

614.47
W17

P 4

TESIS

**PENGARUH MELATONIN
DOSIS FISIOLOGIS DAN FARMAKOLOGIS
TERHADAP PRODUKSI IFN - γ DAN PRODUKSI
HIDROGEN PEROKSIDA MENCIT BALB/c**



**NYOMAN SUCI WIDYASTITI
G 4A097009**

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2000**

UPT-PUSTAK-UNDIP

Lembar pengesahan

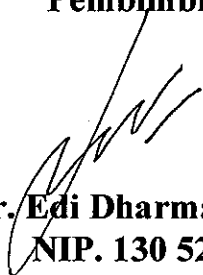
**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 29 FEBRUARI 2000**

**Oleh
Pembimbing Ketua**

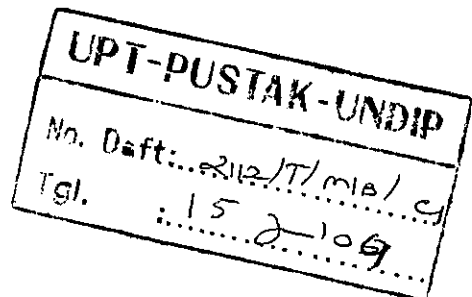


**Prof. Dr. dr. R. Sri Djoko Moeljanto, SpPD, K-E
NIP 130 611 032**

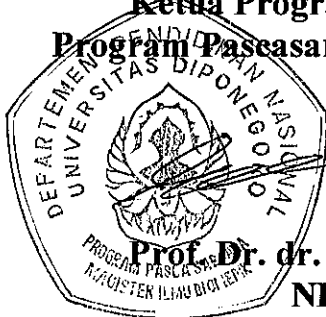
Pembimbing II



**dr. Edi Dharmana, MSc.
NIP. 130 529 451**



**Mengetahui
Ketua Program Studi Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro**



**Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp. PA. FIAC
NIP 130 368 076**

KATA PENGANTAR

Puji syukur dan terima kasih penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih atas anugerahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “penelitian in vitro pengaruh melatonin dosis fisiologis dan farmakologis terhadap produksi IFN - γ dan produksi hidrogen peroksida mencit BALB/c“, sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi pada Program Pendidikan Pasca Sarjana di Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan ini tidak akan mampu penulis selesaikan dengan baik tanpa bantuan berbagai pihak. Khusus kepada Prof. Dr. dr. R. Sri Djoko Moeljanto, SpPD, K-E sebagai dosen pembimbing utama dan dr. Edi Dharmana, MSc sebagai dosen pembimbing , penulis mengucapkan terima kasih atas segala bimbingan, sumbangan pemikiran, waktu serta dorongan semangat dalam penulisan tesis ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih setulus-tulusnya kepada :

1. Rektor Universitas Diponegoro di Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada staf pengajar UNDIP untuk mengikuti program pendidikan Pascasarjana.
2. dr. Anggoro DB Sachro, DTMH Sp A(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan mengikuti pendidikan Pascasarjana.
3. dr. Purwanto AP, SpPK, kepala bagian Patologi Klinik FK. UNDIP dan rekan-rekan di bagian Patologi Klinik FK. UNDIP yang memberikan dukungan dan dorongan semangat selama penulis mengikuti pendidikan Pascasarjana.
4. Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA, FIAC, Ketua Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan mengikuti pendidikan Pascasarjana dan senantiasa memberikan dorongan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis.

5. Dr. dr Susilo Wibowo, MS.Med., SpAnd. dan dr Lisyani Suromo SpPK(K) yang telah menyediakan waktu untuk memberikan petunjuk dan arahan terutama saat pembuatan/ perbaikan proposal dan penulisan tesis.
6. dr. Kis Djamiatun, MSc. yang memberikan petunjuk tentang teknik pelaksanaan penelitian di laboratorium dan mendampingi penulis saat pelaksanaan penelitian.
7. Dr. Wahyu Rohadi MSc yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam analisis statistik dan metodologi penelitian.
8. Tim penguji proposal dan penguji tesis yang telah berkenan memberi masukan dan arahan dalam penelitian dan penulisan tesis.
9. Pimpinan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran UNDIP dan Pimpinan Laboratorium imunologi RS Telogorejo, beserta staf analis laboratorium : Sdri Wiwik, Sdri Endang, Sdri Indah, Ibu Mul, Sdri. Anna, Sdri. Ina dan Sdri. Farida yang mendampingi penulis selama pelaksanaan penelitian.
10. Suami dan ayah tercinta yang penuh pengertian serta senantiasa mendoakan dan memberikan dorongan semangat agar penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal, penelitian, penulisan tesis dan menyelesaikan pendidikan pasca sarjana.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah memberikan andil yang besar dalam penulisan tesis ini.

Akhir kata, penulis yakin bahwa tulisan ini masih banyak kekurangan, karenanya sangat diharapkan saran serta kritik demi kesempurnaan tulisan ini. Penulis berharap agar penelitian ini secara luas berguna bagi pembaca, masyarakat dan berguna pula untuk kemajuan kesehatan dan ilmu pengetahuan khususnya Imunologi di Indonesia.

Semarang, Februari 2000

Penulis

RINGKASAN

Proses *immunosenescence* meningkatkan kerentanan lanjut usia terhadap infeksi. Hal tersebut antara lain disebabkan karena penurunan respon makrofag terhadap sinyal pengaktivasi dari IFN- γ untuk memicu produksi H₂O₂ untuk membunuh mikroorganisme. Melatonin merupakan suatu hormon yang mampu melawan efek *immunosenescence* antara lain dengan meningkatkan produksi IFN- γ yang memicu produksi H₂O₂.

Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis *in vitro* pada splenosit mencit BALB/c muda dan mencit BALB/c tua mampu meningkatkan produksi IFN- γ yang akan memicu produksi H₂O₂. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan penelitian *postest only control group design*. Sampel penelitian ialah mencit BALB/c betina umur muda (6-10 minggu) dan umur tua (18-22 bulan). Mencit secara random dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok pertama splenosit mencit tidak mendapat perlakuan, kelompok kedua splenosit mencit diinkubasi melatonin dosis fisiologis (0,1 nM) dan kelompok ketiga splenosit mencit diinkubasi melatonin dosis farmakologis (0,1 μ M). Supernatan kultur splenosit ketiga kelompok (yang mengandung IFN- γ) tersebut kemudian dipaparkan pada makrofag untuk mengetahui respon produksi H₂O₂ oleh makrofag.

Hasil penelitian yang diperoleh menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan mencit BALB/c tua. Melatonin dosis fisiologis (0,1 nM) mampu meningkatkan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan mencit BALB/c tua secara nyata, sedangkan melatonin dosis farmakologis (0,1 μ M) tidak meningkatkan produksi IFN- γ . Melatonin dosis fisiologis

atau farmakologis tidak meningkatkan produksi H_2O_2 oleh makrofag mencit. Secara statistik tidak terdapat korelasi / hubungan langsung antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi H_2O_2 .

Kata kunci : melatonin, IFN- γ , H_2O_2

ABSTRACT

Immunosenescence in the elderly increases susceptibility to infections. One of the causes is impaired response of macrophage to activating signal of IFN- γ to initiate H₂O₂ production for killing microorganisms. Melatonin is a hormone that is able to fight against the effects of immunosenescence by increasing IFN- γ production that triggers H₂O₂ production.

The study was carried out to prove that administration of physiological or pharmacological dose of melatonin in vitro to splenocytes from young BALB/c mice and old BALB/c mice can increase IFN- γ production that will trigger H₂O₂ production. The present study is a experimental study with posttest only control group design. Young (6-10 weeks of age) female BALB/c mice and old (18-22 months) mice were randomly assigned into three groups. In the first group the splenocytes of the mice receive no treatment, in the second group the splenocytes were incubated with physiological dose of melatonin (0,1 nM) and in the third group the splenocytes were incubated with pharmacological dose of melatonin (0,1 μ M). The supernatant of the culture of splenocytes from the three groups (that contains IFN- γ) was exposed to macrophages to find out the response of macrophages in the production of H₂O₂.

The results of the study suggest that there are no significant difference in the ability splenocytes from young BALB/c mice and old BALB/c mice to produce IFN- γ . Physiological dose of melatonin (0,1 nM) is capable of increasing significantly IFN- γ production by the splenocytes of young BALB/c mice and old BALB/c mice, whereas pharmacological dose of melatonin (0,1 μ M) can not increase IFN- γ production. Both physiological and pharmacological doses of melatonin can not increase H₂O₂ production by macrophages from mice. Statistically there are no direct correlation between IFN- γ production by

splenocytes from young and old BAB/c mice post-incubation with physiological or pharmacological dose of melatonin to H₂O₂ production.

Key words : melatonin, IFN- γ , H₂O₂

DAFTAR ISI

Halaman judul	i
Halaman pengesahan	ii
Kata pengantar	iii
Ringkasan	v
Daftar isi	ix
Daftar tabel	x
Daftar gambar	xi
Daftar singkatan	xii
Daftar lampiran	xiii
BAB 1 : Pendahuluan	
1.1 Latar belakang permasalahan	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	4
1.4 Manfaat penelitian	5
1.4.1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan	5
1.4.2. Bagi kepentingan masyarakat	5
BAB 2 : Tinjauan Pustaka	
2.1 Melatonin	
2.1.1. Fisiologi dan farmakologi	6
2.1.2. Melatonin dan sistem imun	8
2.1.3. Melatonin dan <i>immunosenescence</i>	11
2.2 IFN- γ	12
2.3 Makrofag	
2.3.1 Kinetika dan metabolisme makrofag	14
2.3.2 Mekanisme mikrobisidal makrofag	15
2.3.3. Makrofag dan <i>immunosenescence</i>	18
BAB 3 : Kerangka konseptual dan hipotesis	
3.1 Kerangka teori	21
3.2 Kerangka konseptual	21
3.3 Hipotesis	22
BAB 4 : Metode Penelitian	
4.1 Rancangan Penelitian	23
4.2 Kriteria dan besar sampel	24
4.3 Variabel Penelitian	25
4.4 Bahan dan Alat penelitian	26
4.5 Prosedur pemeriksaan	27
4.6 Lokasi dan jadual penelitian	28
4.7 Skema kerja	30
4.8 Analisis data	31
BAB 5 : Hasil Penelitian	32
BAB 6 : Pembahasan	40
BAB 7 : Kesimpulan dan saran	45
DAFTAR KEPUSTAKAAN	47
LAMPIRAN	52

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 4.1. Jadual penelitian	29
Tabel 5.1. Distribusi IFN- γ dan H ₂ O ₂	32
Tabel 5.2. Perbedaan IFN- γ dan H ₂ O ₂ antara mencit muda dan mencit tua	34

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Struktur kimia hormon melatonin	6
Gambar 2.2. Kadar hormon melatonin berdasar usia manusia	7
Gambar 2.3. Skema hipotetis tentang aksi melatonin pada sel-sel CD4+ imunokompeten yang bersirkulasi pada manusia	9
Gambar 2.4. Pembentukan ROI	17
Gambar 2.5. Penurunan respon makrofag mencit tua terhadap stimulasi IFN- γ	20
Gambar 5.3. Korelasi IFN- γ dengan H ₂ O ₂	35
Gambar 5.4. Rata-rata IFN- γ menurut kelompok umur mencit	36
Gambar 5.5. Rata-rata kadar H ₂ O ₂ menurut kelompok dan umur mencit	38

DAFTAR SINGKATAN

IFN- γ	: Interferon gamma
ROI	: Reactive Oxygen Intermediates
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
DHEA	: Dehidroepiandrosterone
MHC	: Major Histocompatibility complex
IL	: Interleukin
TNF	: Tumor Necrosis Factor
CD	: Cluster of Differentiation
NO	: Nitrit Oksida
MIOS	: Melatonin-Induced Opioid System
Th	: T helper
PBMNC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
NK	: Natural Killer
ADCC	: Antibody Dependent Cellular Citotoxicity
RZR/ROR	: Retinoid Orphan Receptor
Ig	: Immunoglobulin
RNA	: Ribonucleic Acid
NADP	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
Con A	: Concanavalin A
PMA	: Phorbol Myristate Acetate

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN 1 : Prosedur isolasi splenosit mencit	52
LAMPIRAN 2 : Prosedur isolasi makrofag mencit	55
LAMPIRAN 3 : Prosedur pemeriksaan IFN- γ	57
LAMPIRAN 4 : Prosedur pemeriksaan Hidrogen Peroksida	59
LAMPIRAN 5 : Rencana biaya penelitian	61
LAMPIRAN 6 : Data dan perhitungan statistik	62

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Salah satu tolok ukur kemajuan suatu bangsa seringkali dilihat dari harapan hidup penduduknya. Indonesia sebagai negara berkembang, harapan hidup penduduknya semakin lama semakin tinggi, dan pada tahun 2000 harapan hidup penduduk Indonesia diproyeksikan dapat mencapai usia 70 tahun. Menurut laporan dari Biro Pusat Statistik tahun 1992, pada tahun 2000 jumlah penduduk lanjut usia di Indonesia diproyeksikan sebesar 7,28% dari jumlah total penduduk, sedangkan menurut laporan *Bureau of the cencus USA* pada tahun 1993 sebagaimana dikutip oleh Budi - Darmojo, kenaikan jumlah penduduk lanjut usia di Indonesia pada tahun 1990 - 2021 ialah sebesar 414% ; angka tersebut merupakan angka pertambahan penduduk lanjut usia terbesar di dunia.⁽¹⁾ Oleh karena itu pemerintah dan masyarakat Indonesia dalam GBHN 1993 memberikan perhatian khusus terhadap penduduk lanjut usia tersebut.⁽²⁾

Solomon et al. pada tahun 1998 sebagaimana dikutip oleh Budi - Darmojo mengemukakan beberapa kemunduran dan kelemahan yang biasanya di derita oleh kaum lanjut usia, antara lain ialah *immuno-deficiency* dan *infection*.⁽³⁾ Studi epidemiologi menunjukkan bahwa pada usia lanjut dijumpai kenaikan insidens dari berbagai penyakit, khususnya penyakit infeksi. Di antara seluruh kematian pada lanjut usia, 30% diakibatkan penyakit infeksi.⁽⁴⁾ Sebab penyakit pada lanjut usia ini pada umumnya lebih bersifat endogen daripada eksogen.⁽³⁾ Peningkatan kerentanan lanjut usia terhadap infeksi tersebut menggambarkan terjadinya *immunosenescence*.⁽⁵⁾ Pada *immunosenescence* terjadi perubahan sistem imun, baik imunitas spesifik maupun imunitas non spesifik. Salah satu perubahan

imunitas non spesifik yang berperan sebagai pelindung pertama terhadap serangan infeksi dan belum banyak diteliti, ialah perubahan pada makrofag ataupun monosit.

Hingga saat ini belum ada persamaan persepsi tentang perubahan monosit maupun makrofag pada *immunosenescence*. Beberapa peneliti menyatakan tidak terdapat perbedaan kemampuan membunuh bakteri maupun pemacuan produksi sitokin pada makrofag pada usia muda maupun tua⁽⁶⁾, tetapi beberapa peneliti yang lain menyatakan bahwa terdapat penurunan kemampuan mempresentasikan antigen dan produksi sitokin makrofag pada usia tua. Di antara berbagai sitokin, interferon gamma (IFN- γ) ialah aktivator makrofag yang paling poten, baik dalam kondisi *in vitro* maupun *in vivo*.⁽⁷⁾ Salah satu efek IFN- γ yang paling jelas ialah meningkatkan mikrobiostatis atau efek mikrobisidal dari makrofag. Efek tersebut mengarahkan pada deskripsi maupun penjelasan IFN- γ sebagai molekul yang meningkatkan resistensi terhadap agen infeksius.⁽⁸⁾

Efek mikrobisidal dari makrofag diperantarai oleh peningkatan molekul-molekul mikrobisidal, misalnya nitrit oksida (NO) dan *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI).⁽⁹⁾ Kemampuan makrofag untuk melepaskan ROI, antara lain hidrogen peroksida, superoksida dan hidroksil berhubungan erat dengan kapasitasnya sebagai sel efektor pada proses *intracellular killing* dari parasit maupun mikroba tertentu.⁽¹⁰⁾ Penurunan respon makrofag terhadap sinyal pengaktifasi dari IFN- γ untuk memproduksi hidrogen peroksida merupakan salah satu ketidakmampuan respon imun pada mencit tua.⁽¹¹⁾ Pendapat tersebut didukung oleh Ding pada tahun 1994, yang menyimpulkan bahwa makrofag mencit tua melepaskan hidrogen peroksida sebagai respon terhadap IFN- γ hanya 50% dari kemampuan makrofag mencit muda, walaupun tidak ada perbedaan produksi IFN- γ maupun ekspresi permukaan reseptor IFN- γ splenosit mencit tua dan mencit muda.

Beberapa zat nutrisi maupun hormon terbukti dapat 'melawan' proses *immunosenescence*. Zat yang telah lama digunakan ialah selenium, vitamin E dan chromium dosis tinggi, karotenoid, dan yang paling mutakhir ialah hormon dehidroepiandrosterone (DHEA) dan melatonin.⁽¹²⁾ Saat ini melatonin merupakan zat pelawan proses *immunosenescence* yang paling populer karena melatonin sangat aman, tidak mempunyai dosis toksik dan tidak bersifat adiktif.

Melatonin adalah hormon yang diproduksi oleh *pineal gland*, mempunyai kemampuan untuk melawan efek-efek penuaan, disfungsi sistem imun dan kanker.⁽¹³⁾ Penelitian *in vitro* dan *in vivo* memperlihatkan bahwa melatonin dapat meningkatkan baik imunitas alamiah maupun imunitas didapat.⁽¹⁴⁾ Target utama aktifitas melatonin pada sistem imun kemungkinan besar adalah limfosit T dan makrofag.⁽¹⁵⁾ Melatonin juga digunakan sebagai salah satu terapi untuk 'meremajakan' fungsi imun pada usia tua.⁽¹²⁾ Pada mencit tua, pemberian melatonin mampu meningkatkan kadar IFN- γ , meningkatkan presentasi antigen oleh sel makrofag terhadap sel T dengan cara meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas II, dan meningkatkan produksi sitokin, antara lain Interleukin 1 (IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).⁽¹⁶⁾

Melatonin pada dosis fisiologis (1 nM) dan farmakologis (1 μ M) dapat meningkatkan produksi beberapa sitokin oleh sel CD4+ manusia, antara lain IFN- γ , IL-2 dan IL-6.⁽¹⁷⁾ Efek melatonin tersebut tergantung pada dosis. Semakin tinggi dosis melatonin, semakin banyak sitokin yang diproduksi oleh sel CD4+. Dosis fisiologis melatonin juga mampu menginduksi produksi hidrogen peroksida, superoksida dan nitrit oksida pada sel monosit manusia usia dewasa muda.⁽¹⁸⁾

Meskipun banyak penelitian melaporkan tentang manfaat dan kegunaan melatonin dalam meningkatkan respon imun, hingga saat ini belum ada penelitian yang menyelidiki pengaruh melatonin terhadap produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit tua (yang

mengalami penurunan respon terhadap sinyal IFN- γ) dibandingkan dengan makrofag mencit muda.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis ?
- 1.2.2. Apakah terdapat perbedaan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi IFN- γ yang dipacu dengan pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis ?
- 1.2.3. Apakah terdapat korelasi / hubungan antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis dengan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Membuktikan bahwa terdapat pengaruh melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi IFN- γ oleh splenosit dan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda dan tua.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Membuktikan perbedaan antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dengan mencit BALB/c tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis
2. Membuktikan perbedaan antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dengan mencit BALB/c tua pasca inkubasi melatonin dosis farmakologis.

3. Membuktikan perbedaan produksi hidrogen peroksida makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis
4. Membuktikan perbedaan produksi hidrogen peroksida makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis farmakologis.
5. Membuktikan korelasi / hubungan antara produksi IFN- γ splenosit mencit BALB/c muda dengan mencit BALB/c tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi hidrogen peroksida.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan

Hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut pengaruh melatonin terhadap peningkatan respon imun non spesifik, khususnya mekanisme mikrobisidal (produksi H₂O₂) makrofag pada individu lanjut usia.

1.4.2. Bagi kepentingan masyarakat

Hasil penelitian ini dapat memberikan masukan bagi penatalaksanaan pengobatan atau pencegahan terhadap kenaikan insidens penyakit / penurunan respons imun pada lanjut usia.

BAB 2

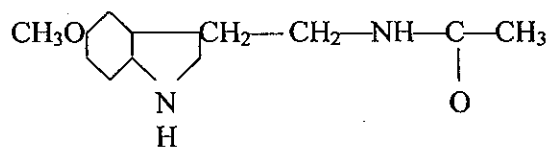
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Melatonin

2.1.1. Fisiologi dan farmakologi

Melatonin atau N-acetyl-5 methoxytryptamine pertama kali diidentifikasi dari ekstrak kelenjar hipotalamus *bovine* oleh Learner dan kawan kawan pada tahun 1950 sebagaimana dikutip oleh Liebmann PM, kemudian mereka memberi nama substansi tersebut melatonin (dari bahasa Yunani : melas = gelap dan tonein = menekan), berdasarkan kemampuan melatonin untuk mengagregasi granula-granula melanin dan mencerahkan warna kulit katak (16,19).

Gambar 2.1. Struktur kimia hormon melatonin ⁽¹⁶⁾



Dalam biosintesis melatonin, mula-mula triptofan dikonversi oleh triptofan hidroksilase menjadi 5-hidroksitriptofan, yang kemudian mengalami dekarboksilasi menjadi serotonin. Sintesis melatonin dari serotonin dikatalisis oleh dua enzim, yaitu arylalkylamine N-acetyltransferase dan hydroxyndole-O-methyltransferase.⁽¹⁹⁾

Sintesis dan pelepasan melatonin dipicu oleh kegelapan dan dihambat oleh cahaya. Informasi fotik dari retina ditransmisikan ke kelenjar hipotalamus melalui nukleus suprachiasma dan sistem saraf simpatetik. Input neural ke kelenjar berupa norepinefrin dan outputnya adalah melatonin. Pada siang hari, sel-sel fotoreseptor retina mengalami hiperpolarisasi, sehingga menghambat pelepasan norepinefrin. Pada saat gelap, fotoreseptor

retina melepaskan norepinefrin, sehingga mengaktifkan sistem tersebut, dan jumlah dari reseptor adrenergik α_1 dan β_1 pada kelenjar akan meningkat, aktifitas arylalkylamine N-acetyltransferase meningkat, mengawali sintesis dan pelepasan melatonin.⁽¹⁹⁾

Hormon melatonin mencapai aliran darah melalui difusi pasif. Pada manusia, sekresi melatonin meningkat segera setelah *onset* gelap, puncaknya pada tengah malam (antara pukul 02.00-04.00), dan secara gradual berkurang menjelang dini hari. Konsentrasi melatonin serum sangat bervariasi tergantung pada usia. Bayi berumur kurang dari 3 bulan mensekresi melatonin dalam jumlah yang sangat sedikit. Sekresi melatonin meningkat dan menjadi sirkadian pada bayi yang usianya lebih tua. Puncak kadar/konsentrasi melatonin nokturnal paling tinggi (kira-kira 325 pg per mililiter /1400pmol per liter) pada usia satu hingga tiga tahun. Pada usia dewasa muda yang normal, kadar pada saat siang dan tengah malam ialah 10 dan 60 pg per mililiter (40 dan 260 pmol per liter). Bersamaan dengan penuaan, kadar puncak melatonin tercapai lebih lambat 1 jam dari normal dan kadar puncak melatonin tersebut hanya 50 % dari kadar orang dewasa muda.^(16,19)

Konsentrasi / dosis fisiologis dan farmakologis melatonin untuk dapat meningkatkan produksi beberapa sitokin oleh sel CD4+ dan induksi produksi ROI dan NO pada sel monosit manusia ialah 1 nM dan 1 μ M.⁽¹⁸⁾ Dosis fisiologis melatonin pada mencit ialah 0,1 nM.⁽²⁰⁾

Gambar 2.2. Kadar hormon melatonin berdasar usia manusia⁽¹⁴⁾

Melatonin secara cepat dimetabolisir, terutama dalam hati, melalui hidroksilasi menjadi 6-hydroxymelatonin dan setelah konjugasi dengan asam sulfuric atau glucuronic, akan disekresi melalui urin. Eksresi urin dari 6-sulfatoxymelatonin (metabolit utama dari melatonin) kadarnya hampir paralel dengan kadar melatonin serum. Pemberian secara intravena melatonin akan secara cepat didistribusikan. (waktu paruh serum : 0,5 sampai 5,6 menit) serta dieliminasi. Bioavailabilitas melatonin yang diberikan secara oral sangat bervariasi.⁽¹⁹⁾

2.1.2. Melatonin dan sistem imun

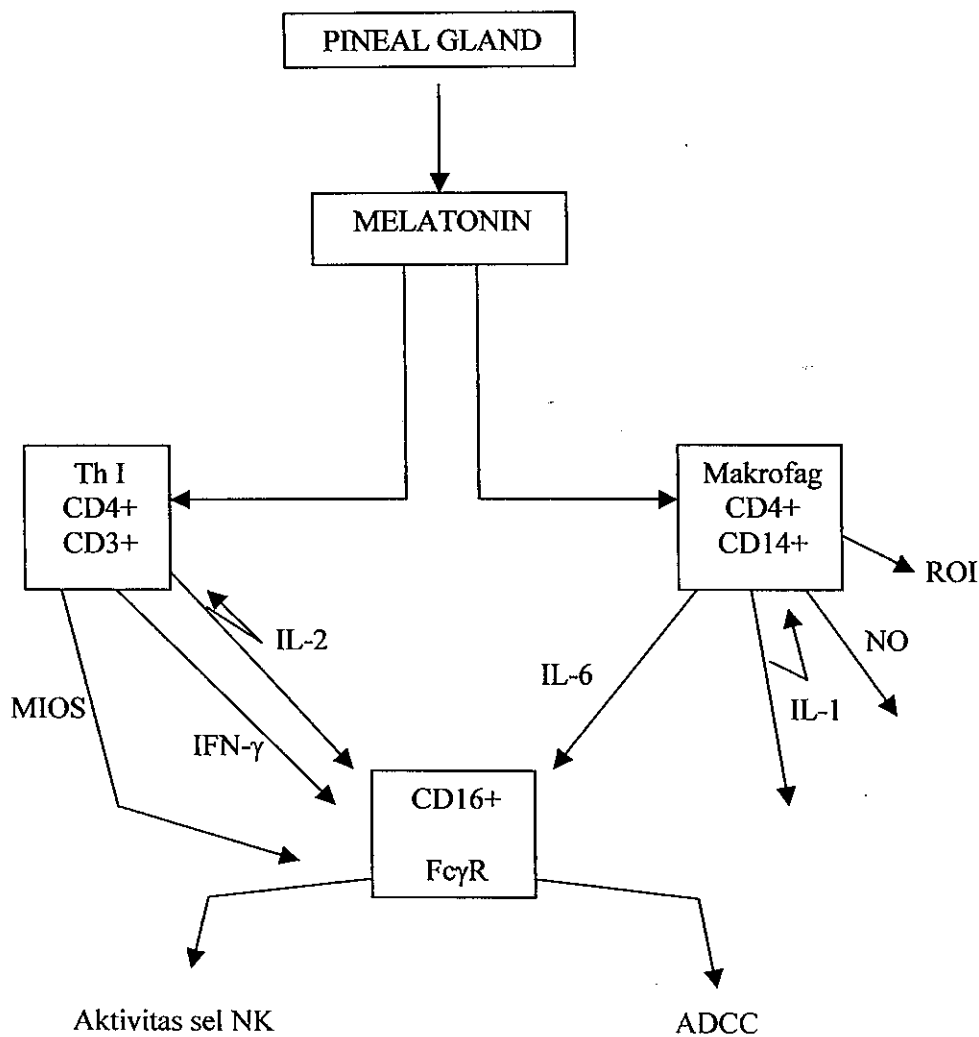
Indikasi pertama penggunaan melatonin ialah sebagai imunoregulator yang mempunyai efek anti tumor. Diawali pada tahun 1959, Hofstatter melaporkan bahwa terapi melatonin pada pasien kanker dapat meningkatkan kualitas hidup dari pasien tersebut. Melatonin menekan pertumbuhan kanker paru dan kolorektal, mencegah transformasi maligna sel-sel mammae. Terapi melatonin selama 30 hari pada pasien tumor tingkat lanjut dapat meningkatkan kadar TNF- α , IL-2 dan IFN- γ .⁽¹⁶⁾

Melatonin, pada hampir semua kasus yang telah diteliti, mampu meningkatkan imunitas humoral dan seluler. Maestroni (1988), melaporkan bahwa melatonin meningkatkan presentasi antigen oleh makrofag lien terhadap sel T. Peningkatan tersebut sebanding dengan peningkatan molekul MHC kelas II dan produksi TNF- α .⁽¹⁷⁾

Melatonin dalam konsentrasi fisiologis (1nM) dan farmakologis (1 μ M) in vitro dapat mengaktivasi limfosit Th1 manusia dengan jalan meningkatkan produksi IL-2, IFN- γ dan MIOS (melatonin-induced opioid system). Sel-sel Th2 tampaknya tidak dipengaruhi oleh melatonin, karena IL-4 yang terutama diproduksi oleh sel-sel Th2 tidak termodifikasi oleh melatonin. Melatonin juga meningkatkan produksi IL-6 oleh PBMNC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*). Aktivasi tersebut tampaknya berhubungan dengan adanya monosit, karena melatonin gagal mengaktivasi IL-6 pada kultur PBMNC tanpa monosit. Aktivasi

PBMNC oleh melatonin bergantung pada dosis. Pada konsentrasi fisiologis, melatonin dapat menginduksi sitotoksitas monosit manusia, sekresi IL-1, produksi ROI dan NO.^(17,18) Efek-efek tersebut pada akhirnya akan menstimulasi aktivitas sel *Natural Killer* (NK) dan *Antibody-Dependent Citotoxicity* (ADCC) oleh sel-sel CD16+. Melatonin meningkatkan persentase sel yang mengekspresikan antigen CD69 pada sel-sel CD4+, tapi tidak pada sel-sel CD8+. Antigen CD69 merupakan salah satu petanda yang diekspresikan pada semua sel limfosit T, limfosit B dan sel NK yang teraktivasi oleh berbagai agen mitogenik.

Gambar 2.3.⁽¹⁷⁾



Gambar 3. ⁽¹⁷⁾

Skema hipotetis tentang aksi melatonin pada sel-sel CD4+ imunokompeten yang bersirkulasi pada manusia, termasuk sel-sel CD4+, limfosit Th1 (CD3+) dan monosit/makrofag (CD14+). Th = sel T helper; M = monosit; NO = Nitrit Oksida; ROI = Reactive Oxygen Intermediates; MIOS = Melatonin-Induced Opioid System; NK = sel Natural Killer; ADCC = Antibody-dependent cellular cytotoxicity.

Pengaturan melatonin pada sistem imun didukung oleh adanya ikatan spesifik melatonin pada sel-sel limfoid. Pada manusia, Lopez-gonzales pada tahun 1992 mengkararakteristik ikatan melatonin dengan afinitas tinggi pada membran sel limfosit darah tepi manusia.⁽¹⁷⁾ Penelitian lebih lanjut menegaskan perbedaan ikatan melatonin pada subset sel limfosit darah tepi. Ikatan 2-[I¹²⁵] Iodomelatonin pada sel limfosit T darah tepi 10 kali lebih tinggi dari pada sel limfosit B, dan ikatan melatonin tersebut terbanyak dijumpai pada sel-sel CD4+ dari pada sel-sel CD8+.⁽¹⁶⁾ Penelitian Maurino pada tahun 1997 juga mendukung bahwa sel Th1 dan monosit merupakan target dari populasi sel-sel CD4+.⁽¹⁷⁾

Mekanisme aksi melatonin pada limfosit dan monosit hingga saat ini belum diketahui secara pasti, dan signifikansi fungsional reseptor-reseptor melatonin pada sel-sel tersebut belum dapat dijelaskan. Aksi imunomodulasi melatonin mungkin melalui ikatan hormon terhadap reseptor membran spesifik pada sel target dengan aktivasi subsekuen dari sinyal-sinyal intraseluler.⁽¹⁷⁾ Berdasarkan sifat lipofiliknya, melatonin dapat menembus membran sel dan terikat pada tempat intraseluler.⁽¹⁶⁾ Lokalisasi nuklear dari melatonin pada sel-sel mamalia yang berbeda tampaknya mendukung dugaan bahwa melatonin juga memiliki efek langsung pada inti sel.⁽¹⁷⁾ Baru-baru ini ikatan melatonin pada reseptor orphan RZR/ROR telah dapat ditemukan. Dalam hubungannya dengan sistem imun, telah ditemukan bahwa terdapat ekspresi yang tinggi dari mRNA RZR α pada PBMNC manusia dan ikatan melatonin terhadap reseptor nuklear RZR α menekan ekspresi gen 5-lipoxygenase pada limfosit B manusia.

2.1.3. Melatonin dan *immunosenescence*

Istilah *immunosenescence* merujuk pada keruntuhan fungsi imun yang tampak pada lanjut usia, dengan manifestasi berupa peningkatan kerentanan terhadap penyakit infeksi, kanker dan fenomena otoimun.⁽²³⁾

Pada lanjut usia, thimus mengalami involusi secara fisiologis dan hal tersebut merupakan penyebab utama penurunan kemampuan sistem imun yang bersifat sel T *dependent*. Persentase sel T memori meningkat, dengan dominan fenotip CD44^{hi}, CD45Rb^{lo}, L-selectin^{lo} dan pola produksi sitokin : IFN- γ dengan kadar tinggi, IL-4 dan IL-5. Hal tersebut memberi dugaan bahwa lingkungan mikro pada thimus yang menua akan mendorong percepatan maturasi sel T CD4+ *naive* menjadi sel memori. Perubahan sel T lainnya ialah penurunan persentase subpopulasi sel T CD28+, yang diduga disebabkan ekspansi subpopulasi sel T CD28-. Sel T CD8+ CD28+ pada umumnya mengekspresikan fenotip CD57+. Analisis sitokin intraseluler memperlihatkan bahwa sel CD8+ CD57+ CD28- memproduksi IFN- γ , tetapi secara nyata mengalami penurunan sekresi IL-2. Sebaliknya sel CD8+ CD57+ CD28+ tidak memproduksi IFN- γ dan mensekresi IL-2 dengan kadar tinggi.⁽²²⁾ IL-2 memainkan peranan penting dalam diferensiasi dan proliferasi berbagai sel efektor (Sel T helper, sel T sitotoksik, sel B dan sel NK), sehingga penurunan IL-2 pada lanjut usia tersebut akan menurunkan diferensiasi dan proliferasi sel efektor dalam sistem imun.⁽²⁴⁾

Pemberian melatonin pada mencit tua mampu mengembalikan aktivitas endokrin kelenjar thimus, meningkatkan berat thimus, dan meningkatkan proliferasi thimosit. Melatonin mampu mengembalikan jumlah dan subset serta meningkatkan respon mitogen dari splenosit mencit tua.⁽²⁴⁾

Pada mencit tua atau mencit yang mengalami immunodepresi karena pengobatan cyclophosphamide, pemberian melatonin secara kronik akan meningkatkan respon mitogenik sel T dan sel B, menginduksi kadar IFN- γ dan IL-2 yang lebih tinggi di splenosit,

meningkatkan presentasi antigen oleh makrofag terhadap sel-sel T dengan cara meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas II, produksi IL-1 dan TNF- α . Melatonin juga meningkatkan potensiasi aktivitas IL-2 dalam respon anti tumor-inang dan aktivitas sel NK pada manusia.^(16,24) Berdasarkan penemuan tersebut, Lissoni (1993) dan Maestroni (1995) memberi postulat bahwa kemungkinan terdapat dua sel target utama aktivitas melatonin pada fungsi imun manusia, yaitu limfosit T dan makrofag.⁽¹⁶⁾

Melatonin diduga berkontribusi terhadap homeostasis sistem imun in vivo. Pada kondisi normal, melatonin tidak berefek atau hanya sedikit berefek. Tetapi pada kondisi immunodepresi, misalnya karena obat-obat immunosupresi, penyakit viral, kanker, penuaan, atau stress akut, melatonin memberi proteksi terhadap ketidakresponsifan limfosit.⁽¹⁶⁾

2.2. IFN- γ

Interferon (IFN) ditemukan oleh Isaacs dan Lindenmann (1957). Interferon pertama kali dideskripsikan sebagai suatu faktor yang diproduksi oleh sel terinfeksi virus, yang dapat melindungi sel-sel lain terhadap infeksi virus tersebut. Interferon diklasifikasikan menjadi tiga kelas antigenik : alfa (IFN- α), beta (IFN- β) dan gamma (IFN- γ). Interferon α dan interferon- β disebut sebagai interferon tipe I dan diproduksi oleh hampir semua sel sebagai respon terhadap infeksi virus. Interferon- γ (Interferon tipe II) diproduksi oleh sel-sel NK teraktivasi, sel-sel T-helper teraktivasi yang berasal dari *subset* Th1 dan sel-sel sitotoksik CD 8 teraktivasi dari fenotip TC1. Stimulasi mitogenik oleh Concanavalin A (Con-A) dan phytohemagglutinin (PHA) pada splenosit akan menimbulkan produksi IFN- γ .⁽²⁵⁾

IFN- γ manusia, sebagaimana IFN- γ mencit dikode oleh gen tunggal, yang membentuk spesies mRNA tunggal 1,2 kb dan polipeptida dengan 166 residu termasuk 23 residu sekuens sinyal hidrofobik. IFN- γ aktif secara biologis dalam bentuk homodimer 43-kDa nonkovalen. IFN- γ berinteraksi dengan reseptor permukaan sel spesifik, yang diekspresikan oleh semua

sel berinti. pada kadar 200-2500 *site*/sel. Reseptor tersebut terutama diekspresikan di luar sistem limfoid.⁽²⁶⁾

IFN- γ merupakan aktivator makrofag paling poten, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.^(7,11) Makrofag teraktivasi mampu membunuh mikroorganisme dengan mekanisme fagositosis dan pembentukan ROI dan NO. IFN- γ meningkatkan kemampuan endositosis dan fagositosis monosit. Fagositosis partikel spesifik dapat ditingkatkan dengan opsonisasi bakteri, yaitu pelapisan bakteri dengan molekul IgG spesifik atau komponen komplemen. IFN- γ menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor Fc dari IgG dengan afinitas tinggi, meningkatkan *uptake* bakteri teropsonisasi. Setelah masuk dalam sel, makrofag akan membunuh bakteri dengan membangkitkan ROI. IFN- γ menginduksi transkripsi gen yang mengkode enzim yang membangkitkan oksigen aktif tersebut.⁽²⁶⁾ Beberapa perangkat pembentuk radikal superoksida, yang merupakan prekursor ROI, telah diidentifikasi pada tingkat molekuler. Anion superoksida terbentuk melalui oksidase NADPH-dependen yang berasosiasi dengan membran. Kompleks enzim flavositokrom multikomponen ini mengkatalis reduksi molekul oksigen menjadi superoksida. Terdapat empat komponen oksidase, yang dibedakan berdasar lokasi subseluler. Dua subunit sitokrom b558 (rantai berat gp91-phox dan rantai ringan gp22) berada di membran seluler, sedangkan p47-phox dan p67-phox berada di sitosol.⁽²⁷⁾

Stimulasi monosit dan makrofag manusia oleh IFN- γ memicu induksi transkripsi mRNA gp91-phox dengan kinetik yang jauh lebih rendah dibanding neutrofil. Pada makrofag, induksi mRNA gp91-phox secara fungsional berkorelasi dengan peningkatan produksi superoksida, yang selanjutnya mengalami dismutasi spontan menjadi hidrogen peroksida dan oksidan lain.⁽²⁷⁾

2.3. Makrofag

2.3.1. Kinetika dan metabolisme makrofag

Sistem fagosit mononuklear merupakan populasi sel utama yang menduduki urutan kedua dari sistem imun dan terdiri dari sel-sel yang mempunyai fungsi utama fagositosis. Sistem fagosit mononuklear berasal dari sel induk pluripotensial di sumsum tulang yang setelah mengalami pemasakan dan aktivasi dapat menjadi berbagai macam sel dengan perbedaan bentuk morfologis. Monoblas adalah bentuk muda dari sistem fagosit mononuklear. Semua monoblas mempunyai reseptor IgG dan dapat memfagositosis eritrosit yang teropsonisasi oleh IgG. Monoblas akan membelah menjadi 2 promonosit. Promonosit mempunyai reseptor Fc IgG, reseptor C3b, dan dapat memfagositosis eritrosit yang teropsonisasi oleh C3b. Promonosit akan membelah menjadi 2 monosit.⁽²⁸⁾

Pada manusia, monosit yang baru terbentuk dari promonosit tetap tinggal di dalam sumsum tulang sekitar 24 jam, sedangkan pada mencit monosit tetap tinggal di dalam sumsum tulang sekitar 22 jam. Monosit kemudian akan masuk sirkulasi darah tepi.^(28,29) Pada manusia, waktu paro monosit mencapai 70 jam, sedangkan pada mencit sekitar 17,4 jam. Monosit dalam darah tepi ini akan bermigrasi ke jaringan ekstravaskuler untuk menjadi makrofag. Sekali monosit meninggalkan sirkulasi mereka tidak akan kembali lagi dan tetap di dalam jaringan sebagai makrofag untuk beberapa bulan. Lebih dari 95 % makrofag jaringan berasal dari monosit, sedangkan yang 5 % diduga berasal dari pembelahan lokal makrofag immatur di dalam jaringan. Umur makrofag dewasa kemungkinan dapat mencapai beberapa bulan.⁽²⁸⁾ Makrofag memiliki reseptor fagositik dan reseptor opsonin, misalnya reseptor Fc, reseptor komplemen 1 dan 3, serta CD14. CD14 tampaknya merupakan mekanisme penting dalam pemusnahan bakteri gram negatif dari darah dan cairan interstitial.⁽³⁰⁾

Metabolisme sel fagosit mononuklear berubah selama mengalami diferensiasi. Seiring perubahan monosit menjadi makrofag, terdapat perubahan jumlah mitokondria, aktivitas

ensim mitokondria dan kecepatan respirasi seluler. Oksidasi glukosa dan produksi laktat meningkat sesuai dengan maturitas sel. Juga terdapat peningkatan jumlah lisosom dan ensim lisosomal. Meskipun dalam keadaan istirahat, makrofag tetap dalam keadaan metabolik aktif. Glikolisis aerobik merupakan sumber energi yang dibutuhkan oleh monosit manusia. Pembentukan energi oleh makrofag matur dilakukan dengan glikolisis dan fosforilasi oksidatif, meskipun sumber energi utama sangat tergantung pada asal makrofag. Adenosin Trifosfat (ATP) yang terbentuk dari glikolisis disimpan sebagai kreatin fosfat yang merupakan sumber energi untuk mobilitas.

2.3.2. Mekanisme mikrobisidal makrofag

Makrofag merupakan pertahanan hospes yang paling penting terhadap invasi berbagai macam mikroorganisme termasuk bakteri, virus, jamur, protozoa dan sel ganas. Makrofag akan teraktivasi bila menjalankan fungsinya, misalnya pembunuhan mikroba.⁽²⁶⁾ Pembunuhan mikroba oleh makrofag melalui proses fagositosis yang diikuti dengan mikrobisidal intraseluler (*intracellular killing*) dan digesti mikroorganisme. Produksi dan pelepasan intraseluler ROI merupakan mekanisme mikrobisidal intraseluler dan lisis ekstraseluler utama pada monosit dan makrofag. Masuknya partikel ke dalam makrofag selalu disertai peningkatan metabolisme yang berbentuk sebagai *respiratory burst* (letupan respiratori).^(11,26)

Istilah letupan respiratori berarti jalur metabolik, tak aktif bila sel sedang beristirahat, fungsinya ialah untuk memproduksi suatu kelompok agen mikrobisidal yang sangat aktif dengan jalan reduksi parsial dari oksigen. Terdapat empat komponen letupan respiratori : peningkatan konsumsi oksigen, produksi superoksida, produksi H₂O₂ dan aktivasi *hexose monophosphat shunt*.⁽³¹⁾

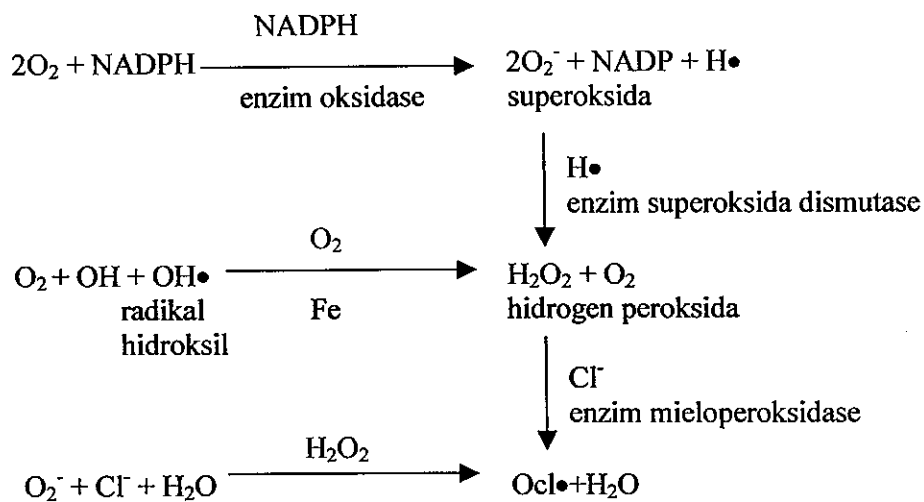
Mekanisme letupan respiratori : ^(31,32,33,34)

1. Kontak partikel dengan membran partikel akan mengaktifkan enzim NADPH oksidase. NADPH oksidase akan mengkatalis reduksi satu elektron dari oksigen menjadi superoksida dengan menggunakan NADPH sebagai donor elektron.
2. Dua molekul superoksida bergabung dengan bantuan enzim superoksida dismutase untuk membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2).
3. Mieloperoksidase (MPO) yang berasal dari degranulasi vakuola fagosit, H_2O_2 dan halida mengkatalis reaksi mikrobisidal.
4. Superoksida yang berasal dari vakuola fagosit direduksi oleh H_2O_2 dengan bantuan enzim superoksida dismutase.

H_2O_2 sitoplasmik didetoksifikasi oleh sistem katalase dan glutathion peroksidase-glutathion reduktase. Baik sistem NADPH oksidase pembentuk superoksida maupun sistem glutathion, keduanya membentuk NADP⁺. NADP tersebut dikonversi kembali menjadi NADPH oleh *hexose monophosphat shunt*.

Mekanisme mikrobisidal pada monosit terutama menggunakan jalur metabolik *oxygen dependent* dan membutuhkan proses letupan respiratori, sedangkan mekanisme mikrobisidal oleh makrofag belum diketahui secara pasti. Pada makrofag tidak terdapat enzim mieloperoksidase, dan pada makrofag yang matur terjadi penurunan progresif kemampuan memproduksi superoksida dan H_2O_2 . Proses mikrobisidal pada makrofag diduga kuat melalui jalur sistem metabolisme yang memproduksi H_2O_2 . Enzim katalase pada makrofag menggantikan peran enzim peroksidase sehingga makrofag mampu mengkatalis substrat dengan bantuan H_2O_2 , dan enzim lipid peroksidase yang berada di alveolar makrofag juga mempunyai kemampuan meningkatkan daya mikrobisidal H_2O_2 .⁽³¹⁾

Gambar 2.4. Pembentukan ROI ⁽³³⁾



Proses mikrobisidal dibagi menjadi 2 kategori besar : ^(31,35)

1. *oxygen-dependent systems*

Terdapat dua proses pada jalur ini :

a. *Peroxidase dependent*

Jalur ini membutuhkan enzim peroksidase. Peran penting peroksidase dalam mikrobisidal bakteri oleh fagosit telah dilaporkan oleh Klebnikoff (1967). Peroksidase akan meningkatkan efisiensi kemampuan mikrobisidal fagosit, sehingga bakteri akan terbunuh pada konsentrasi H_2O_2 yang rendah ($10 \mu\text{M}$). Tanpa bantuan enzim peroksidase, maka dibutuhkan konsentrasi H_2O_2 lebih tinggi ($0,5 \text{ mM}$) Terdapat empat komponen dalam jalur ini, yaitu : mieloperoksidase (MPO), hidrogen peroksida (H_2O_2), kofaktor yang teroksidasi (biasanya halida) dan pH asam. H_2O_2 merupakan komponen kunci pada sistem mikrobisidal *peroxidase dependent*, sebagaimana pertama kali dijelaskan terjadi pada neutrofil oleh Klebanoff pada tahun 1967. Nathan et al pada tahun 1979 menjelaskan bahwa H_2O_2 merupakan faktor utama pada sitotoksitas makrofag dan *killing* parasit. ⁽³⁶⁾

b. *Peroxidase independent.*

Jalur ini tidak membutuhkan peran enzim peroksidase. Komponen jalur ini, yaitu : H_2O_2 , anion superoksida, *singlet* oksigen dan radikal hidroksil. Pada konsentrasi tinggi H_2O_2 mempunyai aktivitas antimikroba secara langsung. H_2O_2 diproduksi secara cepat oleh dismutasi spontan anion superoksida, sehingga pelepasan H_2O_2 menjadi ukuran respon fagosit dan mikrobisidal terhadap stimulasi.^(31,32,36) H_2O_2 merupakan oksidan yang lebih reaktif dari pada superoksida, dan dengan mudah berdifusi lewat membran.⁽³³⁾ Anion superoksida mempunyai kemampuan bakterisidal yang lemah, anion superoksida tersebut dapat membentuk H_2O_2 yang memiliki kemampuan mikrobisidal yang besar apabila digunakan pada jalur peroksidase dependent. Superoksida dan H_2O_2 sangat kurang reaktif dibandingkan radikal hidroksil, dan kemungkinan tidak berperan langsung sebagai oksidan dalam sistem biologis.⁽³²⁾ *Singlet* oksigen berasal dari dismutasi spontan anion superoksida. Radikal hidroksil merupakan molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil.

2. *Oxygen independent systems*

Sistem ini tidak membutuhkan proses letupan respiratori. Proses ini dilakukan oleh enzim yang bersifat mikrobisidal, yaitu : lisosim, serin esterase, laktoferin, asam fosfatase, lipase, fosfolipase, dan histon. Selain itu, penurunan pH karena fusi lisosom akan menyebabkan beberapa organisme dapat terbunuh.

2.3.3. Makrofag dan *immunosenescence*

Perubahan limfosit pada proses penuaan telah banyak dijelaskan, misalnya penurunan respon terhadap sinyal, penurunan kemampuan proliferasi dan ekspansi serta suatu penyimpangan dari produk-produk mereka, misalnya sitokin dan imunoglobulin. Sebaliknya, hanya sedikit yang diketahui tentang perubahan makrofag yang berkaitan dengan penuaan, dan bagaimana perubahan-perubahan tersebut berperan pada *immunosenescence*.

Penelitian pada fungsi monosit dan makrofag pada manula memberikan hasil yang beragam. Beberapa peneliti menemukan bahwa tidak ada perbedaan kemampuan untuk membunuh bakteri ataupun membangkitkan sitokin antara monosit / makrofag orang muda dengan lanjut usia. Beberapa peneliti lain menemukan bahwa kemampuan monosit / makrofag untuk mempresentasikan antigen dan memproduksi sitokin semakin berkurang seiring dengan penambahan usia.

Sel-sel peritoneal *resident* dari mencit tua mengandung persentase sel B lebih banyak dibandingkan mencit muda, akan tetapi populasi sel adheren, yang terutama terdiri dari makrofag, tidak mempunyai perbedaan berarti. Pada lanjut usia terjadi gangguan fungsi makrofag teraktivasi, misalnya pelepasan IL-1 dan TNF- α dan *killing* mikroorganisme. Pelepasan H₂O₂ maupun NO dari makrofag tua sebagai respon terhadap IFN- γ menurun.⁽¹¹⁾ Kedua produk makrofag tersebut merupakan dua produk oksidatif penting yang dilepaskan oleh makrofag teraktivasi untuk mempertahankan inang terhadap ancaman mikroorganisme atau neoplastik.⁽³⁰⁾

Beberapa mekanisme yang diduga berperan pada penurunan letupan respiratori dari makrofag tua :⁽¹¹⁾

1. Penurunan sekresi IFN- γ atau sitokin pengaktivasi makrofag yang lain oleh limfosit.
2. Penurunan parsial pada aktivasi NADPH oksidase.
3. Peningkatan jumlah sel-sel B (yang berkaitan dengan penambahan usia) mungkin menurunkan respon makrofag mencit terhadap IFN- γ melalui pelepasan IL-4 atau IL-10 yang merupakan antagonis IFN- γ .
4. Gangguan kemampuan untuk berespon terhadap sitokin-sitokin pengaktivasi makrofag.

Weksler dan Schwab pada tahun 1992 melaporkan bahwa akibat stimulasi mitogen, sel T CD4+ dari orang lanjut usia memproduksi IL-2 lebih sedikit pada orang dewasa muda, tetapi kadar IFN- γ tidak berbeda secara berarti. Hobbs et al. pada tahun 1991 melaporkan peningkatan produksi IL-3, IL-4, IL-5 dan IFN- γ oleh sel T CD4+ pada mencit tua setelah paparan antibodi terhadap CD3. Penemuan-penemuan in vitro tersebut memberi kesan bahwa perubahan pada respon imun karena penuaan lebih terkait dengan perubahan pada makrofag dari pada limfosit.⁽¹¹⁾

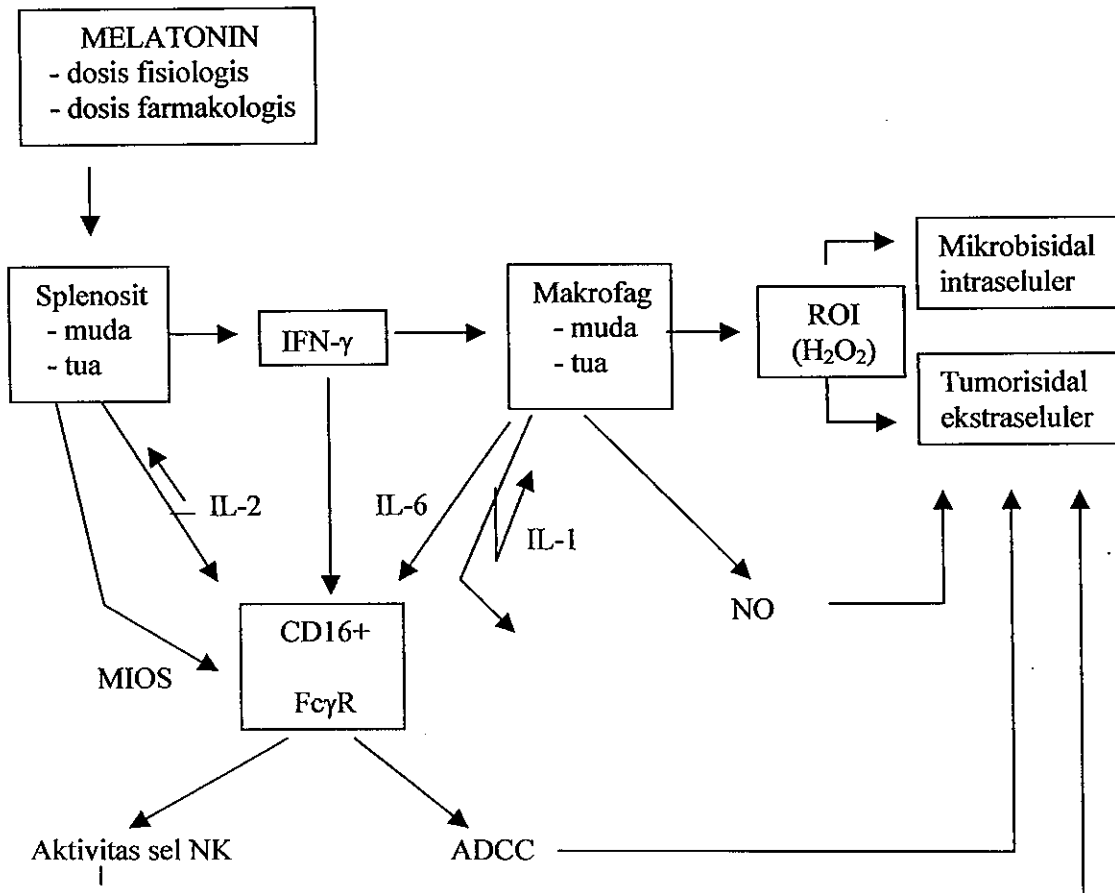
Ding, Hwang dan Schwab pada tahun 1994 melaporkan bahwa makrofag pada mencit BALB/c tua (umur 18 – 22 bulan) memproduksi H₂O₂ 50 % lebih rendah dibanding mencit muda (umur 6 – 8 minggu) sebagai respon terhadap PMA (Phorbol Myristate Acetate) ataupun zymosan. Sebaliknya, tidak ada perbedaan produksi sitokin-sitokin pengaktivasi makrofag (termasuk IFN- γ) pada supernatan splenosit dan ekspresi permukaan reseptor IFN- γ pada makrofag mencit tua dan mencit muda. Sehingga Ding menarik kesimpulan bahwa penurunan produksi H₂O₂ oleh makrofag pada mencit tua tersebut disebabkan karena penurunan respon makrofag tersebut terhadap sinyal pengaktivasi (IFN- γ).⁽¹¹⁾

Gambar 2.5. Penurunan respon makrofag mencit tua terhadap stimulasi IFN- γ ⁽¹¹⁾

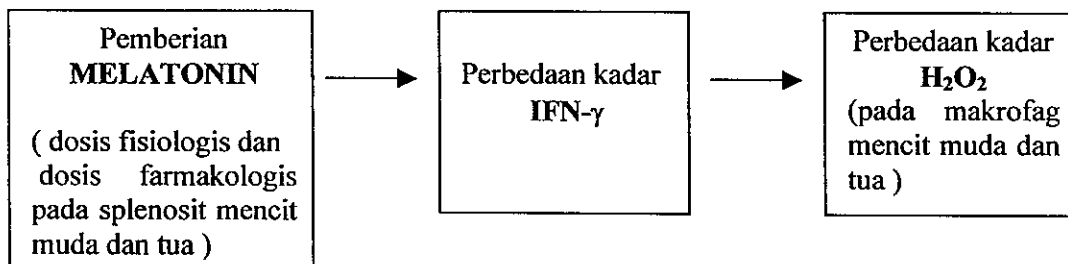
BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka teori



3.2. Kerangka konseptual



3.3. Hipotesis

1. Terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis.
2. Terdapat perbedaan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi IFN- γ yang dipacu dengan pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis.
3. Terdapat korelasi / hubungan antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi hidrogen peroksida.

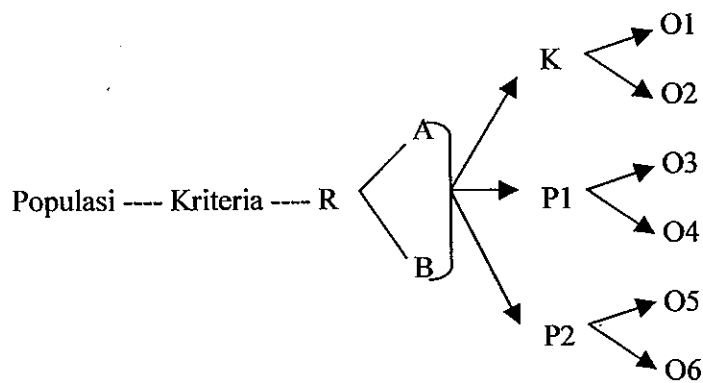
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan menggunakan desain eksperimental sederhana (*posttest only control group design*).

Obyek penelitian ialah hewan coba (mencit). Pemeriksaan dilakukan secara *in vitro*.



Keterangan :

Kriteria : mencit betina strain BALB/c, bergerak aktif, mampu menghabiskan makanan yang diberikan, berat badan 19-22 gram, peka terhadap rangsang, tak ada abnormalitas anatomis yang tampak.

R : Randomisasi

Randomisasi dilakukan dengan rancangan stratifikasi sederhana (*simple stratified random sampling*) berdasarkan umur mencit, yaitu :

- A. Mencit muda (umur 6-10 minggu)
- B. Mencit tua (umur 18 – 22 bulan)

K1 : Kelompok kontrol, mencit yang tidak mendapat perlakuan

P1 : Kelompok perlakuan 1, splenosit diinkubasi melatonin dosis 0,1 nM

P2 : Kelompok perlakuan 2, splenosit diinkubasi melatonin dosis 0,1 μ M

O1 : Hasil pengamatan splenosit mencit muda yang tidak mendapat perlakuan

O2 : Hasil pengamatan splenosit mencit tua yang tidak mendapat perlakuan.

O3 : Hasil pengamatan splenosit mencit muda yang mendapat perlakuan P1.

O4 : Hasil pengamatan splenosit mencit tua yang mendapat perlakuan P1.

O5 : Hasil pengamatan splenosit mencit muda yang mendapat perlakuan P2.

O6 : Hasil pengamatan splenosit mencit tua yang mendapat perlakuan P2.

4.2. Kriteria dan besar sampel

Hewan coba adalah mencit betina strain BALB/c umur muda (6-10 minggu) dan umur tua (18-22 bulan)., yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Malang) dan Pusvetma Surabaya.

Kriteria inklusi :

- a. Bergerak aktif, mampu menghabiskan makanan yang diberikan, peka terhadap rangsang.
- b. Berat badan 19 – 22 gram
- c. Tak ada abnormalitas anatomis yang tampak.

Kriteria eksklusi :

- a. Mencit tampak sakit (gerakan tak aktif, tak mampu menghabiskan makanan yang diberikan, tak peka terhadap rangsang)
- b. Berat badan < 19 gram atau > 22 gram
- c. Terdapat abnormalitas anatomi yang tampak

Mencit yang telah menjalani masa adaptasi selama 1 minggu dibagi secara acak menjadi 6 kelompok.

$$\begin{aligned} \text{Besar sampel} & : (n-1) (t-1) \geq 15 \\ & (n-1) (6-1) \geq 15 \\ & (n-1) (5) \geq 15 \\ & n \geq 4 \end{aligned}$$

4. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

4.3. Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel

- a. Variabel bebas terdiri dari melatonin, dosis fisiologis (0,1 nM) dan dosis farmakologis (0,1 μ M).
- b. Variabel perantara ialah kadar IFN- γ .
- c. Variabel tergantung ialah kadar hidrogen peroksida yang diproduksi oleh sel makrofag peritoneal

Definisi operasional

- a. Melatonin ialah hormon melatonin atau N-acetyl-5 methoxytryptamine yang diperoleh dari Sigma Chemical Co. (katalog M5250)
- b. Dosis fisiologis ialah konsentrasi melatonin yang mampu menimbulkan aktivitas dan atau efek fisiologis. Dosis fisiologis melatonin pada mencit ialah 0,1 nM
- c. Dosis farmakologis ialah konsentrasi melatonin yang mampu menimbulkan aktivitas dan atau efek farmakologik. Dosis farmakologis melatonin pada mencit ialah 0,1 μ M
- d. Kadar IFN- γ ialah kadar IFN- γ yang diproduksi oleh splenosit mencit, satuan : ng/ml dan diperiksa menggunakan metode ELISA dengan sensitifitas 2 pg/ml menggunakan ELISA kit spesifik (R&D system) sesuai dengan prosedur pada lampiran 3.
- e. Splenosit ialah sel yang diperoleh dari limpa mencit sesuai prosedur pada lampiran 1.

- f. Kadar hidrogen peroksida ialah kadar hidrogen peroksida yang diproduksi oleh sel makrofag mencit, satuan : μM , diperiksa menggunakan Bioxytech H_2O_2 kit (R&D system) sesuai dengan prosedur pada lampiran 4.
- g. Makrofag ialah sel yang diperoleh dari peritoneum mencit sesuai prosedur pada lampiran 2.
- h. Keterbatasan penelitian : karena keterbatasan biaya, pada penelitian ini digunakan supernatan splenosit (yang mengandung IFN- γ) sebagai aktivator makrofag, bukan rIFN- γ .

4.4. Bahan dan Alat penelitian

Hewan coba adalah mencit betina Strain BALB/c. Umur mencit 6-10 minggu dan 18-22 bulan. Alasan pemilihan mencit betina disebabkan karena peritoneum mencit betina umur tua tidak mempunyai lemak yang terlalu tebal dibanding mencit jantan umur tua sehingga memudahkan dalam isolasi sel makrofag peritoneum.⁽³⁷⁾ Mencit diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Malang) dan Pusvetma Surabaya. Selama percobaan hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara ad libitum. Sebelum perlakuan, mencit menjalani masa adaptasi selama satu minggu.

Melatonin yang digunakan untuk percobaan diperoleh dari Sigma Chemical Co. (Katalog No.M 5250). Konsentrasi / dosis yang digunakan ialah 0,1 nM dan 0,1 μM .

Splenosit diisolasi dari lien mencit dengan modifikasi metode Mishell (1980) dan Ding (1994) sebagaimana dijelaskan pada lampiran 1.^(11,37)

Makrofag diisolasi dari rongga peritoneum mencit modifikasi dengan metode Ding (1994) dan Lewis (1995) sebagaimana dijelaskan pada lampiran 2.^(11,38)

Pemeriksaan kadar IFN- γ dengan ELISA-kit spesifik (R&D system).

Pemeriksaan hidrogen peroksida dengan Bioxytech H_2O_2 kit (R&D systems)

4.5. Prosedur pemeriksaan

Seluruh hewan coba (\pm 24 ekor mencit) menjalani masa adaptasi selama satu minggu. Mencit yang memenuhi syarat kriteria inklusi kemudian menjalani proses randomisasi stratifikasi sederhana (*simple stratified random sampling*). Mula-mula mencit dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan umur mencit, yaitu umur muda (6-10 minggu) dan umur tua (18-22 bulan). Kemudian masing-masing mencit dalam kedua kelompok tersebut secara random sederhana dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yaitu : kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang mendapat melatonin dosis 0,1 nM (dosis fisiologis) dan kelompok perlakuan yang mendapat melatonin dosis 0,1 μ M (dosis farmakologis). Sehingga secara keseluruhan terdapat enam kelompok, yaitu :

- I. Kelompok kontrol, kelompok mencit muda yang tidak mendapat perlakuan
- II. Kelompok kontrol, kelompok mencit tua yang tidak mendapat perlakuan
- III. Kelompok perlakuan, kelompok mencit muda yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis 0,1 nM
- IV. Kelompok perlakuan, kelompok mencit tua yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis 0,1 nM
- V. Kelompok perlakuan, kelompok mencit muda yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis 0,1 μ M
- VI. Kelompok perlakuan, kelompok mencit tua yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis 0,1 μ M

Semua pemeriksaan dilakukan dengan replikasi tiga kali. Prosedur pemeriksaan merupakan modifikasi prosedur Ding (1994) dan Garcia-Maurino (1997) : ^(11,17)

Isolasi splenosit dilaksanakan setelah mencit mengalami masa adaptasi selama satu minggu. Splenosit mencit (3×10^6 sel/ml) diinkubasi dalam *plate* 24 sumuran berisi 1 ml

medium komplet yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penisilin (50 U/ml), streptomisin (50 µg/ml), glutamine (1 mM), 10 % FBS selama 48 jam dalam CO₂ 5 % pada suhu 37° C.

Pada kelompok perlakuan, pada kultur splenosit ditambahkan melatonin dosis / konsentrasi 0,1 nM (dosis fisiologis) atau 0,1µM (dosis farmakologis) dengan cara melarutkan melatonin dalam ethanol dan diencerkan menggunakan medium RPMI 1640 sebelum digunakan dalam kultur. Konsentrasi akhir ethanol dalam setiap kultur harus < 0,001 %. Pada kultur kontrol juga ditambahkan ethanol dengan konsentrasi maksimal 0,001 %. Supernatan dipisahkan dari sel dengan cara pemusingan dan penyaringan.

Setelah kultur diinkubasi selama 48 jam, konsentrasi IFN-γ dari supernatan kultur diukur dengan menggunakan ELISA-kit spesifik (R&D system), sesuai dengan prosedur pada lampiran 3.

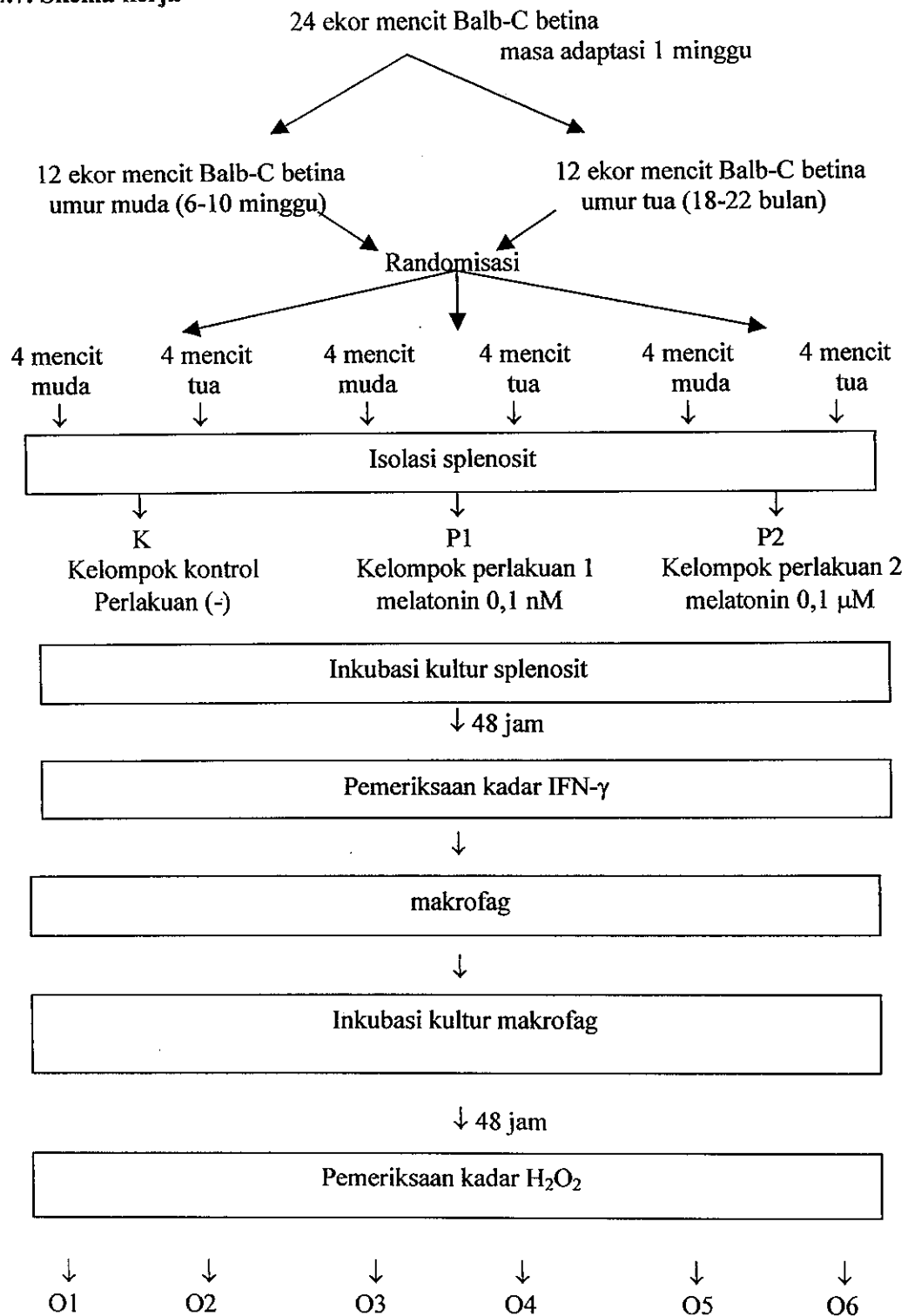
Supernatan kultur yang mengandung IFN-γ kemudian dicampur dengan makrofag mencit dalam *microplate* 96 sumuran dengan perbandingan 150 µl supernatan kultur : 50 µl makrofag mencit (konsentrasi 5 x 10⁵ sel/ml). Kultur kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5 % pada suhu 37° C selama 48 jam.

Setelah kultur diinkubasi selama 48 jam, konsentrasi H₂O₂ dalam kultur diperiksa menggunakan Bioxytech H₂O₂ kit (R&D systems), sesuai dengan prosedur pada lampiran 4.

4.6. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Laboratorium imunologi RS Telogorejo Semarang

4.7. Skema kerja



4.8. Analisis data

Data yang dikumpulkan adalah data primer yang terdiri dari kadar IFN- γ dan kadar H₂O₂ yang diproduksi dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Semua pemeriksaan dilakukan dengan metode yang sama dan dilakukan oleh orang yang sama pula.

Hasil yang didapat akan ditabulasi sesuai dengan kelompok yang ada.

Distribusi data kadar IFN- γ dan kadar H₂O₂ diuji normalitasnya dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Persamaan rerata IFN- γ dan H₂O₂ menurut umur mencit diuji dengan “t-test for equality of means”, yang persamaan variannya diuji dengan “Levene test for equality of variance”.

Perbedaan rerata IFN- γ dan H₂O₂ antar kelompok perlakuan diuji dengan uji Kruskal-Wallis 1-way ANOVA. Nilai batas kemaknaan yang digunakan ialah $p = 0,05$ untuk dua ekor (two tailed).

Korelasi antara IFN- γ dengan H₂O₂ diuji dengan uji korelasi Pearson dengan nilai batas kemaknaan $p = 0,05$ untuk satu ekor (one tailed).

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian pada 24 mencit BALB/c betina, dengan berat 19-22 gr. Secara *stratified random sampling*, mencit terbagi menjadi tiga kelompok, dengan stratifikasi umur. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol, terdiri 4 mencit muda dan 4 mencit tua. Kelompok kedua yang juga terdiri 4 mencit muda dan 4 mencit tua, splenosit diberi perlakuan inkubasi melatonin dosis fisiologis, sedangkan kelompok ketiga, terdiri 4 mencit muda dan 4 mencit tua, splenosit diberi perlakuan inkubasi melatonin dosis farmakologis.

5.1. Distribusi IFN- γ dan H₂O₂

Tabel 5.1. Distribusi IFN - γ dan H₂O₂

	Mean	Median	SD	Min	Max	K-S Z	P	Dist
IFN- γ	39,29	8,28	64,25	0,24	185,06	1,774	0,004	Tak normal
H ₂ O ₂	0,97	0,64	1,12	0,14	5,63	1,238	0,093	Normal

Rerata (mean) kadar IFN- γ semua mencit, baik yang diberi perlakuan melatonin maupun tidak, adalah $39,29 \pm 64,25$ pg/ml, dengan rentang nilai 0,24 pg/ml - 185,06 pg/ml. Median dari kadar IFN- γ adalah 8,28 pg/ml. Ditilik perbedaan rerata (mean) dan median serta besarnya angka SD, maka nampaknya distribusi kadar IFN- γ tidak normal, hal ini dibuktikan dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov yang signifikan ($p < 0,05$).

Kadar H₂O₂ sebagai hasil akhir dari penelitian, reratanya (mean) adalah $0,97 \pm 1,12$ μ M, dengan rentang nilai 0,14 - 5,63 μ M dan median 0,64 μ M. Melalui uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, distribusi kadar H₂O₂ normal.

5.2. Faktor pengaruh umur terhadap produksi IFN- γ dan H₂O₂ (Tabel 5.2.).

Umur tikus diduga berpengaruh terhadap produksi IFN- γ dan H₂O₂ pada mencit yang diberi melatonin. Pada penelitian ini telah dilakukan *matching* umur pada masing-masing kelompok.

Rerata kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit muda adalah 39,35 pg/ml, hampir sama dengan rerata kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit tua (39,22 pg/ml). Sedangkan rerata produksi H₂O₂ sebagai respon IFN- γ pada mencit muda adalah 1,19 μ M; hampir dua kali lipat rerata produksi H₂O₂ pada mencit tua (0,76 μ M).

Meskipun rerata (mean) kadar IFN- γ dan H₂O₂ mencit muda lebih tinggi dibanding mencit tua, namun perbedaan tersebut tidak bermakna ($p=0,996$ dan $p=0,36$).

Hal yang sama juga terjadi pada masing-masing kelompok perlakuan. Kadar IFN- γ mencit muda lebih tinggi dibanding mencit tua, pada kelompok kontrol dan melatonin dosis fisiologis. Sedangkan pada kelompok melatonin dosis farmakologis, kadar IFN- γ lebih tinggi pada mencit tua. Akan tetapi perbedaan kadar IFN- γ tersebut tidak ada yang bermakna ($p>0,05$).

Kadar H₂O₂ kelompok melatonin dosis fisiologis dan melatonin dosis farmakologis pada mencit muda lebih tinggi dibanding mencit tua, sedangkan pada kelompok kontrol kadar H₂O₂ mencit tua lebih tinggi dari pada mencit muda. Namun perbedaan semua di atas terjadi secara kebetulan, atau dengan kata lain tidak bermakna. Dengan demikian pengaruh faktor umur pada penelitian ini dapat dikendalikan.

Tabel 5.2. Perbedaan IFN- γ dan H₂O₂ antara mencit muda dan mencit tua

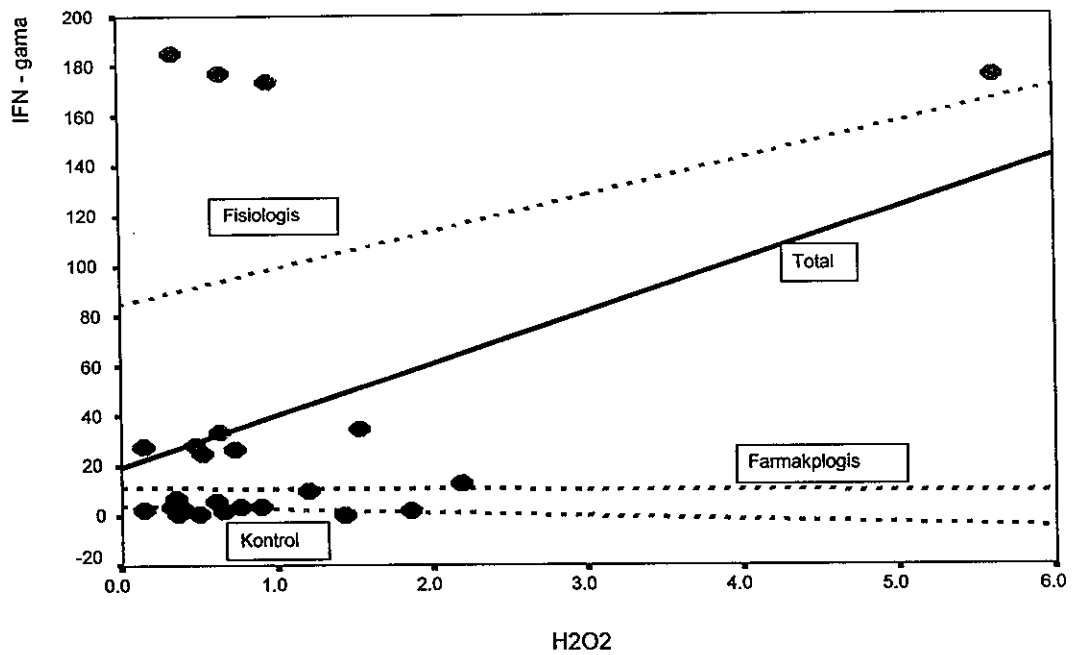
	Mencit Muda		Mencit Tua		P
	Mean	SD	Mean	SD	
IFN - γ	39,35	66,77	39,22	64,60	0,996
H ₂ O ₂	1,19	1,51	0,76	0,50	0,360
IFN - γ					
Kontrol	4,06	2,94	1,61	1,62	0,196
Fisiologis	107,13	84,39	100,99	85,75	0,922
Farmakologis	6,86	5,07	15,06	14,00	0,336
H ₂ O ₂					
Kontrol	0,43	0,12	1,14	0,62	0,104
Fisiologis	2,03	2,45	0,65	0,22	0,341
Farmakologis	1,09	0,82	0,48	0,39	0,222

5.3. Hubungan korelasional IFN- γ dan H₂O₂. (Gambar 5.3)

Terdapat korelasi searah yang erat antara IFN- γ dan H₂O₂ pada seluruh mencit ($r=0,3618$ dan $p=0,041$). Peningkatan kadar IFN- γ akan meningkatkan pula kadar H₂O₂, atau penurunan kadar IFN- γ akan menurunkan produksi H₂O₂.

Khusus pada kelompok mencit yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis, korelasi antara IFN- γ dan H₂O₂ kurang erat walaupun korelasinya searah ($r=0,3236$ dan $p=0,217$).

Korelasi IFN- γ dan H₂O₂ pada mencit kelompok kontrol dan mencit yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis farmakologis makin lemah, bahkan berlawanan arah. (Pada kontrol : $r=-0,0365$ dan $p=0,455$; dosis farmakologis : $r=-0,081$ dan $p=0,483$)



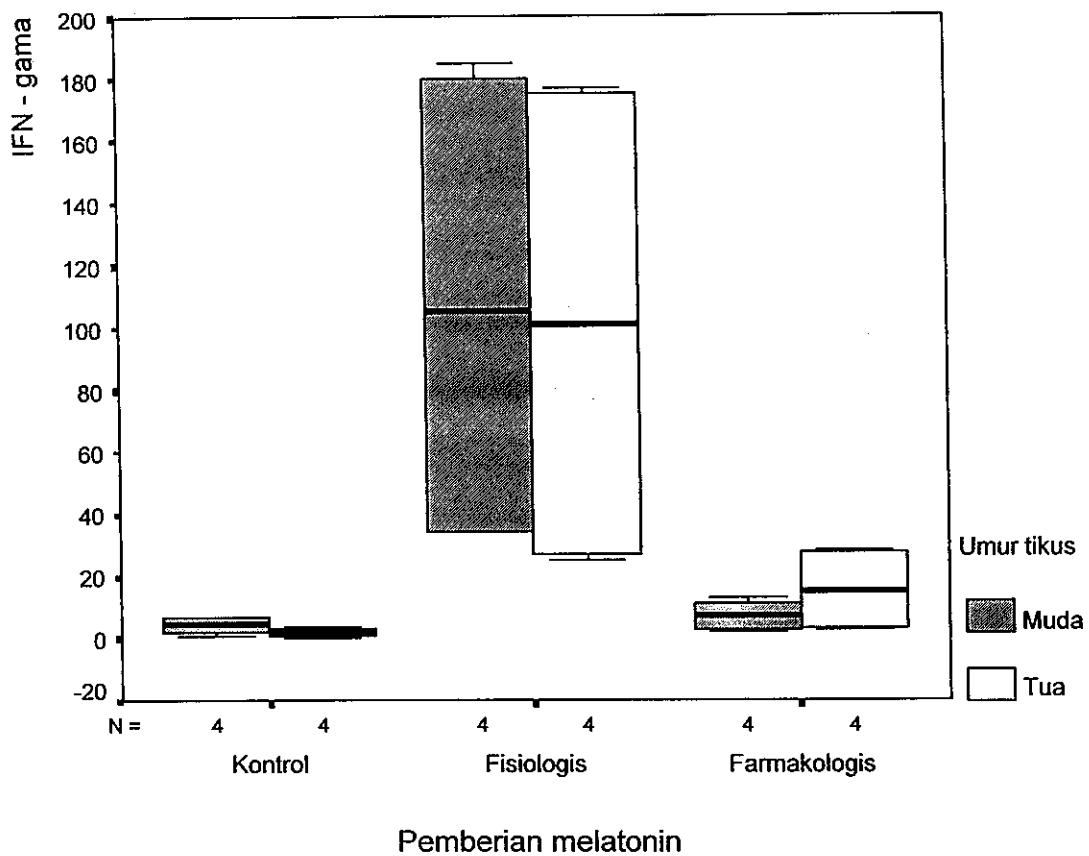
Gbr 5.3. Korelasi IFN - γ dengan H₂O₂

Apabila dilihat dari aspek umur tikus, ternyata pada mencit muda IFN- γ mempunyai korelasi yang erat dan searah dengan produksi H₂O₂ ($r=0,5514$ dan $p=0,032$). Sedangkan pada mencit korelasi IFN- γ dan H₂O₂ tersebut lemah dan berlawanan arah ($r=-0,0365$ dan $p=0,455$)

5.4. Perbedaan kadar IFN- γ pada masing-masing kelompok perlakuan

Variable	Mean	S D	Mean Rank	Min	Max	n
1 Kontrol	2.84	2.56	6.38	0.24	6.89	8
2 Fisiologis	104.06	78.83	20.25	25.05	185.06	8
3 Farmakologis	0.96	10.69	10.88	1.60	27.73	8

Kruskal-Wallis 1-way ANOVA = 16.0350 $p = 0,0003$



Gbr 5.4. Rerata IFN - γ menurut kelompok dan umur mencit

Kadar IFN- γ kelompok mencit yang splenosit diinkubasi melatonin dosis fisiologis lebih tinggi secara sangat bermakna ($p=0,0003$) dibanding kelompok kontrol maupun kelompok mencit yang splenosit diinkubasi melatonin dosis farmakologis.

Kelompok mencit yang splenosit diinkubasi melatonin dosis farmakologis, meskipun kadar IFN- γ lebih tinggi dibanding kelompok kontrol, akan tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna ($p>0,05$).

Apabila dikontrol dengan umur mencit, maka rerata kadar IFN- γ pada kelompok kontrol mencit muda adalah $4,06 \pm 2,94$ pg/ml dan kelompok kontrol mencit tua $1,61 \pm 1,62$ pg/ml. Rerata kadar IFN- γ pada kelompok melatonin dosis fisiologis mencit muda $107,13 \pm$

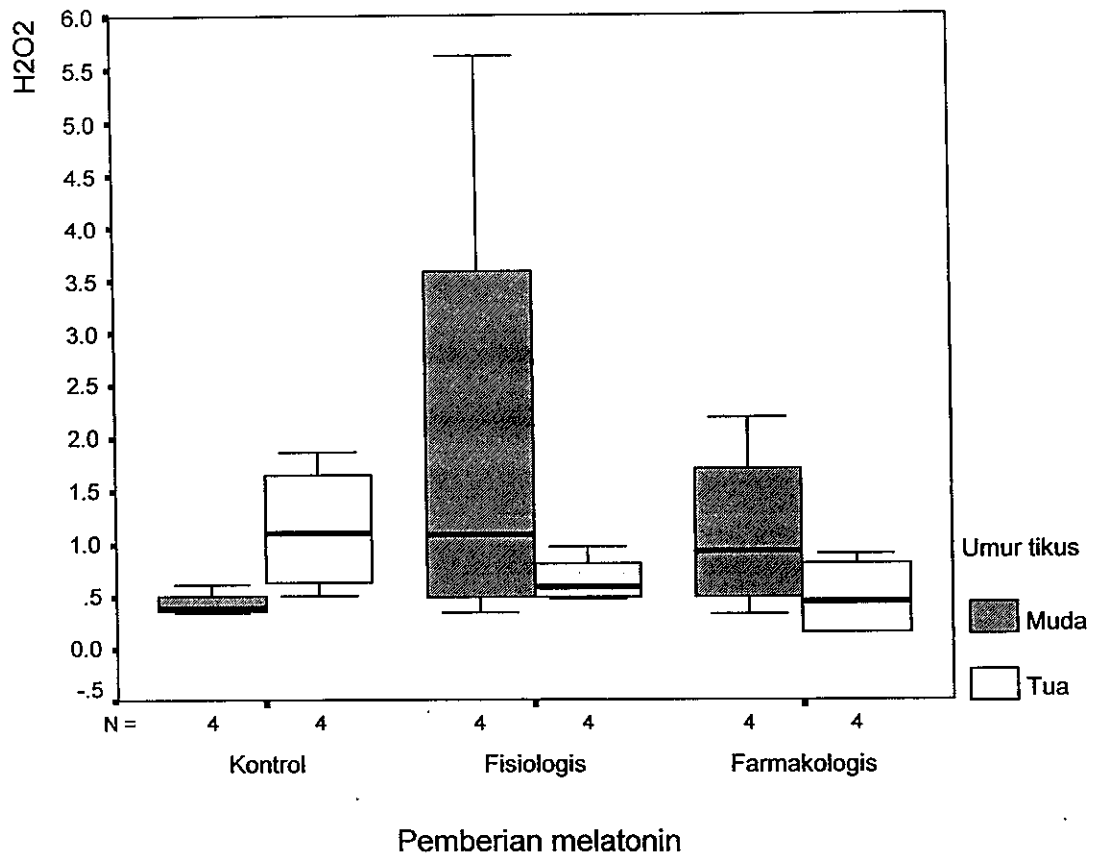
84,39 pg/ml, dan kelompok melatonin dosis fisiologis mencit tua $99,00 \pm 85,75$ pg/ml. Rerata kadar IFN- γ kelompok melatonin dosis farmakologis mencit muda $6,86 \pm 5,07$ pg/ml dan kelompok melatonin dosis farmakologis mencit tua adalah $15,06 \pm 14,00$ pg/ml.

Baik mencit muda maupun tua pada kelompok yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis, berbeda bermakna dengan 4 kelompok lain. Diantara mencit muda dan mencit tua pada kelompok yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Begitu pula kelompok-kelompok mencit muda-tua pada kelompok kontrol dan kelompok yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis farmakologis (lihat gambar 5.4.).

5.5. Perbedaan kadar H₂O₂ pada masing-masing kelompok perlakuan

Variable	Mean	S D	Mean Rank	Min	Max	n
1 Kontrol	0.78	0.56	11.94	0.35	1.86	8
2 Fisiologis	1.34	1.77	13.81	0.35	5.63	8
3 Farmakologis	0.79	0.68	11.75	0.14	2.19	8

Kruskal-Wallis 1-way ANOVA = 0,4164 p = 0,812



Gbr 5.5. Rerata kadar H₂O₂ menurut kelompok dan umur mencit

Tidak ada satupun kadar H₂O₂ yang berbeda secara bermakna ($p > 0,05$) pada mencit yang diberi melatonin fisiologis, melatonin farmakologis dan kontrol, meskipun kadar H₂O₂ pada kelompok fisiologis paling tinggi yaitu 1,34 µM (Gambar 5.5)

Apabila dikontrol dengan umur mencit, maka kadar H₂O₂ pada kelompok kontrol mencit muda adalah $0,43 \pm 0,12$ µM; lebih tinggi dibandingkan kadar H₂O₂ mencit tua ($1,14 \pm 0,62$ µM).

Pada kelompok yang splenositnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis dan farmakologis justru terjadi sebaliknya ; kadar H₂O₂ pada kelompok mencit muda lebih rendah dibandingkan kadar H₂O₂ mencit tua. Kadar H₂O₂ pada kelompok mencit muda yang

splenoitnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis ialah $2,03 \pm 2,45 \mu\text{M}$ dan mencit tua $2,65 \pm 0,22 \mu\text{M}$. Sedangkan kadar H_2O_2 pada kelompok mencit muda yang splenoitnya diinkubasi melatonin dosis farmakologis ialah $1,09 \pm 0,82 \mu\text{M}$ dan kelompok mencit tua $0,48 \pm 0,39 \mu\text{M}$.

Berdasar covariat umur mencit, maka tidak didapatkan perbedaan kadar H_2O_2 yang bermakna diantara kelompok kontrol, kelompok yang splenoitnya diinkubasi melatonin dosis fisiologis, dan kelompok yang splenoitnya diinkubasi melatonin dosis farmakologis.

BAB 6

PEMBAHASAN

Hingga saat ini belum ada kesepakatan di kalangan peneliti tentang perubahan kemampuan produksi IFN- γ pada penuaan. Beberapa peneliti menyimpulkan bahwa seiring dengan penuaan, kemampuan produksi IFN- γ akan menurun atau tidak berubah. Akan tetapi sebagian besar peneliti menyimpulkan bahwa kemampuan produksi IFN- γ pada mencit justru meningkat seiring dengan proses penuaan. ⁽³⁹⁾

Pada penelitian ini, seluruh mencit kelompok perlakuan dan kelompok kontrol rata-rata kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit muda lebih tinggi dibanding mencit tua, akan tetapi perbedaan kemampuan produksi IFN- γ tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$). Sehingga kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit tua sama dengan kemampuan splenosit mencit muda. Hasil penelitian ini mendukung kesimpulan penelitian Ding pada tahun 1994 yang menyimpulkan bahwa tidak dijumpai perbedaan kemampuan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit muda dan mencit tua. ⁽¹¹⁾

Ding juga menyimpulkan bahwa kemampuan produksi H₂O₂ oleh makrofag mencit tua sebagai respon terhadap IFN- γ (tanpa inkubasi melatonin) lebih rendah secara bermakna dibanding mencit muda, dan produksi H₂O₂ oleh makrofag mencit tua hanya 50 % dari makrofag mencit muda. Pada penelitian ini, kedua kelompok kontrol (tanpa inkubasi melatonin), didapatkan bahwa rerata kemampuan produksi H₂O₂ mencit tua justru lebih tinggi dibanding mencit muda, walaupun perbedaan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini sangat bertentangan dengan kesimpulan penelitian Ding, akan tetapi hasil tersebut mendukung pendapat Goonewardene dan Murasko yang menyatakan bahwa tidak ada perbedaan kemampuan pembentukan ROI (H₂O₂) pada lanjut usia, bahkan kemampuan

pembentukan H_2O_2 tersebut justru meningkat pada lanjut usia. Penyebab peningkatan kemampuan pembentukan H_2O_2 tersebut belum diketahui. ⁽⁴⁰⁾

Penelitian ini mendapatkan bahwa walaupun rata-rata kemampuan produksi H_2O_2 oleh makrofag mencit muda pada keseluruhan kelompok (kelompok kontrol maupun kelompok yang mendapat inkubasi melatonin) lebih tinggi dibanding mencit tua, akan tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$). Sehingga kemampuan produksi H_2O_2 makrofag mencit tua sama dengan kemampuan mencit muda.

$IFN-\gamma$ merupakan aktivator makrofag yang paling poten dalam kondisi in vitro maupun in vivo. Stimulasi $IFN-\gamma$ pada makrofag akan menginduksi transkripsi mRNA gp91-phox yang memicu produksi Superoksida yang kemudian mengalami dismutasi spontan menjadi H_2O_2 . ^(7,27)

Pada penelitian ini dijumpai hubungan searah antara kadar $IFN-\gamma$ dan produksi H_2O_2 pada seluruh kelompok dan kelompok 2 (splenosit diinkubasi dengan melatonin dosis fisiologis). Pada kelompok kontrol dan kelompok 3 (splenosit diinkubasi dengan melatonin dosis farmakologis) hubungan kadar $IFN-\gamma$ dan produksi H_2O_2 justru terbalik; peningkatan kadar $IFN-\gamma$ diikuti penurunan kadar H_2O_2 . Akan tetapi keseluruhan hubungan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$), sehingga kadar H_2O_2 yang dihasilkan makrofag pada penelitian ini tidak berkaitan langsung dengan $IFN-\gamma$

Dengan demikian H_0 yang menyatakan tidak terdapat korelasi / hubungan antara produksi $IFN-\gamma$ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi hidrogen peroksida diterima. H_1 yang menyatakan terdapat korelasi / hubungan antara produksi $IFN-\gamma$ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi hidrogen peroksida ditolak.

Hasil penelitian ini sangat bertentangan dengan hasil penelitian Ding yang menyimpulkan adanya hubungan searah dan *dose dependent* antara kadar IFN- γ dan H₂O₂. Perbedaan hasil penelitian ini kemungkinan disebabkan karena pada penelitian Ding digunakan rIFN- γ , sedangkan pada penelitian ini digunakan supernatan splenosit yang mengandung IFN- γ . Pada supernatan splenosit tersebut kemungkinan juga didapatkan aktivator-aktivator makrofag yang berperan dalam pembentukan ROI, misalnya : TNF- α , GM-CSF dan IL-1 α .⁽⁴¹⁾

Melatonin pada dosis fisiologis (0,1 nM) meningkatkan produksi IFN- γ secara sangat bermakna ($p < 0,01$). Peningkatan kemampuan produksi IFN- γ pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis pada mencit tua sama dengan mencit tua ($p > 0,05$). Akan tetapi melatonin pada dosis yang lebih tinggi, yaitu dosis farmakologis (0,1 μ M) meskipun mampu meningkatkan produksi IFN- γ , akan tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna bila dibandingkan kontrol ($p > 0,05$).

Dengan demikian Ho yang menyatakan tidak terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis ditolak. H1 yang menyatakan terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis diterima.

Akan tetapi Ho yang menyatakan tidak terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis farmakologis diterima. H1 yang menyatakan terdapat perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis farmakologis ditolak.

Hasil penelitian ini tidak mendukung penelitian Garcia-Maurino yang menyatakan bahwa dosis fisiologis dan farmakologis melatonin mampu meningkatkan kemampuan

produksi IFN- γ , dan efek tersebut bersifat *dose dependent*, semakin tinggi kadar melatonin, semakin tinggi kemampuan produksi IFN- γ .⁽¹⁷⁾ Perbedaan hasil penelitian tersebut kemungkinan disebabkan karena melatonin diduga berperan pada homeostasis sistem imun.⁽¹⁶⁾ Pada dosis fisiologis melatonin akan meningkatkan produksi IFN- γ , akan tetapi pada dosis yang lebih tinggi (dosis farmakologis), melatonin justru tidak menampakkan efek yang bermakna.

Produksi H₂O₂ oleh makrofag yang diinduksi IFN- γ yang terdapat supernatan splenosit pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis ternyata tidak berbeda secara bermakna dibandingkan kontrol ($p > 0,05$) walaupun terdapat peningkatan produksi H₂O₂ oleh makrofag mencit muda pada kelompok perlakuan 2 (splenosit diinkubasi dengan melatonin dosis fisiologis). Bahkan pada kelompok mencit tua, produksi H₂O₂ oleh makrofag yang diinduksi IFN- γ dari supernatan splenosit pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis dan farmakologis ternyata lebih sedikit dibanding kelompok kontrol.

Dengan demikian Ho yang menyatakan terdapat perbedaan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi IFN- γ yang dipacu dengan pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis diterima. H1 yang menyatakan terdapat perbedaan produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi IFN- γ yang dipacu dengan pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis ditolak.

Hasil penelitian ini sangat bertentangan dengan penelitian terdahulu oleh Morrey yang menyimpulkan bahwa melatonin pada dosis fisiologis mampu meningkatkan produksi H₂O₂.⁽¹⁸⁾ akan tetapi hasil ini sangat mendukung pendapat Ding bahwa pada mencit tua terdapat penurunan kemampuan produksi H₂O₂.⁽¹¹⁾

Ketidakteraturan pola pemicuan produksi H_2O_2 oleh IFN- γ pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis pada penelitian ini kemungkinan disebabkan karena pada penelitian ini digunakan supernatan splenosit yang mengandung IFN- γ sebagai aktivator makrofag, sehingga kemungkinan supernatan tersebut juga mengandung antagonis IFN- γ , yaitu IL-4, yang akan mengganggu efek aktivasi IFN- γ pada makrofag untuk membentuk H_2O_2 .

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

- 7.1.1. Tidak ada perbedaan produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua.
- 7.1.2. Terdapat peningkatan secara sangat bermakna pada produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis.
- 7.1.3. Terdapat peningkatan secara tak bermakna pada produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis farmakologis.
- 7.1.4. Produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda pasca inkubasi IFN- γ lebih tinggi (hampir dua kali lipat) dibanding mencit BALB/c tua.
- 7.1.5. Terdapat peningkatan tak bermakna pada produksi hidrogen peroksida oleh makrofag mencit BALB/c muda pasca inkubasi IFN- γ yang dipacu dengan pemberian melatonin dosis fisiologis atau farmakologis.
- 7.1.6. Tidak terdapat korelasi / hubungan langsung antara produksi IFN- γ oleh splenosit mencit BALB/c muda dan tua pasca inkubasi melatonin dosis fisiologis atau farmakologis terhadap produksi hidrogen peroksida.

7.2. Saran

- 7.2.1. Perlu dilakukan penelitian in vitro lebih lanjut dengan menggunakan rIFN- γ dan dilakukan pemeriksaan kadar sitokin-sitokin supresor / antagonis IFN- γ .
- 7.2.2. Perlu dilakukan penelitian in vivo tentang dosis optimal melatonin yang dapat meningkatkan produksi IFN- γ pada individu muda maupun lanjut usia.

7.2.3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan langsung antara IFN- γ dengan produksi H₂O₂ pasca pemaparan melatonin pada tingkat molekuler dengan cara memeriksa respon transkripsi mRNA gp91-phox.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Darmojo RB. Teori proses menua. Dalam : Darmojo RB, Martono H (eds). Buku ajar geriatri (ilmu kesehatan usia lanjut). Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1999 : 3 – 13.
2. Darmojo RB. Gerontologi sosial, masalah sosial dan psikologik golongan lanjut usia. Dalam : Darmojo RB, Martono H (eds). Buku ajar geriatri (ilmu kesehatan usia lanjut). Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1999 : 14 – 34.
3. Darmojo RB. Demografi dan epidemiologi populasi lanjut usia. Dalam : Darmojo RB, Martono H (eds). Buku ajar geriatri (ilmu kesehatan usia lanjut). Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1999 : 35 – 55.
4. Hadisaputro S, Wibisono BH. Aspek imunologik pada usia lanjut (peranannya pada infeksi dan penyakit lain). Dalam : Darmojo RB, Martono H (eds). Buku ajar geriatri (ilmu kesehatan usia lanjut). Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1999 : 56– 72.
5. Gardner ID, Lim ST, Lawton WM. Monocyte function in ageing human. *Mech. Ageing Dev* 1981; 16: 233- 41.
6. Nielsen H, Blom J, Larsen SO. Human Blood monocyte function in ageing human. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect C Immunol* 1984; 92: 5-12.
7. Nathan CF. Interferon- γ and macrophage activation in cell mediated immunity. In : *Mechanism of host resistance to infectious agents, tumour and allografts*. New York : Rockefeller University press, 1986: 165-184.
8. Denis M, Porat R. Direct effect of cytokines on microorganism. In: Agarwal BB, Puri RK (eds). *Human cytokines : their role in disease and therapy*. Massachusetts: Blackwell science Inc, 1995: 493 – 99.

9. Murray H.W. Interferon gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann intern Med* 1988; 108: 595-608.
10. Murray HW, Cohn ZA. Macrophages oxygen independent antimicrobial activity. III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation. *J Exp Med*. 1980; 152 :1596 – 610.
11. Ding A, Hwang S, Scwab R. Effect of aging on murine macrophages : Diminished response to IFN- γ for enhanced oxidative metabolism. *J. Immunol* 1994; 153 : 2146-52.
12. Mc Carty M.F. Promotion of interleukin-2 activity as a strategy for 'rejuvenating' geriatric immune function 1997; 48: 47-54.
13. Huether G. Melatonin as anti aging drug : between fact and fantasy. *Gerontology* 1996; 42: 87-96
14. Zhang Z, Inserra P.F, Liang B, Ardestani SK, Elliot K.K, Molitor M, et al. Melatonin, immune modulation and aging. *Autoimmunity* 1997; 26: 43-53.
15. Maestroni G.J. T-helper -2 lymphocyte as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal Res* 1995; 18 : 84-89
16. Liebmann P.M, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 203-11
17. Garcia-Maurino S, Gonzales-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN- γ production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997; 159: 574-81.
18. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocyte by the pineal hormon melatonin. *J Immunol* 1994; 153: 2671 - 80.
19. Langer M, Hartmann J, Turkof H, Waldhauser F. Melatonin in the human- an overview. *Wien Klin Wocheshr* 1997 Oct; 109: 707-13.

20. Maestroni GJ. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J pineal Res* 1995 Mar; 18: 84-9.
21. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 21: 307-15.
22. Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Science* 1997; 60: 2255-71.
23. Solana R, Pawelec G. Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 1998; 102: 115-29.
24. Zhang Z, Inserra PF, Liang B, Ardestani SK, Elliot KK, Molitor M, Watson RR. Melatonin, immune modulation and aging. *Autoimmunity* 1997; 26: 43-53.
25. Burleson GR, Burleson FG. Bioassay of interferon. In : Burleson GR, Dean JH, Munson AE (eds). *Methods in Immunotoxicology*. New York: A John Wiley & sons Inc publication, 1995 : 345-56.
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1994: 261-316.
27. Boehm , Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular response to IFN- γ . *Annu Rev. Immunol* 1997; 15: 749-95.
28. Subowo. *Imunobiologi*. Bandung: Angkasa, 1993: 151-65.
29. Lewis JG. Introduction to the mononuclear phagocyte system. In : Burleson GR, Dean JH, Munson AE (eds). *Methods in Immunotoxicology*. New York: A John Wiley & sons Inc publication, 1995 : 3-13.
30. Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, Calabrese C, Peluso G. Role of monocyte/macrophage population in immune response. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 23: 92-6

31. Drutz DJ, Mills JM. Immunity and Infection. In : Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Wells JV (eds). Basic and Clinical Immunology. 4th ed. California: Lange Medical Publication, 1984 : 209-232.
32. Walker BAM, Fantone JC. The inflammatory response. In : Sigal HS, Ron Y (eds). Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York: Mc Graw-Hill Inc., 1994: 359-86.
33. Sigal LH. Immunity to microorganism. In : Sigal HS, Ron Y (eds). Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York: Mc Graw-Hill Inc., 1994: 389-411.
34. Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. Clinical Microbiology reviews 1997 Jan; 10: 1-18.
35. Roitt IM, Brostoff J, Male D. Immunology 3rd ed. London: Mosby-Year Book Europe Ltd., 1988: 172-92.
36. Ruch W, Cooper PH, Baggiolini M. Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanilic acid and horse-radish peroxidase. Journal of Immunological Methods 1983; 63: 347-57.
37. Mishell BB, Shiigi SM, Henry C, Chan EL, North J, Gallily R et al. Preparation of mouse cell suspensions. In : Mishell B, Shiigi SM (eds). Selected methods in cellular immunology. New York: WH Freeman and Company, 1980: 3-21.
38. Lewis JG. Isolation of alveolar macrophages, peritoneal macrophages and kupfer cells. In : Burleson GR, Dean JH, Munson AE (eds). Methods in Immunotoxicology. New York: A John Wiley & sons Inc publication, 1995 : 15-27.
39. Hobbs MV, Ernst DN. The role of cytokines in aging. In: Agarwal BB, Puri RK (eds). Human cytokines : their role in disease and therapy. Massachusetts: Blackwell science Inc, 1995: 354 – 67.

40. Goonewardene IM, Murasko DM. Aging and immune system. In : Sigal HS, Ron Y (eds). Immunology and inflammation. Basic mechanisms and clinical consequences. New York: Mc Graw-Hill Inc., 1994: 495-508.
41. Whitman ED, Doherty GM, Peplinski GR, Norton JA. Role of cytokines in oxidative damage. In: Agarwal BB, Puri RK (eds). Human cytokines : their role in disease and therapy. Massachusetts: Blackwell science Inc, 1995: 333 – 51.