berbeda secara bermakna p= 0,378. Hal ini sesuai dengan hipotesis

Tabel 7. Hasil Uji Mann Whitney Jumlah Relatif Limfoblas

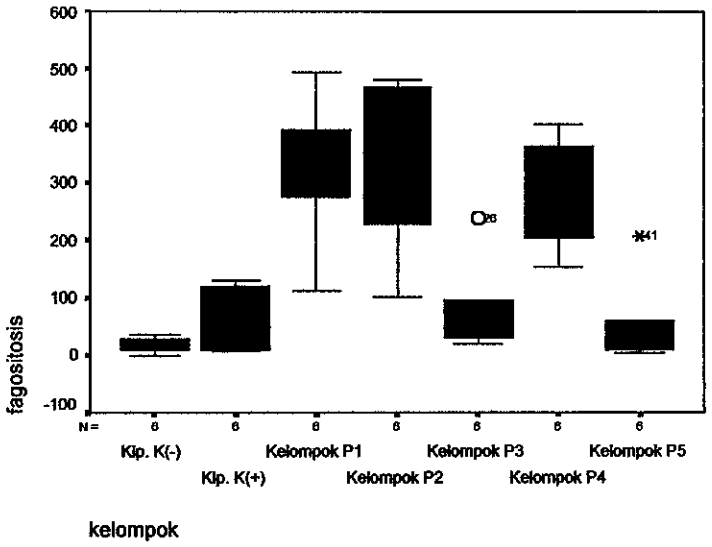
	K(-)	K(+)	P1	P2	P3	P4	P5
K(-)		0,013*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*	0,004*
K(+)	0.013*		**0,006***	**0,006***	**0,053**	**0,004***	**0,378**
P1	0,004*	**0,006***		0,470	0,016*	0,092	0,004*
P2	0,004*	**0,006***	0,470		0,054	0,688	0,004*
P3	0,004*	**0,053**	0,016*	0,054		0,004*	0,025*
P4	0,004*	**0,004***	0,092	0,688	0,004*		0,004*
P5	0,004*	**0,378**	0,004*	0,004*	0,025*	0,004*	

4.1.2 Kemampuan Fagositosis Makrofag

Kemampuan fagositosis makrofag dihitung berdasarkan jumlah partikel latex yang difagosit/200 makrofag. Gambar fagositosis dapat dilihat pada lampiran 2a-e. Hasil pembacaan dan analisisnya tampak pada tabel 8 dan 9 serta gambar 12.

Tabel 8 . Hasil Analisis Kemampuan Fagositosis

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Intervak Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas atas		
Kontrol (-)	6	18,2	12,5	5,1	5,0	31,3	0,0	35,0
Kontrol (+)	6	59,0	56,5	23,0	-0,3	118,3	7,0	128,0
P1	6	320,0	128,7	52,6	184,9	455,1	110,0	494,0
P2	6	324,5	158,1	64,5	158,6	490,4	100,0	480,0
P3	6	79,5	82,5	33,7	-7,0	166,0	20,0	238,0
P4	6	268,5	95,4	38,9	168,4	368,6	153,0	402,0
P5	6	52,0	79,0	32,3	-30,9	134,9	4,0	208,0



Gambar 12. Grafik Boxplot Kemampuan Fagositosis

Dari tabel 8 tampak bahwa kemampuan fagositosis terbesar dijumpai pada kelompok P2 yaitu kelompok L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu P2 yang rata-ratanya mencapai 324,5±158,1, Sedangkan yang terkecil didapatkan pada kelompok P5 yaitu 52,0±79,0. Nilai median yang digambarkan grafik boxplot pada kelompok P1, P2 dan P4 tampak hampir sama dan jauh berbeda dibandingkan K(+). Median P3 dan P5 hampir sama dengan K(+). (Gambar 12)

Dengan uji Kruskal Wallis (p=0,0001) yang dilanjutkan dengan uji Mann Whitney ternyata L-arginin dapat meningkatkan kemampuan fagositosis. Hal ini dapat dilihat bahwa rata-rata kemampuan fagositosis semuanya lebih besar dari kontrol K(+) yang hanya (59,0± 12,5), kecuali L-arginin yang diberikan setelah. infeksi yang reratanya lebih rendah namun tidak berbeda bermakna (p=1,000). Dari seluruh perlakuan yang perbedaannya bermakna dibanding kontrol K(+) adalah kelompok P1 (p=0,010), kelompok P2 (0,010), dan kelompok P4 (p=0,004). Dengan demikian hipotesis terbukti.

Tabel 9. Hasil Uji Mann Whitney Terhadap Kemampuan Fagositosis

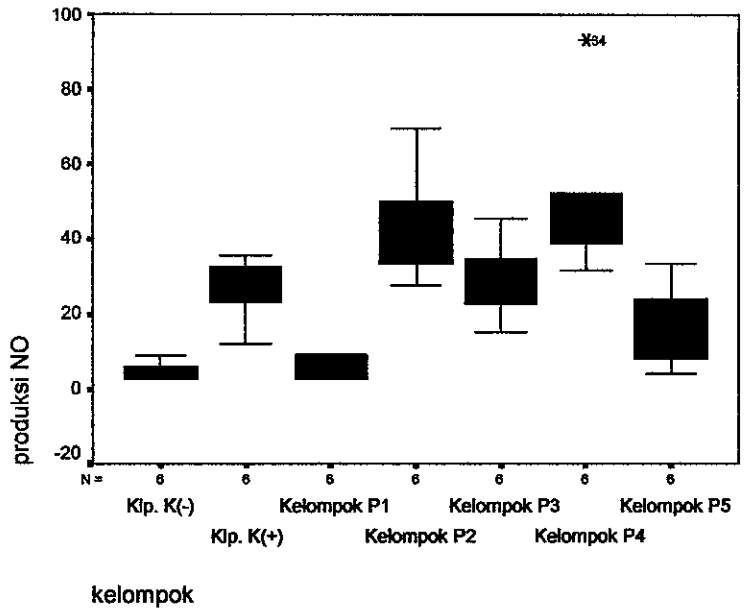
	K(-)	K(+)	P1	P2	P3	P4	P5
K(-)		0,522	0,004*	0,004*	0,037*	0,004*	0,873
K(+)	0,522		**0,010***	**0,010***	0,522	**0,004***	0,521
P1	0,004*	**0,010***		0,873	0,006*	0,423	0,006*
P2	0,004*	**0,010***	0,873		0,016*	0,423	0,006*
P3	0,037*	0,522	0,006*	0,016*		0,016*	0,149
P4	0,004*	**0,004**	0,423	0,423	0,016*		0,010*
P5	0,873	0,521	0,006*	0,006*	0,149	0,010*	

4.13. Produksi NO Makrofag

Produksi NO makrofag diukur dari supernatan kultur makrofag masing-masing kelompok dengan reagens Griess dengan satuan μM. Hasil pemeriksaan produksi NO makrofag dan analisis tampak dalam tabel 10 dan 11 serta gambar 13.

Tabel 10 . Hasil Analisis Produksi NO

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Bawah	Batas Atas		
Kontrol (-)	6	4,9	2,5	1,0	2,3	7,5	2,8	9,0
Kontrol (+)	6	26,9	8,4	3,4	18,2	35,7	12,1	35,8
P1	6	6,9	3,2	1,3	3,6	10,2	2,8	9,0
P2	6	44,3	15,0	6,1	28,6	60,0	27,5	69,7
P3	6	28,0	10,7	4,4	16,8	39,2	15,4	45,7
P4	6	50,8	21,9	8,9	27,8	73,8	31,6	93,2
P5	6	18,3	11,1	4,5	6,7	29,9	3,9	33,6



Gambar 13. Grafik Poduksi NO

Dari hasil pemeriksaan tampak produksi NO tertinggi dijumpai pada kelompok P4 dan terendah pada kelompok P5. (Tabel 10) Median pada grafik boxplot menunjukkan median produksi NO kelompok P2 dan P4 tampak lebih tinggi dibandingkan kelompok K(+), sedangkan pada kelompok P3 dan P5 terlihat tidak berbeda dibandingkan kelompok K(+). (Gambar 13)

Dari uji Kruskal Wallis (p=0,0001) dan dilanjutkan uji Mann Whitney tampak bahwa pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu (kelompok P2), pra infeksi selang-seling (P3) dan pra/pasca infeksi (P4) akan meningkat, hal ini ditunjukkan adanya rerata produksi NO yang lebih besar dibandingkan dibandingkan kontrol K(+) yang rata-ratanya 26,9±8,4. Dari seluruh kelompok perlakuan tersebut yang berbeda bermakna dibanding kontrol adalah kelompok perlakuan P2 (p=0,037) dan P4 (p= 0,010). (Tabel 11) Dari penelitian ini didapatkan bahwa kelompok L-arginin yang diberikan pra/pasca infeksi P4 rata-rata produksi NO nya paling besar (50,8±21,9) walaupun tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu P2 (p=0,631)).

Sedangkan pada kelompok pemberian L-arginin pasca infeksi (P5) produksi NO nya meskipun lebih rendah dibandingkan kontrol tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna dibandingkan K(+) dengan nilai p=0,200.Dengan demikian hal ini sesuai hipotesis.

Tabel 11. Hasil Uji Mann Whitney Produksi NO

	K(-)	K(+)	P1	P2	P3	P4	P5
K(-)		0,004*	0,271	0,004*	0,004*	0,004*	0,024*
K(+)	0,004*		**0,004***	**0,037***	0,873	**0,010***	0,200*
P1	0,271	**0,004***		0,004*	0,004*	0,004*	0,106
P2	0,004*	**0,037***	0,004*		0,037*	0;631	0,006*
P3	0,004*	0,873	0,004*	0,037*		0,025*	0,150
P4	0,004*	**0,010***	0,004*	0,631	0,025*		0,006*
P5	0,024*	0,200*	0,106	0,006*	0,150	0,006*	

4.1.4 Produksi ROI Makrofag

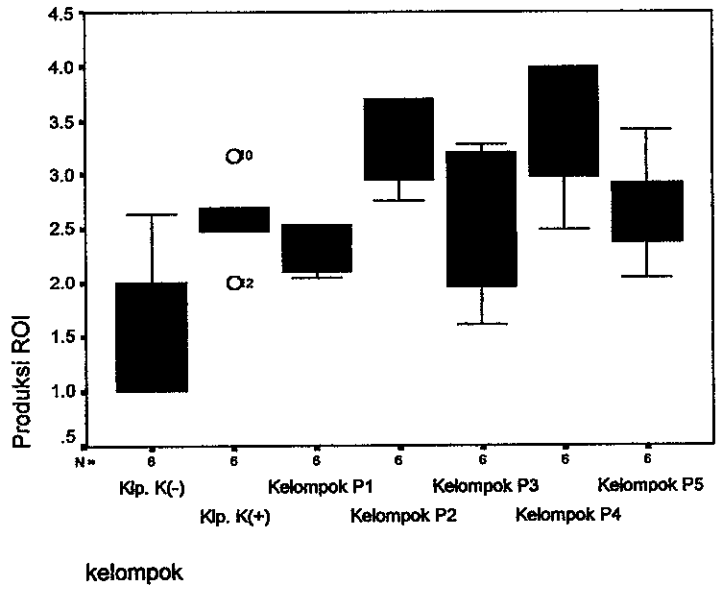
Produksi ROI diperiksa dengan menggunakan metode *Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction assay* menurut Leijh (1986). Derajat presipitat berdasarkan prosentase terbentuknya presipitat pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-rata, dinyatakan dalam derajat 1-4. Lihat pada lampiran 3 gambar a-d. Hasil pemeriksaan ROI dan analisis tampak dalam tabel 12 dan 13 serta gambar 14.

Produksi ROI tertinggi yang mendapat perlakuan terjadi pada kelompok P4 (3,4 +/- 0,6) sedangkan terendah terdapat pada kelompok K(-) 1,6 +/- 0,2. (Tabel 12)

UPT-PUSTAK-UNDIP

Tabel 12 . Hasil Analisis Produksi ROI

	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas Atas	Batas Bawah		
Kontrol (-)	6	1,6	0,7	0,3	0,9	2,2	1,0	2,6
Kontrol (+)	6	2,6	0,4	0,2	2,2	3,0	2,0	3,2
P1	6	2,3	0,2	0,1	2,0	2,5	2,0	2,5
P2	6	3,2	0,4	0,2	2,8	3,6	2,8	3,7
P3	6	2,5	0,7	0,3	1,8	3,3	1,6	3,3
P4	6	3,4	0,6	0,2	2,7	4,0	2,5	4,0
P5	6	2,7	0,5	0,2	2,2	3,2	2,0	3,4



Gambar 14. Grafik Boxplot Produksi ROI

Grafik boxplot pada gambar 14 menggambarkan median produksi ROI kelompok P2 dan P4 tampak berbeda dengan kelompok K(+) maupun K(-). Median kelompok P3 dan P5 tampak tidak berbeda dengan median kelompok K(+). (Gambar 14)

Karena data penghitungan ROI dalam skala ordinal, maka digunakan uji nonparametrik Kruskal Wallis yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil dengan uji Mann Whitney. Dari uji Kruskal Wallis (p=0,001) didapatkan bahwa pemberian L-arginin pada mencit yang diinfeksi akan meningkatkan produksi ROI, hal ini terlihat dari rata-ratanya yang lebih besar dari rata-rata kontrol K(+) yang hanya 2,6±0,4. Produksi ROI kelompok P2 dan P4 tampak berbeda secara bermakna dibandingkan kelompok K(+) dengan p= 0,016 dan p= 0,030. Sedangkan pada kelompok kontrol K(-) dan perlakuan P1 lebih rendah dibandingkan K(+).Hal ini sesuai dengan hipotesis 4.

Tabel 13. Uji Mann Whitney Produksi ROI

	K(-)	K(+)	P1	P2	P3	P4	P5
K(-)		0,020*	0,054	0,004*	0,037*	0,006*	0,016*
K(+)	0.020*		0,199	**0,016***	1,000	**0,030***	0,630
P1	0,054	0,199		0,004*	0,688	0,010*	0,125
P2	0,004*	**0,016***	0,004*		0,109	0,630	0,045*
P3	0,037*	1,000	0,688	0,109		0,065	0,749
P4	0,006*	**0,030***	0,010*	0,630	0,065		0,065
P5	0,016*	0,630	0,125	0,045*	0,749	0,065	

4.1.5. Hitung Kuman dari Kultur Hepar

Hitung kuman dihitung dari jumlah koloni yang tumbuh dari kultur jaringan hepar dengan pengenceran bertingkat (lihat lampiran 4).

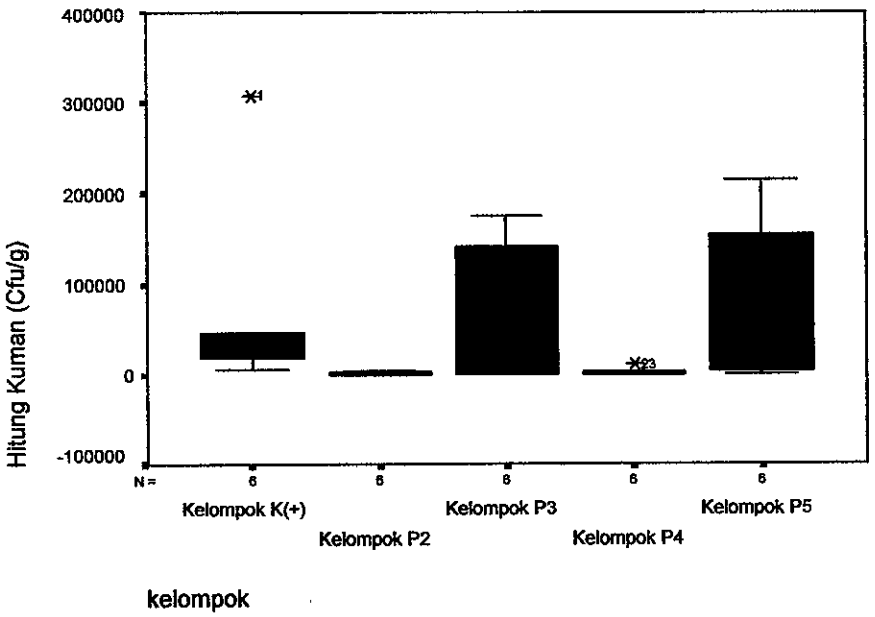
Jumlah Cfu/gram jaringan hepar dihitung berdasarkan rumus:

Jumlah koloni (Cfu)x pengenceran x 10(karena yang diinokulasi 0,1 ml)/gram hepar

Hasil hitung kuman dan analisis tampak dalam table 14 dan 15 serta gambar 15.

Tabel 14 . Hasil Analisis Hitung Kuman dari Kultur Organ Hepar

Kelompok	N	Rerata	Std. Deviasi	Std. Error	Interval Kepercayaan 95%		Minimum	Maksimum
					Batas bawah	Batas atas		
Kontrol (+)	6	73623,0	115362,0	47096,3	-47442,0	194688,0	5181	19469,0
P2	6	2035,8	1454,5	593,8	509,5	3562,2	108	3562,2
P3	6	55383,0	80771,6	32974,9	-29381,8	140147,8	203	140147,8
P4	6	3300,0	4107,7	1677,0	-1010,5	7611,1	234	7611,1
P5	6	79698,8	90750,8	37048,9	-15538,3	174935,9	1277	174935,9



Gambar 15. Grafik Boxplot Hitung Kuman dari Kultur Organ Hepar

Dari penelitian ini didapatkan bahwa kelompok L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu (P2) rerata hitung kuman organ heparnya paling rendah (2035,83±1454,480) Cfu/gram..(Tabel 14) Median hitung kuman yang terlihat pada grafik boxplot dari

kelompok P2, P3 dan P4 tampak lebih kecil dibandingkan kelompok K(+). Median P2,P3 dan P4 tampak tidak berbeda. Sedangkan median kelompok P5 tampak tidak berbeda dengan kelompok K(+). (Gambar 15) Karena distribusi hasil hitung kuman tidak normal maka dilakukan uji nonparametrik Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil dengan uji Mann Whitney. Dari uji Kruskal Wallis (p=0,028) dan uji Mann Whitney tampak bahwa pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu (P2), pra infeksi selang-seling (P3) dan pre/postreatmen (P4) dapat menurunkan hitung kuman, bila dilihat dari jumlah hitung kuman yang lebih rendah dibandingkan kontrol K(+) 73.623±115361,96 Cfu/gram. Dari ketiga kelompok perlakuan tersebut yang berbeda bermakna dibandingkan kontrol K(+), adalah kelompok P2 (p=0,004) dan kelompok P4 (p=0,006). (Tabel 15) Hasil ini sesuai dengan hipotesis 5.

Tabel 15. Hasil Uji Mann Whitney Hitung Kuman Organ Hepar

	K(+)	PII	PIII	PIV	PV
K(+)		**0,004***	0,262	**0,006***	0,749
PII	**0,004***		0,522	0,873	0,037
PIII	0,262	0,522		0,631	0,337
PIV	**0,006***	0,873	0,631		0,055
PV	0,749	0,037	0,337	0,055	

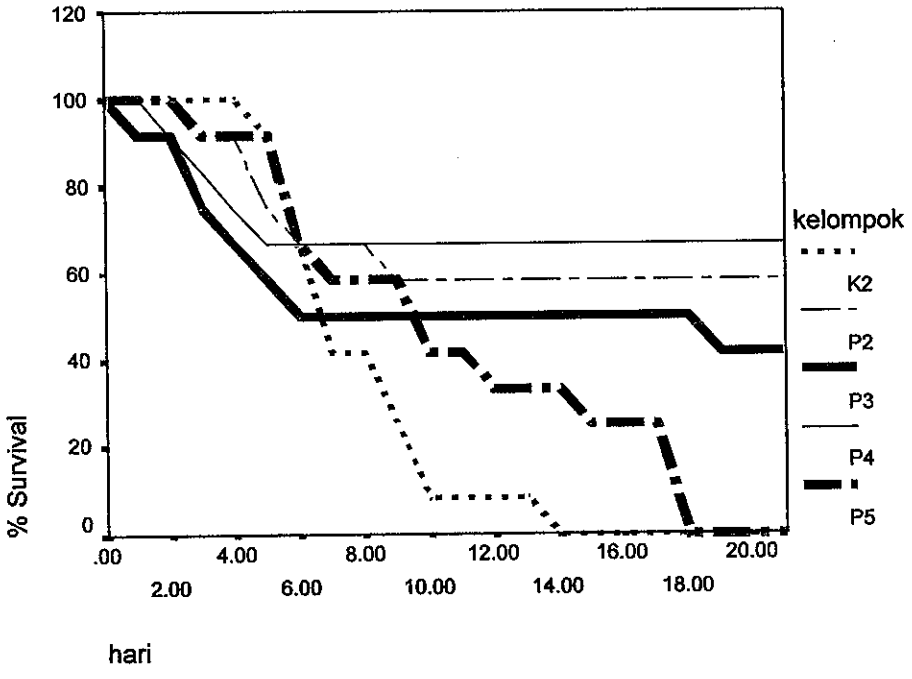
4.1.6. Survival

Survival diamati dari kematian mencit, kemudian dihitung % survival tiap harinya. Waktu pengamatan adalah 21 hari.

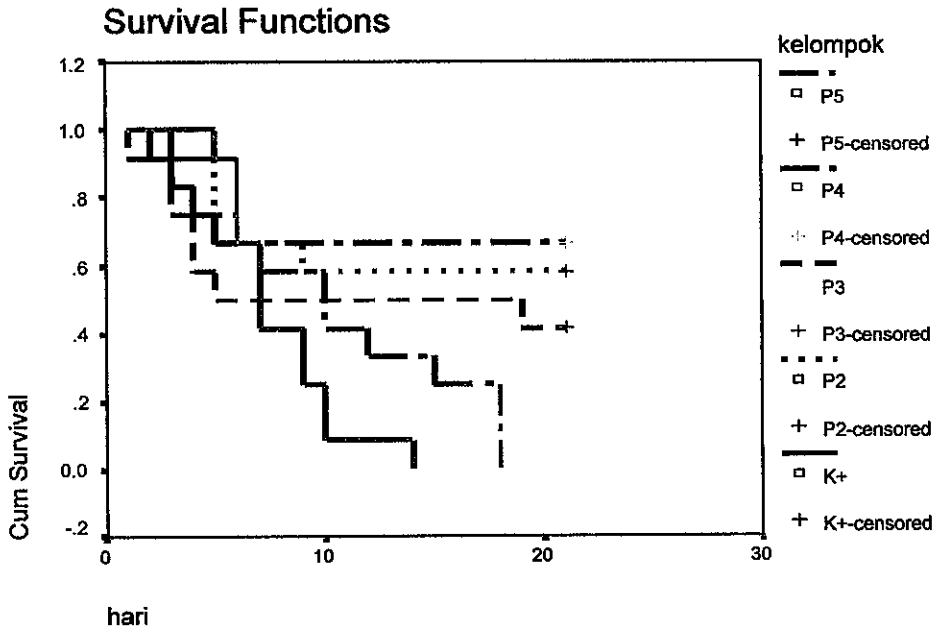
Hasil pengamatan survival tampak pada tabel 16 dan lampiran data survival, dan hasil analisis pada gambar 16 dan tabel 17 :

Tabel 16. Survival (%) pada hari ke 21 :

KELOMPOK	% SURVIVAL
Kelompok K(+)	0,00%
Kelompok P2	58,33%
Kelompok P3	41,67%
Kelompok P4	66,67%
Kelompok P5	0,00%



Gambar 16. Kurva Persentase Survival



Gambar 17. Kurva Survival Kaplan Meier

Survival tertinggi sampai hari ke 21 terdapat pada kelompok P4 sedangkan terendah pada kelompok K(+) dan P5. Survival kelompok P2, P3, dan P4 tampak lebih tinggi dibandingkan survival K(+). (Tabel 16) Pada kurva persentase survival tampak bahwa survival kelompok P2, P3, P4 dan P5 lebih tinggi dibandingkan kelompok K(+). Demikian juga dari kurva survival Kaplan Meier tampak survival P2, P3, P4 dan P5 tampak lebih tinggi dibandingkan K(+).(Gambar 17)

Dari uji beda Log Rank tampak bahwa survival kelompok yang diberi L-arginin pra infeksi kontinyu (P2) dan pra/pasca infeksi kontinyu (P4) menunjukkan survival yang berbeda secara bermakna dibandingkan K(+) dengan nilai p=0,011dan p=0,012. Sedangkan kelompok P3 dan P5 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. (Tabel 17) Dengan demikian hipotesis terbukti.

Tabel 17. Hasil Uji Logrank Survival

	K(+)	PII	PIII	PIV	PV
K(+)		**0,011***	**0,170**	**0,012***	**0,064**
PII	**0,011***		**0,253**	**0,721**	**0,036***
PIII	**0,170**	**0,253**		**0,260**	**0,161**
PIV	**0,012***	**0,721**	**0,260**		**0,013***
PV	**0,064**	**0,036***	**0,161**	**0,013***	

4.2. PEMBAHASAN

Masuknya bakteri intraseluler kedalam tubuh akan mengaktifasi respon imunitas seluler. Fase aktifasi ditandai dengan adanya respon proliferasi limfosit. Respon proliferasi limfosit dapat dinilai dari peningkatan produksi limfoblas yang akan menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah limfosit dan secara makroskopis dijumpai adanya pembesaran organ limfoid.

Pemberian L-arginin dapat menyebabkan bertambahnya berat limpa mencit, tetapi penambahan ini tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok yang hanya mendapatkan imunogen *Salmonella typhimurium*. Meskipun penelitian lain yang dilakukan oleh Barbul dkk (1980), mendapatkan hasil bahwa pemberian L-arginin HCl

selama 6 hari dengan dosis bervariasi (0,5-3%) dapat meningkatkan berat timus dan jumlah limfosit secara bermakna serta tidak *dose dependent*[17], tetapi pada penelitian tersebut L-arginin diberikan pada mencit yang tidak diinfeksi. Jadi pada penelitian ini pemberian L-arginin selama 7 hari belum dapat menambah berat jaringan limpa sehingga berat limpa mencit yang mendapat L-arginin atau tidak, tidak menunjukkan perbedaan.

Berat limpa yang tidak berbeda dibandingkan kontrol pada penelitian ini kemungkinan dapat disebabkan oleh efek L-arginin sebagai anti inflamasi sehingga pembesaran organ karena pengaruh inflamasi dapat ditekan. Efek antiinflamasi L-arginin ditunjukkan dalam penelitian yang dilakukan oleh Vos dkk , bahwa suplementasi L-arginin akan mengurangi inflamasi pada transplantasi ginjal.[56]

Pada penelitian ini jumlah limfosit di limpa pada kelompok perlakuan yang diberi L-arginin lebih tinggi dibandingkan kontrol dan secara statistik berbeda bermakna bila L-arginin diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling dan pra/pasca infeksi. Jumlah limfosit pada kelompok K(+) lebih rendah dibandingkan kontrol tanpa perlakuan K(-), meskipun tidak bermakna. Menurunnya jumlah limfosit pada kelompok K(+) sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Huang, dkk yang menyatakan bahwa NO menekan limfosit T terhadap mitogen *concanavalin-A* (con-A) dan secara invitro mensupresi kapasitas respon splenosit terhadap *Plaque forming cell* (PFC) eritrosit domba.[57] Hasil yang didapat pada penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ochoa dkk yang menyatakan bahwa pemberian L-arginin mampu menstimulasi proliferasi limfosit yang diduga melalui peningkatan reseptor spesifik dan peningkatan IL-2, yaitu sitokin yang menstimulasi proliferasi limfosit.[58] Peranan L-arginin terhadap proliferasi limfosit disamping melalui jalur GH, juga melalui jalur metabolik perantara

poliamin yang sangat dibutuhkan dalam proliferasi sel termasuk limfosit. Hasil pada penelitian ini kemungkinan karena efek L-arginin lebih kuat dalam menstimulasi IL-2 dan poliamin, sehingga mampu menutupi efek negatif yang ditimbulkan oleh NO dalam mensupresi limfosit. Pemberian L-arginin meningkatkan jumlah relatif limfoblas limpa. Diasumsikan bila jumlah relatif limfoblasnya tinggi maka pada kelompok tersebut akan didapatkan jumlah limfosit yang tinggi pula. Pada penelitian ini yang dapat meningkatkan jumlah limfoblas secara bermakna adalah apabila L-arginin diberikan pra/pasca infeksi dan pra infeksi kontinyu. Pada kelompok P3, jumlah limfoblas tidak berbeda bermakna dibandingkan K(+) tetapi ada kecenderungan meningkat (p=0,053). Sedangkan pada kelompok pemberian L-arginin pasca infeksi (P5) didapatkan hasil jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas yang tidak berbeda bermakna dengan K(+), dengan demikian L-arginin yang diberikan pasca infeksi belum dapat memacu respon proliferasi limfosit. Hal ini kemungkinan disebabkan karena L-arginin yang diberikan setelah infeksi tidak dapat menutupi efek NO pada infeksi Salmonella yang dapat menekan perkembangan limfosit *naive* menjadi limfoblas atau menghambat pada jalur pematangan limfoblas menjadi limfosit .

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri diawali dengan proses fagositosis yang kemudian diikuti dengan pembunuhan kuman (*bacterial killing).* Ada beberapa bakteria intraseluler yang dapat luput dari pencernaan tersebut, karena hanya makrofag yang teraktifkan yang dapat membunuh bakteria intraseluler. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dalam penelitian ini dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag. Hal ini sesuai dengan penelitian yang

terdahulu bahwa pemberian L-arginin invitro akan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag maupun polimorfonuklear (PMN) netrofil.[15]

Aktifitas makrofag sebagai fagosit diawali dengan proses kemotaksis kemudian penelanan dan dilanjutkan dengan pembunuhan bakteri intraseluler. Setelah proses fagositosis, makrofag akan membunuh bakteri dengan membentuk ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*) dan NO yang bersifat toksik terhadap bakteri. Pemberian L-arginin dapat meningkatkan NO, karena L-arginin merupakan prekursor NO. Meningkatnya produksi NO ini juga berkaitan dengan meningkatnya aktifitas makrofag sebagai sel fagosit yang sesuai dengan hasil penelitian ini. Pada penelitian ini produksi ROI yang meningkat setelah pemberian L-arginin berkaitan dengan meningkatnya aktifitas makrofag sebagai sel fagosit. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Moinard dkk, yang menyatakan bahwa arginin dapat memodulasi produksi ROI pada netrofil. Mekanisme pembangkitan ROI ini diduga melalui jalur yang sama yang melibatkan poliamin dan sintesa NO.[59]

Setelah aktifitas makrofag meningkat, maka pemberian L-arginin selanjutnya pada kelompok pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat menurunkan hitung kuman dari kultur organ hepar. Hal ini sejalan dengan peningkatan aktifitas makrofag dalam memfagosit, peningkatan produksi ROI dan NO yang merupakan mediator toksik terhadap bakteri, sehingga dimungkinkan bahwa makrofag yang ada dalam jaringan hepar juga akan teraktifkan dan terjadi penurunan jumlah kuman dalam jaringan hepar. Hasil hitung kuman yang rendah pada kelompok P2,dan P4, juga merupakan hasil dari peningkatan respon proliferasi limfosit yang nantinya juga berperan sebagai sel efektor.

Hitung kuman merupakan hasil interaksi berbagai respon imun, baik respon imun non spesifik maupun sub set sel T CD^{8+} dan CD^{4+}. Jika terjadi penurunan jumlah kuman diharapkan terjadi peningkatan survival.

Dari penelitian ini survival mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* tampak meningkat dengan pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi. Hal ini mendukung penelitian-penelitian sebelumnya bahwa suplementasi L-arginin pada penyakit infeksi dapat meningkatkan survival[60,61] Meningkatnya survival disebabkan oleh kemampuan sel-sel imunokompeten dalam menghambat pertumbuhan bakteri, yang dilakukan oleh makrofag teraktifasi sebagai sel fagosit yang berfungsi dalam pembunuhan bakteri, meskipun pada beberapa penelitian seperti dikutip oleh Keuter menyatakan bahwa makrofag teraktifasi bukanlah pembunuh yang baik. Tetapi melalui sitokin yang diproduksinya mampu meningkatkan *killing* sel lain yaitu sel NK dan granulosit terhadap *Salmonella.*[62] Hal ini mungkin dapat menjelaskan mengapa pada kelompok P3 dengan jumlah limfosit yang meningkat, tetapi aktifitas fagositosis, produksi NO dan ROI makrofag tidak terpacu ternyata hitung kuman dan survivalnya tidak meningkat. Hal ini terjadi karena tidak terpacunya fungsi *killing* oleh makrofag. Kemungkinan lain dapat disebabkan oleh tidak terpacunya makrofag pada kelompok ini dalam memproduksi sitokin yang berpengaruh terhadap fungsi *killing* sel NK dan granulosit terhadap *Salmonella.* Survival yang meningkat akibat pemberian L-arginin juga tidak lepas dari peran L-arginin dalam meningkatkan respon proliferasi limfosit yang juga berfungsi sebagai efektor (T CD^{8+}). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Madden dkk yang menyatakan bahwa meningkatnya survival kemungkinan berhubungan dengan pengaruh imunostimulasi sel T.[61] Sedangkan pada kelompok L-

arginin yang diberikan pasca infeksi (P5) tidak menunjukkan peningkatan respon imunitas seluler kemungkinan karena adanya penurunan absorbsi intestinal pasca infeksi atau karena adanya peningkatan penggunaan arginin sementara asupan Larginin belum mencukupi pembentukan respon imun. [61] Melihat keadaan ini pemberian L-arginin pasca infeksi tampaknya ada kemungkinan bisa meningkatkan respon imunitas seluler secara bermakna, apabila dosis pemberian dinaikkan.

Dari hasil yang didapat dari penelitian diatas, perlu diperiksa pola tipe sitokin yang berperan dalam mengaktifasi makrofag yaitu IFN-γ atau Il-12 yang mengaktifasi sel Th1, sel NK, sel T CD^{8+} (CTL). Aktifitas sel efektor sel T CD^{8+} (CTL) dapat juga diperiksa dengan melihat perforin yang dihasilkan. Perlu dicoba lebih lanjut penggunaan dosis yang bervariasi, karena dosis L-arginin kemungkinan berpengaruh terhadap keseimbangan kadar NO pada infeksi bakteri intraseluler, sehingga dapat ditentukan dosis aman.

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

V.A. KESIMPULAN

1. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan respon proliferas limfosit yang dilihat dari:
   a. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan jumlah limfosit limpa mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna.
   b. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra/pasca infeksi dapat meningkatkan jumlah relatif limfoblas secara bermakna.

      Tetapi

   c. Pemberian L-arginin sebagai pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi tidak meningkatkan berat limpa.
2. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna.
3. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan produksi NO makrofag mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna.

4. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan produksi ROI makrofag mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna
5. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat menurunkan jumlah hitung kuman organ hepar mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna.
6. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan survival mencit BALB/c yang diinokulasi *Salmonella typhimurium* secara bermakna.

V.B SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian klinik pada manusia untuk mengetahui efek L-arginin terhadap infeksi *Salmonella typhimurium*
2. Perlu penelitian lanjut untuk melengkapi konsep pemikiran penelitian ini yaitu:
   - Penggunaan dosis L-arginin yang bervariasi
   - Pemeriksaan IFN-γ, IL-12 dan Perforin
   - Pemeriksaan histopatologi hepar

BAB 6
RINGKASAN

Penyakit demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius di negara-negara berkembang dengan higiene dan sanitasi kurang termasuk Indonesia. Penyakit ini dapat memberikan dampak yang kurang baik dengan menimbulkan berbagai macam komplikasi, meskipun pengobatan dengan antibiotik yang tepat dapat berhasil dengan baik. Kegagalan pengobatan pada demam tifoid disebabkan banyak faktor yaitu faktor *host* dan bakteri. Faktor *host* terutama dipengaruhi oleh sistem imunitas dan genetik. Sedangkan faktor bakteri, disamping ditentukan oleh virulensi, juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti kemampuan bakteri bermutasi, bakteri menghasilkan produk yang dapat mensupresi sistem imun dsb. Oleh karena itu strategi terapi pada demam tifoid, disamping antibiotik perlu juga dipikirkan terapi pendamping dengan imunostimulan, diantaranya dengan imunonutrisi seperti L-arginin yang dikenal mempunyai kemampuan sebagai imunomodulator.

Permasalahan dalam penelitian ini dirumuskan: Apakah pemberian L-arginin dengan jadwal yang berbeda (pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dan pasca infeksi) berpengaruh terhadap peningkatan respon imunitas seluler yang dilihat dari respon proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO makrofag, hitung kuman serta survival pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* ?

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi dan pasca infeksi

dapat meningkatkan respon imunitas seluler mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan L-arginin, dinilai dari: respon proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO makrofag, hitung kuman serta survival.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental sesungguhnya dengan rancangan *the post test only control group design* pada hewan coba mencit BALB/c dari UPHP FKH UGM Yogyakarta, umur 8-10 minggu, sehat, berat badan 30-40 gram, jenis kelamin jantan, tanpa kelainan anatomis. Selama penelitian diberi makan dan minum secukupnya. Makanan yang diberikan adalah pakan standard.

Sebanyak 102 ekor mencit yang telah diadaptasi 1 minggu dibagi secara acak menjadi 42 ekor untuk pemeriksaan respon imunitas seluler dan 60 ekor untuk pengamatan survival. Empat puluh dua ekor dibagi acak menjadi 7 kelompok perlakuan: A) Kontrol tanpa perlakuan (-); B) Diinfeksi *Salmonella typhimurium* (Kontrol+); C) Diberi L-arginin 7 hari tanpa infeksi (P1); D) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi kontinyu (P2); E) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi selang-seling (P3); F) Diberi L-arginin 7 hari pra infeksi kontinyu dan pasca infeksi kontinyu 3 hari setelah inokulasi *Salmonella typhimurium* (P4); G) Diberi L-arginin selama 7 hari, sehari setelah diinfeksi/ pasca infeksi (P5). L-arginin diberikan dalam air minum dengan kadar 1,2% (w/v). Sedangkan Salmonella typhimurium yang disuntikkan sebanyak 10^6 intraperitoneal. Kelompok K(+), P2, P3 dan P4 diinfeksi pada hari ke 8 dan hari ke 11 dibunuh, sedangkan kelompok P5 diinfeksi hari ke 2 dan dibunuh hari ke 8.Kelompok K(-) dan P1 dibunuh pada hari ke 8. Setelah dibunuh dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit

(dilihat dari berat limpa, jumlah limfosit di limpa dan jumlah relatif limboblas di limpa), kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO makrofag dengan metode baku. Hepar diambil dan dilakukan kultur untuk menghitung jumlah kuman yang hidup.

Sedangkan survival diamati pada kelompok perlakuan K(+), P2, P3, P4 dan P5 selama 21 hari. Dosis *Salmonella typhimurium* yang digunakan untuk pengamatan survival adalah 10^7 intraperitoneal.

Data berat limpa dianalisis dengan uji ANOVA, sedangkan data jumlah limfosit, jumlah relative limfoblas, kemampuan fagositosis, produksi NO, produksi ROI dan hitung kuman dengan uji non parametrik Kruskal Wallis dilanjutkan Mann Whitney. Sedangkan survival dianalisis dengan metoda Kaplan Meier dan uji beda dengan uji Log rank.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian L-arginin meningkatkan berat limpa walaupun tidak bermakna p= 0,277. Hal ini kemungkinan disebabkan karena L-arginin mempunyai efek anti inflamasi sehingga pembesaran limpa menjadi tidak begitu nyata. Kemungkinan lain adalah pemberian L-arginin yang hanya 7-10 hari belum menimbulkan penambahan jaringan limpa. Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling, pra/pasca infeksi terbukti meningkatkan jumlah limfosit di jaringan limpa secara bermakna (p=0,037, p=0,037, p=0,010). Demikian juga pengaruhnya terhadap jumlah relatif limfoblas, pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi terbukti dapat meningkatkan secara bermakna (p=0,006, p=0,0040), sedangkan pemberian L-arginin pra infeksi selang-seling cenderung meningkat secara bermakna p=0,053.

Hal ini kemungkinan disebabkan oleh peran L-arginin sebagai prekursor NO, melalui jalur GH akan memacu proliferasi limfosit. Selain itu L-arginin merupakan metabolik perantara pembentukan poliamin yang dibutuhkan dalam proliferasi sel termasuk limfosit.

Pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi juga terbukti meningkatkan secara bermakna kemampuan fagositosis (p=0,010; p=0,004), produksi NO (p=0,037; p=0,010) dan ROI(p=0,016; p=0,030). Hal ini terkait dengan fungsi L-arginin sebagai prekursor NO yang merupakan *messenger molecul*. Diduga kenaikan ROI melalui jalur yang sama dengan pembentukan NO dan poliamin serta peningkatan fungsi fagosit. Hasil hitung kuman terlihat menurun secara bermakna pada kelompok L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi (p=0,004; p=0,006). Hasil ini berkaitan dengan peningkatan fungsi makrofag teraktifasi dalam proses fagositosis, dan peningkatan produksi NO dan ROI sebagai bakterisid. Menurunnya jumlah kuman pada penelitian ini karena aksi dari sel efektor lain seperti sel TCD8+ dan sel NK yang tampaknya sejalan dengan peningkatan respon proliferasi limfosit. Demikian juga hasil pengamatan survival menunjukkan bahwa pemberian L-arginin pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi meningkatan survival secara bermakna (p=0,011; p=0,012). Pada L-arginin yang diberikan pra infeksi selang-seling, meskipun respon proliferasi limfositnya meningkat tetapi kemampuan fagositosis, produksi NO dan ROI nya meningkat secara tidak bermakna sehingga tidak menampakkan penurunan hitung kuman dan peningkatan survival secara bermakna. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *killing* makrofag yang tidak terpacu maksimal juga

kemungkinan oleh tidak teraktifasinya produksi sitokin oleh makrofag yang memacu proses *killing* oleh sel NK dan granulosit.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu, pra infeksi selang-seling dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan respon proliferasi limfosit secara bermakna. Sedangkan L-arginin yang diberikan pra infeksi kontinyu dan pra/pasca infeksi dapat meningkatkan kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO,menurunkan hitung kuman dan meningkatkan survival secara bermakna. L-arginin yang diberikan pra infeksi selang-seling dapat meningkatkan kemampuan fagositosis, produksi ROI, NO,menurunkan hitung kuman dan meningkatkan survival secara tidak bermakna. Sedangkan L-arginin yang diberikan pasca infeksi tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan kelompok K(+).

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi akan peranan L-arginin sebagai nutrisi untuk meningkatkan imunitas seluler yng dapat digunakan sebagai terapi nutrisi dan terapi pendamping pada penyakit infeksi oleh kuman patogen intraseluler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soeharyo H. Faktor-faktor Yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Perdarahan dan Perforasi Pada Demam Tifoid. **Disertasi Untuk memperoleh gelar Doktor Universitas Diponegoro,** 1990
2. Keusch GT. Salmonellosis. In: Fauci et al. *Principles of Internal Medicine.* 14th ed. USA: Mc Graw-Hill Companies Inc, 1998: 950-3
3. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology.* Philadelphia: WB Saunders Co, 1997: 4-36, 97-114, 115-93, 213-381
4. Schwacha MG, Meissler JJ Jr, Eisenstein TK. Salmonella typhimurium Infection in Mice Induces Nitric Oxide-Mediated Immunosuppression Trough a Natural Killer Cell-Dependent Pathway. *Infect Immun* 1998; 66(12): 5862-6
5. Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H. Induction of Nitric Oxide Synthase and Xanthine Oxidase and Their Roles in Antimicrobial Mechanisms Againts Salmonella typhimurium Infection in Mice. *Infect Immun* 1997; 65(7): 2932-40
6. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial Action of The NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro. *J Exp Med* 2000; 192(2): 227-236
7. Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. Antimicrobial Action of The NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. II. Effects on Microbial Proliferation and Host Survival In Vivo. *J Exp Med 2000*; 192(2): 237-48
8. MacFarlane AS, Schwacha MG, Eisenstein TK. In Vivo Blockage of Nitric Oxide With Aminoguanidine Inhibits immunosuppression Induced by An Attenuated Strain of Salmonella typhimurium, Potensiates Salmonella Infection, and Inhibits Macrophage and Polymorphonuclear Leukocyte Influx Into The Spleen. *Infect Immun* 1999; 67(2): 891-8
9. Cerquetti MC, Goren NB, Rapolo AJ, Grasso D, Giacomodonato MN, Vaccaro MI. Nitric Oxide and Apoptosis Induced In Peyers Patches by

Attenuated Strains of Salmonella enterica Serovar Enteritidis. *Infect Immun* 2000; 70(2): 964-9

10. Eriksson S, Bjorkman J, Borg S, Syk A, Pettersson S, Andersson DI, Rhen M. Salmonella typhimurium Mutants that Downregulate Phagocyte Nitric Oxide Production. *Cell Microbiol* 2000; 2(3); 139-50
11. Mittrücker HW, Kohler A, Kaufmann SHE. Characterization of the Murine T-Lymphocyte Response To Salmonella enterica Serovar typhimurium Infection. *Infect Immun* 2000; 70(1): 199-203
12. Matsui K, Arai T. Immunosuppression Induced by Salmonella Infection is Correlated With Augmentation of Interleukin-2 Receptor Alpha Chain Expression in Murine Splenic Lymphocytes. *Immunol Med Microbiol* 1995; 10(3-4): 227-34
13. Redmond P, Daly JM. *Arginine*. In: Klurfeld DM. *Nutrition and Immunology*. New York: Plenum Press, 1993: 157-65
14. Potenza Ma, Nacci C, Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory Effects of l-Arginine and Therapeutical Implications. Available from URL: http://www.bentham.org/cdtiemd 1-1 /potenza/potenzam.htm.
15. Maurice E. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999: 19, 564-7, 739-40
16. Edward CK, Ghiasuddin SM, YungerLM, Lorence RM, Arkins s, Dantzer R, Kelley KW. In Vivo Administration of Recombinant Growth Hormone or Gamma Interferon Activates Macrophages: Enhanced Resistance to Experimental Salmonella typhimurium Infection Is Corelated With Generation of Reactive Oxygen Intermediates. *Infect Immun* 1992; 60(6): 2514-21
17. Barbul A, Wasserkrug HL, Sisto DA, Selfter E, Rettura G, Levenson SM, Efrin G. Thymic Stimulatory Actions of Arginine. *J Parenter Enteral Nutr*, 1980;4(5): 446-9
18. Barbul A, Lazaron SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine Enhances Wound Healing and Lymphocytes Immune Responses in Humans. *Surgery* 1990; 108(2): 331-6

19. Heyland,OK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should Immunonutrition Become Routine in Critically Ill Patients ? A Systematic Review of the Evidence. *JAMA* 2001; 286(8): 944-53

20. Efron D, Barbul A. Role of Arginine in Immunonutrition. *J Gastroenterol,* 2000;35 Suppl 12: 20-3

21. Gao XM, Tite JP, Lipscombe M Jones SR, Ferguson DJP, McMichael AJ. Recombinant Salmonella typhimurium Strain That Invade Non Phagocytic Cells Are Resistant to Recognition by Antigen Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Infect Immun* 1992; 60(9): 3780-9

22. Rodwell VW. Struktur dan Fungsi Protein dan Enzim. Asam Amino. Dalam Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Biokimia Harper. Ed 24. Jakarta: EGC, 1997: 24-7

23. Newsholme EA, Leech AR. *Biochemistry For Medical Sciences*. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1990: 386-99

24. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1999 (Dikutip dari Maurice E. Referensi tidak dilihat)

25. Valverde I, Penalva A, Ghigo E, Casanueva FF, Dieguez C. Involvement of Nitric Oxide in The Regulation of Growth Hormone Secretion in Dogs. *Neuroendocrinology* 2001; 74(4); 213-9

26. Fang FC. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimiocrobial Activity.; *J Clin.Invest* 199799(12): 2818-25

27. Huang J, DeGraves FJ, Lenz SD, Gao D, Feng P, Li D, Schlapp T, Kaltenboeck B. The Quantity of Nitric Oxide Released by Macrophages Regulates Chlamydia-induced Disease. *Proc.Natl.Acad.Sci* 2002; 99(6) : 3914-9

28. Elahi S, Pang G, Ashman RB, Clancy R. Nitric Oxide-enhanced Resistance to Oral Candidiasis. *Immunology* 2001; 104(4): 447-54

29. Alam MS, Akaike T, Okamoto S, Kubota T, Yoshitake J, Sawa T, Miyamoto Y, Tamura F, Maeda H. Role of Nitric Oxide in Host Defense in Murine Salmonellosis as a Function of Its Antibacterial and Antiapoptotic Activities. *Infect Immun* 2002; 70(6): 3130-42

30. Fu E, Tz-Chong C, Liu D, Chiu SC. Ameliorated Effect of L-Arginine Supplementation on Gingival Morphology in Cyclosporin-treated Rats. J *Periodontol* 2000; 71(11): 1737-42
31. Leon P, Redmond HP, stein TP, Shou J, Schluter MD, Kelly C, Lanza-Jacoby S, Daly JM. Arginine Supplementation Improves Histone and Acut-phase Protein Synthesis During Gram-negative Sepsis in the Rat. *J Parenter Enteral Nutr* 1991; 15(5): 503-8
32. Angele MK, Nitsch SM, Hatz RA, Angele P, Hernandez-Richter T, Wichmann MW. L-Arginine: A Unique Amino Acid for Improving Depressed Wound Immune Function following Hemorrhage. *Eur Surg Res* 2002;34(1-2):53-60
33. Warwick-Davies J, Lowrie DB, Cole PJ. Growth Hormone is a Human macrophage Activating Factor. Priming of Human Monocytes for Enhanced Release of H2O2. *J Immunol* 1995;154(4): 1909-18
34. Resnick DJ, Softness B, Murphy AR, Aranoff GS, Levine LS. Case Report of an Anaphylactoid Reaction to Arginine. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88(1: 67-8
35. Welniak LA, Sun R, Murphy WJ. The Role of Growth Hormone in T Cell Development and Reconstitution. *J Leuko Biol* 2002; 71: 381-7
36. Postel-Vinay MC, Coelho VM, Gagnerault MC, Dardenne M. Growth Hormone Stimulates Proliferation of Activated Mouse T Lymphocytes. *Endocrinology* 1997; 138(5): 1816-20
37. Subowo. Imunobiologi. Bandung: Angkasa,1993: 35-48, 53-73, 151-64, 187-215
38. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. London-New York Gower Medical Publishing, 1997: 10.1, 18.1, 18.3
39. Goodman JW. *The Immune Response*. In: Stites DP, Terr AI. *Basic and Clinical Immunology*. 8 ed.Connecticut: Prentice Hall Int. Inc, 1994: 40-9
40. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan. Editor: Bonang G. Edisi 16. Jakarta:EGC, 1992: 278-83

41. Stewart FS. *Bigger s Bacteriology and Immunology for Students of Medicine.* 9th ed. Norfolk Lowland Brydone Ltd, 1974: 353-69

42. Mc Kee T, Mc Kee JR. *Biochemistry.* USA: Wim C. Brown Publisher, 1996

43. Varesio L, Delgado IE, Gusella L, Cox GW, Melilo G, Muso T, Bosco MC. *Role of Cytokines in Activation of Monocytes.* In: Aggarwall BB. *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy.* USA: Blackwell Science Inc., 1995: 61

44. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, et al. Interleukin-18 Contributes to Host Resistance and Gamma Interferon Production in Mice Infected with Virulent Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 1999: 478-83

45. Keuter M. Experimental Studies on Pathogenesis of Salmonella Infection. **Thesis.** Katholiek Universiteit Nijmegen,1998

46. Parslow TG. *The Immune Response.* In: Medical Immunology, 9 th ed. New Jersey: Prentice Hall Int. Inc, 1997: 63-72

47. Van Dissel JT, Leijh PCJ, van Furth R. Differences in Initial Rate of Intracellular Killing of Salmonella typhimurium by Resident Peritoneal Macrophages from Various Mouse Strain. *J Immunol* 1985; 134:3404-10

48. Kirk J, Regan MC, Wasserkrug HL, Sodeyama M, Barbul A. Arginine Enhances T-cell Responses in Athymic Nude Mice. *J Parenter Enteral Nutr,* 1992;16(5): 429-32

49. Mishell B.B, Shiigi MS. *Selected Methods in Cellular Immunology.* Freeman and Company. New York; 1980

50. Supargiyono. Mononuclear Phagocyte System (MPs). Makalah pada: Kuliah Defisiensi Biologi Molekuler & Immunologi. Yogyakarta: Tim Pengelola Program Doktor FK UGM, 29 Januari-18 Maret 2000:1-9

51. Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-Jen Sung. *Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages.* In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE. *Methods in Immunotoxicology,* vol 2. New York-Singapore: A John Willey & Son.Inc, 1995:99-117

52. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology,* 9th eds. St Louis:Mosby-Year book.Inc, 1990:284-95

53. Dawson B, Trapp RG. *Basic & Clinical Biostatistic. 3rd Eds. Boston, Toronto.* Mc Graw-Hill Companies; 2001: 29-57, 161-80

54. Santoso S. *SPSS Versi 10 Mengolah Data Statistik Secara Profesional.* Cetakan ke 3. Jakarta. PT Elex Media Komputindo;2002

55. Santoso S. Buku Latihan SPSS Statistik Non Parametrik. Jakarta. PT Elex Media Komputindo;2001

56. Vos IH, Rabelink TJ, Dorland B, Loos R, Van Middelaar B, Grone HJ, Joles JA. L-arginine Supplementation Improves Function and Reduces Inflamation in renal allografts. *J Am Soc Nephrol,* 2001; 2(2):361-7

57. Huang D, Schwacha MG, Eisenstein TK. Attenuated Salmonella Vaccine Induced Suppression of Murine Spleen Cell responses to Mitogen is Mediated by Macrophage Nitric Oxide: Quantitive Aspects. *Infect Immun,* 1996; 64(9): 3786-92

58. Ochoa JB, Strange J, Kearney P, Gellin G, Endean E, Fitzpatrick E. Effects of L-arginine on the Proliferation of T Lymphocyte Subpopulations. *J Parenter Enteral Nutr*, 2001; 25(1): 23-9

59. Moinard C, Caldefie-Chezet F, Walrand S, Vasson MP, Cynober L. Evidence that Glutamine Modulates Respiratory Burst in Stressed Rat Polymorphonuclear Cells through Its Metabolism into Arginine. Br J Nutr, 2002; 88(6): 689-95

60. Cui XL, Iwasa M, Iwasa Y, Ogoshi S. Arginine- supplemented Diet Decreases Expression of Inflamatory Cytokines and Improves Survival in Burned Rats. *J Parenter Enteral Nutr*, 2000;24(2): 89-96

61. Madden HP, Breskin RJ, Wasserkrug HL, Efron G, Barbul A. Stimulation of T Cell Immunity by Arginine Enhances Survival in Peritonitis. *J Surg Res* 1988; 44(6): 658-63

62. Experimental Studies on Pathogenesis of Salmonella Infection. (Dikutip dari Keuter M, referensi tidak dilihat).

UPT-PUSTAK-UNDIP