

**PENGARUH PEMBERIAN DIET
DENGAN BERBAGAI KANDUNGAN SENG
TERHADAP RESPONS IMUNITAS SELULER MENCIT Balb/C
YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

**(The effects of administration of various zinc concentration diets
on cellular immune response of *Salmonella typhimurium* infected Balb/C mice)**



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**HARTATI EKO WARDANI
G4A001003**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
JANUARI
2005**

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN DIET
DENGAN BERBAGAI KANDUNGAN SENG
TERHADAP RESPONS IMUNITAS SELULER MENCIT Balb/C
YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

**(The effects of administration of various zinc diets on cellular immune response
of *Salmonella typhimurium* infected Balb/C mice)**

disusun oleh :

Hartati Eko Wardani

G4A001003

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 7 Januari 2005
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota


dr. Edi Dharmana, PhD. Sp. ParK
NIP. 130 529 451


Dr. dr. Hertanto Wahyu S. MS, Sp. GK
NIP. 130 808 729

Mengetahui :

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Pasca Sarjana Universitas Diponegoro

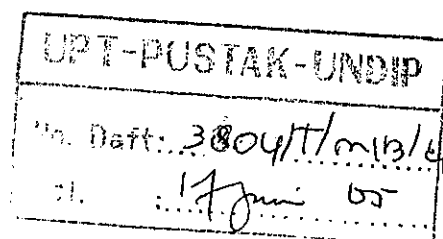

Prof. Dr. H. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 549

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Januari 2005

Hartati Eko Wardani



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

1. Nama Lengkap : dr. Hartati Eko Wardani
2. Jenis kelamin/ Agama : Perempuan/ Islam
3. Tempat/tanggal lahir : Semarang, 18 Januari 1975
4. Alamat : Jl. Taman Lamongan I/6 Semarang

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Petompon II di Semarang, lulus tahun 1987
2. SMPN 13 di Semarang, lulus tahun 1990
3. SMAN 3 di Semarang, lulus tahun 1993
4. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, lulus tahun 1999

Melanjutkan kuliah di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program

Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang mulai tahun 2001.

C. Riwayat Pekerjaan

Staf Pengajar di Jurusan Ilmu Keolahragaan Fakultas Ilmu Pendidikan Universitas Negeri Malang mulai tahun 2000 sampai sekarang.

D. Riwayat Keluarga

1. Orang tua : Bapak : Ir. Soeharto (alm)
Ibu : Sofiati Prangwardani, MSc
2. Suami : Hendra Susanto, SE
3. Anak : Rajendra Arsyad Cakrawardana (3 tahun)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmatnya tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini tersusun tidak lepas dari bantuan, dorongan, dan bimbingan dari berbagai pihak baik berupa moril maupun materil. Pada kesempatan ini, saya mengucapkan banyak terima kasih kepada yang terhormat:

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia melalui program BPPS yang telah memberikan biaya studi bagi kami pada program studi Ilmu Biomedik.
2. Rektor Universitas Negeri Malang, Dekan Fakultas Ilmu Pendidikan, dan Ketua Jurusan Ilmu Keolahragaan Fakultas Ilmu Pendidikan Universitas Negeri Malang, yang telah memberikan ijin dan kesempatan pada staf pengajarnya untuk melanjutkan studi.
3. Rektor Universitas Diponegoro dan Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah mengizinkan saya untuk mengikuti studi di Magister Ilmu Biomedik.
4. Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K), selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, yang membuka peluang untuk saya dalam mengikuti studi di Magister Ilmu Biomedik
5. dr. Edi Dharmana, PhD, Sp.ParK, selaku pembimbing I dan Dr. dr. Hertanto Wahyu Subagio, MS, Sp.GK selaku pembimbing II yang senantiasa

meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing dan memberikan pengarahan dalam menyusun tesis ini.

6. dr. Winarto, DMM, Sp.M, Sp.MK, dr. Kis Djamiatun, MSc, dr. Neni Susilaningsih, MSi, dan dr. M. Masjhoer MSMed, SpFK, selaku Tim Penguji yang telah berkenan memberi petunjuk dan pengarahan lebih lanjut mengenai pelaksanaan penelitian tesis.
7. dr. Parno Widjojo, SpFK, dr. Lisyani Suromo, SpPK(K), Dr. dr. Endang Purwaningsih, MPH, Sp.GK, selaku narasumber yang telah banyak memberi saran untuk penyelesaian tesis ini.
8. Seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah banyak memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis di saat menempuh pendidikan pada program studi tersebut.
9. dr. Hermina Sukmaningtyas MKes, selaku konsultan laboratorium yang telah memberikan bimbingan dalam melaksanakan penelitian di laboratorium Bioteknologi UNDIP.
10. Kepala Laboratorium Biokimia, Bioteknologi, GAKI, dan Mikrobiologi UNDIP beserta staf yang telah membantu dan memberikan kesempatan bagi penulis untuk memanfaatkan fasilitas laboratorium dalam pelaksanaan tesis.
11. Teman-teman S-2 Program Studi Ilmu Biomedik (Ike, Ani, Isti, Emma, Arina) yang telah banyak membantu penulis selama penyelesaian tesis.
12. Ibuku tercinta (Sofiaty Prangwardani, MSc), yang senantiasa berdoa demi kesuksesan penulis, serta suami dan anakku tersayang (Hendra Susanto, SE

dan Rajendra Arsyad Cakrawardana), yang dengan penuh pengertian memberikan kesempatan dan semangat bagi penulis untuk terus maju.

13. Semua pihak yang tak dapat disebutkan satu persatu.

Saya menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, saran dan kritik yang membangun sangat saya harapkan demi kemajuan dan pengembangan keilmuan saya.

Semarang, Januari 2005

Hartati Eko Wardani

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Pernyataan	iii
Riwayat hidup	iv
Kata pengantar	v
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xii
Abstrak	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. <i>Salmonella</i> sp.	8
2.1.1. Aspek bakteriologi	8
2.1.2. Demam Tifoid	9
2.1.2.1. Epidemiologi	9
2.1.2.2. Patofisiologi	10
2.1.3. Fase-fase infeksi <i>S. typhimurium</i> secara eksperimental	11
2.2. Respons Imunitas Tubuh	13
2.2.1. Sistem Imunitas Tubuh	13
2.2.2. Mekanisme respons imunitas terhadap <i>S. typhimurium</i>	14
2.2.2.1. Sistem imunitas alamiah	14
2.2.2.2. Sistem imunitas <i>adaptive</i>	18
2.2.3. Organ Limfoid	22
2.3. Sistem Imunitas dan Zat Gizi	24
2.3.1. Protein dan Sistem Imunitas	25
2.3.2. Seng	26
2.3.2.1 Peranan seng	26
2.3.2.2. Absorpsi dan metabolisme seng	28
2.3.2.3. Homeostasis seng	31
2.3.2.4. Konsentrasi seng serum	33
2.3.2.5. Pengaruh seng terhadap respons imunitas	34
2.3.2.6. Interaksi seng, besi, dan tembaga	37
2.4. Kerangka Teori	41
2.5. Kerangka Konsep	42

2.6. Hipotesis	43
BAB 3. METODE PENELITIAN	44
3.1. Rancangan penelitian	44
3.2. Populasi dan Sampel	45
3.2.1. Populasi	45
3.2.2. Sampel	46
3.2.2.1. Cara pengambilan sampel	46
3.2.2.2. Jumlah sampel	47
3.3. Variabel Penelitian	47
3.4. Definisi Operasional	48
3.5. Bahan dan Materi	50
3.6. Alat/instrumen penelitian	51
3.7. Tempat dan waktu penelitian	51
3.8. Prosedur pengumpulan data	52
3.9. Alur kerja	54
3.10. Analisa Data	55
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	56
4.1. Hasil	56
4.1.1 Penelitian I	56
4.1.1.1 Asupan Seng	56
4.1.1.2 Konsentrasi seng serum	58
4.1.1.3 Respons Proliferasi Limfosit	60
4.1.1.4 Kemampuan Fagositosis Makrofag	63
4.1.1 Penelitian II	66
4.1.2.1 Asupan seng	66
4.1.2.2 Uji Kesintasan (Survival)	67
4.2. Pembahasan	69
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	75
5.1. Kesimpulan	75
5.2. Saran	76
BAB 6. RINGKASAN	77
DAFTAR PUSTAKA	81
LAMPIRAN	86

DAFTAR TABEL

1. Taksonomi genus <i>Salmonella</i> dengan serogrup dan serovar	9
2. Proporsi jenis-jenis sel limfoid pada jaringan manusia normal	22
3. Tabel Deskripsi Asupan Seng Mencit Penelitian I	57
4. Tabel Uji <i>Post Hoc</i> LSD terhadap Asupan Seng (Penelitian I)	58
5. Volume (dalam μ l) dan Kondisi Serum Mencit	59
6. Tabel Deskripsi Berat Lien	61
7. Tabel Deskripsi Jumlah Relatif Limfoblas	63
8. Tabel Deskripsi Jumlah Latex yang difagositosis Makrofag	64
9. Tabel Uji <i>Post Hoc</i> LSD terhadap Jumlah Latex yang difagositosis Makrofag	65
10. Tabel Deskriptif Asupan Seng Mencit (Penelitian II)	66
11. Tabel Uji Mann Whitney Asupan Seng (II)	67
12. Tabel Deskripsi Waktu Survival	68

DAFTAR GAMBAR

1. Mekanisme pengenalan dan respons imunitas alamiah terhadap <i>S. typhimurium</i>	16
2. Kerjasama antara makrofag teraktivasi dengan CTLs dalam mengeliminasi bakteri intraseluler	20
3. Respons imunitas tubuh terhadap <i>S. typhimurium</i>	21
4. Absorpsi seng di intestinum	29
5. Penyaluran seng dalam tubuh	30
6. Pengaruh pemberian seng terhadap respons imunitas seluler	36
7. Efek pemberian seng dosis tinggi terhadap respons imunitas seluler	40
8. Diagram Boxplot Asupan Seng Mencit (Penelitian I)	57
9. Diagram Boxplot Berat Lien	61
10. Diagram Boxplot Jumlah Relatif Limfoblas	62
11. Diagram Boxplot Jumlah Latex yang difagositosis Makrofag	64
12. Diagram Boxplot Asupan Seng Mencit (Penelitian II)	66
13. Diagram <i>Survival Kaplan Meier</i>	68
14. Pengambilan lien mencit	124
15. Pengambilan cairan peritoneum	124
16. Penyuntikan mencit intraperitoneal	125
17. Limfoblas berada di antara beberapa limfosit pada pembesaran 400 x	125
18. Limfoblas dan limfosit	126
19. Sebuah makrofag memfagositosis 11 buah lateks pada pembesaran 1000 x	126
20. Fagositosis lateks oleh makrofag dalam beberapa stadium	127
21. Makrofag pada pembesaran 100 x	127
22. Makrofag pada pembesaran 400 x	127

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Persiapan pembuatan suspensi kuman <i>S. typhimurium</i> dengan kepekatan tertentu	86
2. Penelitian LD50 <i>S. typhimurium</i> .	91
3. Komposisi Diet Mencit	96
4. Lampiran Prosedur	98
5. Lampiran Data	105
6. Lampiran Statistik	112
7. Lampiran Foto	124
8. Hasil Pemeriksaan Seng dalam Serum	128

**PENGARUH PEMBERIAN DIET DENGAN BERBAGAI KANDUNGAN SENG
TERHADAP RESPONS IMUNITAS SELULER MENCIT Balb/C
YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Hartati Eko Wardani

ABSTRAK

Latar belakang : Seng banyak dipakai sebagai terapi penunjang penyakit infeksi karena punya efek positif terhadap sistem imunitas seluler. Penelitian yang membuktikan efek positif seng tersebut banyak dilakukan pada subjek yang mengalami defisiensi seng. Beberapa penelitian membuktikan bahwa pemberian seng dalam dosis tinggi mempunyai efek yang merugikan terhadap sistem imunitas seluler, baik secara langsung maupun melalui interaksinya dengan mineral-mineral lain, seperti besi dan tembaga. Pengaruh pemberian diet dengan konsentrasi seng yang berbeda terhadap respons imunitas seluler pada penyakit demam tifoid belum diketahui.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian diet dengan berbagai kandungan seng terhadap respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*.

Metode : Penelitian ini menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Subjek penelitian, yaitu 88 mencit Balb/C jantan, dibagi menjadi dua kelompok yaitu : grup I (studi respon proliferasi limfosit dan kemampuan fagositosis makrofag) dan II (studi kelangsungan hidup), 40 ekor untuk grup I dan 48 ekor untuk grup II. Tiap grup kemudian dibagi lagi secara acak menjadi empat subgrup, sesuai dengan kandungan seng pada diet, yaitu 30 ppm sebagai kelompok kontrol, 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm. Diet diberikan secara *ad libitum* selama 10 hari (grup I) dan 28 hari (grup II). Mencit diinfeksi dengan $2,5 \times 10^4$ (grup I) dan $2,5 \times 10^6$ (grup II) *S. typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-8. Mencit penelitian I dibunuh pada hari ke-11 untuk diperiksa respons proliferasi limfosit di organ lien, dan kemampuan fagositosis makrofag peritoneal. Jumlah mencit penelitian II yang mati post infeksi diamati dari hari ke-1 sampai hari ke-21 post infeksi.

Hasil : Hasil studi ini menunjukkan bahwa berat lien mencit yang diberi diet tinggi seng tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet seng normal ($p = 0,303$), jumlah relatif limfoblas mencit yang diberi diet tinggi seng tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet seng normal ($p=0,231$), kemampuan fagositosis makrofag mencit yang diberi diet tinggi seng lebih rendah secara bermakna dibandingkan dengan yang diberi diet seng normal ($p=0,000$). Kelangsungan hidup mencit yang diberi diet tinggi seng tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet seng normal ($p = 0,19$).

Kesimpulan : Pemberian diet dengan kandungan seng tinggi pada mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* tidak meningkatkan respons imunitas selulernya.

Kata kunci : seng, respons imunitas seluler, *Salmonella typhimurium*

**THE EFFECTS OF ADMINISTRATION OF VARIOUS ZINC CONCENTRATION DIETS
ON CELLULAR IMMUNE RESPONSE OF
SALMONELLA TYPHIMURIUM INFECTED BALB/C MICE**

Hartati Eko Wardani

ABSTRACT

Background : Zinc is mostly used as adjuvant therapy of infectious disease because of its positive effects on cellular immune system. A lot of studies which proved the positive effects were conducted to zinc deficiency subjects. However, deleterious effects caused by high dose zinc had been found by several studies. These effects were either directly or through its interaction with other minerals, like iron and copper. However, the effect of different zinc concentration diet on cellular immune response during typhoid fever has not been carried out.

Objective : The aim of this study was to find out the effect of administration of various zinc concentration diets on cellular immune response of *S. typhimurium* infected Balb/C mice.

Method : This research used post-test only control design. Eighty-eight male Balb/C mice, were divided into 2 groups : 40 mice for first group (measuring lymphocyte proliferation response and macrophage phagocytosis capacity study) and 48 mice for second group (survival study). Each group was then also divided randomly into four subgroups based on the zinc contained in their diet; 30 ppm as control, 60 ppm, 120 ppm, and 240 ppm. The diet was given *ad libitum* for 10 days (1st group) and 28 days (2nd group). The mice were infected with $2,5 \times 10^4$ (1st group) and $2,5 \times 10^6$ (2nd group) *S. typhimurium* intraperitoneally on the 8th day treatment. The mice on 1st group were killed on the 11th day for the examination of their lymphocyte proliferation response in spleen and peritoneal macrophage for phagocytosis capacity. The number of survived mice on 2nd group was observed from the first day to 21th day post infection.

Result : It is demonstrated in this study that there is no significant difference on the spleen weight and relative amount of lymphoblast between mice given high zinc diet and normal zinc diet ($p=0,303$ and $p=0,231$ respectively). The mice given high zinc diet is significantly lower compared to those given normal zinc diet ($p=0,000$). There is no significant difference on the survival study between mice given high zinc diet and normal zinc diet ($p=0,19$).

Conclusion : Administration of high zinc concentration diet to *S. typhimurium* infected Balb/C mice does not enhance their cellular immune response.

Keywords : zinc, cellular immune response, *Salmonella typhimurium*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Penyakit demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius terutama di negara-negara berkembang. Hasil survey rumah sakit di Indonesia menunjukkan bahwa penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* ini masih menempati tempat kedua dari sepuluh penyakit menular terbanyak setelah gastroenteritis¹. Diperkirakan terdapat 16 juta kasus demam tifoid dengan kira-kira 600.000 kematian di dunia, sedangkan Indonesia menempati urutan tertinggi di Asia Tenggara dengan insiden 1000 per 100.000 penduduk².

Penyakit ini dapat menyebabkan perdarahan dan perforasi usus, bahkan menimbulkan komplikasi seperti hepatitis, meningitis, nefritis, miokarditis, bronchitis, pneumonia, osteomielitis, parotitis, dan lain-lain. Pemakaian antibiotika yang tepat memang dapat mengurangi kejadian komplikasi, namun angka kejadian demam tifoid yang relaps dan resisten terhadap antibiotik makin banyak di beberapa negara endemis. Sekitar 3-5% penderita biasanya menjadi karier asimtomatik dalam jangka waktu yang lama³.

Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara *host* dan mikroba. *S. typhi* sebagai penyebab demam tifoid merupakan kuman batang bergerak, gram negatif, dan bersifat fakultatif intraseluler. Tubuh mempunyai sistem

imunitas, baik alamiah maupun *adaptive*, dalam mengatasi antigen asing yang masuk, termasuk *S. typhi*. Peran fagosit dalam respons imunitas alamiah terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom fagosit dan mempunyai kemampuan untuk menghindar dari proses *killing* fagosit, seperti mencegah fusi antara fagosom dan lisosom⁴.

Sistem imunitas yang lebih efektif dalam mengeliminasi *S. typhi* adalah sistem imunitas *adaptive* seluler. Mekanisme sistem imunitas seluler terdiri dari (1) *killing* mikroba yang terfagositosis sebagai hasil dari aktivasi makrofag oleh sitokin-sitokin limfosit T (terutama IFN- γ) dan (2) lisis sel yang terinfeksi oleh CD8⁺ CTLs⁴.

Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui mekanisme respons imunitas yang terjadi pada demam tifoid manusia, misalnya dengan cara menginfeksi hewan coba, seperti mencit, dengan *S. typhimurium*. Gejala dan perjalanan penyakit yang tampak pada mencit terinfeksi *S. typhimurium*, analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia. Hal tersebut menyebabkan infeksi *S. typhimurium* pada mencit dapat diterima secara luas sebagai model eksperimental untuk demam tifoid manusia⁵.

Sel T *helper* (Th), terutama sel Th1, merupakan sel yang sangat penting dalam respons imunitas melawan *S. typhimurium*. Sitokin-sitokin Th1 seperti IFN- γ dan TNF- α mengaktifkan mekanisme bakterisidal pada makrofag dan meningkatkan kapasitas sel tersebut untuk membunuh *S. typhimurium*. Infeksi *S. typhimurium* pada mencit sebetulnya dapat menginduksi dengan kuat respons sel Th1. Sebagian besar sel T CD4⁺ dan CD8⁺ akan teraktifasi setelah infeksi, namun proliferasi dan

ekspansinya hanya meningkat sedikit⁵. Proliferasi limfosit T yang rendah akan menyebabkan sitokin-sitokin yang dihasilkannya (terutama IFN- γ) tidak cukup banyak untuk dapat mengaktivasi makrofag, sehingga kemampuan fagositosis dan *killing* makrofag terhadap *S. typhi* akan menurun. Inilah yang menjadi alasan mengapa penderita demam tifoid disamping diberi terapi antibiotika perlu diberi suplemen tambahan yang menguntungkan bagi sistem imunitas.

Salah satu mineral yang mempunyai efek positif terhadap sistem imunitas adalah seng. Seng merupakan salah satu zat gizi mikro yang sangat dibutuhkan oleh tubuh meski dalam jumlah relatif kecil. Asupan seng normal pada manusia berkisar antara 107-231 mol/hari (6 – 15 mg/hari) atau ekuivalen dengan 14 – 30 mg/kg (ppm) diet pada tikus⁶. Seng berperan dalam fungsi pertumbuhan, perkembangan, reproduksi, dan stabilisasi membran sel.^{7,8} Keadaan defisiensi seng dapat meningkatkan kerentanan seseorang terhadap penyakit infeksi seperti sepsis, pneumonia, flu, dan *Candida*⁹.

Berbagai penelitian telah membuktikan tentang efek positif seng terhadap sistem imunitas, antara lain sebagai inhibitor apoptosis melalui penekanannya terhadap sekresi hormon glukokortikoid, yang merupakan *inducer* apoptosis bagi timosit maupun prekursor sel T, pada subjek defisiensi seng.⁹ Pemberian seng juga dapat mengaktifkan hormon timulin, suatu hormon yang diperlukan untuk diferensiasi, proliferasi dan maturasi limfosit T.¹⁰ Suplementasi seng dapat pula menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK, suatu sitokin yang diperlukan untuk mengaktivasi makrofag, pada darah perifer pasien hemodialisis defisiensi seng.¹¹

Secara *in vitro*, seng dapat memacu produksi IL-1 β , IL-6, IFN- α , dan TNF- α oleh monosit.¹² TNF- α dapat menginduksi produksi IFN- γ oleh sel NK pada mencit SCID pada fase awal infeksi bakteri intraseluler¹³. Gaworski dan Sharma, seperti dikutip oleh Duchateau, membuktikan bahwa pemberian seng 250 ppm (5 kali dosis optimal seng untuk mencit; ekuivalen dengan 10 kali kebutuhan seng untuk manusia atau 150 mg) per hari lewat makanan pada mencit tanpa defisiensi seng selama satu bulan, dapat meningkatkan respons limfosit terhadap *phytohemagglutinin* (PHA) dan *pokeweed mitogen*.¹⁴

Studi-studi yang membuktikan efek positif seng terhadap sistem imunitas banyak dilakukan pada subjek dengan defisiensi seng.¹⁵ Hal tersebut belum tentu dapat diterapkan pada subjek dengan status gizi normal. Pemberian seng pada penderita defisiensi seng mempunyai peluang lebih besar untuk mengubah biomarker-tergantung seng, karena suplemen secara nyata dapat mengembalikan simpanan seng yang semula rendah¹⁶.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian seng dosis tinggi dapat menurunkan sistem imunitas tubuh. Mekanisme penurunan sistem imunitas tersebut dapat secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung, seng dapat menurunkan kadar IFN- α , konsumsi oksigen oleh neutrofil, dan aktivitas NADPH oksidase, yang kesemuanya dapat menurunkan kemampuan fagositik dan bakterisidal fagosit^{10,17}. Secara tidak langsung, seng menurunkan sistem imunitas melalui interaksinya dengan mineral-mineral lain, seperti besi dan tembaga. Studi Rossander-Hulten menunjukkan bila seng diberikan dalam air dengan rasio seng dan besi 5 : 1,

akan terjadi penurunan absorpsi besi sebesar 56%¹⁸. Pemberian Zn gluconat 50 mg/hari selama 10 minggu pada 18 wanita sehat, dapat menurunkan *Erythrocyte Superoxide Dismutase* (ESOD), yang merupakan salah satu indikator status tembaga¹⁹. Terjadinya penekanan terhadap absorpsi mineral tersebut menyebabkan sistem imunitas juga akan terganggu, karena besi dan tembaga juga mempunyai efek terhadap sistem imunitas. Defisiensi besi, dari berbagai studi in vitro, diketahui dapat menurunkan fungsi leukosit PMN, jumlah limfosit, aktivitas sel NK, dan produksi IL-2 oleh limfosit.²⁰ Defisiensi tembaga dapat menurunkan produksi timulin, aktivitas mikrobisidal fagosit, dan sitotoksitas sel NK pada hewan coba²¹.

Beberapa hasil penelitian yang masih kontroversial tersebut menimbulkan pertanyaan tentang bagaimana pengaruh pemberian seng terhadap sistem imunitas seluler penderita demam tifoid. Sebagai langkah awal, peneliti ingin mengetahui efek pemberian seng pada mencit yang diinfeksi *S. typhimurium*, yang merupakan kuman intraseluler, terhadap sistem imunitas selulernya. Penelitian ini akan mencari pengaruh pemberian seng melalui makanan dengan berbagai kandungan seng terhadap sistem imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*.

1.2. PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian diet dengan kandungan seng 30, 60, 120, dan 240 mg/kg (ppm) dapat mempengaruhi respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. TUJUAN UMUM

Mengetahui pengaruh pemberian diet dengan kandungan seng 30 mg/kg (ppm), 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm terhadap respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*.

1.3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Menganalisis perbedaan konsentrasi seng serum mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada pemberian diet dengan berbagai kandungan seng.
2. Menganalisis perbedaan respons proliferasi limfosit (berat lien dan jumlah relatif limfoblas) mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada pemberian diet dengan berbagai kandungan seng.
3. Menganalisis perbedaan kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada pemberian diet dengan berbagai kandungan seng.
4. Menganalisis perbedaan kelangsungan hidup mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada pemberian diet dengan berbagai kandungan seng.

1.4. MANFAAT PENELITIAN

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pertimbangan dalam memberikan seng sebagai terapi penunjang terhadap penyakit demam tifoid. Karena penelitian ini dilakukan pada hewan coba, maka hasil penelitian ini diharapkan juga dapat dipakai sebagai landasan untuk penelitian lebih lanjut pada manusia, yaitu pemberian seng sebagai terapi penunjang demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 SALMONELLA sp

2.1.1 ASPEK BAKTERIOLOGI

Salmonella sp adalah kuman batang bergerak, gram negatif, berflagela, fakultatif anaerob serta fakultatif intraseluler 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 *Enterobacteriaceae* dan secara signifikan menyebabkan penyakit enterik^{3,22}. *Salmonella* mempunyai tiga macam antigen, yaitu O (antigen somatik), H (antigen flagella), dan Vi (antigen kapsul). Seperti basil gram negatif lain, *salmonella* diselubungi oleh struktur lipopolisakarida (LPS) kompleks yang berperan sebagai endotoksin dan dapat menentukan virulensi kuman.^{23,24}

Salmonellosis adalah penyakit yang disebabkan oleh *salmonella*, yang meliputi beberapa sindrom, yaitu : gastroenteritis, demam enterik, septikemia, infeksi fokal, dan stadium karier asimtomatik. Semua jenis spesies *salmonella* dapat menyebabkan munculnya semua sindrom tersebut, namun *Salmonellosis* yang disebabkan oleh *S. typhi*, *paratyphi A*, dan *S. schottmuelleri* cenderung menyebabkan demam enterik. *Salmonellosis* yang disebabkan oleh *S. typhimurium* dan *S. enteridis* cenderung menyebabkan gastroenteritis²⁴.

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

Tabel 1. Taksonomi genus *Salmonella* dengan serogrup dan Serovar (sumber : Keusch³)

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

- Sebelumnya subspesies (V) *S. enterica*.

2.1.2. DEMAM TIFOID

2.1.2.1 Epidemiologi

Demam tifoid adalah penyakit yang disebabkan oleh *S. typhi*, dan kadang pula oleh *S. paratyphi*. Penyakit ini ditularkan dari satu orang ke orang yang lain, dengan penularan utama adalah kontaminasi melalui feses manusia dengan air sebagai perantara^{23,24}. Penyebaran penyakit ini terkait erat dengan sanitasi lingkungan. Di negara maju yang sanitasi lingkungannya 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, sedangkan di negara berkembang, dimana status ekonominya masih rendah dan sanitasi lingkungan belum baik, penyakit demam tifoid masih merupakan masalah kesehatan yang serius¹.

Saat ini juga sudah ditentukan adanya wilayah yang dikenal sebagai *hotspot* demam tifoid di dunia yaitu Peru, Alexandria, Jakarta, India, Pakistan dan Nepal. Di daerah endemik *S. typhi*, angka kejadian demam tifoid diantara individu dengan HIV positif 25 kali lebih tinggi di bandingkan dengan individu dengan HIV negatif³.

2.1.2.2 Patofisiologi

S. typhi masuk melalui mulut menuju lambung. Sebagian kuman musnah oleh asam lambung, dan sebagian lagi masuk ke usus halus. Kuman membentuk koloni di ileum dan kolon, menginvasi sel epitel usus, melalui salah satu dari dua mekanisme berikut ini untuk kemudian mencapai lamina propria:

- a. *S. typhi* ditangkap oleh sel *microfold* (sel M), suatu epitel berbentuk kubah yang menutupi *Plaque Peyer*, lalu masuk ke dalam sel limfoid di bawahnya.
- b. Kuman terinternalisasi ke dalam enterosit, di mana kuman masuk kedalam vakuola yang terikat membran enterosit, masuk ke dalam sitosol, lalu bakteri dilepas ke bagian basal sel tanpa merusak sel usus.

Kuman yang telah mencapai lamina propria, akan bertemu dengan makrofag yang kemudian akan memfagositosisnya. Beberapa organisme tetap tinggal di dalam jaringan limfoid usus halus dan bermultiplikasi, yang lain dialirkan ke limfonodi mesentrik, lalu melalui *ductus thoracicus* masuk ke dalam aliran darah, sehingga terjadi bakteremia primer yang bersifat sementara dan asimtomatik. Selama terjadi bakteremia primer, organisme disaring dari sirkulasi oleh sel-sel fagosit di hepar, lien, dan sumsum tulang. Kemampuan bakteri untuk bertahan hidup serta bermultiplikasi, yang ditentukan oleh resistensi kuman terhadap daya bunuh makrofag dan sel T yang teraktivasi menentukan apakah terjadi bakteremia sekunder atau tidak.^{3,22}

2.1.3 Fase-Fase Infeksi *Salmonella Typhimurium* Secara Eksperimental

Penelitian tentang respons imunitas pada demam tifoid yang dilakukan pada hewan coba tidak menggunakan kuman *S. typhi*, karena kuman tersebut hanya dapat berkembang biak dalam tubuh manusia²⁶. *S. typhimurium* sering dipakai untuk menginfeksi hewan coba, karena *salmonellosis* yang terjadi analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia.

Infeksi *S. typhimurium* secara sistemik pada tikus diperkirakan melalui fase-fase berikut²⁷:

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

2. Fase kedua. Pada fase ini selama hari pertama infeksi disebut sebagai tahap pertumbuhan eksponensial dan terjadi sebelum respons imunitas spesifik. Pada fase ini, selain faktor genetik host, neutrofil juga sangat berperan, karena neutrofil berfungsi sebagai pertahanan efektif melawan infeksi *Salmonella* akan menghambat pertumbuhan *Salmonella*. Hepar mencit yang diinokulasi *S. typhimurium* mengandung banyak neutrofil yang bila migrasinya dihambat oleh antibodi monoklonal infeksi menjadi lethal.²³
3. Fase ketiga. Setelah 3-7 hari, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hepar dan lien kemudian pertumbuhannya menetap (*latent*) dibawah pengaruh makrofag teraktifasi yang memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi. Makrofag sangat berperan dalam meningkatkan daya bunuh bakteri intrasel oleh sel lain (sel NK atau granulosit) dengan cara memproduksi sitokin-sitokin. Fase ini juga disebut *plateu phase*.
4. Fase pembersihan. Fase ini terjadi selama seminggu ketiga infeksi yang melibatkan aktifitas limfosit. Pada fase ini sel T CD4⁺ dan sel NK memperantarai terjadinya pembersihan *Salmonella* di hepar dan lien. Sitokin yang terlibat adalah IFN- γ yang diekspresikan oleh T CD4⁺ dan sel NK .

Sel Th1 merupakan sel yang sangat penting dalam sistem imunitas melawan *S. typhimurium*. Seperti telah dijelaskan pada bab Pendahuluan, infeksi *S. typhimurium* pada mencit dapat menginduksi dengan kuat respons sel Th1, namun proliferasi dan ekspansinya hanya meningkat sedikit⁵. Ada beberapa

kemungkinan yang menyebabkan rendahnya proliferasi limfosit tersebut, antara lain :²⁸

1. Mencit yang diinfeksi Salmonella dapat mensupresi proliferasi sel T yang diduga berkorelasi dengan meningkatnya ekspresi rantai alfa reseptor IL-2.
2. Mungkin proliferasinya normal, namun diikuti oleh kematian limfosit yang juga tinggi.

2.2 RESPONS IMUNITAS TUBUH

2.2.1. Sistem imunitas tubuh

Sistem imunitas adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk mempertahankan keutuhan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Pertahanan tersebut terdiri atas sistem imunitas alamiah (*natural/innate*) dan didapat (*adaptive/acquired*).²⁹ Sistem imunitas alamiah merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena itu dapat memberikan respons langsung terhadap antigen. Beberapa sel yang penting pada sistem ini adalah sel polimorfonuklear (PMN), mononuklear (MN), sel *Natural Killer* (sel NK), dan sel *Killer* (sel K).²⁹

Sistem imunitas *adaptive* mempunyai kemampuan untuk mengenal benda asing yang sudah pernah dijumpai sebelumnya. Pertama kali muncul, benda asing mensensitisasi sel-sel sistem imunitas spesifik. Bila sel sistem imunitas tersebut

berpapasan kembali dengan benda asing yang sama, maka benda asing itu akan dikenal lebih cepat dan segera dapat dihancurkan.²⁹

Sistem imunitas spesifik ada 2 macam yaitu :

- Sistem imunitas humoral

Berperan dalam sistem imunitas ini adalah limfosit B atau sel B. Bila sel B dirangsang oleh benda asing, maka sel tersebut akan berproliferasi dan berkembang menjadi sel plasma yang membentuk antibodi. Fungsi utama antibodi adalah pertahanan terhadap infeksi bakteri ekstraseluler dan menetralkan toksinnya.²⁹

- Sistem imunitas seluler

Berperan dalam sistem imunitas ini adalah limfosit T atau sel T. Sel T terdiri dari beberapa subset dengan fungsi yang berlainan, antara lain T *helper* (Th) dan T sitotoksik (Tc). Fungsi utama sistem imunitas ini adalah untuk pertahanan terhadap bakteri intraseluler, virus, jamur, parasit dan keganasan.²⁹

2.2.2. Mekanisme respons imunitas terhadap *Salmonella typhimurium*

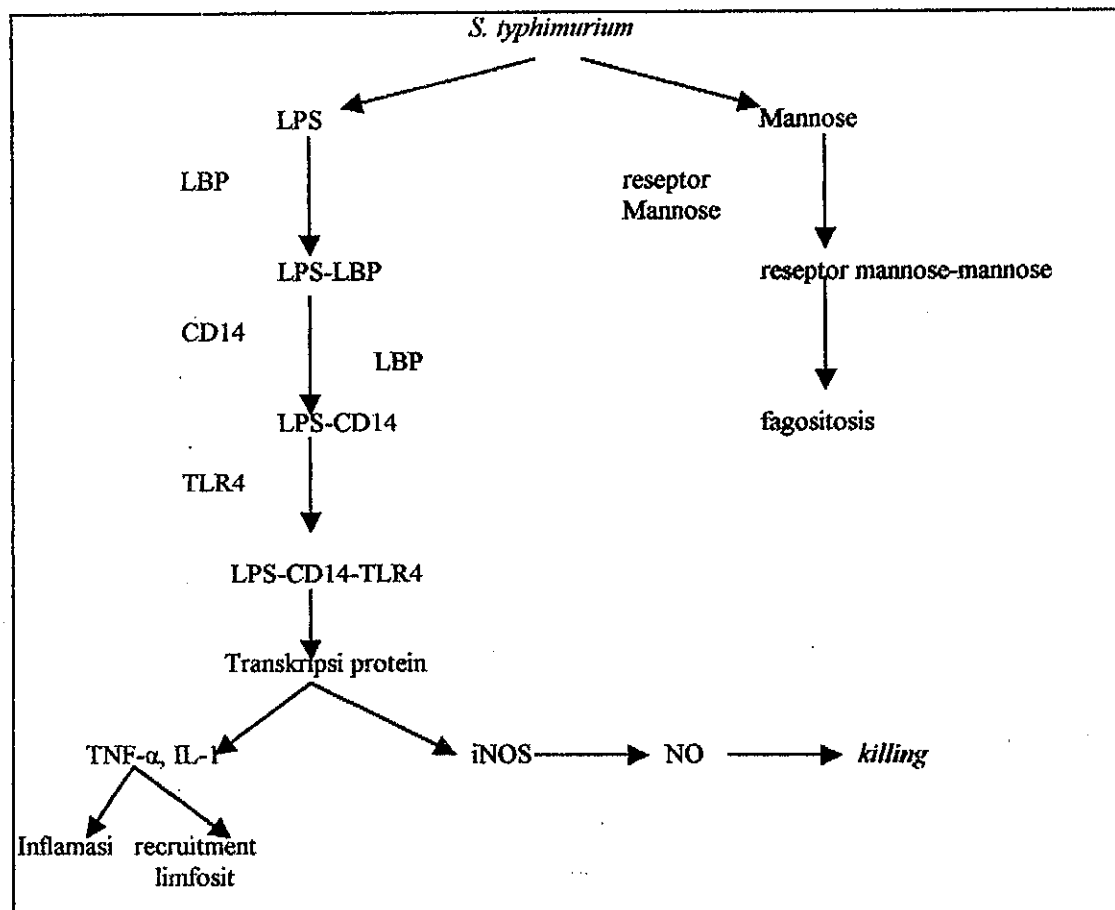
2.2.2.1 Sistem imunitas alamiah

S. typhimurium, seperti halnya bakteri gram negatif lainnya, dapat dikenali oleh sistem imunitas tubuh melalui dinding selnya yang mengandung LPS (lipopolisakarida). LPS yang merupakan bagian dari dinding sel bakteri bagian luar

dan terdiri dari komponen lipid dan polisakarida ini adalah stimulator yang poten bagi sistem imunitas alamiah. LPS mula-mula diikat oleh protein terlarut darah/ cairan ekstraseluler yang disebut *LPS-binding protein* (LBP). Kompleks LPS-LBP akan memfasilitasi pengikatan LPS ke molekul CD14, suatu molekul yang terdapat dalam membran plasma sel fagosit atau terlarut dalam plasma. LBP akan melepaskan diri dari LPS setelah LPS terikat pada CD14, dan kompleks LPS-CD14 bergabung dengan *Toll-like receptor 4* (TLR4), suatu protein reseptor yang dapat mengenali molekul mikroba dan dapat menstimulasi respons imunitas alamiah.³⁰

Kompleks yang terbentuk antara LPS, CD14, dan TLR4 memicu serangkaian proses yang berlangsung dalam fagosit, dengan hasil akhir transkripsi gen pengkode protein-protein yang berperan dalam respons imunitas alamiah, antara lain : sitokin-sitokin inflamasi (TNF- α , IL-1, IL-12) dan protein-protein yang terlibat dalam mekanisme *killing* mikroba (misalnya enzim *inducible nitric oxide synthase* atau iNOS). Sitokin IL-1 dan TNF- α akan mengaktivasi sel endotel untuk memproduksi selektin, ligan untuk integrin, dan kemokin. Ketiganya berperan penting dalam proses *recruitment* leukosit ke tempat infeksi.³⁰

Sebagaimana salmonella yang lain, selain LPS, *S. typhimurium* juga dikenali fagosit melalui mannose yang terdapat dalam dinding selnya. Reseptor mannose fagosit akan membentuk kompleks dengan mannose *S. typhimurium* dan hal ini memicu terjadinya fagositosis pada fagosit.³⁰ (Gambar 3).



Gambar 1. Mekanisme Pengenalan dan Respons Imunitas Alamiah terhadap *S. typhimurium* (Dimodifikasi dari Abbas AK³⁰)

Interaksi yang terjadi antara reseptor dan mannose tersebut akan membangkitkan suatu sinyal yang melibatkan fosforilasi molekul globular aktin (G-aktin), yang akhirnya terpolimerisasi membentuk fiber aktin (F-aktin). Polimerisasi aktin ini membutuhkan hidrolisis ATP yang dilakukan oleh enzim ATP-ase membran. Bentuk F-aktin diperlukan untuk membentuk pseudopodi yang akan melingkupi partikel yang difagositosis dan membentuk fagosom.³¹

Sel-sel fagosit yang telah berkumpul di tempat infeksi akan memfagositosis bakteri tersebut. Bakteri yang telah difagositosis akan terkurung dalam fagosom yang dibentuk oleh membran sel fagosit, dan kemudian fagosom tersebut bergabung dengan lisosom membentuk fagolisosom. Dalam fagolisosom inilah bakteri mengalami proses *killing*.³⁰

Makrofag yang telah memfagositosis bakteri intraseluler melepaskan sitokin IL-12 yang antara lain akan ditangkap oleh sel NK. Sel NK merespons dengan memproduksi IFN- γ yang akhirnya mengaktifasi fagosit. Makrofag yang teraktivasi akan menunjukkan karakter yang berbeda dengan saat belum teraktivasi. Antara lain, makrofag yang teraktivasi lebih aktif membunuh mikroorganisme. Proses *killing* tersebut meliputi fagositosis dan pembentukan ROI (*reactive oxygen intermediate*). IFN- γ meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dan menginduksi transkripsi gen pengkode enzim yang membentuk oksigen reaktif. Sistem pembangkit radikal bebas utama adalah sistem fagosit oksidase (NADPH oksidase) dan proses terbentuknya ROI ini disebut sebagai *respiratory burst*. Fagosit oksidase merupakan enzim yang terutama terdapat dalam membran fagolisosom, yang berfungsi untuk mereduksi molekul oksigen menjadi ROI, seperti radikal O_2^- , H_2O_2 , OH , dan OH . Superoksida secara enzimatik diubah menjadi H_2O_2 yang akan digunakan oleh enzim mieloperoksidase untuk mengubah ion halida yang tidak reaktif menjadi asam hipoklorus yang bersifat toksik untuk bakteri.³⁰

Makrofag yang teraktivasi oleh IFN- γ juga mengekspresikan enzim iNOS yang mengkatalisis produksi RNI (*reactive nitrogen intermediate*). RNI yang paling

utama adalah radikal *nitric oxide* (NO). Proses terbentuknya NO terjadi di sitosol, dimana enzim iNOS mengkatalisa perubahan asam amino L-arginin menjadi sitrulin dengan melepaskan gas NO yang dapat berdifusi ke dalam fagolisosom. NO dapat bereaksi dengan superoksida dalam fagolisosom, membentuk radikal peroksinitrit (ONOO⁻) yang bersifat sangat bakterisidal.³⁰

Selain dengan ROI dan RNI, proses *killing* bakteri juga terjadi melalui aksi enzim-enzim proteolitik yang berasal dari lisosom saat fagosit teraktivasi. Kontribusi enzim-enzim tersebut untuk membunuh bakteri intraseluler relatif kecil, misalnya elastase, suatu protease serin berspektrum luas yang dibutuhkan untuk membunuh banyak tipe bakteri.³⁰

2.2.2.2 Sistem imunitas *adaptive*

Bakteri intraseluler mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup dan bahkan berkembang biak dalam makrofag, sehingga sistem imunitas alamiah kurang efektif dalam membunuh bakteri jenis ini. Sistem imunitas yang paling baik dalam mengeliminasi bakteri intraseluler adalah sistem imunitas *adaptive*, terutama seluler, karena antibodi (sistem imunitas humoral) tidak dapat masuk ke dalam sel untuk membunuh bakteri.⁴ Ada dua mekanisme sistem imunitas *adaptive* seluler dalam mengatasi bakteri intraseluler, yaitu :

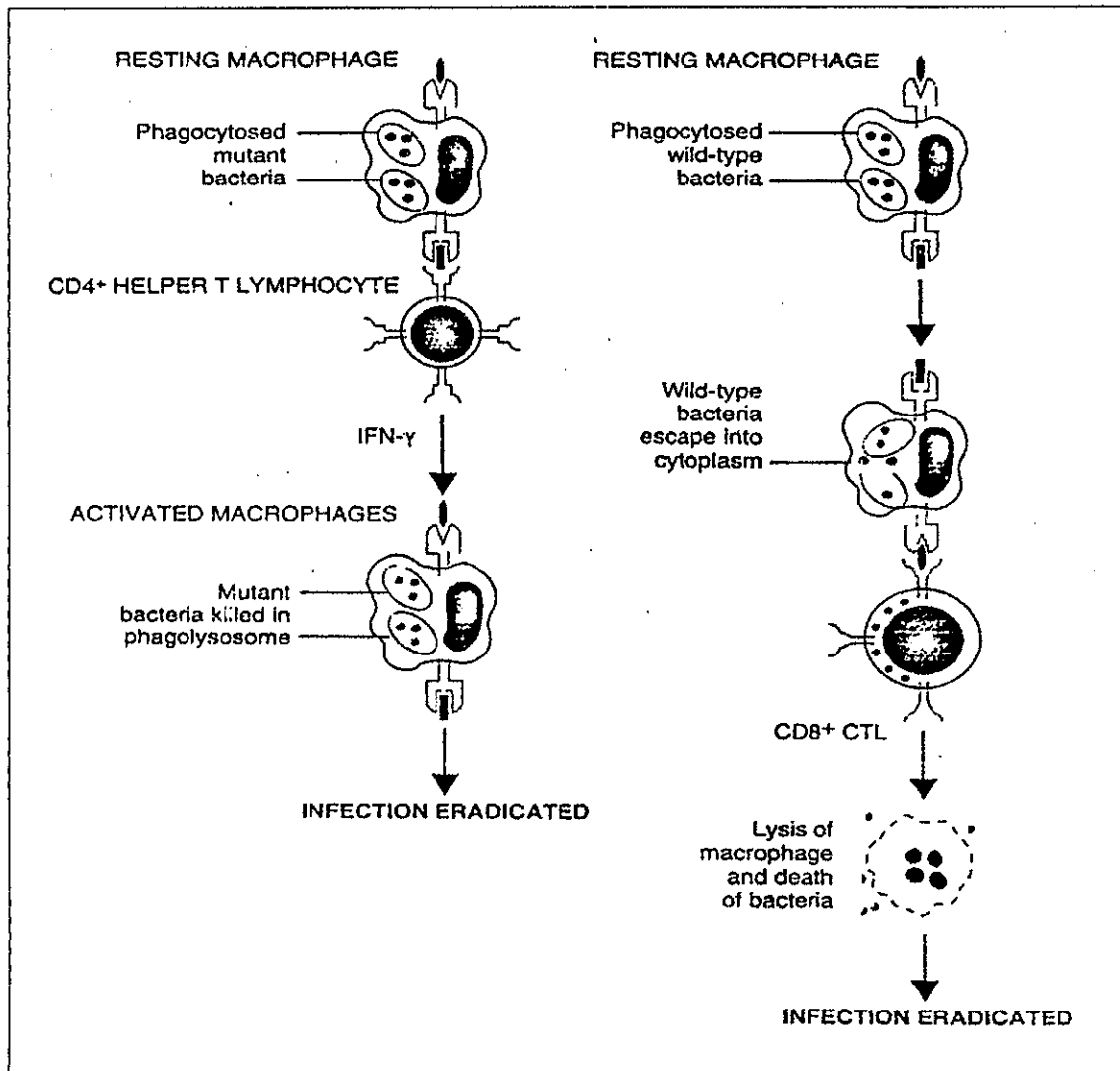
(1) Pembunuhan bakteri sebagai akibat aktivasi makrofag oleh sitokin limfosit T

Seperti telah dijelaskan pada sistem imunitas alamiah, makrofag dapat teraktivasi oleh sitokin IFN- γ yang dihasilkan oleh sel NK, meskipun jumlah dan efek yang terjadi kurang efektif untuk membunuh bakteri intraseluler. Makrofag yang telah memfagositosis bakteri akan mengolah bakteri tersebut menjadi peptida dan mempresentasikan peptida tersebut bersama molekul MHC kelas II kepada sel TCD⁴ (Th). Sitokin IL-12 yang diproduksi oleh makrofag akan membantu differensiasi sel Th ke sel Th1. Sel Th1 akan berproliferasi dan mensekresi banyak IFN- γ , sehingga akan lebih banyak makrofag yang teraktivasi dan aktivitas *killing* makrofag berlangsung lebih efektif.⁴

(2) Lisis sel yang terinfeksi oleh sel TCD8.

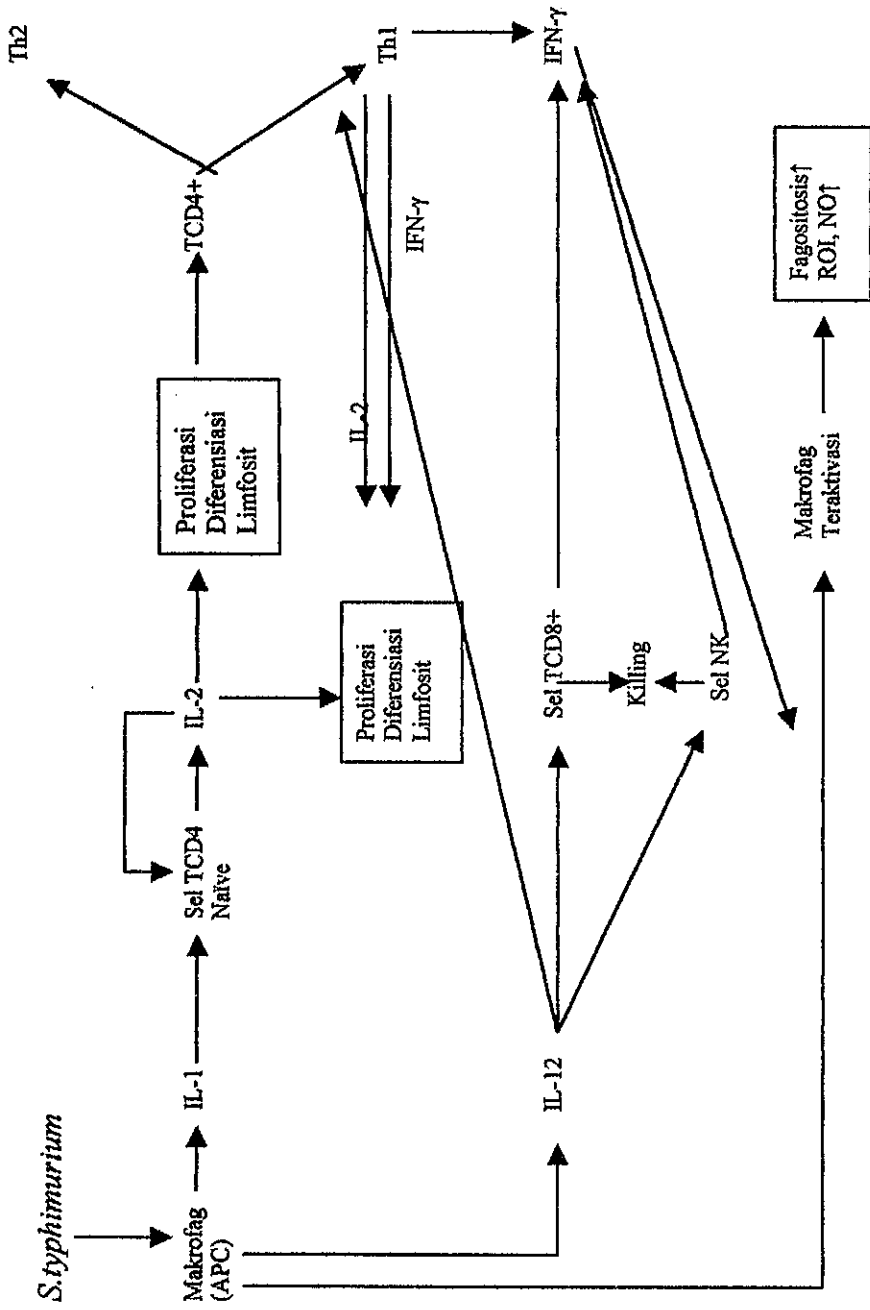
Bakteri intraseluler mempunyai kemampuan untuk meloloskan diri dari mekanisme *killing* fagosit, antara lain mencegah fusi fagosom dengan lisosom, menembus membran fagolisosom, dan resisten terhadap enzim-enzim lisosom. Bakteri intraseluler akan lebih mudah dibunuh, bila sel tempat bakteri tersebut berkembang biak juga dihancurkan. Sel yang paling berperan dalam hal ini adalah sel TCD⁸. Makrofag akan mempresentasikan peptida bersama dengan molekul MHC kelas I kepada sel TCD⁸. Sel TCD⁸ yang telah teraktivasi akan melisiskan sel yang terinfeksi bakteri tersebut, sehingga bakteri intraseluler didalamnya ikut mati.⁴ Adapun peptida yang dipresentasikan oleh makrofag tadi dapat berasal dari produk protein bakteri yang berhasil masuk ke sitoplasma atau

polipeptida bakteri dalam fagosom yang secara aktif / pasif ditranspor ke sitoplasma.³² (Gambar 2).



Gambar 2. Kerjasama antara makrofag teraktivasi dengan CTLs dalam mengeliminasi bakteri intraseluler (Sumber : Abbas AK⁴)

Secara keseluruhan, respons imunitas tubuh terhadap *S. typhimurium* disajikan dalam gambar berikut ini (Gambar 3).



Gambar 3. Respons imunitas tubuh terhadap *S. typhimurium* (Dimodifikasi dari Abbas AK⁴)

2.2.3. ORGAN LIMFOID

Timus dan sumsum tulang merupakan organ limfoid primer karena merupakan tempat utama 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 respons imunitas 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 respons imunitas.³³

Tabel 2. Proporsi Jenis-jenis Sel limfoid Pada Jaringan Manusia Normal
(Sumber : Parslow³³)

Jaringan	Perkiraan (%)		
	Sel T	Sel B	Sel NK
Darah tepi	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

Sebagian besar limfosit *naïve* mempunyai siklus hidup yang pendek dan akan mengalami program kematian sel dalam beberapa hari setelah meninggalkan timus

atau sumsum tulang. Apabila limfosit tersebut menerima sinyal adanya partikel asing atau patogen, maka limfosit akan mengalami aktivasi, yaitu dengan mengadakan proliferasi dan diferensiasi. Istilah proliferasi limfosit dapat dibedakan menjadi dua, 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 teraktivasi sebagai bagian dari respons imunitas. Aktivasi limfosit di jaringan limfoid sekunder adalah serangkaian proses yang terjadi pada limfosit *naïve* yang terstimulasi untuk membelah dan berdiferensiasi, yang di antaranya menjadi sel efektor. Respons aktivasi limfosit yang lengkap meliputi induksi proliferasi sel (mitogenesis) dan ekspresi fungsi imunitas.³⁴

Selama aktivasi limfosit, beberapa detik setelah reseptor limfosit T mengikat antigen, terjadi hidrolisis membran sel fosfolipid seperti phosphatidyl inositol (PI), phosphoinositol-4-phosphat (PIP), dan phosphoinositol-4,5-phosphat (PIP₂). Reaksi yang dikatalisa oleh enzim fosfolipase C tersebut akan menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan inositol triphosphat (IP₃), yang keduanya akan mengaktifkan protein kinase C (PKC) baik secara langsung maupun tidak. PKC akan mengaktivasi *mitogen-activated protein* (MAP) kinase yang akan menginisiasi suatu kaskade yang berakhir pada terfosforilasinya faktor transkripsi nucleus Elk-1. Dengan terfosforilasinya Elk-1, maka gen-gen pengkode protein yang terlibat dalam replikasi sel akan ditranskripsi.^{4,31}

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 menjadi limfoblas. Sintesis DNA terjadi setelah 18-24 jam setelah stimulasi. Pembelahan sel pertama terjadi 2-4 jam sesudahnya, dan pembelahan dapat terjadi lima kali atau lebih dengan selang sedikitnya 6 jam. Sel efektor akan dihasilkan dari tiap pembelahan matang yang lengkap dalam beberapa hari untuk kemudian mengekspresikan fungsi imunitas sesuai asalnya.^{33,34}

2.3. SISTEM IMUNITAS DAN ZAT GIZI

Sistem imunitas tak dapat dipisahkan dari zat gizi. Asupan zat gizi yang kurang tak hanya dapat meningkatkan kerentanan seseorang terhadap infeksi, namun juga meningkatkan frekuensi, derajat, dan waktu penyembuhan infeksi tersebut³⁵.

Zat gizi, baik makro maupun mikro, tak hanya berperan penting dalam membentuk sistem imunitas namun juga penting dalam melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan yang ditimbulkan oleh respons imunitas. Limfosit T, sel NK, makrofag, dan neutrofil dapat melepaskan molekul-molekul yang bersifat destruktif seperti ROI, NO, dan enzim-enzim katabolik, ke lingkungan sekitar, yang tak hanya dapat

membunuh kuman patogen, namun juga dapat merusak sel-sel normal. Zat gizi seperti vitamin C dan E yang mempunyai sifat anti oksidan tentunya sangat diperlukan untuk melindungi tubuh dari kerusakan akibat zat-zat tersebut ²¹.

2.3.1. PROTEIN DAN SISTEM IMUNITAS

Protein merupakan zat gizi yang paling berperan dalam sistem imunitas. Hal ini disebabkan karena protein merupakan unsur penting dalam pembentukan semua sel tubuh, termasuk sel-sel yang terlibat dalam sistem imunitas, antara lain seperti limfosit, neutrofil, dan makrofag. Protein juga merupakan unsur pembentuk semua zat yang berperan dalam respons imunitas seperti hormon, sitokin, maupun antibodi. Kekurangan protein dapat mengganggu imunitas tubuh, seperti menurunnya jumlah sel-sel yang imunokompeten, penurunan jumlah hormon regulator lekosit, sitokin, maupun antibodi yang diperlukan dalam proses eliminasi kuman. Hal-hal tersebut tentunya dapat menurunkan kekebalan seseorang sehingga penderita lebih rentan terhadap infeksi ^{7,36}.

Zat-zat gizi mikro yang berperan penting terhadap sistem imunitas seperti besi, seng, tembaga, dan lain-lain juga sangat membutuhkan protein agar dapat dimanfaatkan oleh tubuh. Transferrin dan albumin dibutuhkan oleh besi dan seng sebagai transporter. Seruloplasmin, suatu enzim yang mengandung tembaga juga dibutuhkan oleh besi untuk mengoksidasi besi agar dapat diikat oleh transferrin, dan *metallothionein* penting untuk menyimpan kelebihan seng dalam sel. Bila status

protein tubuh rendah, maka jumlah zat-zat tersebut akan berkurang, dan zat gizi mikro tak dapat digunakan oleh tubuh untuk membangun sistem imunitas⁷.

2.3.2 SENG

2.3.2.1 Peranan Seng

Seng merupakan salah satu zat gizi mikro yang sangat dibutuhkan oleh tubuh meski dalam jumlah relatif kecil. Tubuh mengandung 2 – 2,5 gram seng yang tersebar di hampir semua organ tubuh, terutama di hepar, pankreas, ginjal, otot dan tulang. Seng merupakan ion intraseluler di dalam cairan sel. Seng mempunyai kemampuan untuk membentuk kompleks yang stabil dengan rantai protein dan nukleotida, sehingga dapat menyusun banyak metalloenzim yang berperan dalam metabolisme, sintesis, serta degradasi karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat. Seng juga berperan dalam fungsi pertumbuhan, perkembangan, reproduksi, stabilisasi membran sel, serta imunitas tubuh.^{7,8}

Seng berperan mengikat residu histidin dan sistein sebagai kofaktor enzim, serta dalam waktu yang sama menstabilkan dan membuka sisi aktif enzim-enzim tersebut sedemikian rupa sehingga katalis dari reaksi dapat berjalan³⁷. Ikatan seng dengan residu histidin dan sistein juga membentuk *zinc finger*. *Zinc finger* adalah suatu sekuen asam amino yang terdapat pada sejumlah protein yang terikat pada DNA. Sekuen yang mengikat atom seng dengan kuat tersebut membentuk konformasi gulungan yang menyerupai bentuk sosis atau jari. Atom seng dibutuhkan untuk

mengikatkan protein pada DNA. Protein-protein tersebut berperan penting dalam regulasi ekspresi genetik³⁸.

Kebutuhan seng pada orang dewasa normal adalah kurang lebih 15 mg/hari. Ini bisa didapatkan dengan mengkonsumsi makanan yang banyak mengandung seng, khususnya dari sumber protein hewani, seperti daging, hepar, kerang, dan telur. Sereal tumbuk dan kacang-kacangan juga merupakan sumber yang baik namun ketersediaannya biologiknyanya rendah. Apabila kebutuhan tubuh akan seng tidak terpenuhi dapat muncul gejala defisiensi seng⁷.

Defisiensi seng tak hanya disebabkan oleh asupan seng yang rendah, namun juga karena ketersediaannya biologik yang rendah, penyakit-penyakit lain seperti penyakit ginjal kronis, penyakit liver kronik, anemia sel sabit, diabetes, keganasan, dan penyakit kronik lain, serta penggunaan *chelating agent* seperti penisillamin pada Penyakit Wilson^{39,40}. Defisiensi seng nutrisi dapat terjadi pada golongan rentan, yaitu anak-anak, ibu hamil dan menyusui, serta orang tua. Sistem organ yang dapat terpengaruh secara klinis oleh kondisi defisiensi seng berat meliputi epidermis, gastrointestinal, sistem saraf pusat, tulang, reproduksi, dan imunitas⁴¹. Hal tersebut menimbulkan gambaran klinis seperti retardasi pertumbuhan, hipogonadisme, perubahan kulit, penurunan ketajaman rasa (*hipogeusia*), mental letargi, serta penurunan imunitas tubuh^{7,8}.

Konsumsi seng berlebihan dapat menimbulkan dampak negatif bagi tubuh, meskipun keracunan seng jarang terjadi. Asupan seng yang sangat tinggi dapat menimbulkan gejala keracunan seng, seperti mual, muntah, nyeri epigastrium, diare,

kram abdomen, dan letargi. Asupan seng kronik dengan dosis 100-300 mg/hari yang tidak diikuti dengan asupan tembaga yang adekuat dapat menimbulkan gejala defisiensi tembaga, karena seng dapat berinteraksi dengan tembaga. Ketidakseimbangan seng dengan tembaga sering terjadi pada orang yang mengkonsumsi suplemen seng.³⁷

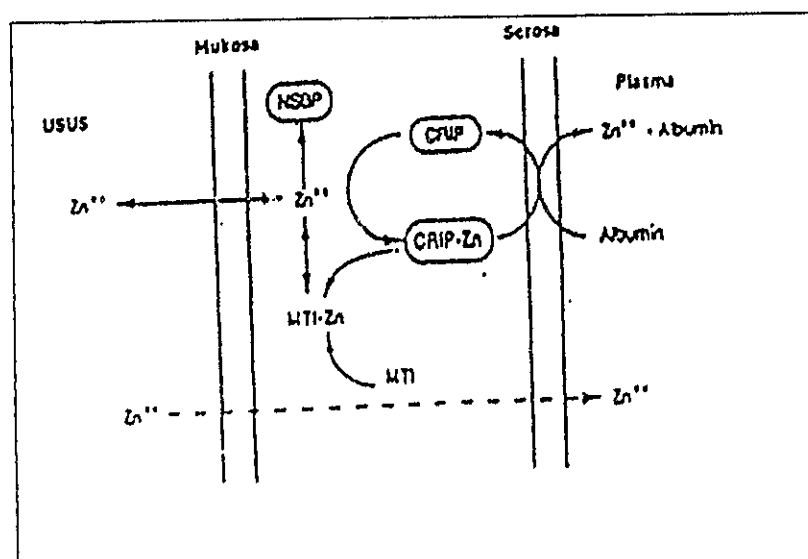
2.3.2.2 Absorpsi dan Metabolisme Seng

Seng diabsorpsi terutama di yeyunum. Jumlah seng yang ada di saluran pencernaan merupakan kombinasi dari asupan seng dan sekresi *endogenous* dari organ seperti pankreas, sekresi gastroduodenal, dan empedu. Pankreas menggunakan seng untuk membuat beberapa enzim pencernaan yang kemudian dikeluarkan lagi dalam saluran pencernaan pada waktu makan. Jadi jumlah seng dalam lumen usus halus setelah makan melebihi jumlah seng dari makanan karena adanya sekresi *endogenous*.⁷

Mekanisme seng memasuki enterosit belum jelas benar. Konsensus secara umum mengatakan bahwa absorpsi seng memasuki enterosit melibatkan dua proses kinetik, yaitu difusi (*non mediated component*) dan berikatan dengan karier (*a carrier mediated component*). Mekanisme difusi pasif lebih dominan pada asupan seng yang tinggi, sedangkan mekanisme dengan karier lebih dominan pada asupan seng yang rendah. Peningkatan efisiensi absorpsi seng yang terjadi saat asupan seng rendah

lebih disebabkan peningkatan kecepatan transfer seng oleh *carrier* melewati membran enterosit dibandingkan dengan perubahan afinitas *carrier* terhadap seng^{6,42}.

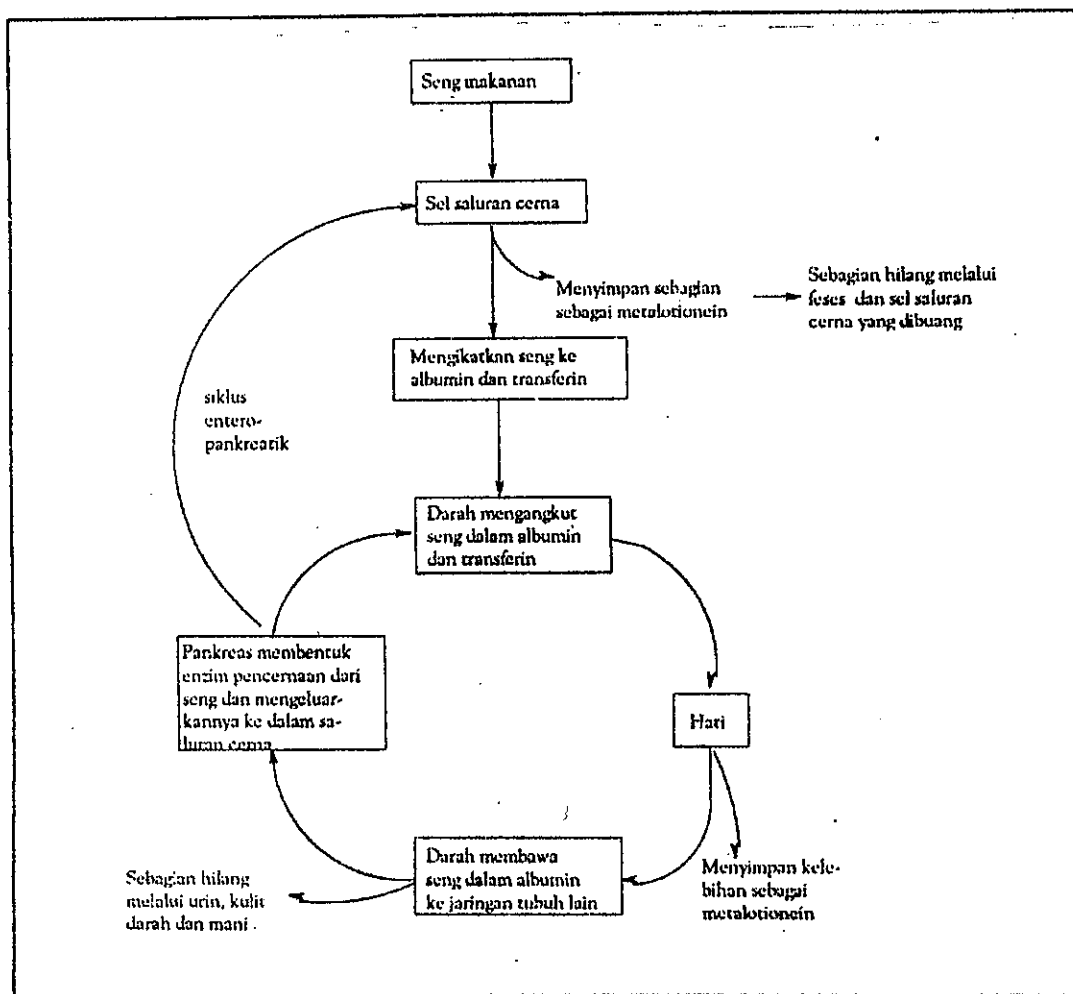
Seng akan diikat oleh protein usus kaya sistein (CRIP = *Cystein-Rich Intestinal Protein*) setelah masuk sel usus, yang akan memindahkan seng ke *metallothionein* atau melintasi sisi serosal usus untuk berikatan dengan protein plasma. Protein plasma pengangkut seng ke aliran darah antara lain albumin, dan transferrin³⁷. (Gambar 4)



Gambar 4. Absorpsi seng di intestinum (Sumber : Berdanier³³)

Seng diangkut oleh albumin dan transferrin menuju ke hepar. Darah membawa seng dari hepar ke jaringan ekstrahepatal seperti pankreas, sedangkan kelebihan seng tetap disimpan di dalam hepar dalam bentuk *metallothionein*. Seng digunakan untuk membuat enzim pencernaan di dalam pankreas, yang pada waktu makan akan dikeluarkan ke dalam saluran cerna. Sirkulasi seng di dalam tubuh dari

pankreas ke saluran cerna dan kembali ke pankreas dinamakan sirkulasi enterohepatik. Seng dikeluarkan tubuh terutama melalui feses (90%), urin (0,5-0,8 mg/hari), kulit 1-5 mg/hari darah menstruasi (0,5 mg/periode), cairan ejakulasi (1mg/ejakulasi) dan sel dinding usus^{7,8}. (Gambar 5).



Gambar 5. Penyaluran seng dalam tubuh (Sumber : Almatsier S⁷)

Diduga ada empat transporter seng pada metabolisme tingkat seluler, yang diberi nama ZnT-1, ZnT-2, ZnT-3, dan ZnT-4. ZnT-1 diekspresikan di berbagai jaringan termasuk usus terutama pada permukaan basolateral villi duodenum dan yeyunum; ginjal; dan hepar. ZnT-1 diketahui berfungsi untuk mentranspor seng dari enterosit ke sirkulasi darah. ZnT-2 terdapat pada vesikel asidik, berfungsi untuk mengakumulasi seng dalam vesikel intrasel, melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh level toksik seng. ZnT-2 banyak terekspresi pada usus, ginjal, dan testis, sedangkan ZnT-3 terbatas pada otak dan testis. ZnT-4 banyak terdapat pada kelenjar payudara dan kemungkinan berhubungan dengan sekresi seng dalam susu^{42,43,44}.

2.3.2.3. Homeostasis Seng

Tubuh mempunyai kemampuan untuk memelihara homeostasis seng dalam keadaan diet dengan kandungan seng rendah maupun tinggi. Normalnya, asupan seng manusia berkisar antara 107-231 mg/hari (6 – 15 mg/hari) atau ekuivalen dengan 14 – 30 mg/kg (ppm) diet pada tikus. Studi dengan hewan coba menunjukkan bahwa bila asupan seng berkisar antara 10-100 mg/kg, kandungan seng tubuh total tetap konstan \pm 30 mg/kg. Asupan seng kurang dari 10 mg/kg atau lebih dari 100 mg/kg akan membuat mekanisme homeostatik tidak cukup untuk memelihara kandungan seng tubuh, sehingga terjadi *zinc loss* atau akumulasi seng dalam tubuh. Mekanisme homeostasis tersebut meliputi perubahan absorpsi dan ekskresi seng pada saluran

cerna, pengaturan ekskresi lewat urin, serta redistribusi jaringan dan seluler. Bila asupan seng menurun, absorpsi seng meningkat dan ekskresi seng lewat feces menurun, dan sebaliknya. Ekskresi melalui urin relatif konstan dan baru menurun bila asupan seng kurang dari 51,6 $\mu\text{mol/hari}$. Seng pada plasma, tulang dan testis akan menurun pada keadaan defisiensi seng, sedangkan konsentrasinya pada rambut, kulit, jantung, dan otot relatif konstan. Penurunan konsentrasi seng pada tulang lebih disebabkan oleh penurunan *uptake* seng dibanding pelepasan seng ke plasma. Pada asupan seng yang tinggi, seng banyak terakumulasi pada tulang⁶.

Pengaturan homeostatik dari absorpsi seng berhubungan dengan sintesis *metallothionein*. *Metallothionein* adalah sebuah metalloprotein kaya sistein yang mengikat seng, tembaga, dan kation valensi dua lainnya. Ekspresi gen *metallothionein* dipengaruhi oleh diet seng dan akumulasi seng pada sel. Keadaan defisiensi seng membuat *metal-responsive transcription factor-1* (MTF-1) terikat pada inhibitor yang sensitif terhadap seng (MTI), yang mencegah ditranskripsinya gen *metallothionein*. Adanya asupan seng menyebabkan MTI terlepas dari MTF-1, sehingga MTF-1 dapat berinteraksi dengan *metal response element* (MRE) pada regio promotor gen *metallothionein*, sehingga transkripsi *metallothionein* meningkat. Konsumsi seng tinggi menyebabkan *metallothionein* akan banyak diproduksi, dan menjadi tempat untuk mengikat seng yang dikonsumsi pada makanan selanjutnya, sehingga absorpsi seng menurun. Bentuk simpanan ini akan dibuang bersama sel dinding usus halus yang umurnya adalah 2-5 hari.^{7,37,38,42}

2.3.2.4 Konsentrasi Seng Serum

Status seng dapat dinilai dengan beberapa indikator, yaitu dari serum/plasma, eritrosit, leukosit, urin, rambut, saliva, enzim yang tergantung seng, tes ketajaman rasa dan metallothionein plasma. Konsentrasi seng serum/plasma sering dipakai sebagai indikator dalam penentuan status seng, karena relatif mudah dan murah, meskipun mempunyai beberapa kelemahan, antara lain kadar seng serum/plasma kurang sensitif terhadap perubahan asupan seng. Defisiensi seng marginal masih menunjukkan konsentrasi seng yang normal.⁸

Konsentrasi seng serum/plasma juga dipengaruhi oleh beberapa perubahan metabolik, seperti stres, infeksi, puasa, status hormonal.⁸ Pada keadaan infeksi bakteri yang mengandung LPS, terjadi peningkatan produksi IL-1 oleh monosit. IL-1 secara langsung atau tidak langsung melalui peningkatan sekresi IL-6 dan hormon glukokortikoid, akan menstimulasi sintesis *metallothionein*, sehingga meningkatkan *uptake* seng di hepar.⁴⁵ Hormon glukokortikoid meningkatkan ekspresi gen *metallothionein* melalui aktivasi *glucocorticoid-responsse element* (GRE) yang terletak pada regio promotor gen *metallothionein*. Kondisi stres dan faktor hormonal lain dapat memacu sintesis *metallothionein* melalui mekanisme aktivasi STAT (*signal transducers and activators of transcription*).⁴⁶ Peningkatan *uptake* seng oleh hepar tersebut menyebabkan penurunan konsentrasi seng serum.

Adanya hemolisis, variasi waktu pengambilan, dan lamanya waktu sebelum separasi serum/plasma dari *whole blood* juga dapat mempengaruhi hasil. Hemolisis

akan meningkatkan seng plasma/serum, karena eritrosit mempunyai kandungan seng yang tinggi. Seng plasma/ serum juga lebih tinggi di pagi hari. Semakin lama waktu separasi plasma/serum dari *whole blood*, konsentrasi seng di plasma/serum semakin tinggi. ⁷ Konsentrasi seng plasma normal pada manusia adalah 12 – 16 $\mu\text{mol/L}$ ⁴⁷ (setara dengan 78- 104 $\mu\text{g/dL}$), sedangkan konsentrasi seng serum normal pada mencit adalah 70 – 90 $\mu\text{g/dL}$ ⁴⁸ (setara dengan 10,7 – 13,8 $\mu\text{mol/L}$).

2.3.2.5 Pengaruh seng terhadap respons imunitas

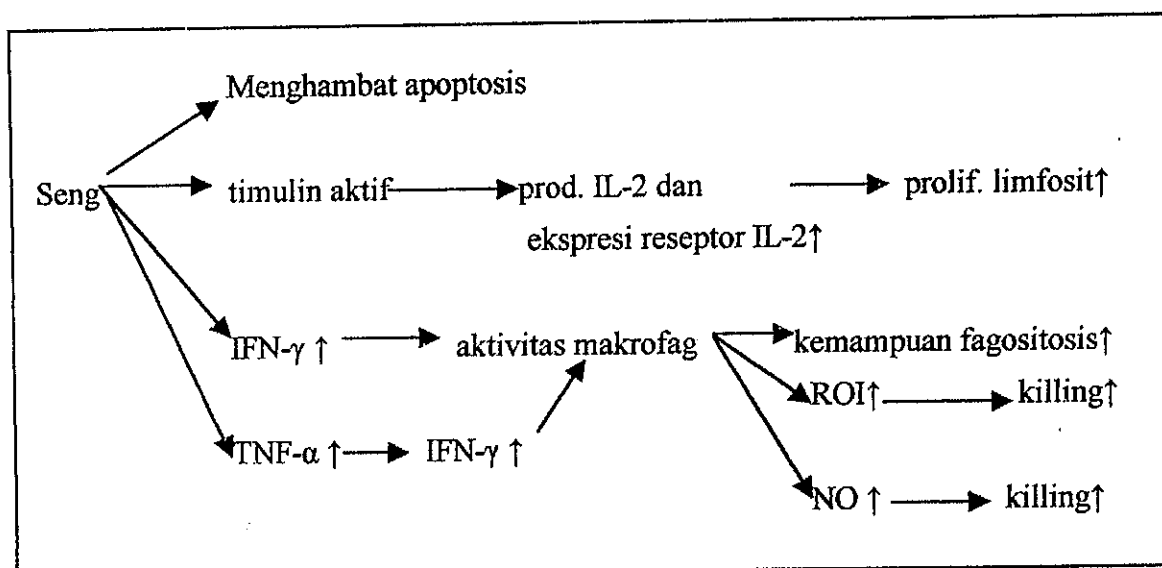
Banyak penelitian yang dilakukan baik pada hewan maupun manusia membuktikan bahwa seng mempunyai peran penting dalam sistem imunitas tubuh. Pengaruh seng terhadap sistem imunitas tubuh dapat diamati secara jelas pada penderita *Acrodermatitis enteropathica*, suatu bentuk kelainan genetik autosomal resesif yang jarang, di mana penderita mengalami sindroma malabsorpsi spesifik seng. Bayi yang lahir dengan kondisi ini mengalami gejala defisiensi berat seperti lesi-lesi pada kulit, diare berat, dan hilangnya rambut ⁴⁹. Penyakit ini sangat berdampak pada sistem imunitas tubuh, antara lain atrofi timus, penurunan jumlah limfosit terutama pada jaringan limfoid perifer dan darah, serta munculnya infeksi virus, jamur, dan bakteri, yang kesemuanya dapat diperbaiki dengan pemberian seng¹⁰.

Seng mempunyai peran penting dalam perkembangan limfosit T maupun B. Studi pada hewan menunjukkan bahwa defisiensi seng berat dapat menyebabkan atrofi timus, organ sentral untuk perkembangan limfosit T. Atrofi timus terjadi karena adanya peningkatan apoptosis limfosit pada timus. Defisiensi seng memicu sekresi hormon glukokortikoid oleh kelenjar adrenal. Sampai di timus, hormon tersebut membentuk ikatan dengan reseptornya pada permukaan limfosit. Ikatan yang terjadi akan membentuk kompleks dengan steroid di sitoplasma, lalu terjadi translokasi kompleks ke nukleus. Kompleks akan terikat pada DNA di dalam nukleus, yang menyebabkan disintesisnya protein-protein yang berpengaruh pada apoptosis. Pemberian seng dapat menghambat proses tersebut, karena pemberian seng dapat menghambat produksi glukokortikoid dan menghambat ikatan antara steroid dan reseptor glukokortikoid.^{9,50} Tikus yang diberi diet rendah seng (1 µg/g) selama 31 hari mengalami involusi timus dan penurunan jumlah limfosit terutama di bagian korteks, tempat dimana timosit imatur berkembang. Ukuran timus meningkat dan korteks kembali terisi sel setelah pemberian diet cukup seng (50 µg/g) selama 1 minggu.⁵¹

Seng telah diketahui dapat mempengaruhi fungsi limfosit T. Ini dapat terjadi melalui efek timulin, suatu hormon yang disekresi sel epitel timus. Seng merupakan kofaktor timulin. Ikatan seng pada timulin menghasilkan perubahan konformasional yang menyebabkan timulin menjadi aktif.⁵² Timulin menginduksi diferensiasi sel T immatur pada timus, mengatur fungsi sel T matur di jaringan perifer, menginduksi ekspresi reseptor IL-2 afinitas tinggi pada sel T matur, serta memacu produksi IL-2 limfosit T.¹⁰ Pada keadaan defisiensi seng, timulin menjadi tidak aktif, sehingga

fungsi diferensiasi, proliferasi dan maturasi limfosit T menurun. Respons limfosit seperti *delayed hypersensitivity* dan aktivitas sitotoksik juga dapat menurun selama defisiensi seng dan membaik setelah suplementasi seng⁴³.

Seng dapat menstimulasi produksi IFN- γ , sitokin yang diperlukan untuk mengaktivasi makrofag, oleh sel NK darah perifer pasien hemodialisis defisiensi seng.¹¹ Secara *in vitro*, seng juga dapat memacu produksi IL-1 β , IL-6, IFN- γ , dan TNF- α oleh monosit.¹² TNF- α dapat menginduksi produksi IFN- γ oleh sel NK mencit SCID pada fase awal infeksi bakteri intraseluler¹³.



Gambar 6. Pengaruh pemberian seng terhadap respons imunitas seluler^{9,11,12,13,52}

Selain mempunyai dampak positif, beberapa penelitian membuktikan bahwa suplementasi seng dapat pula menurunkan respons imunitas. Hasil penelitian Walsh, seperti dikutip oleh Shankar (1998), menyebutkan bahwa pemberian seng pada 11 laki-laki dewasa sebanyak 300 mg/hari (20 kali RDA) selama 6 minggu

menyebabkan penurunan respons limfosit terhadap PHA dan penurunan kemotaksis dan fagositosis PMN di sirkulasi⁵³ Penelitian Cakman et al membuktikan, seperti dikutip oleh Rink (2000), pemberian seng dengan konsentrasi 7-8 kali level fisiologis dapat memblokir produksi IFN- α ¹⁰. Chvapil (dikutip oleh Beisel, 1982) menyatakan bahwa peningkatan jumlah seng dapat menurunkan konsumsi oksigen pada neutrofil yang sejalan dengan penurunan aktivitas fagositik dan bakterisidal.¹⁷ Zukoski et al (dikutip oleh Beisel, 1982) membuktikan adanya penurunan aktivitas enzim NADPH oksidase, aktivitas fagositosis dan migrasi makrofag peritoneal tikus yang diberi diet tinggi seng (2000 ppm) selama 3 hari. Penurunan enzim NADPH oksidase dapat menurunkan kemampuan bakterisidal makrofag.¹⁷ Konsentrasi seng yang tinggi juga dapat menginaktivasi makrofag dengan menghambat membran ATPase, yang akhirnya dapat menurunkan kemampuan fagositosis.^{17,31,54}

2.3.2.6. Interaksi seng, besi, dan tembaga

Mekanisme penurunan respons imunitas juga terjadi secara tidak langsung, yaitu melalui penekanan mineral-mineral lain yang juga berperan dalam sistem imunitas. Zat gizi mikro saling berinteraksi seperti *interlocking gear system* di dalam tubuh. Pemberian salah satu macam zat gizi dapat mengubah keseimbangan zat gizi yang lain. Seng juga berinteraksi dengan banyak mineral lain, seperti besi dan tembaga. Diet seng yang tinggi dapat menekan konsentrasi besi dan tembaga dalam tubuh. Seng akan berkompetisi dengan besi dalam lumen usus halus untuk berikatan

dengan *Divalent Metal Transporter* (DMT1) atau *Natural resistance-associated macrophage protein* (Nramp2). DMT-1 yang banyak terekspresi pada permukaan *brush border* sel usus adalah suatu protein transmembran yang tugas utamanya mengangkut ion ferro dari lumen ke dalam enterosit. Sesuai dengan namanya, DMT-1 dapat mentranspor logam-logam divalent lain seperti seng, mangan, kobalt, nikel, dan cadmium⁵⁵. Seng juga berkompetisi dengan besi pada saat transportasinya di sirkulasi darah, dimana sebagian seng juga menggunakan transferrin, yang juga merupakan alat transpor besi, sebagai alat transpor dari usus menuju sirkulasi darah. Dosis seng yang tinggi akan menghambat absorpsi besi⁷.

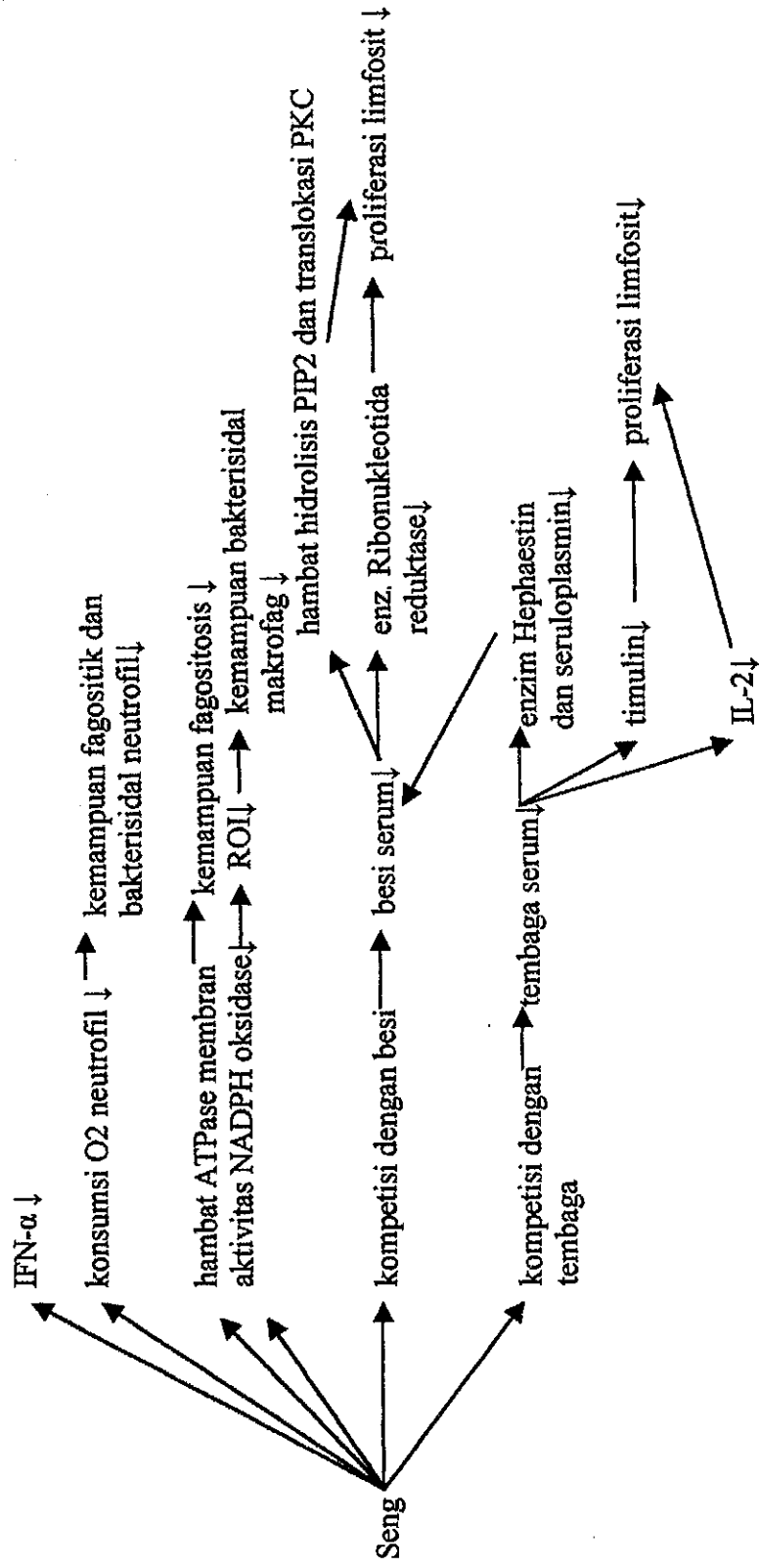
Seng juga bersifat antagonis terhadap tembaga, karena memiliki sifat fisik kimia yang hampir sama. Efek antagonis seng terhadap metabolisme tembaga terjadi pada tingkat mukosa intestinal, melalui *metallothionein*. Jumlah seng yang meningkat menyebabkan sintesa *metallothionein* mukosa intestinal meningkat pula. Afinitas *metallothionein* terhadap tembaga yang lebih tinggi dibanding terhadap seng menyebabkan tembaga yang baru diserap akan terikat oleh *metallothionein*, sehingga tembaga sulit diabsorpsi. Penelitian Fischer yang dilakukan pada 5 kelompok tikus yang diberi pakan dengan dosis seng yang berbeda, yaitu 7,5; 15; 30; 60; 120; dan 240 ppm selama 5 minggu, menunjukkan bahwa konsentrasi serum tembaga pada tikus kelompok 120 ppm dan 240 ppm menurun secara signifikan dibandingkan kelompok lain.⁵⁶

Efek penekanan seng terhadap besi juga dapat terjadi secara tidak langsung melalui penekanannya pada tembaga. Penurunan absorpsi tembaga pada saat asupan

seng tinggi dapat menurunkan konsentrasi seruloplasmin dan hephaestin, suatu enzim yang mengandung tembaga dan berfungsi untuk mengoksidasi ferro menjadi ferri. Bila ferro tak dapat diubah menjadi ferri, maka besi tak dapat diikat oleh transferrin untuk dibawa ke sirkulasi darah⁵⁵.

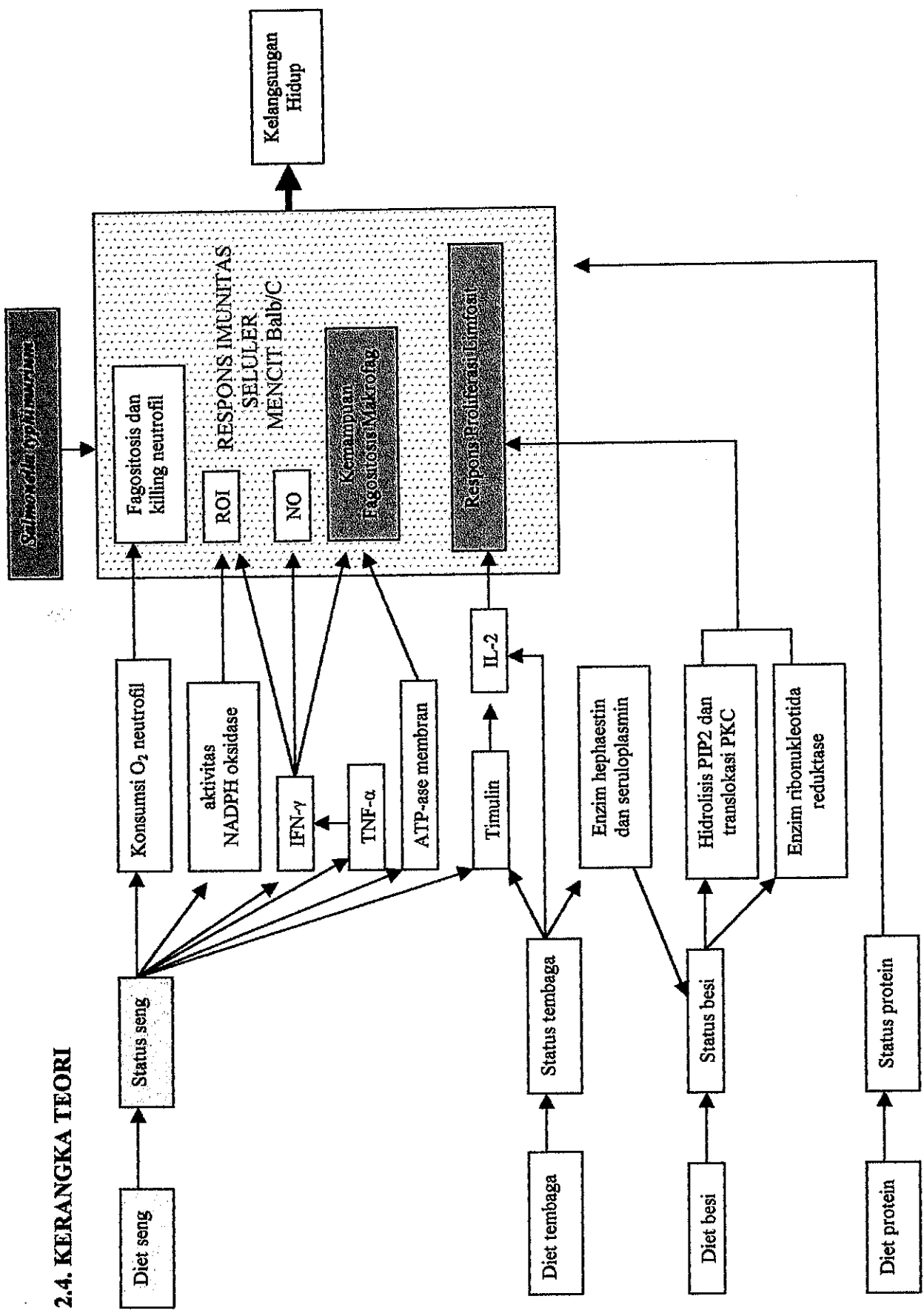
Besi dan tembaga mempunyai efek penting terhadap sistem imunitas tubuh. Defisiensi kedua mineral tersebut diketahui dapat mengganggu *cell-mediated immunity*.²¹ Hewan coba yang mengalami defisiensi tembaga akan mengalami penurunan berat timus dan lien, penurunan jumlah antibodi serta fungsi neutrofil terganggu⁵⁷. Rendahnya status tembaga dapat menekan ekspresi gen yang mengkode IL-2mRNA sehingga produksi IL-2 terhambat.⁵⁸ Defisiensi tembaga juga dapat menurunkan produksi timulin, aktivitas mikrobisidal fagosit, dan sitotoksisitas sel NK, sedangkan defisiensi besi dapat menurunkan proliferasi limfosit, melalui perannya dalam enzim ribonukleotida reduktase. Enzim yang mengandung besi tersebut adalah enzim yang mereduksi ribonukleosida menjadi deoksiribonukleosida, bahan pembentuk DNA, yang tentunya sangat dibutuhkan untuk proliferasi sel, termasuk limfosit²¹. Defisiensi besi juga dapat menghambat hidrolisis PIP₂, serta aktivasi dan translokasi PKC dari sitoplasma ke nukleus. Hal tersebut menyebabkan terhambatnya transkripsi protein-protein yang berperan dalam proliferasi limfosit.⁵⁹

(Gambar 9)



Gambar 7. Efek pemberian seng dosis tinggi terhadap respons imunitas seluler ^{10, 17, 21, 55, 58, 59}

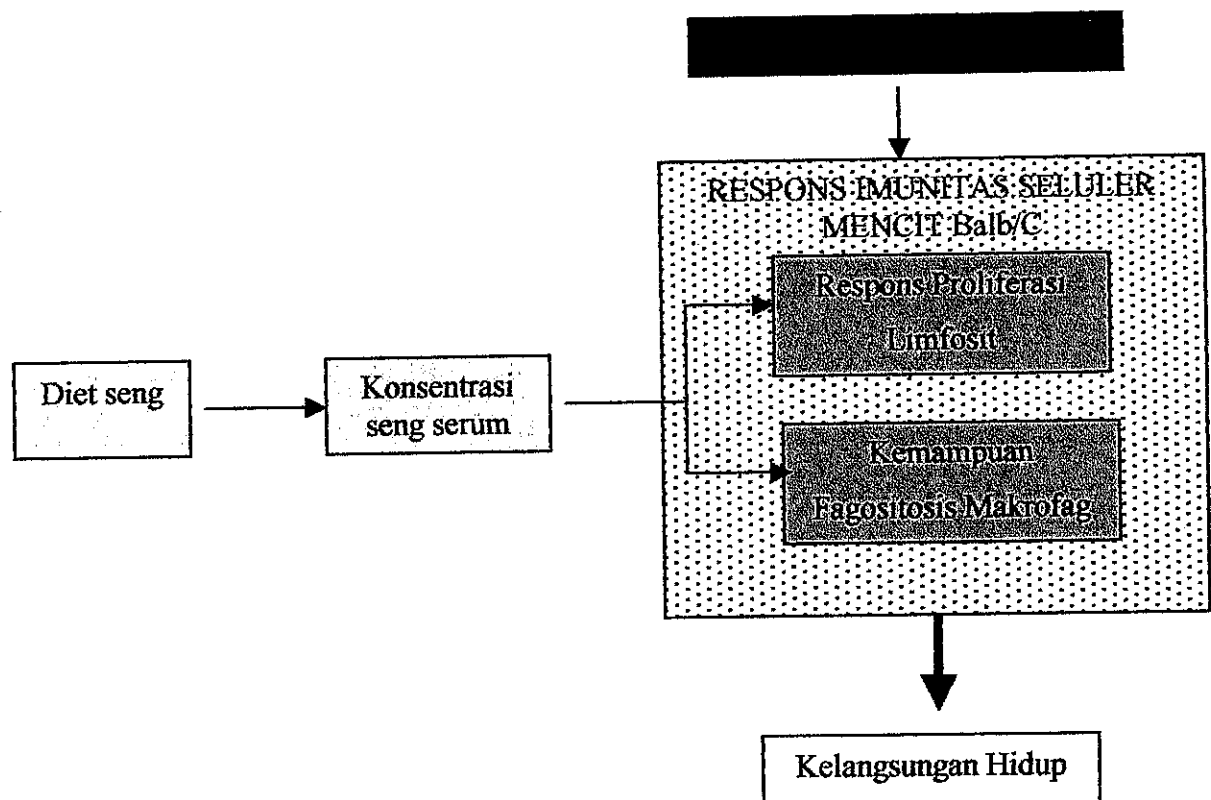
2.4. KERANGKA TEORI



2.5. KERANGKA KONSEP

Berdasarkan kerangka teori yang telah disusun, variabel diet tembaga, diet besi, dan diet protein dapat dikendalikan dengan memberikan diet yang mengandung cukup protein, tembaga, dan besi. Variabel bebas yang diteliti adalah pemberian diet seng. Keterbatasan peneliti menyebabkan variabel tergantung yang diukur hanya variabel respons proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis makrofag, dan kelangsungan hidup. Konsentrasi seng serum yang merupakan salah satu indikator status seng juga diukur sebagai variabel perantara.

Dengan demikian disusunlah kerangka konsep sebagai berikut :



2.6. HIPOTESIS

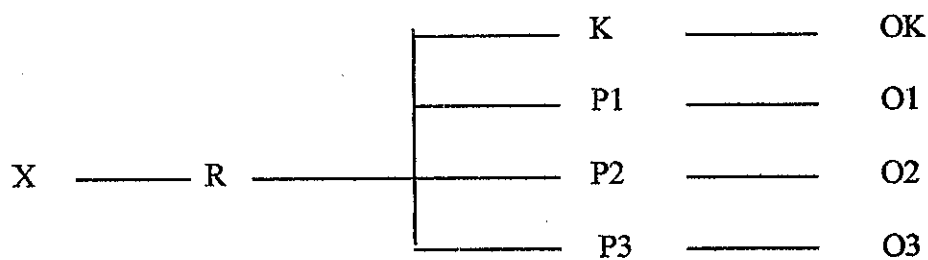
1. Ada perbedaan yang bermakna pada konsentrasi seng serum mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.
2. Ada perbedaan yang bermakna pada respons proliferasi limfosit, yang dinilai dari:
 - a. berat lien
 - b. jumlah relatif limfoblasmencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.
3. Ada perbedaan yang bermakna pada kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.
4. Ada perbedaan yang bermakna pada kelangsungan hidup mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.

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. Penelitian inti terdiri dari 2 kelompok besar, yaitu (1) Penelitian Respons Proliferasi Limfosit, Kemampuan Fagositosis Makrofag, dan Konsentrasi Seng Serum serta (2) Penelitian Kelangsungan hidup. Kedua kelompok tersebut dibagi lagi menjadi 4 kelompok kecil secara acak, yaitu kelompok K, P1, P2, dan P3, dengan rancangan sebagai berikut :



Keterangan :

X → R : Masa adaptasi 1 minggu

R : Randomisasi

- K : Kontrol, sebagai pembanding mencit mendapat diet dengan kandungan seng normal (30 mg seng / kg diet atau 30 ppm) dan diinfeksi *S. typhimurium*
- P1 : Mencit mendapat diet dengan kandungan seng 60 ppm dan diinfeksi *S. typhimurium*
- P2 : Mencit mendapat diet dengan kandungan seng 120 ppm dan diinfeksi *S. typhimurium*
- P3 : Mencit mendapat diet dengan kandungan seng 240 ppm dan diinfeksi *S. typhimurium*
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada mencit kelompok P1
- O2 : Pengamatan pada mencit kelompok P2
- O3 : Pengamatan pada mencit kelompok P3

3.2. POPULASI DAN SAMPEL

3.2.1. POPULASI

Populasi penelitian ini adalah mencit strain Balb/C yang dikembangbiakkan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Mencit Balb/C digunakan karena strain tersebut sensitif terhadap infeksi *S. typhimurium*.

3.2.2. SAMPEL

3.2.2.1 Cara Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari populasi mencit dengan kriteria sebagai berikut:

- Kriteria Inklusi : umur 8 – 10 minggu, jenis kelamin jantan, berat badan 20 – 40 gram, tidak ada kelainan anatomis
- Kriteria Eksklusi : Mencit tampak sakit sebelum diinfeksi *S. typhimurium* dan mencit mati selama diberi perlakuan (khusus penelitian I).

Hal-hal lain yang harus dikontrol untuk menghindari bias dalam penelitian adalah:

1. Penempatan kandang, ditempatkan pada tempat yang sama (di laboratorium)
2. Kebersihan, frekuensi, dan kualitas pembersihan dilakukan sama untuk tiap mencit
3. Cara pemberian makan dilakukan pada jam-jam yang sama

Mencit Balb/C yang telah terpilih sebagai sampel, pada saat penelitian akan diinfeksi dengan *S. typhimurium phage type 510* yang diperoleh dari Rumah Sakit Telogorejo Semarang. Sebelum melaksanakan penelitian inti, terlebih dahulu penelitian tentang dosis LD50 kuman dilakukan di Laboratorium Biokimia UNDIP. Proses hitung kuman dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Bioteknologi UNDIP (lampiran 1). Dari penelitian tersebut didapatkan dosis LD50 sebesar 10^4 (lampiran 2).

3.2.2.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan ditentukan besarnya dengan rumus Federer⁶⁰:

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \rightarrow r = 1 + 15 / (t-1),$$

di mana r = pengulangan, t = perlakuan. Jumlah kelompok perlakuan adalah 4, sehingga : $r = 1 + 15 / (4-1)$; $r = 6$

Oleh karena tiap kelompok kecil terdiri dari 6 ekor mencit, jumlah mencit yang diperlukan untuk kelompok Respons Proliferasi Limfosit, Kemampuan Fagositosis Makrofag, dan Konsentrasi Seng Serum adalah 24 ekor mencit. Peneliti menggunakan 10 ekor mencit per kelompok untuk memperkuat hasil penelitian, sehingga total berjumlah 40 ekor.

Untuk mengamati kelangsungan hidup, masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor mencit, sehingga untuk pengamatan tersebut membutuhkan sampel 48 ekor mencit. Keseluruhan sampel berjumlah 88 ekor mencit.

3.3. VARIABEL PENELITIAN

VARIABEL BEBAS :

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian diet dengan berbagai kandungan seng.

VARIABEL TERGANTUNG

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah : respons proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis makrofag, kelangsungan hidup mencit dan konsentrasi seng serum.

3.4 DEFINISI OPERASIONAL

1. Pemberian diet dengan berbagai kandungan seng adalah pemberian seng melalui makanan dengan kandungan seng yang berbeda untuk setiap kelompoknya, yaitu diet standar AIN-93M (kandungan seng 30 mg/ kg atau ppm), 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm, yang dibuat di Laboratorium PAU Pangan dan Gizi Universitas Gajahmada Yogyakarta. Komposisi diet untuk tiap kelompok dapat dilihat pada lampiran.
2. Respons proliferasi limfosit adalah respons proliferasi limfosit di lien mencit, yang diukur dari dua parameter, yaitu :
 - Berat lien yaitu berat lien mencit yang ditimbang dengan timbangan elektronik dengan satuan mg.
 - Jumlah relatif limfoblas yaitu jumlah limfoblas yang ditemukan setiap 200 sel (yang terdiri dari limfosit dan limfoblas) pada preparat hapus suspensi organ lien mencit dengan pengecatan Giemsa yang dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran lensa objektif 400 kali.

3. Kemampuan fagositosis makrofag, yaitu kemampuan makrofag dalam memfagositosis partikel lateks, dihitung dari jumlah lateks yang difagosit dalam 200 makrofag yang dilihat pada preparat cairan eksudat peritoneal, dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali
4. Konsentrasi seng serum, adalah konsentrasi seng serum mencit yang diukur dengan alat *Atomic Absorbance Spectrophotometer* (AAS) dengan satuan mg/dL.
5. Kelangsungan hidup adalah lama mencit bertahan hidup setelah diinfeksi *S. typhimurium*, yang dinyatakan dalam satuan hari, dengan mengamati jumlah mencit yang mati tiap kelompok per hari yang diamati sejak mulai diinfeksi hingga 21 hari post infeksi.
6. Mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* adalah mencit Balb/C yang disuntik 0,1 cc suspensi kuman *S. typhimurium phage type 510* yang diperoleh dari RS Telogorejo Semarang dengan dosis $2,5 \times 10^4$ cfu (penelitian I) atau $2,5 \times 10^6$ cfu (penelitian II) secara intraperitoneal
7. Sisa pakan adalah sisa makanan yang dikumpulkan setiap hari per kelompok, ditimbang dengan timbangan dengan satuan gram.
8. Asupan pakan rata-rata adalah rata-rata jumlah pakan yang dimakan oleh mencit tiap hari setiap kelompok, dengan satuan gram, yang diperoleh dengan cara mengurangi jumlah pakan yang diberikan tiap hari dengan sisa pakan lalu dibagi jumlah mencit yang hidup.

9. Asupan seng rata-rata adalah rata-rata kandungan seng yang dimakan oleh mencit setiap hari setiap kelompok, dengan satuan mg, yang diperoleh dengan cara mengalikan nilai asupan pakan dengan kandungan seng per mg.

3.5. BAHAN DAN MATERI

- Mencit jantan strain Balb/C umur 8 – 10 minggu diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi UGM Yogyakarta
- Lien mencit tersebut
- *Peritoneal Exudate Cells* (PEC) dari mencit
- *S. typhimurium* yang diperoleh dari RS Telogorejo Semarang
- *Foetal Bovine Serum* (FBS)
- Larutan NaCl 0,9%
- Metanol, larutan Giemsa
- Penicillin
- *Latex beads*
- *Royal Park Memorial Institute* (RPMI) 1640
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Medium kultur *Mc Conkey*
- HClO₃ 70.0 – 72.0%
- Air bebas ion
- HNO₃ 69.0 – 70.0%

3.6. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN

- Mikroskop
- Spuit disposable 1 cc, 10 cc
- Timbangan elektronik
- Kaca benda
- Tabung reaksi
- Cawan petri
- Plate 24 well dasar rata
- *Atomic Absorption Spectrophotometer*
- Tabung mikrosentrifus
- *Laminar flow*
- Inkubator
- Tabung reaksi alas datar
- Pinset, gunting
- Coverslip bulat diameter 12 mm
- Bilik hitung *Neubauer Improve*

3.7. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di :

- Laboratorium Biokimia UNDIP Semarang pada bulan Maret 2004.
- Laboratorium Bioteknologi UNDIP Semarang pada bulan April 2004
- Laboratorium GAKI Semarang pada bulan Mei 2004
- Laboratorium Mikrobiologi UNDIP Semarang pada bulan Maret 2004

3.8. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

- 88 ekor mencit jantan strain Balb/C, umur 8-10 minggu diadaptasikan di laboratorium dengan dikandangkan dan diberi diet standar AIN-93M (kandungan seng 30 ppm) selama 1 minggu secara ad libitum
- 88 ekor mencit dibagi menjadi 2 kelompok besar pengamatan, masing-masing 40 ekor untuk kelompok pemeriksaan respons proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis makrofag, dan konsentrasi seng serum (I), dan 48 ekor untuk kelompok pengamatan kelangsungan hidup (II).

Kelompok besar I dibagi menjadi :

- Kelompok Kontrol (K) mendapatkan diet dengan kandungan seng normal (30 ppm) selama 10 hari, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^4$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal. Hari ke-11 mencit dibunuh, dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respons proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis makrofag, dan konsentrasi seng serum.
- Kelompok P1 mendapatkan diet dengan kandungan seng 60 ppm selama 10 hari, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^4$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal. Hari ke-11 mencit dibunuh, dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respons proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis makrofag, dan konsentrasi seng serum.
- Kelompok P2 mendapatkan diet dengan kandungan seng 120 ppm selama 10 hari, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^4$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal. Hari

ke-11 mencit dibunuh, dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respons proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis makrofag, dan konsentrasi seng serum.

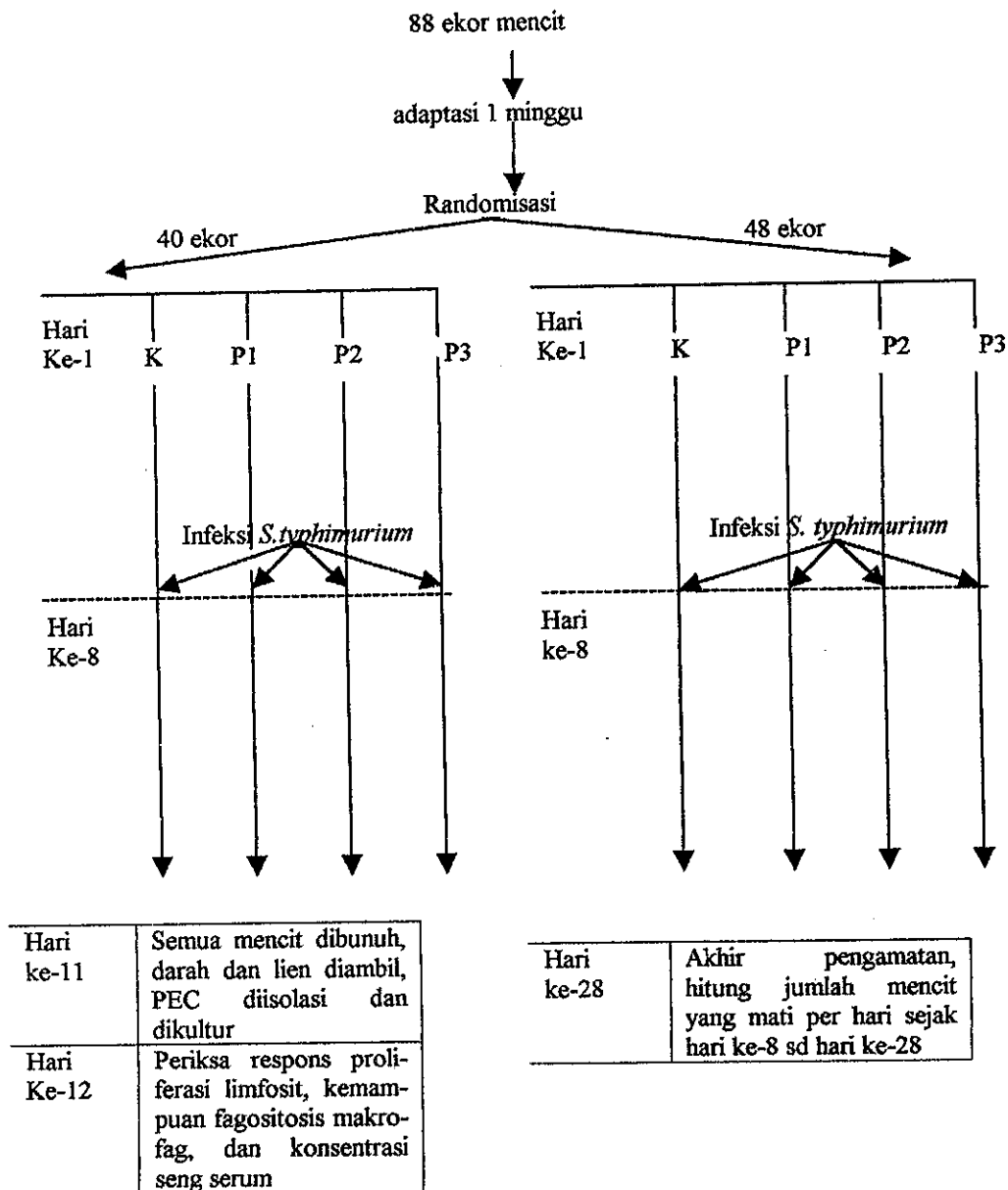
- Kelompok P3 mendapatkan diet dengan kandungan seng 240 ppm selama 10 hari, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^4$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal. Hari ke-11 mencit dibunuh, dan dilakukan pengambilan sampel untuk pemeriksaan respons proliferasi limfosit di lien, kemampuan fagositosis makrofag, dan konsentrasi seng serum.

Kelompok besar II dibagi menjadi 4 kelompok :

- Kelompok kontrol (K) mendapatkan diet dengan kandungan seng normal (30 ppm), hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^6$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal.
- Kelompok kontrol P1 mendapatkan diet dengan kandungan seng 60 ppm, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^6$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal.
- Kelompok kontrol P2 mendapatkan diet dengan kandungan seng 120 ppm, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^6$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal.
- Kelompok kontrol P3 mendapatkan diet dengan kandungan 240 ppm, hari ke-8 diinfeksi $2,5 \times 10^6$ *S. typhimurium* secara intraperitoneal.

Diet diberikan setiap hari dan pengamatan kelangsungan hidup dilakukan dari hari pertama sampai hari ke-28 (21 hari setelah infeksi).

3.9. ALUR KERJA



- Ket : - Kelompok I untuk meneliti respons proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis makrofag dan konsentrasi seng serum
- Kelompok II untuk meneliti kelangsungan hidup mencit

3.10. ANALISIS DATA

Analisis statistik meliputi :

1. Analisis Deskriptif dengan menampilkan grafik boxplot dan tabel deskriptif menurut keempat kelompok intervensi setiap variabel.
2. Analisis analitik :

Mula-mula dilakukan uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk*, dan tes homogenitas varians dengan *Levene's test* terhadap setiap variabel.

Data asupan seng (I), berat lien, jumlah relatif limfoblas, dan jumlah lateks yang difagositosis makrofag, diuji beda dengan *one way Anova*. Data asupan seng (I) dan jumlah lateks yang difagositosis makrofag menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (*LSD= Least Significant Difference*). Data asupan seng (II) diuji beda dengan uji *Kruskall Wallis* yang, karena menunjukkan perbedaan bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Jumlah mencit penelitian II yang bertahan hidup dianalisis uji beda dengan *log-rank test*. Analisis statistik dilakukan dengan program *SPSS 10.0 for Windows*⁶¹.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 HASIL

4.1.1 PENELITIAN I

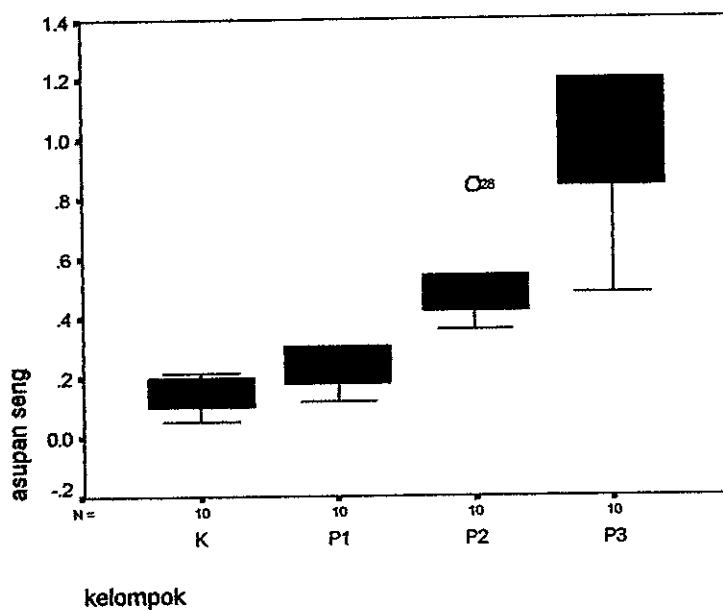
Sebanyak 4 ekor mencit dari kelompok kontrol mati setelah disuntik *S. typhimurium* intraperitoneal, sehingga dari total 40 ekor mencit yang menjadi subjek penelitian pada penelitian I, hanya 36 ekor yang dapat diambil sampelnya. Hasil penelitian disajikan secara berurutan dari asupan seng mencit per hari, konsentrasi seng serum, berat lien, jumlah relatif limfoblas, dan jumlah lateks yang difagositosis makrofag. Hasil ditampilkan dalam bentuk grafik boxplot dan tabel silang. Keseluruhan data dapat dilihat pada tabel hasil pengamatan (bagian lampiran).

4.1.1.1 ASUPAN SENG

Asupan seng mencit perlu diketahui sebelum menganalisis variabel tergantung, untuk memastikan apakah asupan seng tiap kelompok memang berbeda bermakna. Hal ini disebabkan karena metode pemberian makanan mencit pada penelitian ini dilakukan secara *ad libitum* sehingga sulit mengendalikan berapa banyak zat yang dikehendaki, dalam hal ini seng, yang masuk ke dalam tubuh mencit setiap hari. Asupan seng mencit didapat, setelah sebelumnya dilakukan penimbangan

sisia pakan tiap hari dari tiap kelompok mencit, menghitung asupan pakan dengan rumus tertentu dan mengalikan nilai pada asupan pakan dengan kandungan seng tiap kelompok (tercantum pada lampiran data).

Data tersebut kemudian dianalisis secara deskriptif dan dibuat grafik boxplot seperti di bawah ini :



Gambar 4.1. Diagram Boxplot Asupan Seng Mencit

Tabel 4.1. Tabel Deskripsi Asupan Seng Mencit dalam mg

Kelompok	n	Rata-rata	Simpang Baku
K	10	0,15	0,056
P1	10	0,23	0,060
P2	10	0,50	0,136
P3	10	0,95	0,274

Grafik dan tabel tersebut menunjukkan bahwa rata-rata asupan seng mencit kelompok P3 paling tinggi (0,95 mg), diikuti oleh kelompok P2 (0,5 mg), P1(0,23 mg), dan K (0,15 mg). Uji normalitas data menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal,

sehingga perlu dilakukan transformasi dengan $u = \log x$. Transformasi data menghasilkan data yang berdistribusi normal dan varians homogen, sehingga data dapat diuji beda dengan *one way Anova*. Uji Anova menunjukkan bahwa ada beda rata-rata asupan seng yang bermakna antar kelompok ($p=0,000$). Uji *Post Hoc* dengan LSD membuktikan bahwa asupan seng mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi, secara bermakna lebih tinggi dibandingkan kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal.

Tabel 4.2. Tabel Uji *Post Hoc* LSD terhadap Asupan Seng

	K	P1	P2	P3
K	-	0,003*	0,000*	0,000*
P1	0,003*	-	0,000*	0,000*
P2	0,000*	0,000*	-	0,000*
P3	0,000*	0,000*	0,000*	-

$p < 0,05$

4.1.1.2 KONSENTRASI SENG SERUM

Konsentrasi seng serum diukur untuk mengetahui perbedaan konsentrasi seng serum antar kelompok setelah diberi diet dengan berbagai kandungan seng. Konsentrasi seng serum diukur dengan alat *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS). Sebanyak 19 sampel dari 36 serum yang berhasil diambil dari mencit, di

antaranya mengalami lisis. Berikut adalah volume dan kondisi serum masing-masing mencit tiap kelompok setelah disentrifus.

Tabel 4.3. Volume (dalam μl) dan Kondisi Serum Mencit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K	200	lisis	lisis	300	300	lisis	x	x	x	x
P1	lisis	lisis	200	200	200	200	175	150	lisis	150
P2	lisis	lisis	lisis	lisis	400	300	lisis	lisis	300	300
P3	300	200	lisis	lisis	lisis	200	lisis	lisis	lisis	lisis

Volume serum yang terkumpul untuk tiap kelompok setelah dilakukan *pooling* adalah : kelompok K 800 μl , P1 1275 μl , P2 1300 μl , P3 700 μl , sehingga volume serum *pooling* kelompok K dan P3 tidak memenuhi syarat untuk diperiksa konsentrasi seng serumnya karena masih kurang dari 1 ml. Peneliti mencoba untuk mengukur konsentrasi seng serum yang diencerkan dengan NaCl fisiologis 1 : 2, setelah sebelumnya peneliti melakukan penelitian pendahuluan untuk menguji apakah pengukuran konsentrasi seng serum dengan pengenceran tersebut tidak berbeda bermakna dengan konsentrasi seng serum tanpa pengenceran. Kesimpulan yang didapat dari penelitian pendahuluan tersebut adalah konsentrasi seng serum yang diencerkan dengan NaCl fisiologis 1 : 2 yang dikalikan 2 tidak berbeda bermakna dengan konsentrasi seng serum tanpa pengenceran (lihat lampiran). Atas dasar hasil tersebut, maka peneliti mengukur konsentrasi seng serum mencit melalui pengenceran dengan NaCl fisiologis 1 : 2, sehingga syarat minimal volume serum yang dibutuhkan untuk mengukur konsentrasi seng menjadi 500 μl . Hal tersebut

memungkinkan kelompok K dan P3 untuk diukur, meskipun masing-masing hanya satu sampel. Kelompok P1 dan P2 yang volume serumnya lebih dari 1 ml masing-masing bisa didapatkan dua sampel. Adapun hasilnya adalah sebagai berikut :

$$K = 127,2 \mu\text{g/dL}$$

$$P1 = 79 \mu\text{g/dL dan } 73,3 \mu\text{g/dL ; Rata-rata} = 76,15 \mu\text{g/dL}$$

$$P2 = 86,5 \mu\text{g/dL dan } 98,6 \mu\text{g/dL ; Rata-rata} = 92,55 \mu\text{g/dL}$$

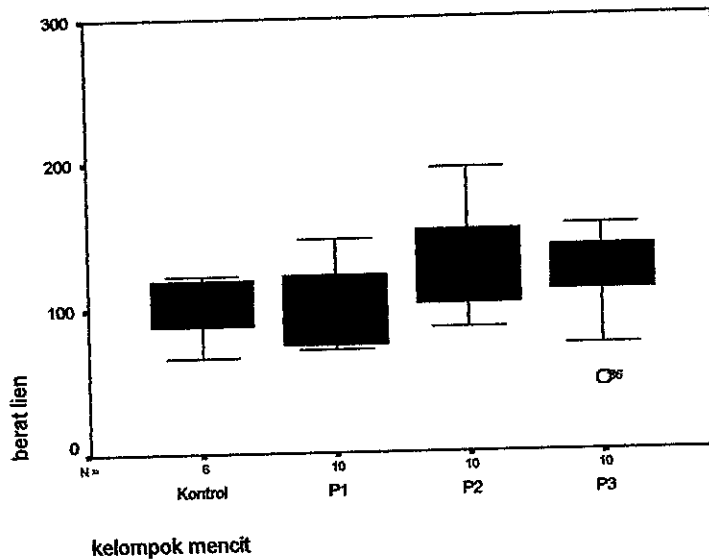
$$P3 = 99,5 \mu\text{g/dL}$$

Hasil pengukuran tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi seng serum kelompok K lebih tinggi dibanding kelompok lain. Jumlah sampel yang sangat sedikit tersebut tidak memungkinkan data dianalisis lebih lanjut, sehingga peneliti tak dapat mengambil kesimpulan tentang perbedaan rata-rata antar kelompok.

4.1.1.3 RESPONS PROLIFERASI LIMFOSIT

a. Berat Lien

Tiga puluh enam mencit diambil liennya dan ditimbang dengan timbangan elektronik, dengan satuan milligram (mg). Hasilnya dapat dilihat pada grafik boxplot dan tabel deskripsi berat lien berikut ini.



Gambar 4.2. Diagram Boxplot Berat Lien

Tabel 4.4. Tabel Deskripsi Berat Lien dalam mg

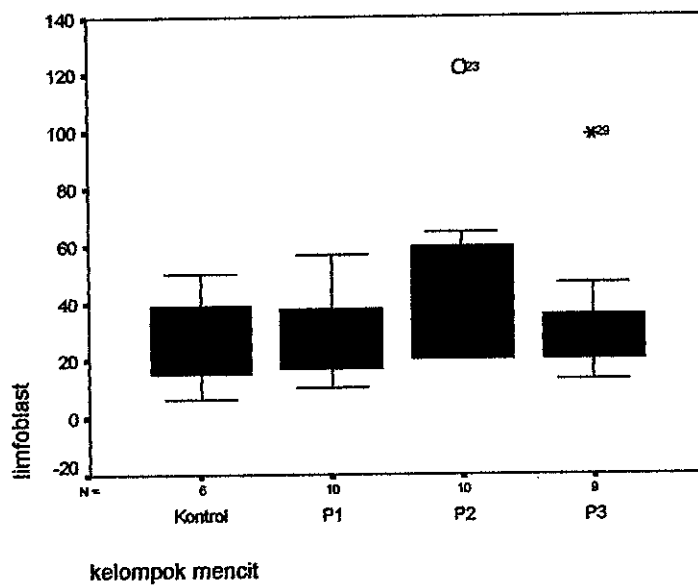
Kelompok	n	Rata-rata	Simpang Baku
K	6	100,05	22,093
P1	10	105,34	26,499
P2	10	125,75	35,303
P3	10	119,63	34,217

Grafik dan tabel di atas menunjukkan bahwa rata-rata berat lien kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol. Setelah dilakukan uji normalitas serta uji homogenitas varians, ternyata data berdistribusi normal dan varians homogen, sehingga uji beda dilakukan dengan *one way Anova*. Uji tersebut membuktikan bahwa meskipun rata-rata berat lien kelompok P1, P2, dan P3 lebih tinggi dibanding kontrol, namun perbedaan tersebut tidak bermakna ($p = 0,303$). Uji tersebut membuktikan bahwa tidak ada perbedaan bermakna pada berat lien mencit Balb/C

yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.

b. 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).



Gambar 4.3. Diagram Boxplot Jumlah Relatif Limfoblas

Tabel 4.5. Tabel Deskripsi Jumlah Relatif Limfoblas

Kelompok	n	Rata-rata	Simpang Baku
K	6	24,50	16,55
P1	10	29,50	15,01
P2	10	46,10	31,75
P3	9	33,67	26,51

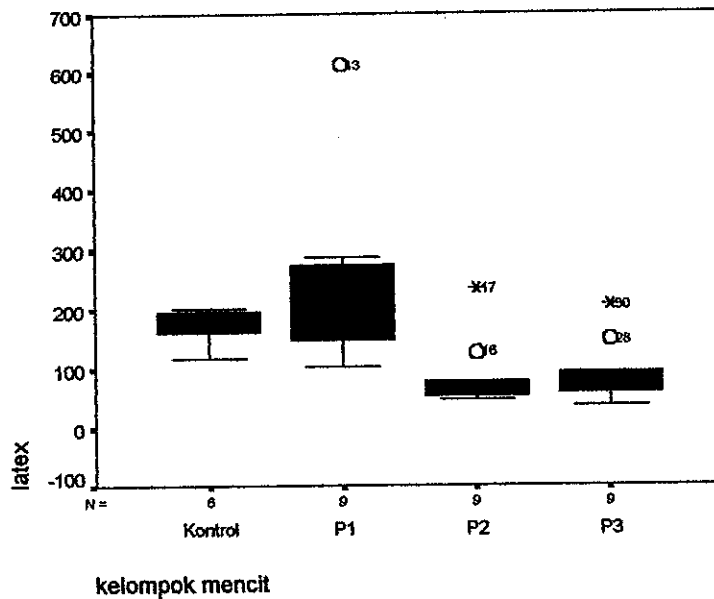
Grafik dan tabel menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan memiliki jumlah relatif limfoblas yang lebih tinggi dari kelompok K. Uji normalitas data menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal, sehingga selanjutnya dilakukan transformasi data dengan $u = \log x$. Transformasi menyebabkan distribusi data menjadi normal dan varians homogen, sehingga uji beda dapat dilakukan dengan *one way Anova*. Hasil uji beda tersebut menunjukkan bahwa rata-rata jumlah relatif limfoblas tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan ($p = 0,231$). Uji tersebut membuktikan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada jumlah relatif limfoblas mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.

4.1.1.4 KEMAMPUAN FAGOSITOSIS MAKROFAG

Jumlah Lateks yang difagositosis Makrofag

Jumlah lateks yang difagositosis oleh makrofag, yang merupakan salah satu indikator kemampuan fagositosis makrofag, dihitung dari rata-rata jumlah lateks yang difagositosis oleh 200 makrofag, dihitung tiga kali. Hanya 33 sampel yang dapat

diolah dari 36 cairan eksudat peritoneal yang dapat diambil, karena 3 diantaranya terlalu banyak bercampur darah sehingga tak dapat diproses secara laboratorik.



Gambar 4.4. Diagram Boxplot Jumlah Lateks yang difagositosis Makrofag

Tabel 4.6. Tabel Deskripsi Jumlah Lateks yang difagositosis oleh 200 Makrofag

Kelompok	n	Rata-rata	Simpang Baku
K	6	169,61	29,82
P1	9	238,56	154,07
P2	9	87,15	59,94
P3	9	89,55	54,52

Grafik dan tabel tersebut menunjukkan bahwa di antara ketiga kelompok perlakuan hanya kelompok P1 yang rata-rata jumlah lateksnya lebih tinggi dari kelompok Kontrol. Kelompok P2 dan P3 jumlah lateksnya justru lebih rendah dari kelompok Kontrol.

Uji normalitas data menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal, sehingga dilakukan transformasi data dengan $u = \log x$. Transformasi menyebabkan data berdistribusi normal dan varians homogen, sehingga uji beda dapat dilakukan dengan *one way Anova*. Uji beda dengan *Anova* tersebut menunjukkan bahwa ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan ($p=0,000$). Uji *Post Hoc* dengan *LSD* menunjukkan bahwa kelompok P1 tidak berbeda bermakna dengan kelompok K, namun berbeda bermakna dengan kelompok P2 dan P3. Uji tersebut membuktikan bahwa kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* pada kelompok diet dengan kandungan seng tinggi, secara bermakna lebih rendah dibandingkan kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal.

Tabel 4.7. Tabel Uji *Post Hoc LSD* terhadap Jumlah Lateks yang difagositosis Makrofag

p	K	P1	P2	P3
K	-	0,418	0,005*	0,006*
P1	0,418	-	0,000*	0,000*
P2	0,005*	0,000*	-	0,919
P3	0,006*	0,000*	0,919	-

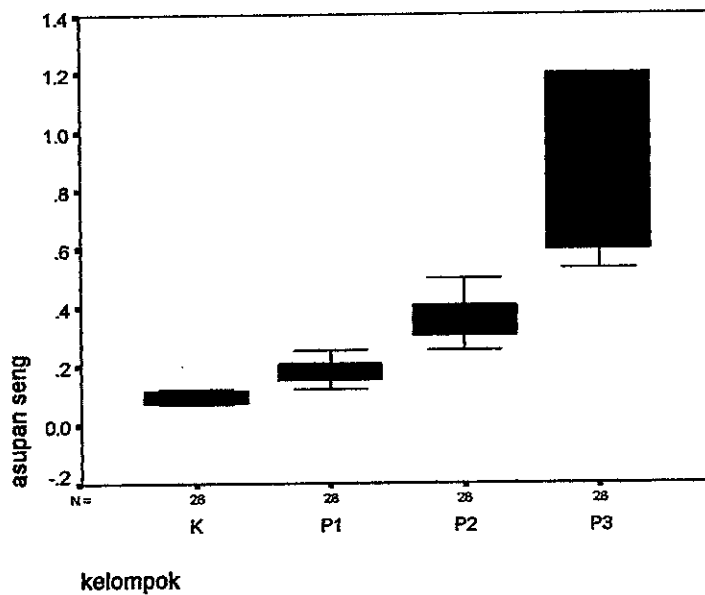
$p < 0,05$

4.1.2 PENELITIAN II

4.1.2.1 ASUPAN SENG

Asupan seng mencit pada penelitian II didapatkan dengan prosedur yang sama seperti penelitian I (lihat lampiran data).

Data yang diperoleh dibuat tabel deskriptif dan grafik boxplot sebagai berikut :



Gambar 4.5. Diagram Boxplot Asupan Seng Mencit (Penelitian II)

Tabel 4.8. Tabel Deskriptif Asupan Seng Mencit (Penelitian II) dalam mg

Kelompok	n	Rata-rata	Simpang Baku
K	28	0,10	0,017
P1	28	0,19	0,034
P2	28	0,36	0,062
P3	28	0,92	0,027

Grafik dan tabel di atas menunjukkan bahwa rata-rata asupan seng mencit kelompok P3 paling tinggi (0,92 mg), diikuti oleh kelompok P2 (0,36 mg), P1(0,19 mg), dan K (0,10 mg). Hasil uji normalitas data menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal, baik sebelum maupun sesudah dilakukan transformasi. Analisis dengan uji non parametrik *Kruskall Wallis* membuktikan adanya perbedaan asupan seng rata-rata yang bermakna pada semua kelompok ($p = 0,00$), dan uji dengan *Mann Whitney* menunjukkan adanya perbedaan asupan seng rata-rata antar kelompok yang bermakna. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa asupan seng mencit Balb/C yang diinokulasi *S. typhimurium* pada kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi, secara bermakna lebih tinggi dibandingkan kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal.

Tabel 4.9. Uji Mann Whitney Asupan Seng (II)

	K	P1	P2	P3
K	-	0,00	0,00	0,00
P1	0,00	-	0,00	0,00
P2	0,00	0,00	-	0,00
P3	0,00	0,00	0,00	-

4.1.2.2 UJI KESINTASAN (*SURVIVAL*)

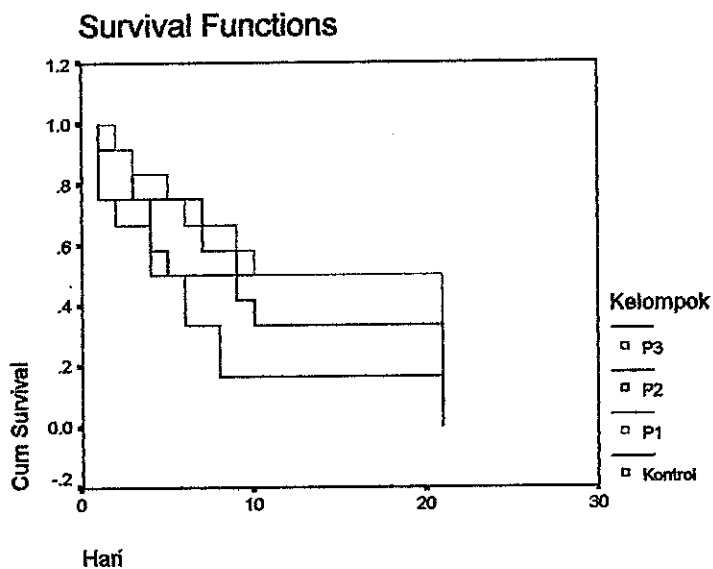
Hasil pengamatan terhadap jumlah mencit yang dilakukan selama 21 hari post infeksi (seperti tercantum pada bagian lampiran), diolah dan disusun tabel deskripsi waktu *survival*nya sebagai berikut:

Tabel 4.10. Tabel Deskripsi Waktu *Survival*

Kelompok	Waktu <i>survival</i> (hari)	
	Rata-rata	Median
K	11	9
P1	13	10
P2	12	5
P3	7	4

Data tersebut menunjukkan bahwa *median survival time* terpendek adalah P3, yaitu 7 hari, dan tertinggi adalah P1, 13 hari.

Diagram *survival Kaplan Meier* ditampilkan pada gambar berikut ini

Gambar 4.6. Diagram *Survival Kaplan Meier*

Hasil analisis dengan *Log Rank Test* menunjukkan bahwa tak ada beda bermakna pada waktu *survival* semua kelompok, ($p= 0,1887$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tak ada perbedaan bermakna pada kelangsungan hidup mencit Balb/C yang

diinfeksi *S. typhimurium* antara kelompok yang diberi diet dengan kandungan seng normal dan tinggi.

4.2 PEMBAHASAN

Hasil penghitungan asupan pakan mencit pada penelitian I menunjukkan mencit mengkonsumsi antara 2 – 7 gram pakan setiap harinya, sedangkan penelitian II 2 - 5 gram. Uji beda lanjutan menunjukkan bahwa besarnya perbedaan tersebut tidak bermakna, sehingga disimpulkan bahwa asupan pakan mencit antar kelompok tidak berbeda bermakna (tercantum pada lampiran). Asupan seng rata-rata kelompok K hingga P3 selama 10 hari masing-masing adalah 0,15; 0,23; 0,50 dan 0,95 mg per hari dan hasil uji bedanya menunjukkan bahwa asupan seng antar kelompok tersebut bermakna. Asupan seng rata-rata pada penelitian II dari kelompok K hingga P3 selama 28 hari masing-masing adalah 0,10; 0,19; 0,36; 0,92 mg per hari, dan hasil uji bedanya menunjukkan bahwa asupan seng antar kelompok juga bermakna. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian makan secara *ad libitum* dapat menyebabkan ketidakseragaman asupan pakan tiap kelompok, sehingga asupan seng kedua jenis penelitian tidak sama.

Konsentrasi seng serum merupakan salah satu indikator status seng yang relatif mudah dilakukan. Usaha peneliti dalam rangka membandingkan konsentrasi seng serum antar kelompok pada penelitian I tidak berhasil karena jumlah darah yang terkumpul setiap mencit terlalu sedikit, dan banyak diantaranya yang tak dapat

digunakan karena mengalami lisis. Peneliti hanya bisa mendapatkan satu data untuk masing-masing kelompok, yaitu dari kelompok K hingga P3 berturut-turut 127,2; 76; 92,5; dan 99,5 $\mu\text{g/dL}$. Hampir semua kelompok mempunyai konsentrasi seng serum yang lebih dari nilai normal, kecuali kelompok P1 yang nilainya masih dalam batas normal (nilai normal konsentrasi seng serum mencit = 70 –90 $\mu\text{g/dL}$)⁴⁸. Konsentrasi seng serum tersebut juga menunjukkan kecenderungan meningkat dari P1 hingga P3.

Respons proliferasi limfosit pada organ lien dinilai dari tiga indikator yaitu berat lien, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas. Pada penelitian ini, respons proliferasi limfosit hanya dapat dinilai dari berat lien dan jumlah relatif limfoblas saja, karena analisis jumlah limfosit mengandung bias pengamat. Hasil analisis deskriptif menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan berat lien dan jumlah relatif limfoblas dari kelompok K hingga P2, namun kembali menurun pada kelompok P3. Hasil uji beda menunjukkan tak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dengan pemberian seng selama 10 hari *ad libitum*. Hal ini sejalan dengan penelitian Denduluri et al yang membuktikan bahwa pemberian seng 50 mg/kg justru menurunkan respons stimulasi limfosit terhadap PHA serta jumlah limfosit di lien dibanding kontrol (25 ppm).⁶² Pemberian seng selama 10 hari diharapkan dapat meningkatkan konsentrasi seng pada sel epitel timus, penghasil hormon timulin, sehingga jumlah timulin aktif dapat meningkat. Timulin aktif akan meningkatkan sekresi IL-2 dan ekspresi IL-2R pada limfosit sehingga proliferasi limfosit akan meningkat pula.¹⁰ Sejauh ini belum ada penelitian yang membuktikan apakah pemberian seng dapat meningkatkan kadar timulin darah baik pada subjek dengan

defisiensi seng maupun normal. Peningkatan konsentrasi seng intrasel yang tidak diikuti oleh peningkatan jumlah timulin tentunya tak dapat meningkatkan jumlah timulin aktif, namun hanya meningkatkan prosentase timulin aktif, karena seng merupakan kofaktor timulin. Penelitian tentang respons proliferasi limfosit tersebut sebaiknya juga dilakukan pada minggu ke-3 infeksi atau memasuki fase pembersihan (*clearance*), di mana pada fase tersebut limfosit merupakan sel utama penghasil IFN- γ yang akan mengaktivasi makrofag.

Sel yang berperan penting dalam pertahanan tubuh mencit terhadap *S. typhimurium* pada fase ketiga atau *plateu phase*, yaitu hari ke-3 sampai 7 post infeksi, adalah sel NK dan makrofag²⁷. Pada fase tersebut, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hepar dan lien yang kemudian pertumbuhannya akan menetap di bawah pengaruh makrofag yang telah teraktivasi. Teraktivasinya makrofag adalah pengaruh dari sitokin IFN- γ yang pada fase awal infeksi terutama dihasilkan oleh sel NK¹³. Makrofag yang teraktivasi akan mengalami peningkatan kemampuan fagositosis, produksi ROI dan RNI-nya, sehingga banyak kuman yang dapat dieliminasi³⁰. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa pemberian seng dapat meningkatkan produksi TNF- α oleh monosit dan IFN- γ oleh sel NK¹¹. Pemberian seng selama 10 hari diharapkan dapat meningkatkan konsentrasi seng sel NK dan monosit, sehingga produksi sitokin-sitokin tersebut pun akan meningkat. Pada fase awal infeksi tersebut, TNF- α akan memacu produksi IFN- γ oleh sel NK, dan IFN- γ akan mengaktivasi makrofag¹³. Studi ini menilai pengaruh pemberian seng terhadap salah satu indikator aktivasi makrofag, yaitu kemampuan fagositosis, yang dinilai

dengan menghitung banyaknya lateks yang difagositosis makrofag, pada keadaan infeksi *S. typhimurium*. Hasil analisis justru menunjukkan adanya penurunan jumlah lateks yang difagositosis makrofag secara bermakna dari kelompok P1 ke P3, meskipun ada kenaikan yang tidak bermakna dari kelompok K ke P1. Hal ini mungkin disebabkan karena telah terjadi penurunan enzim ATP-ase pada membran sel makrofag. Menurut Gross, konsentrasi seng yang tinggi dapat menginaktivasi makrofag dengan menghambat membran ATP-ase⁵⁴. Enzim ATP-ase diperlukan oleh makrofag untuk menghidrolisis ATP dalam proses polimerisasi aktin sehingga terjadi perubahan struktur dari G-aktin menjadi F-aktin dan fagositosis dapat terjadi.³¹ Bila pemberian diet tinggi seng dapat menurunkan enzim tersebut, maka saat lateks berikatan dengan reseptor pada makrofag hanya sedikit molekul G-aktin yang terpolimerisasi, sehingga fagositosis akan menurun. Hal tersebut menjadi alasan perlunya dilakukan penelitian tentang konsentrasi enzim ATP-ase membran.

Penelitian ini hanya memeriksa kemampuan fagositosis makrofag pada hari ke-3 post infeksi. Pemeriksaan sebaiknya juga dilakukan pada minggu ke-3 post infeksi atau memasuki fase pembersihan (*clearance*) untuk lebih memahami peran seng terhadap kemampuan fagositosis makrofag post infeksi, karena pada fase tersebut IFN- γ yang merupakan aktivator makrofag utama, banyak dihasilkan oleh limfosit maupun sel NK²⁷.

Kelangsungan hidup merupakan indikator yang sederhana untuk menggambarkan respons imunitas tubuh mencit secara umum. Penelitian kelangsungan hidup atau *survival* pada studi ini bertujuan untuk mengetahui

pengaruh pemberian diet tinggi seng dan jangka panjang, yaitu 28 hari, yang terdiri dari 7 hari pra infeksi dan 21 hari post infeksi *S. typhimurium*. Memasuki hari ke-21 post infeksi, atau fase *clearance*, aktivitas limfosit dalam menghasilkan sitokin, terutama IFN- γ sangat diperlukan, karena pada fase ini, IFN- γ yang sebagian besar dihasilkan oleh limfosit Th, diharapkan dapat mengaktivasi makrofag, sehingga kemampuan fagositosis, serta produksi NO dan ROI meningkat^{27,30}. Peningkatan fagositosis bakteri dan kemampuan bakterisidal makrofag inilah yang diharapkan dapat meningkatkan kelangsungan hidup mencit. Hasil analisis *survival* menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna pada waktu *survival* antar kelompok. Hasil uji beda antar kelompok tampak bahwa kelompok P3 justru lebih rendah secara bermakna dibanding kelompok P1. Hal ini mungkin karena telah ada efek penekanan seng terhadap respons imunitas seluler.

Tingginya konsentrasi seng pada makrofag menyebabkan adanya penurunan aktivitas enzim iNOS dan/atau enzim NADPH oksidase. Zukoski et al membuktikan adanya penurunan aktivitas enzim NADPH oksidase makrofag peritoneal tikus yang diberi diet tinggi seng (2000 ppm) selama 3 hari.¹⁷ NADPH oksidase merupakan enzim yang terutama terdapat dalam membran fagolisosom, yang berfungsi untuk mereduksi molekul oksigen menjadi ROI, seperti radikal O_2^- , H_2O_2 , OH^- , dan OH. Superoksida secara enzimatis diubah menjadi H_2O_2 yang akan digunakan oleh enzim mieloperoksidase untuk mengubah ion halida yang tidak reaktif menjadi asam hipoklorus yang bersifat toksik untuk bakteri³⁰. Penurunan enzim NADPH oksidase tentunya dapat menurunkan kemampuan bakterisidal makrofag. Studi Spahl

membuktikan bahwa pemberian seng dapat menurunkan aktivitas enzim iNOS, suatu enzim yang berperan dalam pembentukan NO⁶³. Enzim iNOS mengkatalisa perubahan asam amino L-arginin menjadi sitrulin dengan melepaskan gas NO yang dapat berdifusi ke dalam fagolisosom. NO dapat bereaksi dengan superoksida dalam fagolisosom, membentuk radikal peroksinitrit (ONOO-) yang bersifat sangat bakterisidal.³⁰ Penurunan aktivitas enzim iNOS dapat menurunkan produksi NO. Hal tersebut belum dapat dibuktikan karena studi ini tidak meneliti tentang konsentrasi enzim iNOS maupun NADPH oksidase.

Penurunan kemampuan makrofag dalam membunuh bakteri dapat dinilai dengan indikator lain, yaitu pemeriksaan hitung kuman pada organ lien atau hepar, karena pada kedua organ itulah mikroorganisme tumbuh pesat²⁷. Pada hari ke 3-7 post infeksi, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hepar dan lien kemudian pertumbuhannya menetap (*latent*) dibawah pengaruh makrofag teraktifasi yang memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi²⁷. Untuk itu perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian seng terhadap hasil hitung kuman pada kedua organ tersebut.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. a. Tak ada perbedaan bermakna pada berat lien mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*, antara yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal .
b. Tak ada perbedaan bermakna pada jumlah relatif limfoblas mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*, antara yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal
2. Kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium* yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi, secara bermakna lebih rendah dibandingkan dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal
3. Tak ada perbedaan bermakna pada kelangsungan hidup mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*, antara yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal

Dari ketiga pernyataan di atas dapat disimpulkan bahwa pemberian diet dengan kandungan seng tinggi tidak meningkatkan respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*.

5.2 SARAN

Beberapa saran yang dapat dikemukakan mengacu pada pengalaman selama penelitian dan berdasar hasil penelitian ini, antara lain :

1. Pemberian seng dilakukan hingga hari ke-7 atau hingga minggu ke-3 post infeksi untuk kemudian diperiksa respons imunitas selulernya.
2. Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-7 dan minggu ke-3 post infeksi dengan menggunakan dosis kuman yang lebih kecil dari $2,5 \times 10^4$
3. Pengukuran status seng dengan indikator metallothionein
4. Pemberian seng dilakukan per sonde agar asupan seng mencit dapat lebih dikontrol.

RINGKASAN

Penyakit demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius terutama di negara-negara berkembang. Tubuh mempunyai sistem imunitas dalam mengatasi antigen asing yang masuk, termasuk *Salmonella typhi*, yang merupakan bakteri penyebab demam tifoid. Sistem imunitas yang efektif dalam mengeliminasi bakteri intraseluler seperti *S. typhi* adalah sistem imunitas *adaptive* seluler.

Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui mekanisme respons imunitas yang terjadi pada demam tifoid manusia, misalnya dengan cara menginfeksi hewan coba, seperti mencit, dengan *S. typhimurium*. Gejala dan perjalanan penyakit yang tampak pada mencit terinfeksi *S. typhimurium* analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia. Hal tersebut menjadikan alasan dapat diterimanya infeksi *S. typhimurium* pada mencit secara luas sebagai model eksperimental untuk demam tifoid manusia.

Infeksi *S. typhimurium* pada mencit menyebabkan teraktivasinya sebagian besar sel T CD4⁺ dan CD8⁺, namun proliferasi dan ekspansinya hanya meningkat sedikit. Bila proliferasi limfosit T rendah, maka sitokin-sitokin yang dihasilkannya (terutama IFN- γ) tidak cukup banyak untuk dapat mengaktivasi makrofag, sehingga kemampuan fagositosis dan *killing* makrofag terhadap *S. typhi* akan menurun. Inilah yang menjadi alasan mengapa penderita demam tifoid disamping diberi terapi

antibiotika perlu diberi suplemen tambahan yang menguntungkan bagi sistem imunitas.

Salah satu mineral yang mempunyai efek positif terhadap sistem imunitas adalah seng. Berbagai penelitian telah membuktikan tentang efek positif seng terhadap sistem imunitas, antara lain sebagai inhibitor apoptosis, mengaktifkan hormon timulin, dan menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK. Secara *in vitro*, seng juga dapat memacu produksi IL-1 β , IL-6, IFN- α , dan TNF- α oleh monosit.

Studi-studi yang membuktikan efek positif seng terhadap sistem imunitas banyak dilakukan pada subjek dengan defisiensi seng. Hal tersebut belum tentu dapat diterapkan pada subjek dengan status gizi normal. Pemberian seng pada penderita defisiensi seng mempunyai peluang lebih besar untuk mengubah biomarker-tergantung seng, karena suplemen secara nyata dapat mengembalikan simpanan seng yang semula rendah.

Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian seng dosis tinggi dapat menurunkan respons imunitas tubuh, antara lain seng dapat menurunkan kadar IFN- α , konsumsi oksigen oleh neutrofil, serta aktivitas NADPH oksidase dan enzim iNOS, yang kesemuanya dapat menurunkan kemampuan fagositik dan bakterisidal fagosit. Melalui penekanannya terhadap mineral-mineral lain, seperti besi dan tembaga, seng juga dapat menekan sistem imunitas. Defisiensi besi dapat menurunkan fungsi lekosit PMN, jumlah limfosit, aktivitas sel NK, dan produksi IL-2 oleh limfosit, sedangkan defisiensi tembaga dapat menurunkan produksi timulin, dan aktivitas mikrobisidal fagosit, dan sitotoksisitas sel NK.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian diet dengan kandungan seng 30 mg/kg (ppm), 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm terhadap respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*, khususnya terhadap respons proliferasi limfosit, kemampuan fagositosis makrofag dan kelangsungan hidup mencit.

Penelitian ini menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Penelitian dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu penelitian I (respons proliferasi limfosit dan kemampuan fagositosis makrofag) yang menggunakan 40 ekor mencit, dan penelitian II (kelangsungan hidup) yang menggunakan 48 ekor mencit. Subjek penelitian berupa mencit Balb/C jantan umur 8 – 10 minggu, berat badan 20-40 gram yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi PAU UGM Yogyakarta. Subjek diadaptasikan selama 1 minggu, lalu masing-masing kelompok besar dibagi secara acak menjadi empat kelompok kecil, sesuai dengan kandungan seng pada pakan, yaitu kelompok 30 ppm sebagai kelompok kontrol, 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm. Diet diberikan secara *ad libitum* selama 10 hari (penelitian I) dan 28 hari (penelitian II). Mencit diinfeksi dengan $2,5 \times 10^4$ (penelitian I) dan $2,5 \times 10^6$ (penelitian II) *S. typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-8. Mencit penelitian I dibunuh pada hari ke-11 untuk diperiksa respons proliferasi limfosit di organ lien (yang dinilai dari berat lien dan jumlah relatif limfoblast), dan kemampuan fagositosis makrofag yang diambil dari *peritoneal exudates cell*. Data asupan seng (I), berat lien, jumlah relatif limfoblas, dan jumlah lateks yang difagositosis makrofag, diuji beda dengan *one way Anova*. Data asupan seng (I) dan jumlah lateks yang difagositosis makrofag

menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (*LSD= Least Significant Difference*). Data asupan seng (II) diuji beda dengan uji *Kruskall Wallis* yang karena menunjukkan perbedaan bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Analisis jumlah mencit dianalisis uji beda dengan *log-rank test*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa berat lien mencit yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal ($p = 0,303$); jumlah relatif limfoblas mencit yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal ($p=0,231$), kemampuan fagositosis makrofag mencit yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi, secara bermakna lebih rendah dibandingkan dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal ($p= 0,000$), kelangsungan hidup mencit yang diberi diet dengan kandungan seng tinggi tidak berbeda bermakna dengan yang diberi diet dengan kandungan seng normal ($p =0,19$). Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah bahwa pemberian diet dengan kandungan seng tinggi tidak meningkatkan respons imunitas seluler mencit Balb/C yang diinfeksi *S. typhimurium*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Soeharyo H. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kejadian perdarahan dan perforasi pada demam tifoid. Disertasi untuk mencapai gelar doktor. Universitas Diponegoro Semarang. 1990
2. Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M. Typhoid fever and other salmonellosis : a continuing challenge. *Trends Microbiol* 1995; 3 : 253- 255
3. Keusch GT. Salmonellosis. In : Fauci et al. *Principles of Internal Medicine*, 14th ed. USA: Mc Graw Hill Companies Inc; 1998 : 950-953
4. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 3rd ed. Philadelphia : WB Saunders Co; 1997: 166 -167
5. Mittrucker 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
6. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 2000; 130 : 1360S-1366S.
7. Almatsier S. Mineral mikro. Dalam : Prinsip dasar ilmu gizi. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama ; 2001: 257-261
8. Gibson RS. *Principles of nutritional assessment*. New York : Oxford University Press; 1990: 542-553
9. Fraker PJ, King LE, Laako T, Vollmer TL. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr* 2000; 130: 1399S-1406S
10. Rink L, Kirchner H. Zinc-altered immune function and cytokine production. *J Nutr* 2000; 130 : 1407S-1411S
11. Salas M, Kirchner H. Induction of interferon-gamma in human leukocyte cultures stimulated by Zn²⁺. *Clin Immunol Immunopathol* 1987 Oct; 45(1) :139- 142
12. Driessen C, Hirv K, Rink L, Kirchner H. Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; 13(1) :15-20.
13. Bancroft GJ, Sheehan KC, Schreiber RD, Unanue ER. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. *J Immunol* 1989; 143(1) :127-30.
14. Duchateau J, Delepesse G, Vereecke P. Influence of oral zinc supplementation on the lymphocyte response to mitogens of normal subjects. *Am J Clin Nutr* 1981; 34 : 88-93

15. Black RE. Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *Am J Clin Nutr* 1998;68 (suppl) : 476S-9S
16. Wood RJ. Supplement : Assessment of marginal zinc status in human. *J Nutr* 2000; 130 : 1350- 1354S
17. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 1982 ; 35 : 417-468
18. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr* 1998; 68 : 442S-6S
19. Yadrick et al. Zinc and compounds. CASRN. 1991. Available in <http://www.epa.gov/iris/subst/0426.htm>.
20. Oppenheimer SJ. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J. Nutr* 2001; 131 : 616S-635S
21. Kuvibidilla S, Yu L, Ode D, Warriar RP. The immune response in protein-energy malnutrition and single nutrient. In : *Nutrition and immunology. USA : Plenum Press; 1993 : 121-155*
22. Gasem MH. Typhoid fever- clinical and epidemiological studies in Indonesia. 2001: 4-5
23. Suhendro, Inada K, Hendarwanto, Zulkarnain I. Patterns of cytokines and nitric oxide in typhoid fever. In : *Demam Tifoid- peran mediator, diagnosis dan terapi. Jakarta : FKUI; 2000 : 6*
24. Gianella RA. Salmonella. In : *Medical Microbiology. 4th ed. USA : The University of Texas Medical Branch at Galveston ; 1996 : 395-402*
25. Le TP, Hoffman SL. Typhoid fever. In : *Tropical Infectious Diseases. Principles, pathogens, and practice. USA : Churchill Livingstone; 1999 : 277-295.*
26. Lesser CF, Miller SI. Salmonellosis. Available in <http://www.harrisononline.com/>
27. Keuter M. Experimental studies on pathogenesis of salmonella infection. Thesis. Katholiek Universiteit Nijmegen. 1998: 20-22
28. 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) : 227-234
29. Baratwidjaja KG. *Immunologi dasar edisi ke-4. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2001 : 3 - 15*
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology. 5ed. Philadelphia : WB Saunders Co; 2003: 275- 297*
31. Fuller GM, Shields D. *Molecular basis of medical cell biology. 1st ed. USA : Prentice Hall International; 1998: 27-28, 86-88, 135-136*

32. Kaufmann SHE. Immune response to intracellular bacteria. In : Clinical Immunology Principles and Practice. USA : Mosby ; 1996 : 510-512
33. Parslow TG. The immune response. In : Medical Immunology, 9th ed. New Jersey: Prentice Hall Int. Inc; 1997: 63-72
34. Goodman JW. The immune response. In : Stites DP, Terr AI. Basic and Clinical Immunology. 8ed. Connecticut : Prentice Hall Int. Inc; 1994 : 40-49
35. Chen JF. Nutritional immunology. Utah : Bright Ideas Press ; 1995
36. Klasing KC, Leshchinsky TV. Interactions between nutrition and immunity. In : Nutrition and Immunology. New Jersey : Humana Press Inc; 2000: 363- 371
37. Berdanier CD. Advanced nutrition micronutrients. USA : CRC Press New York; 1998 : 194 – 200
38. Brody T. Nutritional biochemistry. California : Academic Press;1994 : 581 – 590
39. Prasad AS. Zinc deficiency in humans : a neglected problem. Journal of the American College of Nutrition 1998; 17 ; 6: 542-543
40. Prasad AS. Zinc deficiency; Has been known for 40 years but ignored by global health organizations. BMJ 2003; vol 326 : 409-410
41. Hambidge M. Human zinc deficiency. J Nutr 2000; 130 :1344S-1349S
42. Fleet JC. Zinc, copper, and manganese. In : Biochemical and physiological aspects of human nutrition. USA : WB Saunders company; 2000 : 741-759
43. Cousins RJ, Mc Mahon RJ. Integrative aspects of zinc transporters. J Nutr 2000; 130 : 1384S-1387S
44. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. J Nutr 2001; 131 : 46-52
45. Brown KH. Effect of infections on plasma zinc concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries. Am J Clin Nutr 1998; 68 (suppl) : 425S- 9S.
46. David SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals : a physiological perspective on function. J Nutr 2000; 130 : 1085-1088
47. Ibs HK, Rink L. Zinc-altered immune function. J Nutr 2003; 133 : 1452S-1456S
48. Wirth JJ, Fraker PJ, Kierszenbaum F. Changes in the level of marker expression by mononuclear phagocytes in zinc-deficient mice. Am J Clin Nutr 1984; 114; 10 : 1826-33.
49. Rundles SC. Zinc and immune function; The importance of zinc on health. Available in <http://www.zincworld.org>

50. Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, Zalewski PD. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/ gene-directed cell death. *J Nutr* 2000; 130 : 1459S-1466S.
51. Fraker PJ, Jardieu PD, Zwickl CM, Luecke RW. Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *U S A : Proc Natl Acad Sci*; 1978; 75 (11) : 5660-5664
52. Dardenne M, Pleau JM, Nabbara B, et al. Contribution of zinc and other metals to biological activity of the serum thymic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5370-3
53. Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998; 68 (suppl); 447S-63S
54. Gross RL, Osdin N, Fong L, Newberne PM. Depressed immunological function in zinc-deprived rats as measured by mitogen response of spleen, thymus, and peripheral blood. *Am J Clin Nutr* 1979; 32 : 1260-1265
55. Nixon P. Iron transport, storage, and overload. GMC Biochemistry Home Page. Biochemistry Department. Australia : The University of Queensland; 2000. Available in http://biosci.uq.edu.au/GMC/iron_ovr_00.html
56. Fischer PWF, Giroux A, L'Abbe MR. The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am J Clin Nutr* 1981; 34 : 1670-1675
57. Percival SS. Copper and immunity. *Am J Clin Nutr* 1998; 67 (suppl) : 1064S-8S
58. Hopkins RG, Failla ML. Transcriptional regulation of IL-2 gene expression is impaired by copper deficiency in jurkat human T lymphocyte. *J Nutr* 1999; 129 : 596-601.
59. Kuvibidilla SR, Baliga S, Warrie RP, Suskind RM. Iron deficiency reduces the hydrolysis of cell membrane phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate during splenic lymphocyte activation in C57BL/6 mice. *J Nutr* 1998; 128 : 1077-1083
60. Hanaffiah, K.A. Rancangan percobaan : Teori dan aplikasi. Jakarta : Rajawali Press; 1991: 6
61. Santoso S. SPSS versi 10 mengolah data statistik secara professional. Cetakan ke-3. Jakarta : PT Elex Media Computindo; 2002 : 261-274, 422-428, 452-459
62. Denduluri S, Langdon M, Chandra RK. Effect of zinc administration on immune responses in mice. *J Trace Elem Exp Med* 1997 ; 10 : 155-162.
63. Spahl DU, Grun DB, Suschek CV, Bachofen VK, Kroncke KD. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO-synthase-derived NO : Nuclear metallothionein translocation and intranuclear zinc release. *PNAS* 2003 ;vol 100; no.24 : 13952-13957

64. Anonim. Persiapan pembuatan suspensi kuman *Salmonella typhimurium* dengan kepekatan tertentu. Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. 2004
65. Ngestiningsih D. Pengaruh pemberian Ganoderma lucidum terhadap respon proliferasi limfosit mencit Balb/C yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Tesis untuk mencapai gelar magister. Universitas Diponegoro Semarang. 2001
66. Sukmaningtyas H. Pengaruh pemberian L-Arginin terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinokulasi *Salmonella typhimurium*. Tesis untuk mencapai gelar magister . Universitas Diponegoro Semarang . 2003 : 6
67. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. The American Journal of Hygiene 1938; vol.27 : 493-497
68. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents : Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr 1993 ; no.123 : 1939-1951
69. Irmawati I. Pengaruh jus aloe vera terhadap proliferasi limfosit, produksi reactive oxygen intermediate dan koloni organ hepar mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Tesis untuk mencapai gelar magister. Universitas Diponegoro Semarang. 2004
70. Rahfiludin MZ. Pengaruh suplementasi besi dan seng pada makanan jajanan terhadap status tembaga anak pendek sekolah dasar. Tesis untuk mencapai gelar magister. Universitas Diponegoro Semarang. 2002.