



LAPORAN PENELITIAN

**STATUS SENG (Zn)  
DAN IMUNITAS SELULER : *FOKUS PADA  
FUNGSI FAGOSITOSIS PMN,*  
PADA PASIEN DIABETES MELITUS TIPE 2  
DENGAN REGULASI GLUKOSA DARAH  
BAIK DAN BURUK**

Oleh :

Rastri Mahardhika Prabawanti

BAGIAN / SMF ILMU PENYAKIT DALAM  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
RUMAH SAKIT UMUM PUSAT DOKTER KARIADI  
S E M A R A N G

2003

## HALAMAN PENGESAHAN

- 1. JUDUL PENELITIAN** : Status Seng (Zn) dan imunitas seluler pada pasien DM tipe 2 dengan regulasi glukosa darah baik dan buruk.
- 2. RUANG LINGKUP** : Endokrin – Metabolik Penyakit Dalam.
- 3. PELAKSANA PENELITIAN** :
- Nama lengkap** : Rastri Mahardhika Prabawanti
- NIP** : 140 328 909
- Pangkat/golongan** : Penata Tingkat I/III B
- Jabatan** : Peserta PPDS I Ilmu Penyakit Dalam FK Universitas Diponegoro Semarang.
- 4. PEMBIMBING PENELITIAN** : Prof.DR.Dr.RRJ.Djokomoeljanto SpPD, KE
- 5. KONSULTAN** : Dr. Edi Dharmana MSc, PhD
- 6. LAMA PENELITIAN** : 3 (tiga) bulan.
- 7. BIAYA PENELITIAN** : Atas biaya sendiri.

Semarang, Oktober 2003

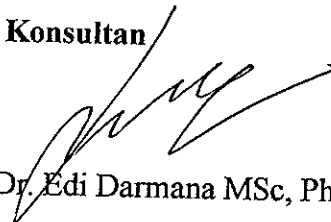
**Disetujui:**

**Pembimbing**



Prof.DR.Dr.RRJ Djokomoeljanto SpPD, KE

**Konsultan**



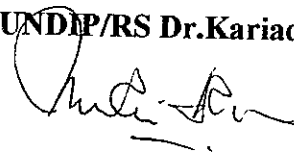
Dr. Edi Darmana MSc, PhD

**Ketua Bagian /SMF I. Peny.Dalam  
FK UNDIP/RS Dr. Kariadi**



DR. Dr. Darmono SpPD, KE

**Ketua Program Studi I. Peny.Dalam  
FK UNDIP/RS Dr.Kariadi**



Dr. Murni Indrasti SpPD, KGH

## KATA PENGANTAR

Saya mengucapkan syukur dan terima kasih kepada Tuhan karena atas perkenanNya tesis ini, yang saya susun untuk memenuhi persyaratan tugas akhir Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS-I) Ilmu Penyakit Dalam di FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang, dapat diselesaikan.

Saya sangat berterima kasih kepada semua pasien yang telah bersedia ikut serta dan menjalani semua prosedur dalam penelitian ini.

Saya juga mengucapkan terima kasih kepada pembimbing saya Prof.DR.Dr.RRJ.Djokomoeljanto SpPD,KEMD yang telah memberikan ide penelitian dan dengan penuh kesabaran memberikan dorongan, bimbingan, pengarahan dan koreksi yang saya perlukan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Saya sampaikan pula terima kasih kepada Dr. Edi Darmana MSc, PhD selaku konsultan penelitian yang selama persiapan dan pelaksanaan penelitian telah memberikan bimbingan dan arahan sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih saya sampaikan kepada:

1. Dr. Gatot Suharto Mkes, MMR; Direktur RS Dr. Kariadi Semarang atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan selama mengikuti pendidikan di Bagian Ilmu Penyakit dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang.
2. Prof.Dr. Kabul R, SpKK; Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK UNDIP Semarang.
3. DR. Dr. Darmono, SpPD, KEMD; Ketua Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang atas segala bimbingan, dorongan dan arahan yang sangat berharga bagi saya selama mengikuti PPDS-I.
4. Dr. Murni Indrasti, SpPD, KGH; Ketua Program Studi Ilmu Penyakit Dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang atas bimbingan , dorongan dan arahan yang sangat berharga bagi saya selama mengikuti PPDS-I.
5. Pada guru besar: Prof.Dr.KRT Boedhi Darmojo SpPD,KKV,KGer. Prof. DR.Dr. Imam Parsudi SpPD, KGH. Prof.Dr. Sunarto, SpPD, KR-KHOM. Prof.DR.Dr.Soeharyo Hadisaputro, SpPD, KPTI dan Prof. Dr. Pasiyan

- Rahmatullah, SpPD, KP atas segala bimbingan dan pengarahan yang sangat berharga selama mengikuti PPDS-I.
6. Semua kepala subbagian di lingkungan Bagian Penyakit Dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang yang dengan tulus telah mendidik dan membimbing saya selama mengikuti PPDS-I.
  7. Semua staf pengajar Bagian Penyakit Dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang atas semua bimbingan dan pengarahan selama mengikuti PPDS-I.
  8. Dr. F. Soemanto PM, MSc, SpPD, KGEH, selaku koordinator Tim Penelitian karya akhir atas bimbingan, arahan dan koreksi yang diperlukan untuk perbaikan tesis ini.
  9. Prof.DR.Dr Djokomoeljanto, SpPD,KEMD selaku Direktur Utama Laboratorium Bioteknologi FK UNDIP Semarang yang telah menyediakan fasilitas yang diperlukan untuk pemeriksaan imunologi, A1C dan Zn serum.
  10. Dr. Tjahyati Djokomoeljono, SpPK, Kepala Laboratorium GAKI/Bioteknologi FK UNDIP dan Staf Bagian Patologi Klinik FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang.
  11. Dr. Edi Darmana, MSc, PhD, Kepala Laboratorium Imunologi/Bioteknologi FK UNDIP.
  12. Dr. Latijani Djamil SpPK; Kepala Instalasi Laboratorium Sentral RS Dr. Kariadi Semarang.
  13. Drg. Henry S, MSc selaku pembimbing statistik, atas segala bimbingannya selama pengolahan data dan penyusunan tesis ini.
  14. Para laboran di laboratorium imunologi dan GAKI/Bioteknologi FK UNDIP yang dengan penuh kesabaran dan sukacita membantu saya selama pemeriksaan sampel penelitian.
  15. Semua rekan sejawat residen Ilmu Penyakit dalam FK UNDIP Semarang atas segala kerja sama selama saya mengikuti PPDS-I.
  16. Semua paramedis di bangsal dan poliklinik Ilmu Penyakit dalam RS Dr. Kariadi Semarang atas segala bantuan dan kerja samanya selama saya mengikuti PPDS-I.
  17. Kepada almarhum ayah Yogaswara Jarwadi Kusumawardana dan ibu Sumarmi yang dengan sepenuh hati dan kasih telah mengasuh dan mendidik saya hingga dewasa, mendorong untuk hidup jujur, bekerja dengan sungguh hati dan tekun menuntut ilmu, penulis persembahkan hormat, penghargaan dan ucapan terima

menuntut ilmu, penulis persembahkan hormat, penghargaan dan ucapan terima kasih yang tak terhingga, terlebih untuk ibu yang dengan penuh kasih mendampingi saya dan Hizkia selama saya menjalani pendidikan di PPDS-I.

18. Kepada suami tercinta Ir. Hanam Fajar Nugraha, terima kasih tak terhingga atas pengorbanan, dorongan semangat dan kesetiaan yang dicurahkan dengan penuh kasih, pengertian dan kesabaran.

Kepada anakku Hizkia Febrian Raditya Nugraha, keberadaanmu sungguh menjadi matahari-sumber semangat dan kegembiraan tak berkesudahan bagi ibu.

Akhirnya kepada berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan namanya satu persatu saya ucapkan terima kasih. Kiranya segala sesuatu yang telah saya kerjakan dapat bermanfaat untuk ilmu pengetahuan dan kesejahteraan sesama. Tuhan memberkati.

# DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
ABSTRAK.....	xi
PENDAHULUAN.....	1
I.A. Latar belakang penelitian.....	1
I.B. Rumusan masalah.....	3
I.C. Tujuan penelitian.....	3
I.C.1. Tujuan umum.....	3
I.C.2. Tujuan khusus.....	3
I.D. Manfaat penelitian.....	4
KEPUSTAKAAN.....	
II.A. Diabetes melitus.....	5
II.A.1. Definisi.....	5
II.A.2. Diagnosis DM.....	6
II.A.3. Pengendalian DM.....	7
II.B. Imunitas.....	8
II.B.1. Definisi.....	9
II.B.2. Respon imun.....	10
II.C. Perubahan sistem imun pada DM.....	17
II.D. Seng (Zn).....	21
II.D.1. Metabolisme Zn.....	21
II.D.2. Kebutuhan dan sumber Zn.....	22
II.E. Zn pada DM.....	22
II.F. Zn dan imunitas.....	23
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS.....	
III.A. Kerangka teori.....	28
III.B. Kerangka konsep.....	29
III.C. Hipotesis penelitian.....	30
METODOLOGI PENELITIAN.....	31
IV.A. Ruang lingkup.....	31
IV.B. Jenis penelitian.....	31
IV.C. Populasi dan sampel.....	31
IV.C.1. Populasi.....	31
IV.C.2. Sampel dan besar sampel.....	31
IV.D. Kriteria inklusi dan eksklusi.....	32
IV.D.1. Kriteria inklusi.....	32
IV.D.2. Kriteria eksklusi.....	32
IV.E. Variabel penelitian.....	32
IV.F. Pengumpulan data.....	32
IV.F.1. Tempat pengumpulan data.....	33

IV.F.2. Pemeriksaan pengukuran yang dilakukan .....	33
IV.F.3. Alur penelitian.....	34
IV.F.4. Pemeriksaan sampel darah.....	35
IV.G. Analisis statistik.....	40
IV.H Definisi operasional.....	40
HASIL PENELITIAN.....	43
PEMBAHASAN .....	54
KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	61
Lampiran 1. Lembar persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian.....	66
Lampiran 2. Lembar isian data peserta penelitian.....	67
Lampiran 3. Data penelitian.....	69

## DAFTAR GAMBAR

	<b>hal</b>
<b>Gambar 1.</b> Kerja sama imunitas bawaan dan spesifik dalam pertahanan tubuh melawan infeksi	9
<b>Gambar 2.</b> Urutan peristiwa suatu respon imun prototipikal.	14
<b>Gambar 3.</b> Lokasi efek spesifik nutrien pada jaringan imunologi.	24
<b>Gambar 4.</b> Rerata IMT pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	45
<b>Gambar 5.</b> Rerata Zn serum pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	46
<b>Gambar 6.</b> Rerata limfosit T pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	48
<b>Gambar 7.</b> Rerata kadar NO PMN pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	49
<b>Gambar 8.</b> Rerata persentase PMN yang mereduksi NBT pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	50
<b>Gambar 9</b> Rerata indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM regulasi baik dan buruk.	51

## DAFTAR TABEL

	<b>hal</b>
<b>Tabel 1.</b> Klasifikasi etiologi DM menurut ADA 2003	5
<b>Tabel 2.</b> Kriteria diagnosis DM dan gangguan toleransi glukosa menurut PERKENI 2002.	6
<b>Tabel 3.</b> Kriteria pengendalian DM	7
<b>Tabel 4.</b> Kandungan granula-granula netrofil.	13
<b>Tabel 5.</b> Jalur mikrobisidal oksidatif utama dalam netrofil.	16
<b>Tabel 6.</b> Rerata umut pasien DM tipe 3 regulasi baik dan buruk.	43
<b>Tabel 7.</b> Distribusi jenis kelamin pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk .	44
<b>Tabel 8.</b> Rerata lama DM pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	44
<b>Tabel 9.</b> Rerata IMT pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	45
<b>Tabel 10.</b> Rerata kadar Zn serum pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	46
<b>Tabel 11.</b> Distribusi Zn serum pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	47
<b>Tabel 12.</b> Rerata limfosit T pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	48
<b>Tabel 13.</b> Rerata kadar NO PMN pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	49

<b>Tabel 14.</b> Rerata persentase sel PMN yang mereduksi NBT pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	50
<b>Tabel 15.</b> Rerata indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	51
<b>Tabel 16.</b> Uji beda lama DM, IMT, jumlah limfosit T, kadar NO, persentas reduksi NBT PMN dan indeks NBT PMN pada kategori ZN serum.	52
<b>Tabel 17.</b> Perbandingan umur, lama DM, IMT, Zn serum, jumlah limfosit T, kadar NO PMN, persentase reduksi NBT PMN dan indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.	53

# STATUS SENG (Zn) DAN IMUNITAS SELULER PADA PASIEN DIABETES MELITUS TIPE 2 DENGAN REGULASI GLUKOSA DARAH BAIK DAN BURUK

*R. Mahardhika\**, *R. Djokomoeljanto\**, *E. Darmana\*\**

\*Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK UNDIP/RS Dr. Kariadi Semarang

\*\*Lab imunologi/Bioteknologi dan Bagian Parasitologi FK UNDIP

## Abstrak

**Latar belakang:** Infeksi pada diabetes menjadi faktor pencetus yang penting pada kematian akibat ketoasidosis diabetik. Untuk mengatasi infeksi diperlukan respon imun tubuh yang baik. Pada diabetes diduga ada penurunan fungsi respon imun baik seluler maupun humoral. Penelitian-penelitian mengenai respon imun pada diabetes menunjukkan hasil yang kontroversi. Pasien diabetes tipe 2 dapat mengalami perubahan mikronutrien, di antaranya kadar Zn yang rendah, yang mungkin ikut berperan menyebabkan terganggunya sistem imunitas terutama imunitas seluler.

**Tujuan penelitian:** Untuk mengetahui status Zn dan imunitas seluler pasien diabetes tipe 2 dengan regulasi glukosa darah baik dan buruk.

**Pasien dan metode:** Penelitian dilakukan secara *cross sectional* pada empat puluh enam pasien diabetes tipe 2 yang kontrol di poliklinik Endokrinologi dan Metabolik RS Dr. Kariadi Semarang antara bulan Maret sampai Juni 2003, kemudian diperiksa kadar A1C dan dikelompokkan dalam regulasi glukosa baik dan buruk. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar Zn serum dengan metode *Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS)* dan imunitas seluler. Parameter imunitas seluler yang diperiksa adalah jumlah limfosit T dengan metode *rossette*, dan *oxydative killing* dengan mengukur kadar NO PMN dengan metode *Griess* serta persentase dan indeks reduksi NBT PMN. Analisis statistik deskriptif untuk menentukan rerata dan sebaran, dan analisis analitik dengan uji t independent untuk menentukan ada tidaknya perbedaan pada kelompok regulasi baik dan buruk.

**Hasil:** Berdasarkan A1C dikelompokkan 16 pasien regulasi baik dan 16 pasien regulasi buruk. Empat belas pasien dengan regulasi sedang dikeluarkan dari penelitian. Kadar Zn serum kelompok regulasi baik *tidak berbeda bermakna* dibandingkan regulasi buruk ( $80.33 \pm 27.87$  vs  $78.22 \pm 21.14$   $\mu\text{g/dL}$ ;  $p=0.811$ ). Parameter imunitas seluler: jumlah limfosit T kelompok regulasi baik dan buruk *tidak berbeda bermakna* ( $59.69 \pm 7.25$  vs  $60.31 \pm 10.05$  %;  $p=0.841$ ), kadar NO PMN kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk ( $13.88 \pm 9.27$  vs  $7.84 \pm 3.57$   $\mu\text{M}$ ;  $p=0.025$ ), persentase sel PMN mereduksi NBT kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk ( $80.75 \pm 13.97$  vs  $62.88 \pm 10.48$  %;  $p=0.0001$ ), indeks reduksi NBT PMN kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk ( $43.62 \pm 7.39$  vs  $28.31 \pm 9.04$ ;  $p=0.0001$ )

**Kesimpulan:** Kadar Zn serum pasien diabetes tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk tidak berbeda. Jumlah limfosit T pasien diabetes tipe 2 regulasi glukosa baik dan buruk tidak berbeda. *Oxydative killing* (NO PMN dan NBT PMN) pasien diabetes tipe 2 regulasi glukosa darah baik lebih baik dibandingkan regulasi glukosa darah buruk.

# ZINC STATUS AND CELLULAR IMMUNITY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS WITH GOOD AND POORLY CONTROLLED

*R. Mahardhika\**, *R. Djokomoeljanto\**, *E. Darmana\*\**

\*Dept of Internal Medicine Medical Faculty Diponegoro University/ Dr Kariadi Hospital Semarang

\*\*Lab. Immunology/Biotechnology Medical Faculty Diponegoro University

## **Abstract.**

**Background.** Infection is an important factor in diabetic ketoacidosis patients, leading to death. Good immune response is needed to handle infection. Host immune response in diabetics, both the cellular and the humoral component are notoriously consider to be impaired. Studies on this area are scanty and found controversial results. Zinc deficiency occurs in type 2 diabetics, which may play role in abnormal immune response, especially cellular immunity leading to increase infection.

**Objective.** This study will identify Zn status and cellular immunity in type 2 diabetics with good and poorly controlled.

**Patients and methodes.** This study was conducted cross sectionally in forty six subjects diagnosed type 2 diabetic attending outpatients clinic at Dr. Kariadi hospital in Semarang who were recruited into this study between March and June 2003.. Grouping for good and poorly controlled diabetics were based on their A1C level. Determination concentration of minerals was performed by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS). Determination cellular immune response was performed by T rosette-lymphocyte assay and oxydative killing by determining NO PMN concentration (using Griess methode) dan PMN fagocyte function (percentage and index of NBT reduction by PMN). The t tes was used for differences in mean between two groups.

**Results.** Grouping based on A1C level: 16 (50%) were good controlled and 16 (50%) were poorly controlled. The remaining were excluded. **Zinc serum level** in type 2 diabetic both group were *not different* ( $80.33 \pm 27.87$  vs  $78.22 \pm 21.14$   $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0.811$ ). For **cellular immunity: T-lymphocyte count** in type 2 diabetic both group were *not different* ( $59.69 \pm 7.25$  vs  $60.31 \pm 10.05$  %;  $p = 0.841$ ) and type 2 diabetic with good controlled had better oxydative killing compared to poorly controlled: Good controlled diabetic had *upper NO PMN concentration* than poorly controlled ( $13.88 \pm 9.27$  vs  $7.84 \pm 3.57$   $\mu\text{M}$ ;  $p = 0.025$ ), good controlled had *upper percentage of NBT reduction by PMN* than poorly controlled (  $80.75 \pm 13.97$  vs  $62.88 + 10.48\%$ ;  $p = 0.001$ ) and good controlled also had *upper reduction index of NBT by PMN* than poorly controlled ( $43.62 \pm 7.39$  vs  $28.31 \pm 9.04$ ;  $p = 0.001$ )

**Conclusion.** There were no difference on Zn serum level and T-lymfocyte count between good and poorly controlled type 2 diabetic patients. Good controlled type 2 diabetic had better oxydative killing than poorly controlled.

# ZINC STATUS AND CELLULAR IMMUNITY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS WITH GOOD AND POORLY CONTROLLED

*R. Mahardhika\**, *R. Djokomoeljanto\**, *E. Darmana\*\**

\*Dept of Internal Medicine Medical Faculty Diponegoro University/ Dr Kariadi Hospital Semarang  
\*\*Lab. Immunology/Biotechnology Medical Faculty Diponegoro University

## **Abstract.**

**Background.** Infection is an important factor in diabetic ketoacidosis patients, leading to death. Good immune response is needed to handle infection. Host immune response in diabetics, both the cellular and the humoral component are notoriously consider to be impaired. Studies on this area are scanty and found controversial results. Zinc deficiency occurs in type 2 diabetics, which may play role in abnormal immune response, especially cellular immunity leading to increase infection.

**Objective.** This study will identify Zn status and cellular immunity in type 2 diabetics with good and poorly controlled.

**Patients and methodes.** This study was conducted cross sectionally in forty six subjects diagnosed type 2 diabetic attending outpatients clinic at Dr. Kariadi hospital in Semarang who were recruited into this study between March and June 2003.. Grouping for good and poorly controlled diabetics were based on their A1C level. Determination concentration of minerals was performed by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS). Determination cellular immune response was performed by T rosette-lymphocyte assay and oxydative killing by determining NO PMN concentration (using Griess methode) dan PMN fagocyte function (percentage and index of NBT reduction by PMN). The t tes was used for differences in mean between two groups.

**Results.** Grouping based on A1C level: 16 (50%) were good controlled and 16 (50%) were poorly controlled. The remaining were excluded. **Zinc serum level** in type 2 diabetic both group were *not different* ( $80.33 \pm 27.87$  vs  $78.22 \pm 21.14$   $\mu\text{g/dL}$ ;  $p = 0.811$ ). For **cellular immunity: T-lymphocyte count** in type 2 diabetic both group were *not different* ( $59.69 \pm 7.25$  vs  $60.31 \pm 10.05$  %;  $p = 0.841$ ) and type 2 diabetic with good controlled had better oxydative killing compared to poorly controlled: Good controlled diabetic had *upper NO PMN concentration* than poorly controlled ( $13.88 \pm 9.27$  vs  $7.84 \pm 3.57$   $\mu\text{M}$ ;  $p = 0.025$ ), good controlled had *upper percentage of NBT reduction by PMN* than poorly controlled ( $80.75 \pm 13.97$  vs  $62.88 + 10.48\%$ ;  $p = 0.001$ ) and good controlled also had *upper reduction index of NBT by PMN* than poorly controlled ( $43.62 \pm 7.39$  vs  $28.31 \pm 9.04$ ;  $p = 0.001$ )

**Conclusion.** There were no difference on Zn serum level and T-lymfocyte count between good and poorly controlled type 2 diabetic patients. Good controlled type 2 diabetic had better oxydative killing (NO PMN concentration, percentage and index of reduction NBT by PMN) than poorly controlled.

# BAB I.

## PENDAHULUAN

### I.A. Latar belakang penelitian

Berbagai penelitian di Indonesia menunjukkan besarnya prevalensi diabetes melitus (DM) pada penduduk usia lebih dari 15 tahun sebesar 1,5-2,3%<sup>1</sup>. Diabetes di Indonesia diduga paling tidak terjadi pada sedikitnya 4 juta orang pada saat ini dan akan meningkat menjadi 5 juta orang pada tahun 2010<sup>2</sup>. Bahkan dalam *Diabetes Atlas 2000* tercantum asumsi prevalensi DM di Indonesia tahun 2000 sebesar 5,6 juta dan akan menjadi 8,6 juta pada tahun 2020. Begitu pula halnya dengan prevalensi DM regional dan di dunia. Di kawasan Asean jumlah penderita DM diperkirakan 8,5 juta orang pada tahun 1995 dan meningkat menjadi 12,3 juta pada tahun 2000<sup>1</sup>. Tahun 1995 prevalensi DM dewasa adalah 7,4% dan diperkirakan meningkat menjadi 9% pada 2025.<sup>3</sup> Diabetes melitus tipe 2 meliputi 90% dari seluruh populasi penderita DM<sup>4</sup>.

Diabetes sebagai suatu penyakit degeneratif potensial menyebabkan kecacatan akibat komplikasinya, dengan karakteristik kadar glukosa darah yang meningkat. Infeksi adalah hal lain yang harus mendapat perhatian pada penderita diabetes. Sebelum era terapi antimikroba modern, infeksi merupakan penyebab kematian terbanyak pada penderita diabetes. Pada tahun 1964 – 1980 berdasarkan hasil otopsi, 123 dari 1043 (11,8%) kematian di Joslin Clinic disebabkan oleh infeksi. Infeksi juga menjadi faktor pencetus atau kontribusi pada kematian akibat ketoasidosis diabetik.<sup>5</sup> Selain neuropati dan vaskulopati, faktor yang dianggap berpengaruh terhadap infeksi adalah respon imun penderita dan macam mikroba. Untuk dapat mengatasi infeksi diperlukan adanya respon imun yang memadai, baik respon imun humoral maupun seluler, spesifik maupun nonspesifik.<sup>6</sup>

Pada pasien DM yang kadar glukosanya tidak terkontrol diketahui ada penurunan fungsi respon imun.<sup>6,7,8</sup> Telah dilakukan berbagai penelitian mengenai perubahan imunitas seluler pada penderita DM dengan menggunakan parameter imunitas seluler yang berbeda-beda. Penelitian-penelitian tersebut sebagian besar menunjukkan hasil yang sama, yaitu menyimpulkan adanya penurunan respon imun pada pasien DM, terlebih lagi yang regulasi gula darahnya tidak baik<sup>9-16</sup>. Akan tetapi beberapa penelitian menunjukkan hasil yang berbeda dalam hal perubahan-perubahan parameter imunitas seluler pada DM,

hasil yang berbeda dalam hal perubahan-perubahan parameter imunitas seluler pada DM, seperti: fungsi kemotaksis PMN (*polymorphonuclear*), fungsi fagosit PMN, daya bunuh bakteri dan *granulocyte adherence*; yaitu tidak ada perbedaan yang bermakna dibandingkan kontrol<sup>8-11,13,14,16</sup>.

Sejumlah penelitian yang telah dilakukan menyimpulkan adanya perubahan status beberapa mikronutrien pada penderita diabetes<sup>12,17-26</sup>. Beberapa penelitian menunjukkan kadar seng (Zn) penderita DM lebih rendah dibandingkan individu sehat<sup>17,19,20,25</sup>, sementara kadar seng pada penderita DM dengan berbagai regulasi tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna<sup>25</sup>. Defisiensi Zn pada penderita diabetes ini akan menyebabkan terganggunya sistem imun tubuh yang memperlambat proses penyembuhan infeksi<sup>14,15,20,22</sup>. Penelitian hubungan defisiensi Zn dengan imunitas juga menunjukkan hasil yang beragam, baik mengenai aktifitas sel NK (*natural killer*), jumlah limfosit T, proliferasi limfosit T, subset limfosit T, produksi antibodi (yang *T-cell dependent* maupun *non T-cell dependent*), produksi sitokin (baik oleh *T helper 1/Th1* maupun *T helper 2/Th2*), respon DTH (*delayed type hypersensitivity*)<sup>12,15,27-31</sup>.

Berangkat dari hasil-hasil penelitian yang masih belum sepakat tersebut maka kami bermaksud melakukan penelitian untuk mengetahui status Zn dan status imunitas seluler pada penderita DM tipe 2 dengan pengendalian glukosa darah baik dan buruk.

Status Zn pada penelitian ini diukur dengan pemeriksaan kadar Zn serum. Menurut Gibson (1990) kadar Zn serum telah digunakan secara luas untuk menyatakan status Zn karena dianggap kadar Zn dalam serum cukup besar dan metode pemeriksaannya tidaklah rumit. Kadar Zn eritrosit jarang dipilih untuk menentukan status Zn karena waktu paruh eritrosit cukup panjang sehingga tidak menggambarkan perubahan pada simpanan Zn tubuh dalam waktu yang relatif pendek. Kadar Zn leukosit atau neutrofil sebetulnya bisa lebih dipercaya dibandingkan Zn serum atau eritrosit, tetapi interpretasi hasilnya masih sulit dilakukan karena belum ada konsensus mengenai metode yang digunakan. Kesulitan ini timbul mengingat pemisahan leukosit dari sel-sel darah masih cukup sulit dilakukan dan sering terjadi kontaminasi dengan trombosit yang mempunyai kandungan Zn cukup tinggi.<sup>(32)</sup>

Uji imunitas seluler, tanpa membedakan spesifik maupun non spesifik, dapat dilakukan dengan berbagai metode, tetapi tidak ada satu metode tunggal yang dapat

mewakili imunitas seluler. Penelitian ini akan menyoroti secara khusus fungsi fagositosis PMN yaitu dengan uji untuk menilai *oxydative killing* dari PMN dan uji limfosit T darah tepi: secara kuantitatif dengan T rosette dan kualitatif. *Oxydative killing* PMN diuji dengan menilai kemampuan PMN menghasilkan *reactive oxygen intermediate* (ROI) yaitu radikal superoksida ( $O_2^-$ ) – diukur secara tidak langsung dengan uji fagositosis yaitu reduksi pengecatan *nitroblue tetrazoleum* (NBT) dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) yaitu *nitric oxide* (NO) diukur dengan metode Griess.<sup>(33)</sup>

Diharapkan penelitian ini dapat menambah wawasan di tengah kontroversi mengenai hubungan status Zn dan status imun seluler pada penderita DM tipe 2.

### **I.B.Rumusan masalah**

Berdasar pada uraian latar belakang masalah tersebut di atas, dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

Apakah terdapat perbedaan status Zn serum dan imunitas seluler khususnya fungsi fagositosis PMN antara pasien DM tipe 2 regulasi baik dan regulasi buruk?

### **I.C.TUJUAN PENELITIAN**

#### **I.C.1.Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian adalah:

Mengetahui ada tidaknya perbedaan status Zn serum dan status imun selulerkhususnya fungsi fagositosis PMN antara pasien DM tipe 2 regulasi baik dan regulasi buruk.

#### **I.C.2. Tujuan Khusus**

1. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan status Zn serum antara pasien DM tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk
2. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah dan proliferasi limfosit T darah tepi antara pasien DM tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk.
3. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan persentase reduksi NBT PMN antara pasien DM tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk..
4. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kadar NO PMN antara pasien DM tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk.

#### **I.D. MANFAAT PENELITIAN**

1. **Pendidikan (pengetahuan)** : Menambah wawasan tentang unsur kelumit Zn dan status imun seluler khususnya fungsi fagositosis PMN pada pasien DM tipe 2.
2. **Pelayanan kesehatan** : Pengelolaan lebih baik bagi pasien DM tipe 2 dalam kaitannya dengan sistem imun/pertahanan terhadap infeksi.

## B A B II

### KEPUSTAKAAN

#### II.A. DIABETES MELITUS

##### II.A.1. Definisi

Diabetes melitus adalah suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai hiperglikemia akibat defek sekresi insulin, aksi insulin atau keduanya. Hiperglikemia kronik ini berhubungan dengan kerusakan, disfungsi dan kegagalan berbagai organ jangka panjang.<sup>3</sup>

Beberapa proses patogenik terlibat dalam timbulnya DM, mulai dari destruksi akibat proses autoimun pada sel beta pankreas dengan konsekuensi defisiensi insulin sampai pada berbagai abnormalitas yang menyebabkan resistensi aksi insulin<sup>3</sup>. Klasifikasi DM berdasar etiologi dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Klasifikasi etiologi diabetes mellitus menurut American Diabetes Association 2003<sup>(3)</sup>

- 
- I DM tipe 1 (kerusakan sel beta, biasanya menyebabkan defisiensi insulin absolut)
    - a. diperantarai proses imun
    - b. idiopatik
  - II. DM tipe 2 (bisa mulai dari yang predominan resistensi insulin dengan defisiensi insulin relatif sampai pada predominan gangguan sekresi dengan resistensi insulin)
  - III. Tipe spesifik lainnya:
    - A. Defek genetik fungsi sel beta
    - B. Defek genetik aksi insulin
    - C. Penyakit pada pankreas eksokrin
    - D. Endokrinopati
    - E. Induksi obat atau bahan kimia
    - F. Infeksi
    - G. Bentuk yang tidak umum/biasa dari DM yang diperantarai imun
    - H. Sindrome genetik lain yang kadang-kadang berhubungan dengan DM
  - IV. DM gestasional
- 

Dikutip dari American Diabetes Association. *Clinical practice recommendation 2003.*

## II.A.2 Diagnosis DM

Saat ini secara internasional telah disepakati kriteria diagnosis diabetes melitus dan gangguan toleransi glukosa yang disusun oleh *World Health Organization* (WHO). Kriteria WHO 1985 menganjurkan pemakaian kadar glukosa acak sebagai titik tolak kerja, kemudian untuk kasus yang meragukan diperlukan tes toleransi glukosa. Kadar glukosa darah puasa tidak disebutkan sebagai titik tolak kerja karena dianggap tidak dapat dipercaya, selain itu didapat data bahwa mereka yang kadar glukosa darah > 140 mg/dL, hampir pasti kadar gula darah 2 jam *postprandial* (PP) selalu > 200 md/dL.<sup>34</sup>

Berdasarkan Konsensus pengelolaan diabetes melitus tipe 2 di Indonesia 2002 oleh PERKENI, kriteria diagnosis DM seperti tercantum dalam tabel 2.

**Tabel 2.**Kriteria diagnosis diabetes melitus dan gangguan toleransi glukosa menurut PERKENI 2002<sup>(1)</sup>

- 
1. Kadar glukosa darah sewaktu (plasma vena)  $\geq$  200 mg/dL  
**atau**
  2. Kadar glukosa darah puasa (plasma vena)  $\geq$  126 mg/dL  
**atau**
  3. Kadar glukosa plasma  $\geq$  200 mg/dL pada 2 jam sesudah beban glukosa 75 gram pada TTGO\*\*
- 

- Kriteria diagnostik tersebut harus dikonfirmasi ulang pada hari yang lain, kecuali untuk keadaan khas hiperglikemia dengan dekompensasi metabolik berat seperti ketoasidosis, gejala klasik: poliuri, polidipsi, polifagi dan berat badan menurun dengan cepat.
- Cara diagnosis dengan kriteria ini tidak dipakai rutin di klinik. Untuk penelitian epidemiologis pada penduduk dianjurkan memakai kriteria diagnostik kadar glukosa darah puasa dan 2 jam pasca pembebanan. Untuk DM Gestasional juga dianjurkan kriteria diagnostik yang sama.

Dikutip dari PERKENI. *Konsensus pengelolaan diabetes mellitus di Indonesia*. 2002.

### II.A.3 Pengendalian DM

Pengendalian DM yang baik berarti menjaga agar kadar glukosa darah tetap dalam kisaran normal, sehingga penderita tidak sampai masuk dalam keadaan hiperglikemia maupun hipoglikemia. Untuk mencapai pengendalian yang baik diperlukan pemantauan status metabolik yang teratur.

*The Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), 1993, adalah suatu penelitian multisenter pada penderita DM tipe 1 yang menyimpulkan bahwa pengendalian DM yang baik dapat mengurangi komplikasi kronik DM yaitu retinopati, nefropati dan neuropati. Hasil yang sama juga didapat pada penelitian *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), 1998, yang dilakukan pada penderita DM tipe 2<sup>3</sup>.

Pemantauan status metabolik dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu rasa sehat secara subyektif, pengendalian berat badan, tes glukosa urin, tes keton urin, tes glukosa darah baik di klinik maupun pemeriksaan sendiri, pemeriksaan A1C serta kadar lipid.

**Tabel 3.** Kriteria pengendalian DM menurut PERKENI 2002<sup>(1)</sup>

	Baik	Sedang	Jelek/buruk
Glukosa darah (plasma vena mg/dL)			
- Puasa	80 – 109	110 – 125	≥ 126
- 2 jam <i>postprandial</i>	80 – 144	145 – 179	≥ 180
A1C (%)	< 6,5	6,5 – 8	> 8
Kolesterol total (mg/dL)	< 200	200 – 239	≥ 240
Kolesterol LDL (mg/dL)	< 100	100 – 129	≥ 130
Kolesterol HDL (mg/dL)	> 45		
Trigliserida (mg/dL)	< 150	150 – 199	≥ 200
Indeks Massa Tubuh (kg/m <sup>2</sup> )	18,5 – 22,9	23 – 25	> 25
Tekanan darah (mmHg)	< 130/80	130-140/80-90	> 140/90

Dikutip dari PERKENI. *Konsensus pengelolaan diabetes mellitus di Indonesia*. 2002.

## II.B.IMUNITAS

### II.B.1. Definisi

Istilah imunitas berasal dari bahasa latin *immunis* yang mulanya digunakan untuk mereka yang terbebas dari pajak atau tugas militer<sup>35</sup>. Dalam dunia kedokteran imunitas ialah semua mekanisme pertahanan tubuh terhadap invasi benda asing sehingga terjadi interaksi antara tubuh dan benda asing tersebut.

Untuk melindungi diri terhadap invasi mikroorganisma, tubuh memiliki 2 macam sistem pertahanan, yaitu imunitas bawaan (*innate immunity*) dan imunitas didapat (*acquired immunity*)<sup>35</sup>.

Imunitas bawaan; telah dimiliki orang sejak lahir, bersifat nonspesifik yang berarti respon terhadap benda asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar pada benda asing tersebut. Hal-hal yang berperan dalam mekanisme imunitas bawaan ialah: 1). Dari hospes: ras, spesies, genetis individual, umur, jenis kelamin, hormonal dan gizi. 2) fisis: kulit, membran mukus, permukaan yang basah, perangkap anatomis misalnya rongga nasal, pembersih mekanis misalnya silia. 3) Antimikroba aktif: sekresi keringat dan sebaseum, sekresi kulit yang bersifat antibakteri, antifungus, antivirus, substansi-substansi antimikroba jaringan, misalnya lisosim, polipeptida fagositris, sel-sel yang melakukan fagositosis. 4). Determinan lain yang dapat berpengaruh: pemberian kortison, antibiotik dan keadaan suhu<sup>35,36</sup>.

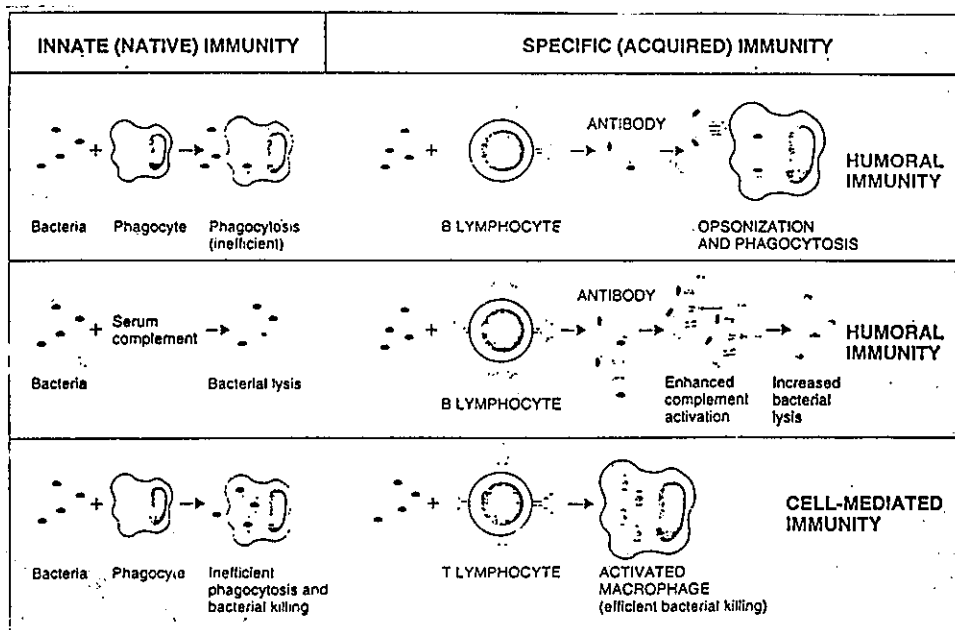
Imunitas didapat: bersifat spesifik, mekanisme pertahanannya banyak bergantung pada pembentukan respon imun terhadap benda asing tertentu yang memberikan rangsangan atau induksi. Pada hakekatnya imunitas spesifik merupakan interaksi antara berbagai komponen dalam sistem imun secara bersama-sama, tetapi secara garis besar sistem imun ini terdiri atas imunitas seluler (*cell mediated immunity*) dan imunitas humoral (*humoral immunity*).<sup>33,35,36</sup>

Imunitas seluler: terdiri atas sel-sel limfoid yang mengalami sensitisasi secara spesifik oleh antigen tertentu dan mampu bereaksi langsung dengan antigen tersebut, sehingga menimbulkan peristiwa sitoksis, misalnya terhadap sel-sel asing pada pencangkokan jaringan. Sel limfoid ini disebut limfosit T yang perkembangannya

dipengaruhi timus dan merupakan 65 - 80% dari jumlah limfosit yang beredar dalam tubuh. Komponen yang berperan dalam imunitas seluler adalah limfosit T, limfokin dan makrofag. Sistem imun ini mula-mula aktif karena adanya stimulus antigen yang ditangkap oleh limfosit T yang kemudian mengeluarkan limfokin dan mengadakan aktivasi makrofag. Sistem imunitas seluler berperan penting dalam pertahanan terhadap infeksi oleh kuman intrasel. <sup>35,36</sup>

Imunitas humoral; terdiri atas kelompok limfosit B yang dalam perkembangannya pada burung dipengaruhi oleh *bursa fabricus* dan pada manusia dipengaruhi oleh *gut associated lymphoid tissue* (GALT). Limfosit B berperan dalam sintesis antibodi dan merupakan 20% dari seluruh limfosit tubuh. Dalam sistem imun humoral dikenal 5 kelas imunoglobulin (Ig) yaitu: IgA, Ig M, Ig D, Ig E dan Ig G. Komponen yang berperan dalam mekanisme pertahanan humoral adalah limfosit B, antibodi, komplemen dan lekosit PMN. Antibodi tersebut di atas penting untuk pertahanan terhadap infeksi yang disebabkan oleh kuman ekstraseluler <sup>35,36</sup>.

Meskipun imunitas nonspesifik dan spesifik berbeda, yaitu adanya spesifisitas dan pembentukan memori terhadap antigen tertentu yang hanya dimiliki oleh respon imun spesifik, telah terbukti bahwa keduanya saling meningkatkan efektivitas dan bahwa respon imun yang terjadi merupakan interaksi antara satu komponen dengan komponen lain dalam sistem imun yang berlangsung bersama-sama sedemikian rupa sehingga menghasilkan suatu aktivitas biologik yang seirama dan serasi seperti sebuah konser. <sup>33</sup>



Gambar 1. Kerja sama imunitas bawaan dan spesifik dalam pertahanan tubuh melawan infeksi <sup>(37)</sup>.  
Dikutip dari Abbas AH, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 3<sup>rd</sup>ed.  
Philadelphia. WB Saunders Company. 1991

Gambar 1 menunjukkan kerjasama dan hubungan imunitas bawaan dan spesifik dalam pertahanan tubuh melawan infeksi. Antibodi membantu fagositosis atau komplemen serum yang telah diaktivasi untuk membunuh mikroba dan limfosit T meningkatkan fungsi makrofag untuk memfagosit dan membunuh mikroba <sup>37</sup>

## II.B.2 Respon Imun

Bila tubuh mendapat imunogen maka akan terjadi respon imun. Perkenalan dengan suatu imunogen akan membangkitkan respon primer. Antibodi dalam serum akan muncul beberapa waktu setelah pemberian imunogen, yang disebut periode laten atau induksi. Setelah periode laten, menyusul periode biosintesis yang terbagi menjadi 3 fase, yaitu: fase logaritmis, fase mantap (*steady phase*) dan fase penurunan. Sesuai dengan aktivitas seluler maka terjadi peristiwa sebagai berikut: pada periode laten: imunogen diproses disampaikan pada sel yang imunokompeten, terjadi proliferasi dan diferensiasi sel; pada periode biosintesis: fase logaritmis, jumlah sel plasma akan mengalami diferensiasi berlipat ganda dengan cepat; fase mantap, kecepatan sintesis antibodi sama dengan kecepatan katabolismenya; fase penurunan, katabolisme antibodi lebih cepat daripada sintesisnya. Umumnya pada respon primer IgM timbul lebih dulu baru kemudian disusul IgG, tetapi katabolisme IgM lebih cepat dibandingkan IgG. <sup>36</sup>

Terdapat perbedaan yang nyata antara respon imun primer dan sekunder, yaitu bahwa pada respon imun sekunder ditemukan periode laten yang lebih pendek, sintesis antibodi yang lebih cepat, titer antibodi yang lebih tinggi dan bertahan untuk jangka waktu yang lebih lama. <sup>36</sup>

Pada stimulasi respon primer, sel-sel prekursor membelah diri dan mengadakan diferensiasi menjadi sel-sel pembentuk antibodi yang memproduksi IgM atau IgG. Selama proses ini terbentuk memori sel yang jumlahnya terbatas. Kemudian bila terjadi stimulasi respon sekunder, sel-sel yang sensitif antigen jumlahnya bertambah cepat dan terjadi penumpukan sel-sel pembentuk antibodi yang lebih banyak sehingga meningkatkan sintesis antibodi dengan kelas IgG yang predominan. Dosis imunogen

yang dibutuhkan untuk membangkitkan respon sekunder lebih kecil dibandingkan yang dibutuhkan untuk membangkitkan respon primer.<sup>36,38</sup>

### **II.B.3.Respon Host (penjamu)**

Respon host terhadap invasi mikroba dapat dibagi atas 3 tahapan. Tahap pertama bersifat nonspesifik atau *innate*, yaitu berupa respon inflamasi. Tahap kedua bersifat spesifik dan didapat, yang diinduksi oleh komponen antigenik mikroba. Tahapan ketiga adalah respon peningkatan dan koordinasi sinergistik antara pertahanan spesifik dan nonspesifik yang diatur oleh berbagai produk komponen inflamasi.<sup>36,39</sup>

#### **a. Tahapan pertama**

Respon inflamasi host merupakan salah satu pertahanan tubuh yang muncul sebagai akibat invasi mikroba pada jaringan. Respon ini terdiri atas sel inflamasi, antara lain sel leukosit (netrofil, limfosit, monosit) sel makrofag, sel mast, sel *natural killer* (NK), serta mediator-mediator kimia kompleks yang dihasilkan oleh sel dan yang terdapat dalam plasma. Sel fagosit mononuklear maupun netrofil berfungsi pada proses awal untuk membunuh mikroba dan mediator-mediator kimia dapat meningkatkan fungsi ini. Mediator tersebut antara lain histamin, kinin/bradikinin, komplemen, prostaglandin, leukotrien dan limfokin. Respon inflamasi ini bertujuan untuk mengeliminasi dan menghambat penyebaran kuman.<sup>36,39</sup>

#### **b. Tahapan ke dua**

Bila mikroba berhasil melampaui mekanisme pertahanan nonspesifik, terjadilah tahapan kedua yaitu berupa pertahanan spesifik yang dirangsang oleh antigen mikroba itu sendiri atau oleh antigen yang dipresentasikan makrofag. Tahapan ini terdiri atas imunitas humoral dan imunitas seluler.<sup>35</sup>

Imunitas humoral yang diperankan oleh antibodi hasil dari sel plasma sebagai akibat aktivasi antigen mikroba terhadap limfosit B akan menetralkan toksin yang dilepaskan mikroba sehingga tidak toksis lagi. Antibodi juga akan menetralkan mikroba agar tidak infeksius lagi. Selain itu antibodi akan bersifat sebagai *opsonin* sehingga memudahkan proses fagositosis mikroba. Antibodi juga dapat mengaktifkan komplemen untuk melisis mikroba. Demikian juga, antibodi juga ikut memegang peranan dalam proses *antigen dependent cell mediated cytotoxic* (ADCC) oleh sel T

sitotoksik (Tc) maupun sel NK sehingga kemudian terjadi lisis sel yang dihuni oleh mikroba.<sup>39</sup>

Pada imunitas seluler, sel T akan melepaskan limfokin-limfokin yang mempunyai fungsi-fungsi yang berbeda, yaitu meningkatkan produksi antibodi oleh sel plasma, meningkatkan fungsi sel fagosit untuk memfagosit mikroba dan meningkatkan aktivitas sel NK untuk melisis sel yang dihuni virus<sup>38,40</sup>.

### c. Tahapan ke tiga

Pada tahapan ini terjadi peningkatan respon imun baik melalui aktivasi jalur komplemen klasik maupun peningkatan kemotaksis, opsonisasi dan fagositosis. Sel makrofag dan limfosit T terus memproduksi sitokin yang selanjutnya meningkatkan lagi respon inflamasi melalui ekspresi molekul adhesi pada sel endotel serta merangsang kemotaksis, pemrosesan antigen, fagositosis, pembunuhan intrasel dan lisis, sehingga infeksi dapat teratasi. Respon imun yang terkoordinasi melibatkan sel T, antibodi, sel makrofag, netrofil, komplemen dan pertahanan nonspesifik lainnya.<sup>39</sup>.

Jadi, bila ada partikel asing (imunogen) yang masuk ke tubuh *host*, misalnya bakteri, virus, partikel karbon, maka yang pertama kali bekerja adalah respon imun alami (*innate*), di mana sel fagosit netrofil sangat berperan<sup>Abbas1</sup>. Setelah terjadi mobilisasi sel-sel fagosit menuju tempat masuknya imunogen, imunogen tersebut akan mengalami fagositosis melalui proses *zippering* yang progresif sehingga imunogen tersebut akan benar-benar tertelan (*engulfed*).<sup>41</sup>

Imunogen yang telah tertelan oleh netrofil awalnya akan masuk ke dalam vakuola bermembran yang disebut fagosom. Selanjutnya granula-granula yang terdapat dalam sitoplasme netrofil akan menyatu dengan fagosom (*phagolysosome*). Granula ini mengandung sejumlah enzim dan substrat (Tabel 4) yang dapat membunuh dan menyebabkan degradasi bakteri atau partikel yang telah difagositosis.<sup>41</sup>

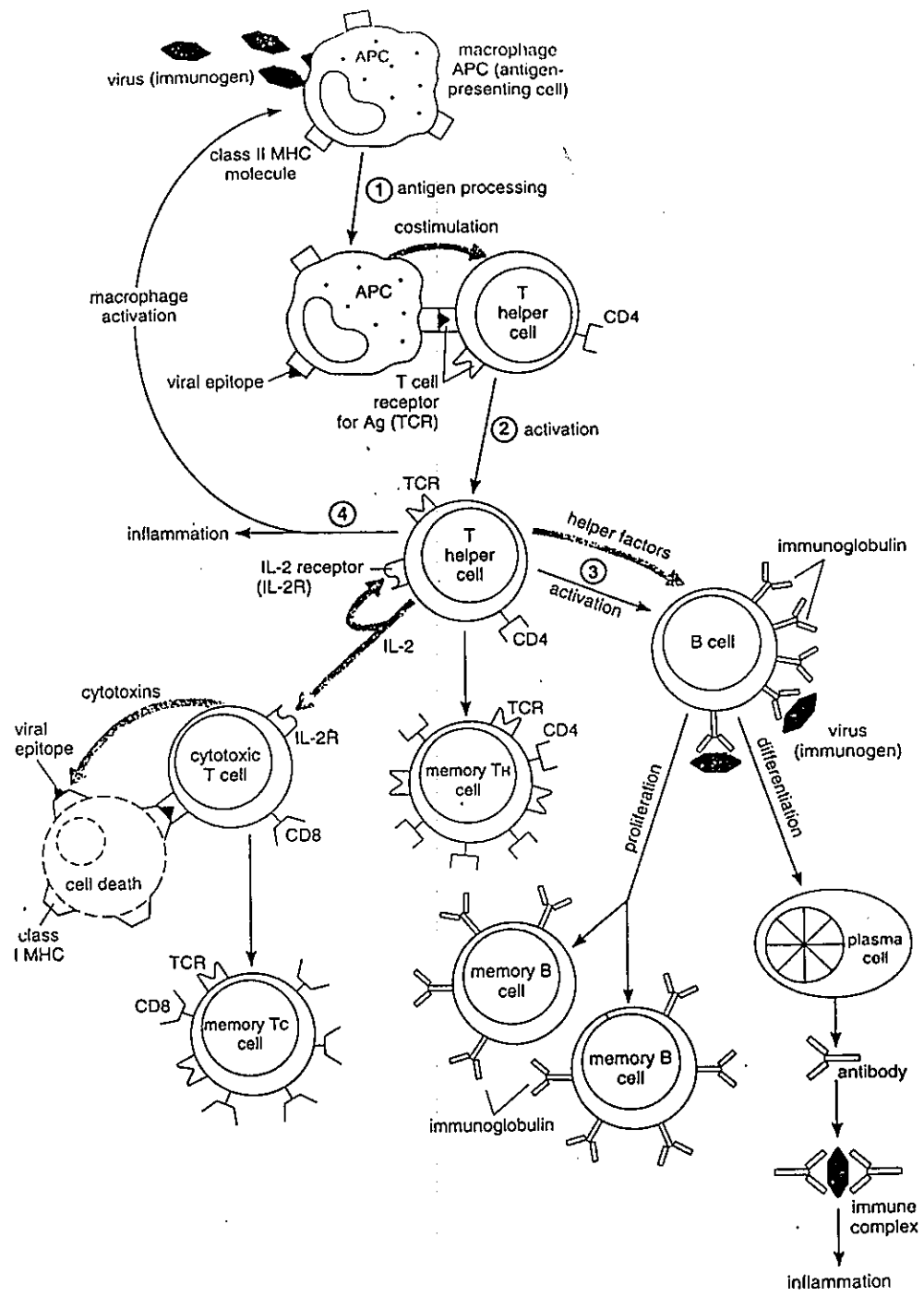
Tabel 4. Kandungan granula-granula netrofil <sup>(42)</sup>

Isi	Fungsi
<b>I. Granula azurophilic</b>	
<i>Acid hydrolase</i>	Degradasi material yang telah diingesti/ ditelan
<i>Neutral proteases</i>	Destruksi jaringan inflamasi
Lisosim	Digesti dinding sel bakteri
Defensin dan bactericidal/ <i>permeability-increasing protein</i>	<i>Oxygen-independent bacterial killing</i>
<i>Myeloperoxidase</i>	<i>Oxygen-dependent bacterial killing</i>
<b>II. Granula spesifik</b>	
Lisosim	Digesti dinding sel bakteri
Cobalamine-binding protein	Berikatan dengan <i>bacterial cobalamine-analogue</i>
Apolactoferin	Berikatan dengan Fe bebas, mengontrol granulopoiesis
Kolagenase	Digesti jaringan ikat
C5-splitting enzyme	Melepaskan C5a

Dikutip dari Babior BM. Function of neutrophils and mononuclear phagocytes. In: Plum F(ed) *Cecil textbook of medicine. Vol 1. 19<sup>th</sup> ed.* Philadelphia. WB Saunders. 1992:898-903

Bakteri intrasel cenderung resisten terhadap enzim lisosom fagosit sehingga peran fagosit dalam respon imun alami terhadap bakteri intrasel kurang efektif. Selanjutnya antigen yang ada akan mengaktifasi sistem imun spesifik.

Gambar 2 menunjukkan gambaran skematik urutan peristiwa yang terjadi selama respon imun prototipikal.



Gambar 2. Urutan peristiwa suatu respon imun prototipikal. Dikutip dari Parslow TG. The immune response. Dalam Stites DP, Terr AI, Parslow TG: *Medical immunology*, 9<sup>th</sup> ed. Connecticut. Appleton and Lange. 1997:63-73<sup>(41)</sup>

Respon terhadap imunogen/antigen hanya bisa dimulai setelah antigen ditangkap, diproses dan disajikan oleh suatu *antigen presenting cell* (APC). Antigen akan ditangkap oleh APC dengan berbagai cara, baik fagositosis, endositosis maupun pinositosis, untuk selanjutnya masuk ke dalam suatu vesikel berbatas membran yang ada dalam sitoplasma. Di dalam vesikel, antigen akan mengalami proses denaturasi atau digesti proteolitik sehingga berubah menjadi bentuk peptida-peptida pendek yang kemudian berhubungan secara *noncovalent* dengan protein *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II dan dikirim ke permukaan APC. Selanjutnya Th CD4 yang berhubungan langsung dengan APC akan mulai diaktifkan bila ia mengekspresikan suatu protein reseptor sel T (TCR) yang bisa mengenali dan mengikat peptida tertentu dari MHC yang disajikan APC.<sup>41</sup>

Aktivasi Th akan menyebabkan Th menghasilkan interleukin 2 (IL-2), IL-4 dan IL-6 dan juga mulai mengekspresikan reseptor IL-2 pada permukaannya. Interleukin-2 akan menyebabkan proliferasi sel T. Di samping itu IL-2 juga berperan dalam aktivasi sel T sitotoksik (Tc). Interleukin-2 bersama-sama dengan kontak Tc dengan kompleks yang terbentuk antara antigen spesifik dan molekul MHC kelas I akan mengaktifkan Tc untuk membunuh sel target baik dengan cara menghasilkan toksin maupun dengan menginduksi sel untuk bunuh diri (apoptosis).<sup>41</sup>

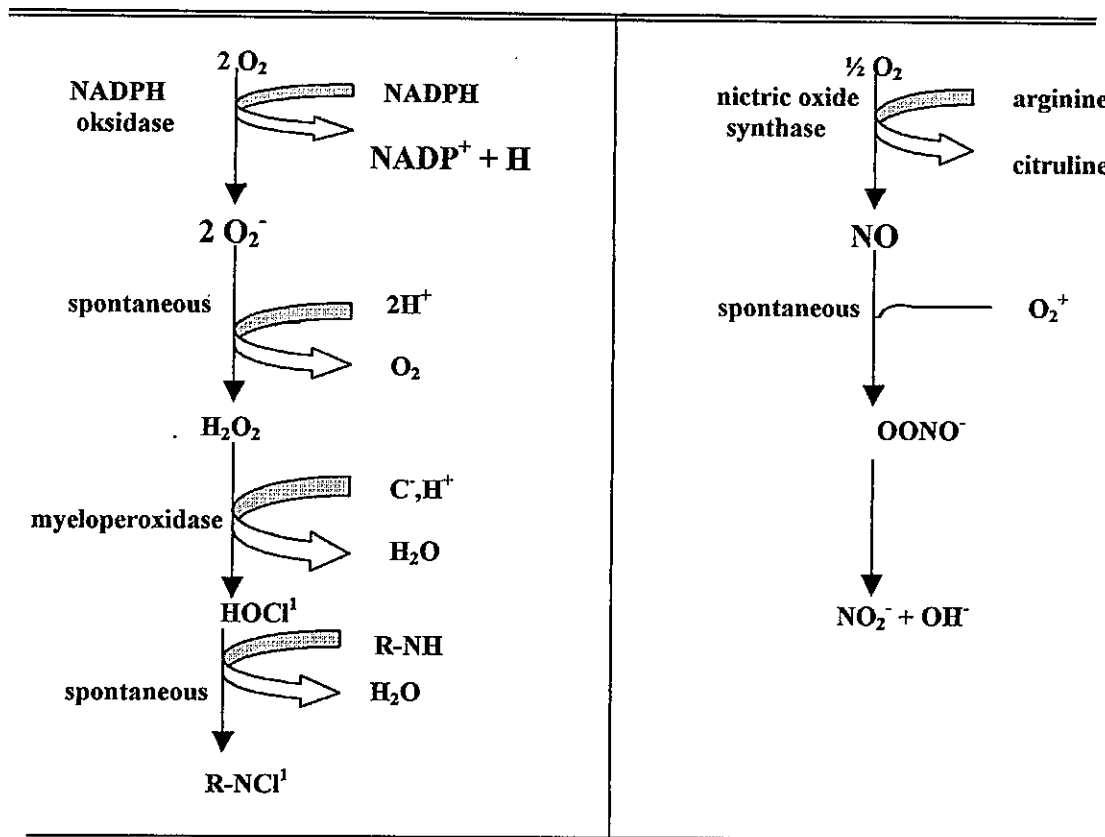
Interleukin-2, IL-4 dan IL-6 yang dihasilkan Th, bersama-sama dengan antigen yang terikat pada permukaan imunoglobulin akan mengaktifkan sel B sehingga terjadi proliferasi sel B dan juga diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi spesifik terhadap antigen.<sup>41</sup>

Respon imun protektif terhadap bakteri intrasel adalah imunitas seluler. Pada imunitas seluler dijumpai 2 reaksi yaitu (a) penghancuran bakteri yang difagosit oleh makrofag yang diaktifasi oleh sitokin-sitokin yang diproduksi oleh limfosit T dan (b) lisis terhadap sel terinfeksi oleh sel T CD8+ (*Cluster of differentiated 8+*). Sel fagosit yang teraktifasi akan memproduksi substrat-substrat dan enzim-enzim yang akan membunuh bakteri yang difagosit sebagai sel efektor, di antaranya adalah hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radikal superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radikal hidroksil dan singlet oksigen yang disebut *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) dan NO yang termasuk *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI). Substrat-substrat tersebut bersifat toksik terhadap bakteri.<sup>37,43</sup>

Proses pembentukan ROI meningkatkan kebutuhan oksigen berlipat ganda, sehingga prosesnya disebut *respiratory burst*. *Respiratory burst* diawali perubahan  $O_2$  menjadi  $O_2^-$  oleh NADPH ( bentuk tereduksi dari *nicotinamide-adenin dinucleotide phosphat*) oksidase .Dua molekul  $O_2^-$  dan 2 molekul  $H^+$  dengan bantuan *superoxide dismutase* (SOD) akan membentuk  $H_2O_2$ . Selanjutnya myeloperoxidase membantu interaksi antara  $H_2O_2$  dan  $CL^-$  untuk membentuk HOCl (asam hipoklorit). Produk antara *respiratory burst* ini mempunyai aktifitas bakterisidal dan dapat menyebabkan kerusakan seluler bila dilepaskan ke jaringan. Asam hipklorit (HOCl) digunakan secara langsung karena mampu mengoksidasi amin, tiol, asam nukleat maupun protein lain pada partikel target. Di samping itu sebagian HOCl akan membentuk kloramin organik (R-NCl), suatu agen pengoksidasi yang kurang kuat tetapi mempunyai waktu paruh yang lebih panjang.<sup>44</sup>

*Oxydative killing* juga terjadi melalui jalur ke dua yang melibatkan produksi NO. Saat diaktifkan, netrofil mengeluarkan *inducible nitric oxide syntethase* (iNOS) yang dengan bantuan  $O_2$  dapat mengubah arginin menjadi sitrulin dan NO. *Nitric oxide* ini bersifat toksik terhadap bakteri dan sel tumor serta menghambat replikasi virus.<sup>41</sup>

**Tabel 5.** Jalur mikrobisidal oksidatif utama dalam netrofil <sup>(41)</sup>



Kemampuan bakteri untuk bertahan dan berkembang dalam sel fagosit tergantung pada 2 hal yaitu (a) produk mikroba yang dapat meningkatkan resistensi terhadap daya bunuh dan (b) limfosit T spesifik yang teraktifasi, sebagai bagian dari mekanisme imun seluler<sup>45</sup>.

### **II.C. PERUBAHAN SISTEM IMUM PADA DM**

The World Health Organization telah memasukkan DM dalam klasifikasi penyakit defisiensi imun sekunder. Penyakit defisiensi imun sekunder sering ditandai dengan infeksi yang berat, berkepanjangan dan kambuh-kambuhan. Timbulnya defisiensi imun sekunder ini tampaknya ditentukan oleh gangguan pada komponen-komponen yang terlibat dalam mekanisme respon imun.<sup>46</sup>

Proses-proses dalam respon imun yang terganggu pada DM adalah:

#### **1. Fungsi PMN**

##### *a) Kemotaksis*

Yang termasuk dalam proses ini adalah migrasi sel darah putih. Mikroorganisma akan menghasilkan substansi-substansi kemotaktik yang akan menarik sel-sel PMN menuju lokasi infeksi. Di samping itu aktivasi komplemen dan faktor-faktor yang diinduksi secara lokal oleh sel-sel PMN juga berperan dalam proses ini. Sel-sel PMN penderita DM, terutama yang tidak terkontrol, mengalami penurunan kemampuan kemotaksis<sup>7,46</sup>. Delamaire M dkk (1997) menyatakan adanya penurunan kemotaksis pada penderita DM dengan hiperglikemi dan komplikasi vaskuler<sup>14</sup>. Tidak semua peneliti sependapat dengan hasil tersebut karena ada peneliti lain yaitu Molenaar yang tidak melihat adanya perbedaan yang bermakna (dikutip dari Sentochnik)<sup>7</sup>.

##### *b) Fagositosis*

Ada 2 fase dalam fagositosis yaitu adhesi dan ingesti partikel asing (misalnya mikroorganisma) ke dalam vakuola intrasitoplasmik. Pada penderita DM ada 2 hal diduga menyebabkan gangguan fagosit. Yang pertama, terjadi peningkatan sekresi enzim sialidase dan berkurangnya asam sialik membran sel yang menyebabkan

defek intrinsik PMN. Pendapat kedua menduga terjadi defek reseptor lektin akibat kadar glukosa yang tinggi, sehingga tidak mampu memulai proses fagositosis.<sup>13,46</sup> Dziatiowiak H dkk (1982) melalui penelitiannya mendapatkan bahwa kemampuan granulosit penderita DM untuk mengabsorpsi bakteri masih normal<sup>11</sup>. Delamaire M dkk (1997) juga menyatakan bahwa fungsi fagositosis yang diuji dengan *latex beads* pada penderita DM tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol<sup>14</sup>. Sementara Marhoffer(1992) dalam penelitiannya pada penderita DM yang mendapat terapi insulin menyimpulkan bahwa fungsi fagosit penderita DM menurun<sup>13</sup>.

c) *Adherence*

Bagdade JD dkk (1978) menyatakan bahwa *granulocyte adherence* pada penderita DM yang tak terkontrol akan terganggu; setelah diberikan terapi insulin 1 – 2 mg dan gula darah puasa turun maka fungsi tersebut kembali membaik<sup>9</sup>. Sementara itu penelitian Delamaire M dkk (1997) mendapatkan fungsi *adherence* PMN tanpa stimulasi justru meningkat tetapi setelah stimulasi tidak ada perbedaan yang bermakna dibandingkan kontrol<sup>14</sup>.

d) *Daya bunuh (killing activity atau bacteria killing)*

Selama proses fagositosis, makrofag dan netrofil juga menghasilkan berbagai produk toksis untuk membantu membunuh mikroorganisme yang telah diingesti. Produk-produk tersebut bersifat toksik secara langsung terhadap bakteri; yang paling penting di antaranya adalah  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  dan NO, suatu gas radikal bebas yang sangat labil, yang merupakan metabolit oksidatif ( *$O_2$ -dependent*) dan defensin yang merupakan metabolit non oksidatif (*non- $O_2$  dependent*)<sup>42</sup>.

Bila fagosom dan lisosom telah melakukan fusi maka selanjutnya terjadi proses pembunuhan mikroba yang tergantung pada integrasi dari metabolisme oksidatif dan metabolisme non oksidatif. Diduga jalur sorbitol yang ada pada penderita DM hiperglikemi mengganggu proses pembunuhan mikroba yang  *$O_2^-$  dependent* karena jalur tersebut membutuhkan banyak NADPH, sehingga hanya tersisa sedikit NADPH untuk *oxydative killing*<sup>7,46,47</sup>. Keadaan hiperglikemi akan menyebabkan glikosilasi-non-enzimatik(GNE) matriks dan protein membran sel sehingga dihasilkan beberapa sitokin di antaranya TNF $\alpha$ (*tumor necrozing factor*

$\alpha$ ). Pemaparan TNF $\alpha$  yang lama (12 hari) terhadap adiposit akan menurunkan kadar GLUT(*glucose transporter*) 1 dan GLUT 4, yang berakibat menurunnya ambilan glukosa. Penurunan ambilan glukosa ini akan menurunkan *oxydative burst* yang selanjutnya menurunkan kemampuan sel PMN mengeliminasi *S.aureus*.<sup>47</sup>

Nolan (1978) menemukan adanya defek *intraceluler killing* terhadap stafilocokus oleh granulosit dari penderita DM yang tidak terkontrol<sup>10</sup>. Selanjutnya penelitian yang dilakukan Dziatiowiak (1982) menunjukkan hasil yang mendukung penelitian Nolan<sup>11</sup>. Penelitian oleh Marhoffer W (1992) menunjukkan adanya gangguan *bacteria killing*(BK) pada pasien DM yang secara signifikan berkorelasi dengan A1C sebagai parameter kontrol metabolik. Gangguan ini diduga melibatkan peran glikosilasi protein yang mengganggu fungsi PMN melalui efek inhibisi akibat meningkatnya kadar glukosa PMN. *Bacteria killing* diukur dengan menggunakan uji respon *chemiluminesence* terhadap *phorbol-myristic acetate* yang merupakan salah satu uji BK dengan metabolit oksidatif selain menggunakan uji reduksi pengecatan *nitrobluetetrazoline*<sup>13</sup>. Muchova J dkk (1999) melakukan penelitian untuk menilai efek DM tipe 2 terhadap enzim-enzim yang berperan penting dalam *oxydative killing* oleh lekosit. Penelitian ini menunjukkan bahwa aktifitas SOD PMN pada penderita DM tipe 2 lebih rendah 41% dibandingkan kontrol, tetapi ternyata aktifitas katalase tidak berbeda bermakna pada kedua kelompok<sup>16</sup>.

## **2.Fungsi monosit**

Akibat hiperglikemi, melalui GNE akan terbentuk AGEs (*advanced glycosylation end products*) yang bersifat kemotaktik terhadap monosit. Ternyata pada membran monosit dijumpai reseptor AGEs.Keadaan ini akan menyebabkan kemotaksis monosit menurun dan *adherence* terhadap Stafilocokus aureus berkurang.<sup>47</sup>

## **3.Limfosit dan subpopulasinya**

DM tipe 1 berhubungan dengan perubahan pada beberapa subpopulasi limfosit. Penelitian pada penderita ulkus/ganggren diabetik di Jakarta menunjukkan adanya penurunan persentase sel limfosit B dan sel limfosit T pada

penderita DM dengan ulkus/ganggren.<sup>8</sup> Penelitian lain di Jakarta pada penderita DM ulkus, DM non ulkus dan non DM mendapatkan hasil bahwa indeks stimulasi limfosit kelompok DM non ulkus meningkat tetapi tidak setinggi kelompok non DM dan indeks stimulasi subkelompok DM tidak terkontrol rendah (di bawah nol) pada kadar glukosa tinggi<sup>6</sup>. Niewoehner (1986) dalam penelitiannya pada penderita DM menyimpulkan bahwa respon proliferasi limfosit T terhadap mitogen yaitu PHA (*phytohemagglutinin*) pada kelompok DM lebih rendah dibandingkan kontrol, tetapi tidak berhubungan dengan kadar A1C<sup>12</sup>.

Beberapa penelitian menunjukkan adanya penurunan jumlah limfosit T CD4, yang berakibat menurunnya rasio CD4:CD8. Perubahan ini bisa disebabkan oleh menurunnya kadar insulin atau aktifitas insulin atau keduanya<sup>46</sup>.

#### 4. Immunoglobulin

Kadar IgA dan IgG serum dilaporkan menurun pada penderita DM dibandingkan subyek normal. Penelitian lain menunjukkan respon antibodi terhadap polisakarida pneumokokal pada populasi DM normal, meskipun penentuan kelompok kontrol yang kurang tepat dianggap sebagai penyebab hasil tersebut. Suatu penelitian lain yang telah *dimatching* dengan baik dan melibatkan sejumlah besar kelompok non diabetik menunjukkan titer antibodi terhadap Coxsackie B3 dan B4 lebih rendah pada kelompok DM dibandingkan subyek non DM<sup>46</sup>.

#### 5. Komplemen

Saat ini muncul perhatian terhadap kemungkinan adanya penurunan kuantitas dan aktivitas fungsional dari komponen komplemen pada pasien DM. Suatu penelitian pada kelompok DM tipe I menunjukkan hampir 25% dari kelompok tersebut mempunyai kadar C4 yang rendah, yang berhubungan dengan adanya gen *null C4A*<sup>46</sup>.

## II.D. SENG (Zn)

Zinc(Zn) adalah suatu mineral yang menjadi kandungan penting dari enzim-enzim yang dibutuhkan pada beberapa jalur metabolisme, sehingga bisa disebut metaloenzim. Zn juga ditemukan dalam tulang dan asam nukleat.<sup>48</sup>

### II.D.1. Metabolisme Zn

Dalam saluran cerna terdapat 2 sumber Zn, yaitu yang berasal dari makanan dan endogenous. Seng endogenous adalah Zn yang disekresi ke dalam saluran pencernaan saat terjadiproses digesti. Sumber utama Zn adalah getah pankreas; sumber lain berasal dari empedu, sekresi gastroduodenum dan *transepitel influx* Zn sel mukosa.<sup>49,50</sup>

Penyerapan Zn dalam saluran cerna terjadi sepanjang usus halus. Sejumlah kecil Zn diabsorpsi dalam lambung dan usus besar. Absorpsi Zn tergantung pada panjang dan luas permukaan usus halus serta waktu dan sekresi Zn endogenous.<sup>18,49,50</sup>

Absorpsi Zn tidak dipengaruhi pH usus, tetapi berkompetisi dengan absorpsi elemen valensi dua yang lain seperti besi (Fe), tembaga (Cu), Kadmium (Cd) dan kalsium (Ca). Senyawa fitat(fosfat inositol), selulose dan hemiselulose merupakan senyawa yang terkandung dalam makanan tinggi serat, yang terbukti dapat menghambat absorpsi<sup>18,49,50</sup>. Mekanisme masuknya Zn ke dalam sel mukosa belum diketahui dengan jelas. Ada dugaan bahwa masuknya Zn ke dalam sel mukosa antara lain melalui mekanisme *carrier* dan difusi. Mekanisme *carrier* terutama berperan bila kandungan Zn dalam lumen usus rendah sampai normal. Mekanisme ini memerlukan energi dan belum diketahui karakteristik reseptor protein yang spesifik untuk Zn. Makanan yang mengandung kadar Zn rendah akan merangsang mekanisme *carrier*. Makanan yang mengandung kadar Zn tinggi akan memicu proses difusi menjadi lebih dominan. Mekanisme ini terjadi melalui difusi pasif atau pergeseran di antara sel mukosa..<sup>49,50</sup>

Transpor Zn melalui membran serosa menggunakan mekanisme *carrier* dengan bantuan adenosin trifosfat(ATP). Di dalam sirkulasi Zn akan berikatan dengan protein dan akan dibawa melalui sistem porta menuju ke hati. Transpor utama Zn dalam plasma adalah albumin(60-70%), sisanya adalah alfa2 makroglobulin, transferin dan asam amino bebas.<sup>50</sup>

Ekskresi Zn terutama melalui feses, berasal dari Zn dalam makanan yang tidak terabsorpsi dan Zn endogenous. Sebagian besar Zn endogenous diabsorpsi kembali. Bila kadar Zn dalam makanan rendah, jumlah Zn yang keluar lewat feses < 1 mg/hr dan bila

kadar Zn dalam makanan tinggi, maka jumlah Zn yang keluar lewat feses > 5 mg/hari. Makanan yang masuk merupakan rangsangan ekskresi Zn endogenous.<sup>49,50</sup>

Ekskresi Zn juga terjadi melalui urine, haid, ejakulat, keringat, deskuamasi kulit, sel yang terlepas dan rambut. Ekskresi Zn di ginjal terjadi melalui proses ultrafiltrasi. Lebih dari 95% Zn yang difiltrasi akan diresorpsi kembali pada tubulus distalis dan tubulus renalis. Jumlah Zn yang diekskresi melalui urine sesuai dengan produksi urine. Dalam keadaan normal ekskresi Zn melalui urine antara 0,4-0,6 mg/hari.<sup>49,50</sup>

#### **II.D.2. Kebutuhan dan sumber Zn**

Sumber utama Zn dalam makanan berasal dari daging sapi atau daging yang berwarna merah, ayam, ikan, buah-buahan, kacang-kacangan dan minuman teh, kopi dan susu<sup>49</sup>.

Kebutuhan Zn untuk bayi usia 0-1 tahun: 5 mg/hari; anak usia 1-10 tahun: 10 mg/hari; wanita usia 11 tahun atau lebih: 12 mg/hari, pria usia 11 tahun atau lebih 15 mg/hari. Ibu hamil perlu mendapat tambahan sebesar 15 mg/hari, sedangkan ibu menyusui perlu tambahan 10 mg/hari.<sup>49,51</sup>

Masukan rerata Zn pada bayi baru lahir yang mendapat air susu ibu sebesar 0,7-5 mg/hari, pada anak-anak usia 1-13 tahun diperkirakan sebesar 5-13 mg/hari dan pada orang dewasa sehat sebesar 8-16 mg/hari.<sup>49,50,51</sup>

#### **II.E. Zinc pada diabetes melitus**

Zinc diketahui mempunyai peran yang penting dalam sekresi insulin dan metabolisemenya<sup>19,21,22,26,48</sup>. Zinc ikut serta secara langsung dalam produksi, penyimpanan dan pelepasan insulin dari sel beta pankreas<sup>19</sup>. Pada beberapa penelitian, defisiensi Zn dihubungkan dengan sekresi insulin yang menurun dan meningkatnya resistensi jaringan terhadap aksi insulin. Zinc meningkatkan ikatan insulin pada membran hepatosit dan memperkuat efek lipogenik insulin.<sup>52</sup>

Pengetahuan tentang efek insulin terhadap penyimpanan Zn di jaringan lebih banyak berasal dari penelitian pada binatang, sehingga prevalensi yang sebetulnya pada penderita DM belum diketahui<sup>21</sup>. Penelitian yang dilakukan oleh Pidduck (1970) menemukan adanya perbedaan kadar Zn plasma pada pasien DM dibandingkan kontrol<sup>53</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Walter RM dkk(1991) menunjukkan adanya kadar Zn

yang rendah pada penderita DM tipe 1 dan 2<sup>22</sup>. Penelitian oleh Kinlaw WB,dkk mendapatkan 9% penderita DM tipe 2 mempunyai kadar Zn < 70ug/dL. Kadar Zn pada penderita non diabetes berkisar antara 70-120ug/dL<sup>20</sup> Penelitian yang dilakukan Jacobus A (2000) di Semarang menunjukkan rerata kadar Zn serum kelompok DM lebih rendah dibandingkan kelompok non DM. Pada penderita DM terutama dengan regulasi gula darah jelek didapatkan prevalensi defisiensi Zn yang lebih tinggi<sup>25</sup> Rendahnya kadar Zn pada penderita DM diduga dipicu hiperzincuria akibat hiperglikemia dan gangguan absorpsi di usus.<sup>12,22-24,54</sup>

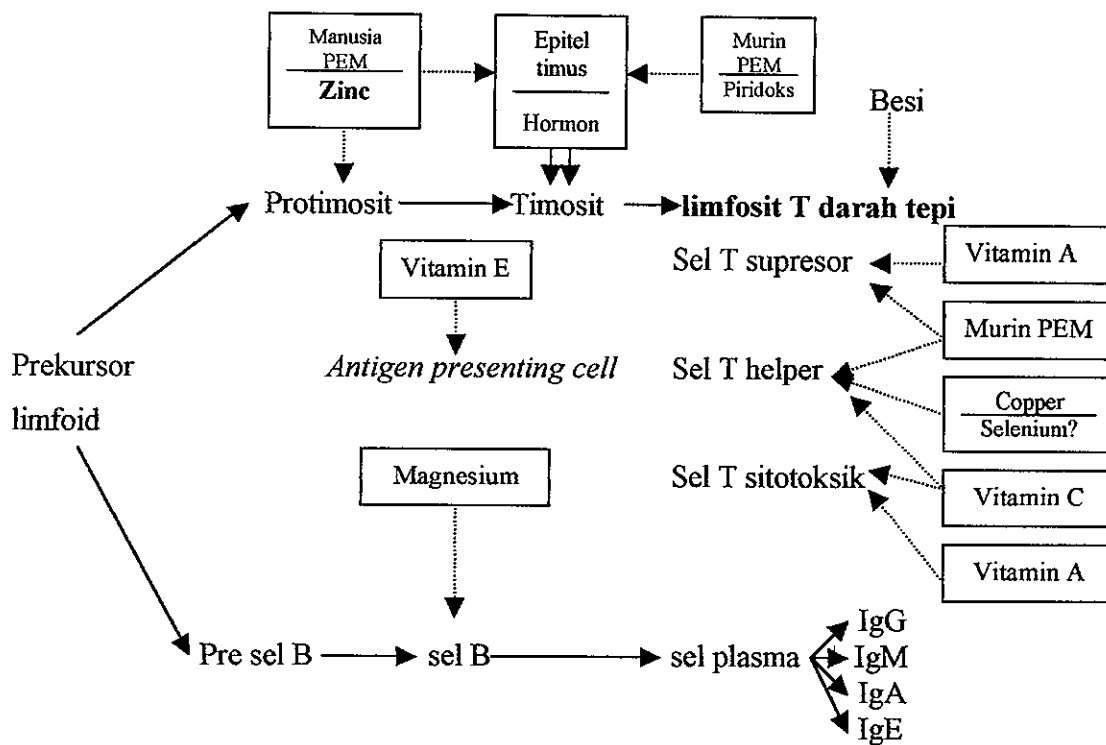
Sebagai bagian dari SOD, Zn mempunyai peran protektif terhadap kerusakan jaringan, yang kemudian dilaporkan mempengaruhi efek insulin atau *cell membrane glucose transporter*<sup>19</sup>.

Terapi suplemen dengan Zn pada tikus ob/ob menunjukkan adanya peningkatan sekresi insulin dari islet sel pankreas<sup>19</sup>. Suatu penelitian tanpa kontrol pada penderita ulkus(vena) di kaki menunjukkan bahwa proses penyembuhan ulkus di kaki terjadi lebih cepat pada penderita dengan kadar Zn > 110 ug/dL (baik sebelum terapi maupun setelah terapi) dibandingkan dengan kadar < 110 ug/dL<sup>23</sup>.

## **II.F. Zinc dan imunitas**

Kebutuhan Zn untuk suatu fungsi fisiologis dan respon imunologik tidak sama. Pada penelitian dengan menggunakan mencit yang mendapatkan diit Zn dengan jumlah yang ditingkatkan selama 28 hari setelah menyusui, didapatkan konsentrasi maksimum Zn adalah 3,4 ug Zn/diit, sedangkan pada kadar 5,4 ug Zn/diit maka pertumbuhan akan berhenti. Sedangkan untuk mendapatkan fungsi sel NK yang optimal dalam melawan tumor dibutuhkan dosis tinggi yaitu 40 ug Zn/diit.<sup>32</sup>

Keadaan *protein-energy malnutrition* (PEM) diketahui mempengaruhi sistem pertahanan tubuh tertentu. Akibat yang muncul kebanyakan berupa hambatan imunitas seluler yang terutama disebabkan kegagalan diferensiasi limfosit T (Gambar 3). Jumlah total limfosit mungkin normal, tetapi proporsi sel T yang matur berkurang. Selanjutnya fungsi yang tergantung pada sel T matur seperti misalnya respon terhadap mitogen akan terbatas. Pengaruh dari nutrien tertentu pada proses imun terlihat pada gambar 3.<sup>55</sup>



Gambar 3. Lokasi efek spesifik nutrien pada jaringan imunologi<sup>(55)</sup>. Dikutip dari Keusch GT. Nutrition and infection. In: Schaechter M, Medolf G, Eisenstein BI.(eds) *Microbial disease*.2<sup>nd</sup> ed Baltimore. Williams and Wilkins.1993:891-8

Pada keadaan defisiensi Zn respon pembentukan antibodi humoral akan berkurang<sup>32,56</sup>. Pada tikus muda yang dibuat defisiensi Zn marginal 5 – 17 hari pasca melahirkan, didapatkan penurunan produksi IgM dan IgG yang dirangsang oleh sel T yang bersifat sementara. Setelah diberikan suplementasi Zn selama 2 minggu maka titer antibodinya meningkat lagi. Percobaan pada tikus yang lebih tua yang dibuat menjadi defisiensi Zn selama 6 minggu pasca menyusui, didapatkan penurunan produksi antibodi yang *T cell dependent*, sedangkan pada *T cell independent* tidak ditemukan penurunan produksi antibodi. Hal ini diduga akibat defisiensi Zn akan terjadi penurunan kemampuan sel T penolong (*T helper/Th*) untuk memacu produksi antibodi pada sel B<sup>32</sup>. Fraker PJ dkk melaporkan bahwa pada mencit dewasa yang dibuat menjadi defisiensi Zn, respon yang dimediasi antibodi terhadap antigen yang *T cell dependent* dan *T cell independent* keduanya menurun. Perubahan lain yang terjadi adalah atrofi timus, limfopenia dan

menurunnya respon sel Tc, aktifitas sel NK dan reaksi DTH (delayed type hypersensitivity)<sup>56</sup>.

Defisiensi Zn juga menyebabkan gangguan dalam respon imun seluler<sup>15,32,56</sup>. Percobaan pada mencit berumur 7 minggu yang dibuat menjadi defisiensi terhadap Zn selama 1 bulan, menunjukkan penurunan respon hipersensitivitas tipe lambat pada kulit (DTH) dan subkutan terhadap antigen fluorobenzen, sedangkan setelah diberikan suplementasi seng selama 3 minggu maka respon tersebut membaik<sup>32</sup>. Pasien yang mengalami akrodermatitis enteropati, suatu defek genetik dalam kemampuan mengasimilasi seng sehingga timbul defisiensi Zn, memberikan respon DTH yang buruk<sup>56</sup>. Bogden dkk (dikutip Gibson RS) melakukan evaluasi untuk menilai status Zn dan imunitas pada usia lanjut. Penelitian ini menunjukkan bahwa dari 100 orang usia lanjut dengan diet seng yang lebih rendah dari yang direkomendasikan, 41% di antaranya tidak menunjukkan respon DTH terhadap paparan 7 macam antigen pada kulit. Respon ini mempunyai kaitan yang erat dengan kadar seng dalam darah<sup>32</sup>.

Jumlah limfosit darah tepi pada keadaan defisiensi ZN juga menurun. Secara khusus dijumpai penurunan pada jumlah limfosit T darah tepi pada penderita dengan defisiensi Zn. Pada pasien akrodermatitis enteropati, defisiensi Zn menurunkan jumlah CD4 dan meningkatkan jumlah CD8 sehingga rasio CD4:CD8 akan berubah.<sup>56</sup> Fungsi sel T tampaknya juga menurun pada keadaan defisiensi Zn; hal ini berdasarkan menurunnya berat timus dari mencit yang dibuat defisiensi Zn. Oleh karena timus merupakan tempat pematangan sel T, maka menurunnya berat timus akan mempengaruhi pematangan sel T. Pada penderita akrodermatitis enteropati, respon sel T terhadap stimulasi PHA akan menurun, dan dengan suplementasi seng respon ini akan kembali normal. Suplementasi seng pada individu dewasa sehat juga akan meningkatkan proliferasi limfosit T terhadap stimulasi PHA<sup>32</sup>.

Penelitian yang dilakukan Moradian AD dkk<sup>15</sup> pada tikus DM dan non DM yang diberikan diit Zn sehingga menjadi defisiensi, kecukupan dan kelebihan Zn didapatkan bahwa proliferasi limfosit yang distimulasi PHA pada tikus DM dengan defisiensi Zn akan lebih rendah, tetapi produksi IL-2 pada kelompok DM dan non DM tidak dipengaruhi status Zn.

Prasad AS(1) dkk pada penelitiannya mengenai perubahan produksi sitokin dan subpopulasi sel T pada pasien dengan kanker leher dan kepala dibandingkan kelompok kontrol menemukan bahwa produksi sitokin oleh sel Th1 (IL-2,IFN $\gamma$ ) sensitif terhadap status Zn, sementara itu produksi sitokin oleh sel Th2(IL-4,IL-5, IL-6) tak dipengaruhi status Zn. Aktifitas sel NK ternyata menurun pada kelompok pasien dengan keganasan kepala dan leher yang mengalami defisiensi Zn, demikian juga pengerahan sel T *naïve* (CD4+CD45RA+) dan prekursor sel T sitolitik (CD8+CD73+CD11b-). Perubahan ini dianggap bertanggung jawab terhadap disfungsi imunitas seluler pada keadaan defisiensi Zn.<sup>29,30</sup>

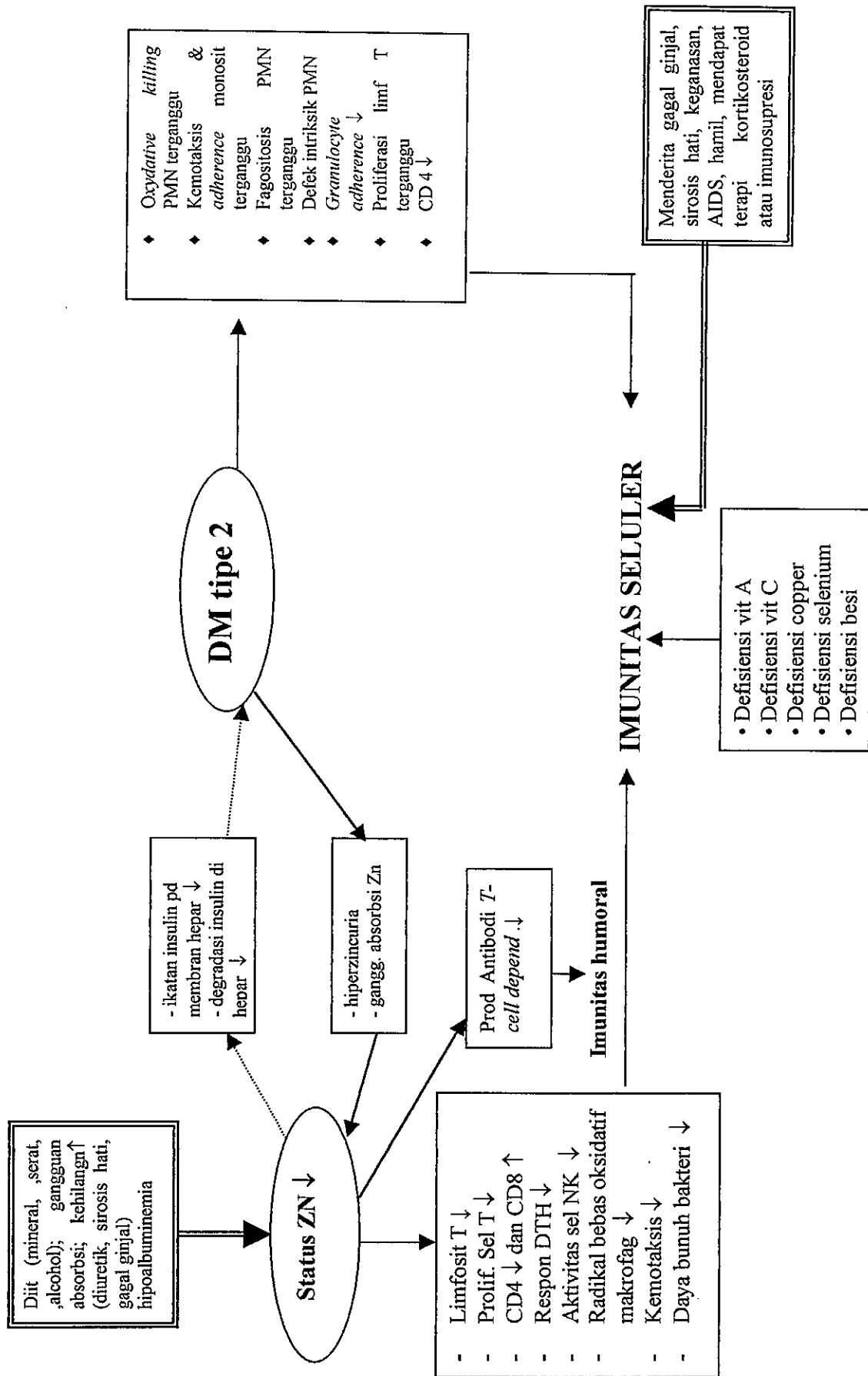
Analisis sel-sel fagositik pada penelitian-penelitian tentang defisiensi Zn menunjukkan gambaran yang bervariasi. Erickson KL (2000) menyatakan bahwa penelitian yang menilai hubungan Zn dengan fagositosis makrofag pada manusia tidak banyak. Disimpulkan bahwa akibat defisiensi Zn terjadi penurunan fagositosis makrofag dan daya bunuh bakteri intraseluler. Fungsi netrofil juga mengalami gangguan terutama pada proses *oxydative killing*. Setelah suplemen Zn dijumpai peningkatan aktifitas sel NK, tetapi bila penambahan ini melebihi batas yang tertentu justru terjadi penurunan aktifitas sel NK.<sup>57</sup>

Pada pasien akrodermatitis enteropati didapatkan gangguan dalam kemampuan melakukan fagositosis. Sejumlah penelitian pada manusia menunjukkan adanya gangguan kemotaksis sel-sel fagositik pada kelompok defisiensi Zn.<sup>56</sup> Sistem imunitas dalam melawan parasit juga menurun pada keadaan defisiensi Zn. Pada mencit yang dibuat defisiensi Zn dan kemudian diinfeksi *Typanosoma cruzi*, maka pada hari ke-15 dalam darah mencit tersebut didapatkan peningkatan jumlah parasit 20 kali lipat dibandingkan kontrol dan pada hari ke 22 pasca infeksi 80% mencit tersebut mati. Pada penelitian ini juga didapatkan penurunan oksigen radikal bebas pada makrofag. Radikal bebas merupakan petanda suatu respon awal dalam mengeliminasi berbagai zat patogen. Penelitian secara invitro menunjukkan bahwa perbaikan status Zn akan memperbaiki fungsi makrofag dalam membunuh parasit. Berdasarkan penelitian ini maka peranan Zn di makrofag berkaitan dengan produksi oksigen radikal bebas<sup>32</sup>.

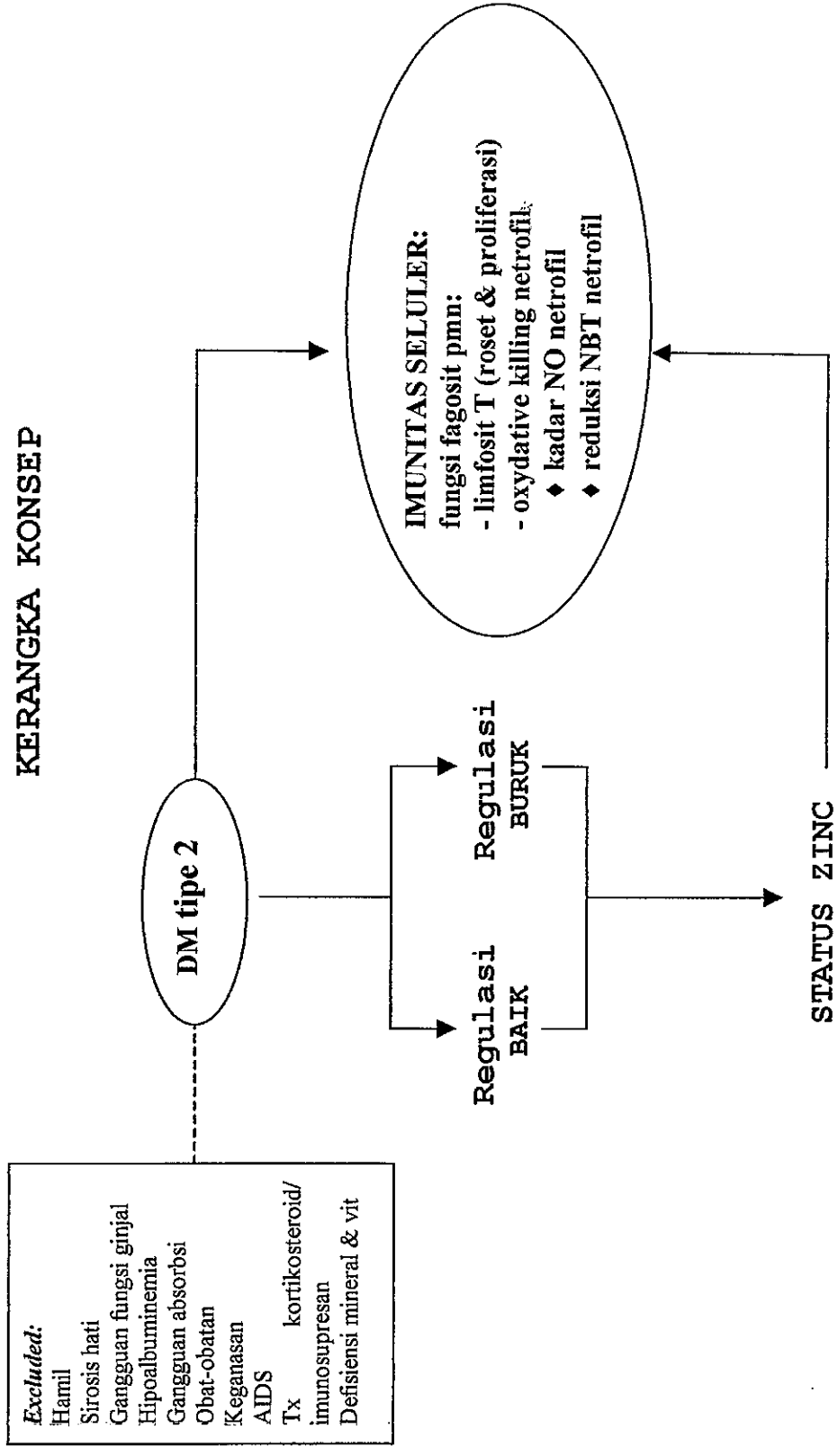
Dari penelitian-penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa sebagian besar peneliti sepakat:

1. Status Zn pada kelompok DM lebih rendah dibandingkan kontrol.
2. Parameter-parameter imunitas seluler pada kelompok DM (jumlah limfosit T, rasio CD4/CD8, respon proliferasi limfosit T, produksi sitokin oleh limfosit T, fungsi-fungsi fagosit makrofag dan netrofil) lebih rendah dibandingkan kontrol.
3. Pada keadaan defisiensi Zn didapatkan penurunan parameter imunitas seluler (limfosit T, rasio CD4/CD8, respon proliferasi limfosit T dan produksi sitokin oleh limfosit T, fungsi fagosit makrofag dan netrofil).

# KERANGKA TEORI



# KERANGKA KONSEP



### **I.C.HIPOTESIS PENELITIAN**

Pada DM tipe 2 regulasi buruk didapatkan kadar Zn serum, jumlah dan proliferasi limfosit T darah tepi, reduksi pengecatan NBT PMN dan kadar NO PMN yang lebih rendah dibandingkan kelompok regulasi baik..

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### III.A. Ruang lingkup penelitian

Penelitian dilakukan pada pasien poliklinik khusus endokrinologi dan metabolik RS Dr. Kariadi Semarang.

#### III.B. Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan rancangan penelitian *cross sectional*.

#### III.C. Populasi dan sampel

##### III.C.1. *Populasi*

Populasi adalah penderita DM tipe 2 dewasa yang berobat di poliklinik khusus endokrinologi dan metabolik (poliklinik 158) RSUD Dr.Kariadi Semarang.

##### III.C.2. *Sampel dan besar sampel*

Sampel adalah anggota populasi studi yang dipilih dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi selama rentang waktu 3 bulan.

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$n1=n2= \left[ \frac{(Za+Zb)S}{T} \right]^2$$

Dimana:

n = besar sampel

a = 0,05    Za = 1,96

b = 0,2    Zb = 0,842

S = deviasi standar    Zn serum = 24,07 ug/dL

T = Perbedaan rerata Zing serum penderita DM regulasi baik dan jelek

= 68,03 – 52,03 ug/dL = 16 ug/dL

$$n1=n2= \left[ \frac{(1,96+0,842) \times 24,07}{16} \right]^2$$

= 15,7241 dibulatkan menjadi 16 orang.

#### **III.D. Kriteria inklusi**

1. Penderita dewasa usia < 60 tahun
2. Penderita DM tipe 2 dengan regulasi gula darah baik dan buruk.
3. Kreatinin < 1,5 mg/dL
4. Albumin > 3,5 gr/dL
5. Bersedia ikut serta penelitian ini.

#### **III.E. Kriteria eksklusi**

1. Menderita penyakit akut
2. Menderita penyakit ginjal
3. Menderita penyakit hati
4. Menderita gangguan absorpsi (diare, telah menjalani reseksi usus)
5. Menderita penyakit pankreas
6. Menderita penyakit keganasan
7. Menderita penyakit AIDS
8. Menderita kekurangan vitamin dan mineral.
9. Hamil/menyusui
10. Mempunyai riwayat alkoholik
11. Mendapat terapi kortikosteroid atau immunosupresif
12. Mendapat suplementasi besi/mineral, obat diuretik dan antasida.
13. Anemia.

#### **III.F. Variabel penelitian**

1. Variabel bebas: kelompok regulasi glukosa baik dan buruk
2. Variabel tergantung: kadar Zn serum, jumlah dan proliferasi limfosit T darah tepi, kadar NO PMN dan reduksi pengecatan NBT PMN.

#### **III.G. Pengumpulan data**

Data dikumpulkan dari bulan Maret sampai Juni 2003. Metoda pengumpulan data yang dipakai meliputi wawancara, pengukuran antropometri, pemeriksaan fisik dan

pemeriksaan darah. Subyek yang diikutkan akan diberikan penjelasan tentang tujuan penelitian. Semua subyek yang bersedia ikut dalam penelitian harus menandatangani *informed consent* (surat persetujuan tindakan medik).

### **III.G.1. Tempat pengumpulan data**

Tempat pengumpulan data adalah Poliklinik khusus endokrinologi dan metabolik RS Dr. Kariadi Semarang.

### **III.G.2. Pemeriksaan dan pengukuran yang dilakukan**

Selama penelitian dilakukan wawancara, penilaian, pemeriksaan dan pengukuran.

#### **2.a. Wawancara untuk mendapatkan data**

Identitas subyek penelitian: nama, jenis kelamin, tanggal lahir, umur dalam tahun, tanggal pemeriksaan, alamat dan nomor telepon (bila ada).

Riwayat penyakit: lama sakit, riwayat pengobatan/kontrol ke poliklinik, riwayat penyakit yang pernah diderita. Obat dan atau suplementasi mineral yang sedang diminum dan tanggal pemberian obat dan suplemen terakhir.

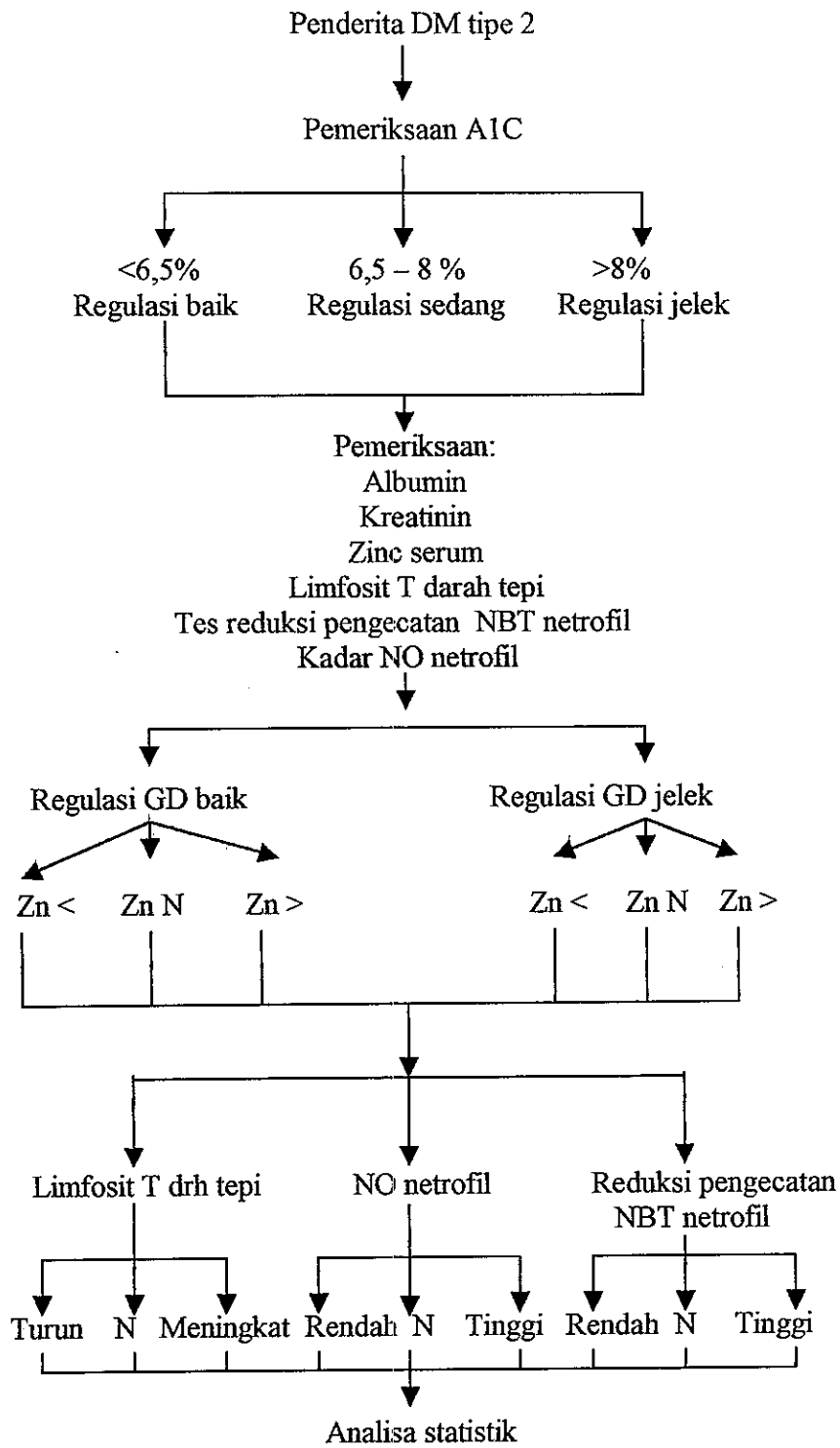
#### **2.b. Penilaian, pemeriksaan dan pengukuran untuk mendapatkan data**

Penilaian: kesan umum, tanda penyakit akut/kronik, defisiensi mineral/vitamin.

Pengukuran: tinggi badan dan berat badan. Pengukuran tinggi badan: subyek diukur dalam posisi berdiri, diukur dengan meteran fleksibel yang telah distandarisasi. Subyek yang akan diukur dilepas sepatunya dan berdiri dengan tumit menempel pada lantai. Angka dibaca dalam cm, bila lebih atau sama dengan 0,5 cm dibulatkan ke atas dan bila kurang dari 0,5 cm dibulatkan ke bawah. Pengukuran berat badan: subyek ditimbang dalam posisi berdiri dengan timbangan mekanikal yang telah distandarisasi, ditimbang dengan berpakaian minim. Angka dibaca dalam Kg dengan tingkat ketelitian 0,1 kg.

Pemeriksaan: keadaan fisik subyek pada waktu pemeriksaan di poli endokrinologi dan metabolik RSUD Dr. Kariadi Semarang. Kreatinin dan albumin serum diperiksa di laboratorium sentral/Patologi klinik RSUD Dr.Kariadi Semarang. Kadar A1C, Zn serum dan NO PMN diperiksa di laboratorium GAKI/Bioteknologi FK Universitas Diponegoro Semarang. Jumlah dan proliferasi limfosit T darah perifer dan tes reduksi pengecatan NBT PMN dilakukan di laboratorium Imunologi/Bioteknologi FK Universitas Diponegoro Semarang.

### III.G.3. ALUR PENELITIAN



### III.G.4. Pemeriksaan sampel darah

#### Pemeriksaan tahap I (skrining).

Subyek menjalani pemeriksaan kadar A1C dalam darah.

Persiapan: Subyek tidak perlu puasa untuk pengambilan darah.

Pelaksanaan:

- a. Diambil darah vena sebanyak 1 cc dan ditambahkan EDTA.
- b. Pemeriksaan kadar A1C menggunakan metoda *fast ion-exchange resin separation*.
- c. Berdasarkan hasil pemeriksaan tersebut: nilai A1C < 6,5% masuk kelompok regulasi baik dan nilai > 8% masuk kelompok regulasi jelek. Nilai A1C 6,5 – 8% dieksklusi.

#### Pemeriksaan tahap II.

Subyek yang masuk kriteria inklusi akan menjalani pemeriksaan kadar Zn serum dan pemeriksaan imunitas seluler yaitu limfosit T darah tepi dan *oksidatif killing*. Pemeriksaan *oksidatif killing* dilakukan dengan 2 cara, yaitu uji reduksi pengecatan NBT PMN untuk ROI dan pengukuran kadar NO PMN untuk RNI.

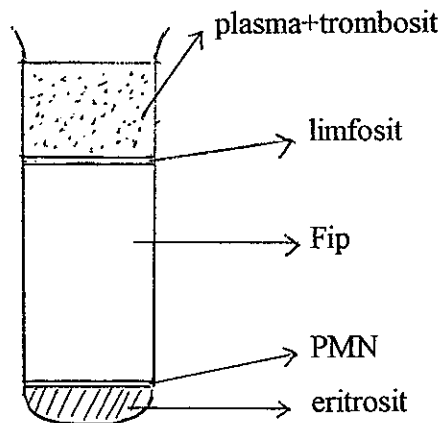
Persiapan: Sebelum pengambilan darah untuk keempat pemeriksaan tersebut, subyek diharuskan puasa pada malam hari (10-12 jam setelah makan malam yang terakhir), dan dilakukan pengambilan darah (antara jam 7 – 9 pagi) sebanyak 15 cc dengan perincian: 5 cc darah vena tanpa penambahan apapun dan 10 cc darah vena ditambah EDTA. Selanjutnya dilakukan pencatatan nama, tanggal dan nomor pemeriksaan.

1. Pemeriksaan mineral Zn dilakukan dengan metode *Flame Atomic Absorption Spectrophotometry* (FAAS). Nilai normal Zn serum adalah 70 – 120 ug/dL.
2. Untuk pemeriksaan imunitas seluler terlebih dahulu dilakukan pemisahan sel-sel darah dengan cara sentrifus. Cara ini berdasarkan daya pengendapan yang berbeda antara tiap-tiap jenis sel darah apabila darah yang diencerkan dengan larutan penyangga dituangkan ke atas suatu media khusus, kemudian dipusingkan dengan kecepatan tertentu.

Cara kerja:

- a. Masukkan 10 cc darah ke dalam tabung yang berisi 0,1 ml heparin (100 unit)
- b. Encerkan darah dengan PBS dengan perbandingan 1:2 atau 1:3.

- c. Darah yang telah diencerkan dituangkan ke atas larutan Ficoll-Isopaque yang ada di tabung lain secara hati-hati sehingga merupakan 2 lapisan yang terpisah. Perbandingan darah dengan Ficoll-Isopaque 3-4:1.
- d. Pusing tabung-tabung tersebut 30 menit dengan kecepatan 400 g (1600rpm) pada suhu 20 C.
- e. Lapisan yang terbentuk adalah:



- Prosedur pemeriksaan limfosit T darah tepi:

Prinsip: Limfosit T dapat dibedakan dengan limfosit B karena memiliki reseptor terhadap eritrosit domba, sehingga mampu menyusun roset dengan eritrosit tersebut secara spontan.

- i. Lapisan sel limfosit yang terdapat di antara plasma dengan Ficoll-Isopaque diisap dan dimasukkan ke dalam tabung lain, kemudian diencerkan dengan PBS dengan perbandingan 1:4.
- ii. Pusing selama 10 menit dengan kecepatan 200 g pada suhu 20 C. Buang supernatan, lalu masukkan lagi PBS kemudian dipusing. Pencucian ini diulang sebanyak 2 kali.
- iii. Hitung jumlah limfosit dengan hemositometer, lalu buat suspensi sedemikian rupa hingga diperoleh jumlah limfosit  $2 \times 10^6/\text{ml}$ .
- iv. Cuci suspensi eritrosit domba dengan PBS dengan cara memusing eritrosit dengan sentrifus pada kecepatan 400 gf, lalu buang supernatan dan ulangi lagi pencucian sebanyak 2 kali.
- v. Encerkan eritrosit domba dengan fetal calf serum (FCS) hingga mencapai konsentrasi 5%. Hitung jumlah eritrosit lalu tambahkan PBS hingga diperoleh suspensi eritrosit yang mengandung sel  $160 \times 10^6/\text{ml}$ .

diperoleh suspensi eritrosit yang mengandung sel  $160 \times 10^6/\text{ml}$ . Diusahakan perbandingan eritrosit:limfosit pada langkah berikutnya adalah kira-kira 50:1 hingga 100:1 agar diperoleh pembentukan roset yang jelas.

- vi. Masukkan 0,25 suspensi eritrosit ke dalam tabung yang telah berisi 0,25 ml suspensi limfosit. Perbandingan eritrosit:limfosit 80:1.
- vii. Inkubasikan dalam penangas air pada suhu 37 C selama 15 menit. Pusing dengan kecepatan 200 g selama 5 menit lalu inkubasikan dalam suhu 4 C selama 16 jam.
- viii. Hisap supernatan dengan menyisihkan beberapa tetas di atas endapan, kemudian endapan dikocok perlahan hingga diperoleh suspensi yang homogen.
- ix. Teteskan suspensi di atas kaca obyek lalu tutup dengan kaca penutup. Jumlah limfosit yang membentuk roset dihitung di bawah mikroskop cahaya. Hitung sebanyak 500 limfosit, kemudian tentukan persentase limfosit yang membentuk roset. Limfosit dinyatakan membentuk roset apabila pada sel melekat sedikitnya 3 eritrosit. Dalam keadaan normal persentase limfosit T adalah 65-80% dari limfosit total.

#### Kualitas dengan uji proliferasi limfosit T

- i. Ambil suspensi dari hasil pemeriksaan limfosit T cara rosette, masukkan dalam *microwell* 24 sumur; masing-masing sampel diisikan ke dalam 2 sumur.
- ii. Satu sumur diberi tambahan PHA 10  $\mu\text{g}$  sementara sumur yang satu tidak diberi tambahan apapun. Lakukan demikian untuk tiap-tiap sampel.
- iii. Inkubasikan 72 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5%.
- iv. Setelah 72 jam, keluarkan dari inkubator, selanjutnya pusing 10 menit dalam sentrifus berpendingin dengan kecepatan 500 g dan suhu 20°C.
- v. Buang supernatan dan sel-sel yang mengendap dibuat apusan tebal di kaca obyek, keringkan.
- vi. Fiksasi dengan metanol absolut 2 – 3 menit, kemudian dicat dengan Giemsa 10%.

- Prosedur isolasi netrofil.
  - i. Lapisan netrofil yang diambil dari lapisan bawah hasil pemisahan sel-sel darah diisap dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung, kemudian disentrifus 800 g pada suhu 4 C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan PBS sampai bersih.
  - ii. Eritrosit dilisiskan dengan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sampai seluruh eritrosit lisis, kemudian dicuci lagi dengan PBS.
- Prosedur pemeriksaan ROI dengan uji reduksi pengecatan NBT PMN:
 

Prinsip: PMN distimulasi dengan PMA sehingga menghasilkan anion superosid ( $\text{O}_2^-$ ) yang akan mengoksidasi NBT menjadi formazan (tidak larut), yang dengan pewarnaan Neutral Red tampak butir-butir biru.

  - i. PMN terlebih dulu dilihat viabilitasnya dengan eosin 5% atau metilen blue 1%. Dikatakan baik bila viabilitas PMN  $>90\%$ , dan dapat dilanjutkan pada langkah pemeriksaan selanjutnya. Bila  $<90\%$  pemeriksaan tidak dilanjutkan.
  - ii. Suspensi PMN yang telah dihitung selanjutnya dikultur pada microplate 24 well yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  sel), diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% 37 C selama 30 menit.
  - iii. Tambahkan medium komplet 1 ml/sumuran, diinkubasi selama 2 jam.
  - iv. Sel dicuci dengan RPMI 2 X, kemudian ditambahkan medium komplet 1 ml/sumuran. Sel distimulasi dengan lipopolisakarida E. Coli dan diinkubasikan 24 jam.
  - v. Setelah itu tambahkan 500  $\mu\text{L}$  larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja.
  - vi. Inkubasikan dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% 37 C selama 60 menit.
  - vii. Sel dicuci dengan PBS 3 x, dikeringkan pada suhu kamar.
  - viii. Fiksasi dengan metanol absolut selama 2 – 3 menit.
  - ix. Setelah kering, warnai dengan 2% Neutral Red Sol. Selama 15 menit, cuci dengan agudes lalu keringkan pada suhu kamar.
  - x. Coverslip dimounting pada kaca obyek dengan canada balsam atau DPX.

- xi. Sel dengan reduksi NBT (biru) dihitung persentasinya dari 100 sel PMN. Indeks reduksi NBT (modifikasi dari indeks fagosit<sup>58</sup>) dihitung dengan rumus:

Indeks reduksi NBT = % sel PMN yang mereduksi NBT X rata-rata  
persentase reduksi NBT untuk tiap sel PMN yang  
mengalami reduksi NBT.

Nilai normal didapat dari hasil pemeriksaan pada kontrol (normal).

- Prosedur pemeriksaan produksi NO PMN.

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

- i. Masukkan 100 ul reagen Griess (reagen chromogenik) dalam setiap sumuran.
- ii. Pipet 100 ul supernatan PMN yang hendak dites atau standar NaNO dalam plate dengan duplikasi. Gunakan medium kontrol sebagai blanko.
- iii. Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan chromophore dan stabilisasi.
- iv. Ukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan automated microplate reader (misal Bio=Tek model EL312).
- v. Buat kurva standar menggunakan analisis regresi linier sederhana atau simple dari pembacaan standar NaNO. Hitung konsentrasi sampel berdasarkan kurvastandar atau rumus regresi. Bila tidak tersedia microplate reader, dapat digunakan spektrofotometer konvensional.
- vi. Campur reagen Griess dengan supernatan netrofil atau standar NaNO dalam volume yang sama.
- vii. Tunggu 5 menit pada suhu ruang untuk pembentukan warna.
- viii. Ukur absorbansi pada 550nm (540-550 nm).
- ix. Buat kurva standar dan hitung konsentrasi nitrit seperti di atas.

Nilai normal didapat dari hasil pemeriksaan pada kontrol (normal).

### III.H. Analisis statistik

Data yang terkumpul akan *diedit*, *dikoding* dan *dientry* ke dalam *file* komputer. Setelah itu dilakukan *cleaning* data dan selanjutnya dilakukan analisis statistik sebagai berikut:

#### 1. analisis deskriptif

- a. Akan dihitung rerata dan sebaran variabel A1C, kadar Zn serum, jumlah dan proliferasi limfosit T darah tepi, reduksi pengecatan NBT PMN dan kadar NO PMN.
- b. Hasil analisis akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

#### 2. analisis analitik

- a. Akan dilakukan uji hipotesis bivariat antara kelompok regulasi gula darah dengan kadar Zn serum, jumlah dan proliferasi limfosit T darah tepi, reduksi pengecatan NBT PMN dan kadar NO PMN dengan uji t independen.

### III.I. Definisi operasional

#### a. Diabetes melitus

Diagnosis DM berdasarkan Konsensus pengelolaan DM tipe 2 di Indonesia 2002 oleh Perkeni:

**Tabel 2.** Kriteria diagnosis diabetes melitus\* dan gangguan toleransi glukosa menurut PERKENI 2002<sup>(1)</sup>

- 
1. Kadar glukosa darah sewaktu (plasma vena)  $\geq 200$  mg/dL  
**atau**
  2. Kadar glukosa darah puasa (plasma vena)  $\geq 126$  mg/dL  
**atau**
  3. Kadar glukosa plasma  $\geq 200$  mg/dL pada 2 jam sesudah beban glukosa 75 gram pada TTGO\*\*
- 

- Kriteria diagnostik tersebut harus dikonfirmasi ulang pada hari yang lain, kecuali untuk keadaan khas hiperglikemia dengan dekompensasi metabolik berat seperti ketoasidosis, gejala klasik: poliuri, polidipsi, polifagi dan berat badan menurun dengan cepat.

- Cara diagnosis dengan kriteria ini tidak dipakai rutin di klinik. Untuk penelitian epidemiologis pada penduduk dianjurkan memakai kriteria diagnostik kadar glukosa darah puasa dan 2 jam pasca beban. Untuk DM Gestasional juga dianjurkan kriteria diagnostik yang sama.

Dikutip dari PERKENI. *Konsensus pengelolaan diabetes mellitus di Indonesia*. 2002.

#### **b. Kriteria DM tipe 2**

Idealnya dengan penetapan kurva C peptide, tetapi hal tersebut tidak dapat dilakukan pada penelitian ini, sehingga dipilih:

- Penderita DM dengan riwayat berobat jalan cukup lama.
- Diketahui mempunyai respon terhadap obat hipoglikemik oral.
- Tidak jatuh dalam keadaan koma (ketoasidosis) tanpa pemberian insulin lebih dari 10 hari.

#### **c. Kriteria DM tipe 2 regulasi baik**

Kriteria untuk menentukan DM regulasi baik adalah A1C < 6,5%. Sedangkan dengan memakai gula darah dikatakan regulasi baik bila GDP 80 - 109 mg/dL dan 2 jam PP 80 - 144 mg/dL sedikitnya 1 kali/bulan untuk pemeriksaan selama 3 bulan berturut-turut.

#### **d. Kriteria DM tipe 2 regulasi jelek**

A1C > 8% atau dengan memakai gula darah dikatakan regulasi jelek bila GDP > 126 mg/dL dan 2 jam PP > 180 mg/dL sedikitnya 1 kali per bulan untuk pemeriksaan selama 3 bulan berturut-turut.

**e. Penyakit akut:** penyakit yang timbulnya mendadak dan berlangsung dalam waktu singkat, yang dapat menyebabkan terjadinya hendaya fungsional atau diperlukan suatu perawatan di rumah sakit (misalnya: koma diabetik, infeksi, demam)

**f. Penyakit hati kronik;** adanya keluhan yang sesuai dengan penyakit hati kronik dan pada pemeriksaan ditemukan stigmata penyakit hati kronik.

**g. Penyakit ginjal:** adanya kelainan anatomis dan penurunan fungsi ginjal yang telah dibuktikan dengan pemeriksaan klinis dan laboratorium.

**h. Alkoholik:** ketergantungan akan hal-hal yang berkaitan dengan alkohol atau kebiasaan yang berhubungan dengan alkohol.

- i. **Diare kronik:** diare yang berlangsung sekurang-kurangnya selama 3 minggu.
- j. **Penyakit keganasan:** penyakit yang berhubungan dengan neoplasma ganas, baik neoplasma padat maupun darah.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

Pada saat penapisan di Poliklinik Endokrinologi Metabolik RS Dr. Kariadi Semarang didapatkan 46 pasien DM tipe II dengan perincian: 16 orang dengan regulasi glukosa darah baik (A1C < 6,5%), 14 orang dengan regulasi glukosa darah sedang (A1C 6,5% - 8%) dan 16 orang dengan regulasi glukosa darah buruk (A1C > 8%). Empat belas orang dengan regulasi glukosa darah sedang dikeluarkan dari penelitian. Selanjutnya dilakukan penilaian umur, jenis kelamin, lama DM, IMT, kadar ZN, kadar NO PMN, persen sel dengan reduksi NBT, indeks reduksi NBT, persentase dan proliferasi limfosit T pada kelompok regulasi glukosa baik dan buruk. Lihat tabel 6 – 14.

**Tabel 6.** Rerata umur (tahun) pasien DM tipe 2 kelompok regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	52.00	8.00	2.00
Buruk	16	57.13	2.92	0.73

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p : 0.026$

Rerata (mean) umur kelompok pasien DM tipe 2 dengan regulasi baik adalah 52 tahun dan kelompok regulasi buruk adalah 57.13 tahun. Perbedaan ini secara statistik signifikan (0.026). Data ini memberikan informasi bahwa kelompok DM regulasi baik mempunyai rata-rata usia yang lebih muda dibandingkan kelompok regulasi buruk.

**Tabel 7.** Distribusi jenis kelamin pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

JENIS KELAMIN	REGULASI DM MENURUT A1C				TOTAL	
	BAIK		BURUK			
Laki-laki	6	42.9%	8	57.1%	14	43.7%
Perempuan	10	55.6%	8	44.4%	18	56.3%
TOTAL	16	50.0%	16	50.0%	32	100%

Chi-Square : 0.508

p : 0.476

Dari 14 pasien DM laki-laki, 42.9% di antaranya mempunyai regulasi glukosa baik dan 57.1% buruk. Sedangkan di antara 18 pasien DM perempuan, 55.6% regulasinya baik dan 44.4% mempunyai regulasi buruk. Pada tabel di atas tampak bahwa walaupun proporsi pasien DM perempuan dengan regulasi glukosa baik lebih banyak dibanding laki-laki, ternyata perbedaan ini tidak signifikan ( $p = 0.476$ ).

**Tabel 8.** Rerata lama DM (tahun) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	3.75	4.43	1.11
Buruk	16	6.69	4.36	1.09

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p = 0.069$

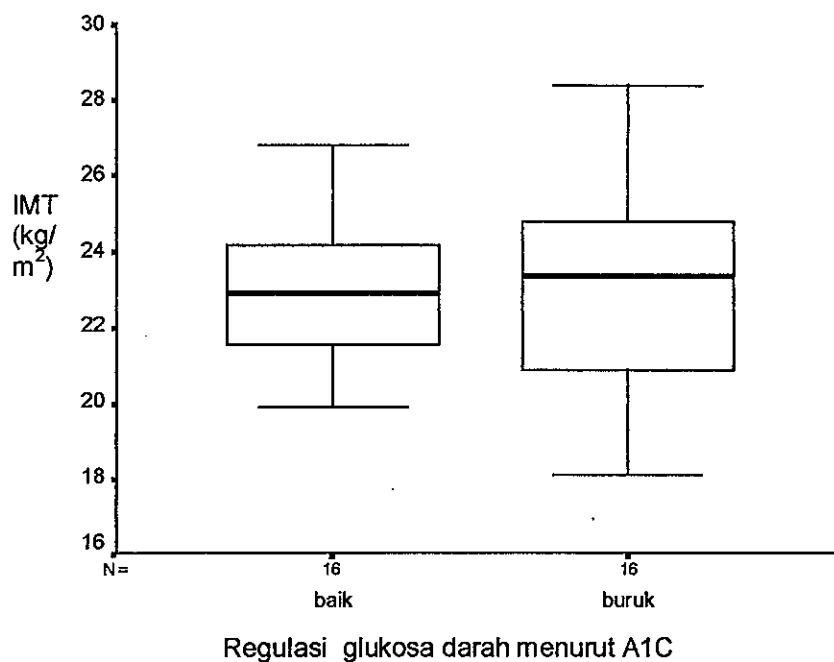
Kelompok DM regulasi buruk ternyata menderita DM lebih lama dibandingkan kelompok DM regulasi baik, meskipun perbedaan di antara kedua kelompok tersebut tidak berbeda bermakna ( $p = 0.069$ )

**Tabel 9.** Rerata IMT ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	22.84	1.98	0.49
Buruk	16	23.04	2.84	0.71

Perbedaan di antara kedua kelompok :  $p = 0.814$

Pada tabel di atas tampak bahwa kelompok DM regulasi baik mempunyai IMT yang lebih kecil dibandingkan kelompok regulasi buruk, tetapi perbedaan tersebut tidak signifikan ( $p = 0.814$ )



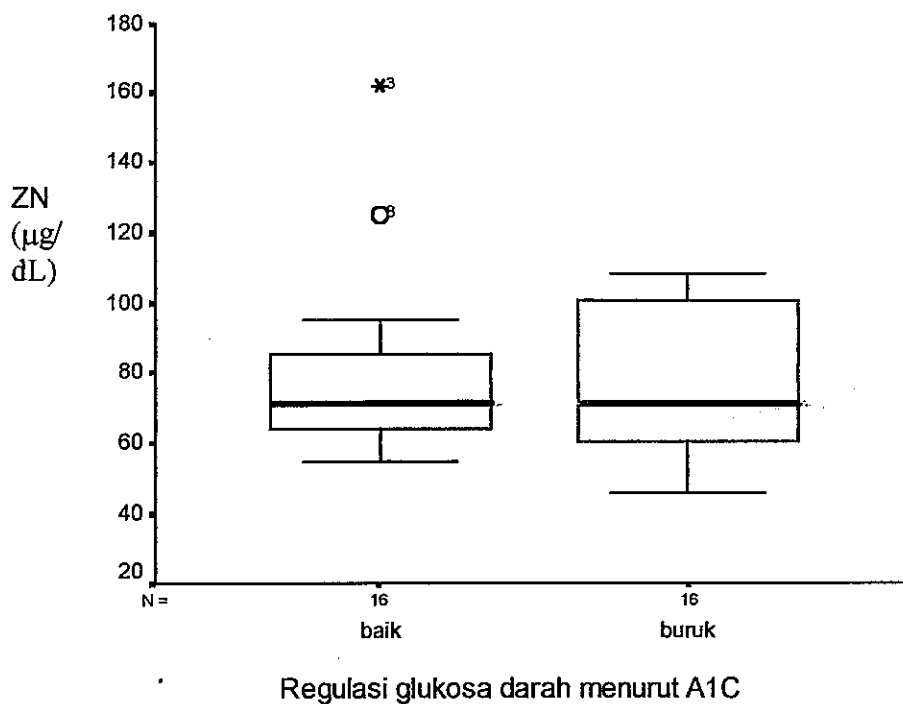
**Gambar 4.** Rerata IMT pada pasien DM regulasi baik dan buruk

**Tabel 10.** Rerata kadar Zn serum ( $\mu\text{g/dL}$ ) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut batas nilai A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	80.33	27.87	6.97
Buruk	16	78.22	21.14	5.29

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p = 0.811$

Rerata kadar Zn serum pada kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan kelompok regulasi buruk, tetapi perbedaan tersebut tidak signifikan ( $p = 0.811$ ). Rerata kadar Zn pada kelompok regulasi baik maupun buruk ternyata masih berada dalam kisaran nilai normal Zn serum ( $70\text{-}120 \mu\text{g/dL}$ ).



**Gambar 5.** Rerata kadar Zn serum pada pasien DM regulasi baik dan buruk

**Tabel 11.** Distribusi Zn serum pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk.

Kategori A1C	Kategori Zn serum			TOTAL
	Rendah < 70 µg/dL	Normal 70 – 120 µg/dL	Tinggi > 120 µ g/dL	
BAIK	8 (50.0%)	6 (37.5%)	2 (12.5%)	16 (50.0%)
BURUK	8 (50.0%)	8 (50.0%)	0 (0.0%)	16 (50.0%)
<b>TOTAL</b>	16 (50.0%)	14 (43.8%)	2 (6.3%)	32 (100%)

Chi-square : 2.286    p = 0.319

Tabel di atas menunjukkan bahwa baik kelompok regulasi baik maupun buruk keduanya lebih banyak masuk dalam kategori Zn serum rendah dan normal. Meskipun 12,5 % kelompok regulasi baik masuk dalam kategori Zn tinggi tetapi ternyata distribusi kategori Zn serum pada kelompok regulasi baik dan buruk tidak berbeda (p = 0.319).

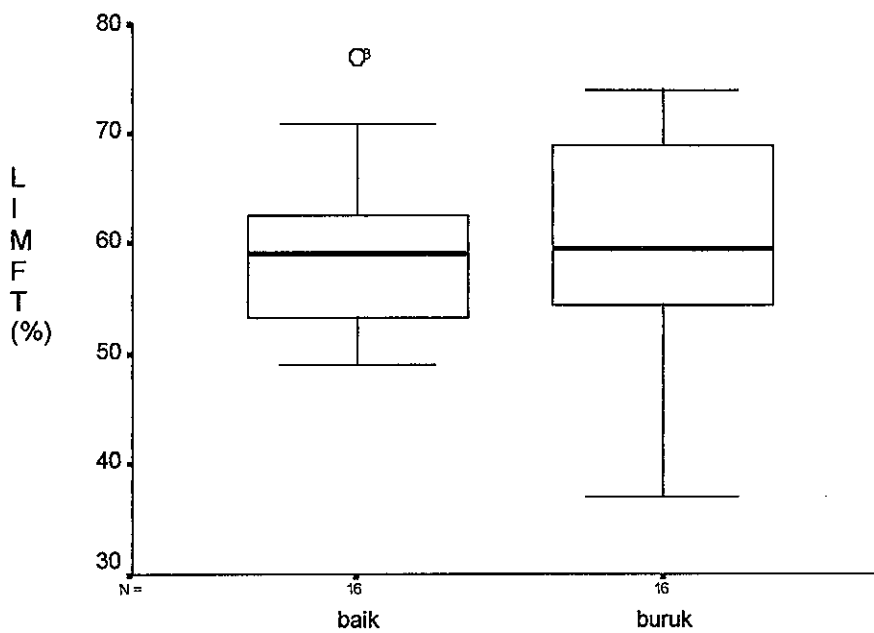
Parameter imunitas seluler yang diukur pada penelitian ini adalah kadar NO PMN, persentase sel PMN yang mereduksi NBT, indeks reduksi NBT dan uji limfosit T yaitu secara kuantitatif dengan persentase limfosit T (T rosette) dan kualitatif dengan proliferasi limfosit T. Uji proliferasi limfosit T dengan mitogen (PHA) maupun tanpa mitogen ternyata tidak memberikan hasil karena dari 32 sampel yang diuji 20 (62,5%) sampel terkontaminasi *Candida* sebelum inkubasi mencapai 72 jam. Dari 12 (37,5%) sampel yang tersisa ternyata hasil pengecatannya kurang memuaskan (banyak yang bergerombol) sehingga tidak cukup layak untuk dibaca.

**Tabel 12.** Rerata limfosit T (%) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	59.69	7.25	1.81
Buruk	16	60.31	10.05	2.51

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p = 0.841$

Tabel di atas menunjukkan bahwa rerata persentase limfosit T antara kelompok regulasi baik dan buruk tidak berbeda bermakna ( $p = 0.841$ ) meskipun tampaknya kelompok regulasi baik justru mempunyai persentase limfosit T yang sedikit lebih rendah dibandingkan kelompok regulasi baik. Rerata persentase limfosit T pada kedua kelompok ternyata lebih rendah dibanding nilai normal (65 – 80%).



Regulasi glukosa darah menurut A1C

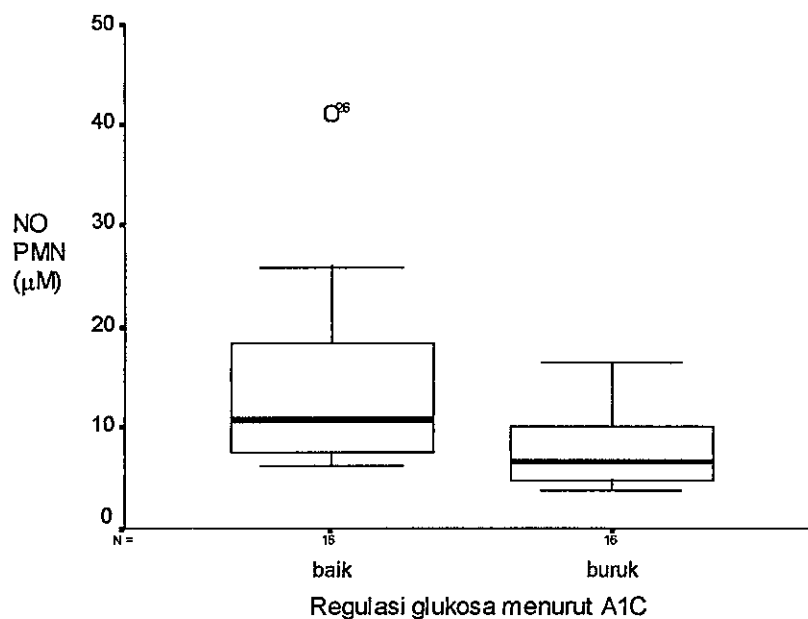
**Gambar 6.** Rerata persentase limfosit T pada pasien DM regulasi baik dan buruk

**Tabel 13.** Rerata kadar NO PMN ( $\mu\text{M}$ ) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	13.88	9.27	2.31
Buruk	16	7.84	3.57	0.89

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p = 0.025$

Rerata kadar NO PMN pada kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan kelompok regulasi buruk ( $p = 0.025$ ), meskipun ternyata rerata kadar NO PMN kedua kelompok masih lebih rendah dibandingkan nilai kontrol (normal) yaitu antara  $25 - 50 \mu\text{M}$ .



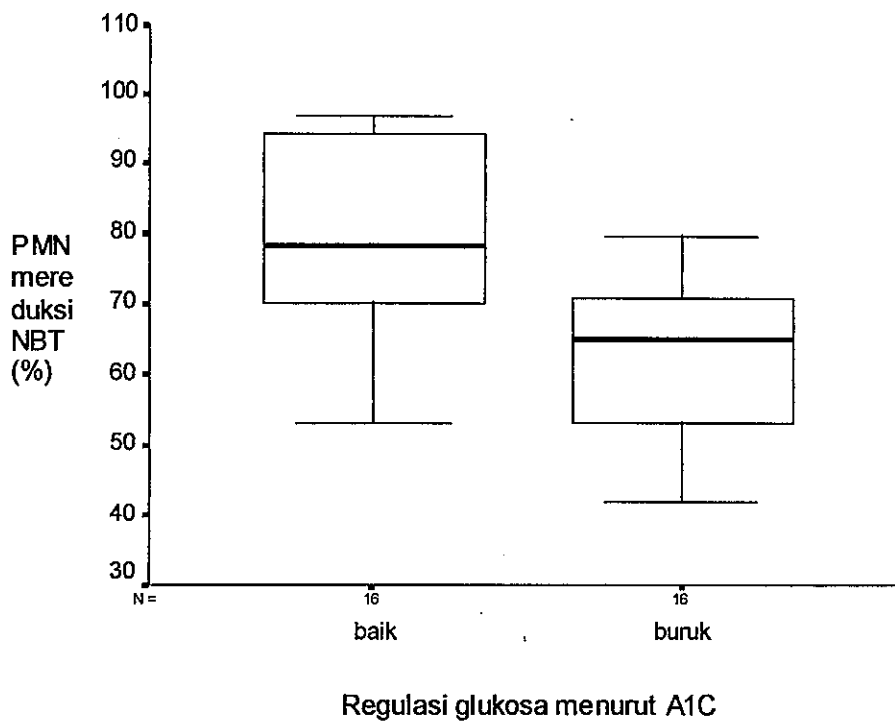
**Gambar 7.** Rerata kadar NO PMN pada pasien DM regulasi baik dan buruk.

**Tabel 14.** Rerata persentase sel PMN yang mereduksi NBT (%) pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	80.75	13.97	3.94
Buruk	16	62.88	10.48	2.62

Perbedaan di antara kedua kelompok :  $p = 0.001$

Pada tabel di atas terlihat bahwa rerata persentase PMN yang mereduksi NBT kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk ( $p = 0.0001$ ). Nilai normal (kontrol) 75 – 95%.



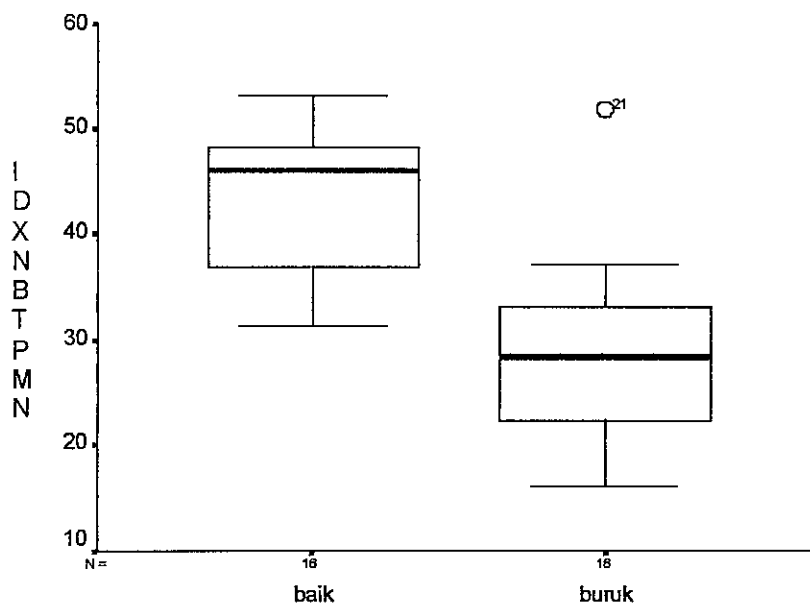
**Gambar 8.** Rerata persentase PMN yang mereduksi NBT pada pasien DM regulasi baik dan buruk

**Tabel 15.** Rerata indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM tipe 2 regulasi baik dan buruk menurut nilai batas A1C.

Kelompok	N	Mean	SD	SE
Baik	16	43.62	7.39	1.84
Buruk	16	28.31	9.04	2.26

Perbedaan di antara kedua kelompok:  $p = 0.0001$

Indeks reduksi NBT PMN merupakan modifikasi dari indeks fagosit<sup>58</sup> yang menggabungkan persentase sel PMN yang melakukan reduksi NBT dengan rata-rata derajat reduksi NBT dari sel yang melakukan reduksi NBT. Rerata indeks reduksi NBT PMN pada kelompok regulasi baik lebih tinggi secara signifikan ( $p = 0.0001$ ) dibandingkan regulasi buruk, meskipun rerata kedua kelompok tersebut ternyata lebih rendah dibandingkan nilai normal (kontrol) yaitu 50 – 55.



Regulasi glukosa darah menurut A1C

**Gambar 9.** Rerata indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM regulasi baik dan buruk

**Tabel 16.** Uji beda lama DM, IMT , jumlah limfosit T, kadar NO PMN, persentase reduksi NBT PMN dan indeks reduksi NBT PMN pada kategori Zn serum.

	Lama DM (th)	IMT (kg/m <sup>2</sup> )	Limf T (%)	NO ( $\mu$ M)	Reduksi NBT (%)	Idx NBT (%)
Chi-square	12.932	10.029	12.942	12.625	12.857	12.857
Df	11	11	11	11	11	11
Asymp.Sig	0.298	0.528	0.297	0.319	0.303	0.303

a. Tes Kruskal Wallis

b. Variabel kelompok: Zn (rendah, sedang, tinggi)

Tabel di atas menunjukkan bahwa di antara kategori Zn rendah, sedang dan tinggi tidak ada perbedaan yang signifikan pada lama DM, IMT, jumlah limfosit T, kadar NO PMN, persentase reduksi NBT PMN dan indeks reduksi NBT PMN.

**Tabel 16.** Perbandingan Umur, Lama Sakit DM, IMT, Zn serum, Limfosit T, NO PMN, persentase reduksi NBT PMN dan Indeks reduksi NBT PMN pada pasien DM tipe 2 Regulasi baik dan buruk.

KARAKTERISTIK	REGULASI						P
	B A I K (n = 16)			B U R U K (n = 16)			
	Mean	SD	SE	Mean	SD	SE	
Umur (thn)	52.00	8.00	2.00	57.13	2.92	0.73	0.026
Lama sakit DM (thn)	3.75	4.43	1.11	6.69	4.36	1.09	0.069
IMT (kg/m <sup>2</sup> )	22.84	1.98	0.49	23.04	2.84	0.71	0.814
Zn serum ( $\mu$ g/dL)	80.33	27.87	6.97	78.22	21.14	5.29	0.811
Limfosit T (%)	59.69	7.25	1.81	60.31	10.05	2.51	0.841
NO PMN ( $\mu$ M)	13.88	9.27	2.31	7.84	3.57	0.89	0.025
Reduksi NBT PMN (%)	80.75	13.97	3.94	62.88	10.48	2.62	0.0001
Indeks NBT PMN	43.62	7.39	1.84	28.31	9.04	2.26	0.0001

Dari tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa di antara pasien DM tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk terdapat perbedaan umur, kadar NO PMN, persentase PMN yang mereduksi NBT dan indeks reduksi NBT PMN. Rerata umur kelompok regulasi baik lebih muda dibandingkan regulasi buruk ( $p = 0.026$ ). Rerata kadar NO PMN kelompok regulasi baik lebih tinggi dibandingkan kelompok regulasi buruk ( $p = 0.025$ ). Persentase PMN yang mereduksi NBT dan indeks reduksi NBT PMN pada kelompok regulasi baik ternyata lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk ( $p = 0.0001$ ).

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Rentang usia subyek penelitian adalah antara 36 – 59 tahun, mengingat pasien DM tipe 2 umumnya terdapat pada rentang usia tersebut. Pasien DM lanjut usia (>60 tahun) tidak diikutsertakan dalam penelitian ini karena para usia lanjut umumnya telah mengalami gangguan sistem imun baik alamiah maupun adaptif<sup>27,59,60</sup> dan biasanya asupan nutrisi termasuk Zn akan berkurang<sup>59-61</sup> sehingga kadar Zn serum biasanya juga rendah<sup>60,62</sup>. Pada penelitian ini terdapat perbedaan rerata usia yang signifikan antara kelompok DM tipe 2 regulasi glukosa baik (52,00 tahun) dan buruk (57.13 tahun) dengan  $p = 0.026$ . Penelitian Jacobus<sup>25</sup> (2000) di Semarang menunjukkan hasil yang sama, yaitu adanya perbedaan signifikan rerata usia kelompok regulasi baik dan buruk, tetapi perbedaan rerata usia antara kelompok regulasi baik, sedang dan buruk tidak signifikan.

Distribusi jenis kelamin menurut regulasi glukosa darah menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara kelompok regulasi baik dan buruk.. Penelitian Jacobus<sup>25</sup> (2000) menunjukkan hasil yang berbeda, yaitu laki-laki lebih mendominasi kelompok regulasi baik dan perempuan mendominasi kelompok regulasi buruk.

Rerata IMT subyek dengan regulasi baik dan buruk pada penelitian ini ternyata juga tidak berbeda ( $p = 0.814$ ) dan rerata kedua kelompok menunjukkan bahwa keduanya masih ada dalam batasan berat badan yang diharapkan. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Jacobus<sup>25</sup> (2000) yaitu rerata IMT pasien DM kelompok regulasi baik, sedang dan buruk tidak berbeda bermakna. Penelitian Chen dkk<sup>18</sup> (1995) menunjukkan bahwa pasien DM obese mempunyai kadar Zn plasma sedikit lebih rendah dibandingkan pasien DM non obese .

Penelitian ini menunjukkan bahwa rerata status Zn (Zn serum) pada pasien DM di Semarang masih dalam batas normal. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Isbir<sup>24</sup> (1994), William<sup>18</sup> (1995) dan Jacobus<sup>25</sup> (2000) yang menemukan adanya penurunan kadar Zn serum sebesar berturut turut 19,2%, 17% dan 40% dari nilai normal pada kelompok DM. Rerata kadar Zn serum kelompok regulasi baik ternyata tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok regulasi buruk ( $p = 0.811$ ). Penelitian Niewoehner (1986) dan Jacobus (2000) menunjukkan hasil yang serupa, yaitu: tidak ada perbedaan

rerata kadar Zn serum pada kelompok regulasi baik, sedang dan buruk.<sup>12,25</sup> Dengan menggunakan nilai normal Zn serum 70 -120µg/dL didapatkan 50% subyek DM tipe 2 mengalami defisiensi Zn. Di antara kelompok regulasi baik 50% di antaranya mengalami defisiensi Zn dan 12,5% mempunyai kadar Zn di atas normal. Pada kelompok regulasi buruk ternyata didapatkan prevalensi defisiensi Zn yang sama yaitu 50%. Data ini membawa kita pada dugaan bahwa meskipun regulasi glukosa baik ternyata kadar Zn belum (tidak) normal. Pada pasien DM meskipun pengendalian glukosa darah selalu dijaga baik akan tetap terjadi komplikasi kronik dengan akibat di antaranya adalah hiperzincuria dan gangguan absorpsi Zn yang akhirnya menyebabkan kadar Zn serum rendah<sup>54</sup>. Kemungkinan gangguan ini menetap sehingga status Zn pada DM tidak dipengaruhi regulasi glukosa darah, seperti yang disimpulkan Niewoehner<sup>12</sup> (1986) tetapi dipengaruhi oleh asupan nutrisi yang mengandung Zn.

Uji beda mean untuk tiga sampel non parametrik pada kategori subyek menurut status Zn (rendah, normal, di atas normal) dengan lama DM dan IMT dapat disimpulkan bahwa di antara kategori Zn serum rendah, sedang dan lebih dari normal ternyata tidak ada perbedaan lama DM dan IMT yang signifikan.

Imunitas seluler pada subyek penelitian ini diukur dengan pemeriksaan limfosit T secara kuantitatif (T rosette) dan kualitatif (proliferasi dengan dan tanpa mitogen) dan pemeriksaan *oxydative killing* dengan pengukuran NO PMN dan reduksi NBT PMN (persentase PMN yang mereduksi NBT dan indeks reduksi NBT).

Kedua kelompok subyek mempunyai rerata jumlah limfosit T di bawah nilai normal. Penelitian ini menyimpulkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara jumlah limfosit T darah tepi antara kelompok regulasi baik dan buruk. . Sejauh ini peneliti belum menemukan penelitian mengenai perbedaan dan hubungan jumlah limfosit T dengan regulasi glukosa darah sebagai pembanding. Kebanyakan penelitian yang dilakukan menggunakan parameter uji proliferasi limfosit baik dengan maupun tanpa mitogen dan subset limfosit T. Niewoehner<sup>17</sup> (1986) menyimpulkan bahwa respon proliferasi limfosit terhadap PHA pada pasien DM lebih rendah dibandingkan kontrol tetapi tidak berhubungan dengan A1C. Sarwono<sup>8</sup>(2000) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa indeks stimulasi limfosit kelompok DM tidak terkontrol ternyata tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok DM terkontrol. Mooradian<sup>9</sup> (1998) menemukan bahwa

proliferasi limfosit tanpa stimulasi pada kelompok DM lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Uji kualitas limfosit dengan pemeriksaan proliferasi limfosit, reaksi hipersensitifitas kulit tipe lambat maupun dengan mengukur langsung sitokin-sitokin yang dihasilkan akan memberikan interpretasi imunitas seluler yang lebih baik dibandingkan hanya uji kuantitas limfosit. Hasil sediaan apus uji proliferasi limfosit yang dilakukan peneliti tidak cukup baik sehingga sulit dinilai. Idealnya uji proliferasi limfosit dilakukan dengan pengukuran serapan thymidin (radioaktif) yang diperlukan untuk sintesis DNA. Metode ini lebih dipilih karena uji proliferasi limfosit dengan metode yang dilakukan peneliti dapat menimbulkan kerancuan saat pembacaan hasil secara mikroskopis, yaitu limfosit yang besar sulit dibedakan dengan limfosit yang mengalami proliferasi.<sup>33</sup>

Penelitian ini menunjukkan bahwa kadar NO PMN kelompok regulasi baik ternyata lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok regulasi buruk, meskipun rerata kedua kelompok tersebut masih di bawah nilai kontrol (normal). Demikian juga parameter *oxydative killing* yang lain yaitu persentase PMN yang mereduksi NBT dan indeks reduksi NBT PMN keduanya menunjukkan bahwa kelompok regulasi baik mempunyai persentase PMN yang mereduksi NBT dan indeks reduksi NBT yang lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk dan perbedaan tersebut signifikan. Hasil ini berbeda dengan penelitian Sarwono<sup>8</sup> (2000) di Jakarta yang menyimpulkan bahwa persentase fagositosis PMN dengan NBT pada kelompok DM tidak terkontrol justru lebih tinggi dibandingkan kelompok DM terkontrol dan penelitian Habib<sup>63</sup> (2002) di Yogyakarta yang menyimpulkan tidak ada hubungan antara fungsi fagositosis PMN (dengan NBT) dan kadar gula darah puasa pada DM tipe 2. Kedua peneliti tersebut menggunakan prosedur pemeriksaan NBT yang berbeda dengan prosedur peneliti, yaitu sampel diambil dari darah lengkap tanpa memisahkan PMN dari komponen lainnya dan tanpa inkubasi yang terlalu lama (hanya 15 menit, dibandingkan dengan prosedur peneliti yaitu inkubasi 24 jam), sehingga mungkin hasil yang berbeda ini bisa juga dipengaruhi metode pemeriksaan yang berbeda. Sebetulnya pemeriksaan *oxydative killing* juga bisa diperiksa dengan metoda kuantitatif baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung bisa dilakukan pengukuran oksigen radikal yang dihasilkan, misalnya hidrogen peroksida. Secara tidak langsung bisa dengan uji NBT kuantitatif secara spektrofotometer maupun

dengan mengukur kemampuan oksigen radikal mengubah *dihydrorhodamin* 123 (DHR 123) menjadi *rhodamin* 123 (R 123) yang berfluoresensi dan diukur secara *flowcytometri*. Silman<sup>64</sup> (2001) melakukan pengukuran kemampuan oksigen radikal netrofil mengubah DHR 123 menjadi R 123 secara *flowcytometri* dan menyimpulkan adanya gangguan pembentukan oksigen radikal oleh netrofil pada penderita DM. Penelitian Silman ini tidak menghubungkan pembentukan oksigen radikal ini dengan regulasi glukosa darah.

Rerata kadar NO PMN dan NBT PMN ( persentase reduksi dan indeks reduksi) kelompok regulasi baik ternyata lebih tinggi (baik) dibandingkan regulasi buruk, meskipun rerata kedua kelompok tersebut ( kecuali persentase reduksi NBT PMN kelompok regulasi baik) di bawah nilai normal. Hasil ini membawa kita pada dugaan bahwa dengan pengendalian glukosa yang baik maka *oxydative killing* yang diukur dengan NO PMN dan NBT PMN akan membaik. Kemungkinan lain adalah karena kelompok regulasi baik secara signifikan lebih muda dibandingkan regulasi buruk, padahal dengan pertambahan usia maka imunitas juga akan menurun.

Uji beda mean pada kategori status Zn untuk parameter imunitas seluler ternyata menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan jumlah limfosit T, kadar NO PMN, persentase reduksi NBT dan indeks NBT PMN pada ke tiga kategori status Zn. Untuk melihat adanya hubungan antara status Zn dengan parameter imunitas seluler tersebut pada pasien DM tipe 2 idealnya dilakukan penelitian *cross sectional* dengan subyek penelitian yang lebih luas (pasien DM pada semua kelompok regulasi glukosa darah dan kontrol non DM) atau penelitian eksperimental dengan perlakuan pemberian suplemen Zn.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan:

1. Hipotesis bahwa pada DM tipe 2 regulasi buruk didapatkan kadar Zn serum yang lebih rendah dibandingkan regulasi baik tidak terbukti pada penelitian ini.
2. Hipotesis bahwa pada DM tipe 2 regulasi buruk didapatkan jumlah limfosit T darah tepi yang lebih rendah dibandingkan regulasi baik tidak terbukti pada penelitian ini.
3. Hipotesis bahwa pada DM tipe 2 regulasi buruk didapatkan reduksi pengecatan NBT PMN lebih rendah dibandingkan regulasi buruk tidak terbukti pada penelitian ini.
4. Hipotesis bahwa pada DM tipe 2 regulasi buruk didapatkan kadar NO PMN lebih rendah dibandingkan regulasi buruk tidak terbukti pada penelitian ini.

Keterbatasan penelitian ini yang mungkin ikut mempengaruhi hasil penelitian adalah:

1. Meskipun kelompok usia lanjut telah dieksklusi (subyek penelitian dibatasi usia  $\leq$  60 tahun) ternyata ada perbedaan usia yang signifikan antara kelompok regulasi baik dan buruk. Usia adalah salah satu faktor yang berpengaruh terhadap status Zn dan imunitas seluler. Penelitian ini belum bisa melakukan *matching* pada usia karena jumlah sampel akan menjadi terlalu kecil untuk bisa dianalisis.
2. Parameter limfosit T hanya bisa dinilai dari kuantitasnya karena uji kualitas yang dilakukan pada penelitian ini yaitu proliferasi limfosit T hasilnya tidak bisa dianalisis. Seyogyanya dilakukan uji kualitas dengan metode yang lebih baik, misalnya uji proliferasi dengan pengukuran serapan thymidin atau uji DTH pada kulit.
3. Kelompok non DM dan kelompok DM tipe 2 regulasi sedang tidak diikuti dalam penelitian sehingga tidak bisa melakukan uji hubungan antara Zn serum dan parameter imunitas seluler dengan regulasi glukosa darah.

## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **KESIMPULAN**

1. Pada DM tipe 2 kelompok usia yang lebih muda mempunyai pengendalian glukosa yang lebih baik.
2. Distribusi jenis kelamin, IMT dan lama waktu menderita DM pada kelompok DM tipe 2 regulasi baik dan buruk tidak berbeda.
3. Kadar Zn serum kelompok DM tipe 2 regulasi baik dan buruk masih normal dan tidak berbeda bermakna.
4. Jumlah limfosit T darah tepi kelompok DM tipe 2 regulasi baik dan buruk tidak berbeda.
5. Kadar NO PMN kelompok DM tipe 2 regulasi baik lebih tinggi dibandingkan kelompok regulasi buruk.
6. Persentase reduksi NBT PMN dan indeks reduksi PMN kelompok DM tipe 2 regulasi baik lebih tinggi dibandingkan regulasi buruk.
7. Uji kualitas limfosit T dengan menilai proliferasi limfosit T tidak dapat dinilai. pada penelitian ini.
8. Tidak ada perbedaan lama menderita DM, IMT, jumlah limfosit T, kadar NO PMN, reduksi NBT PMN dan indeks reduksi NBT PMN pada kategori Zn serum rendah, normal dan tinggi.

## SARAN

1. Pemeriksaan imunitas seluler dianjurkan sebagai pemeriksaan rutin pada pasien DM tipe 2
2. Untuk mendapatkan status Zn yang cukup, selain pengendalian glukosa darah perlu diberikan suplemen Zn.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk menilai hubungan status Zn dan imunitas seluler pada DM tipe 2 regulasi baik, sedang dan buruk dan pada non DM dengan *matching* faktor-faktor yang mempengaruhi status Zn dan imunitas seluler.
4. Perlu dilakukan penelitian serupa dengan menggunakan parameter imunitas seluler yang lebih baik ( uji limfosit T dengan mengukur subset limfosit T, sitokin-sitokin yang dihasilkan, uji proliferasi dengan radioaktif dan pengukuran radikal oksigen secara langsung).

## DAFTAR PUSTAKA

1. PERKENI. *Konsensus pengelolaan diabetes mellitus di Indonesia*. 2002.
2. Sidartawan Soegeo. Peran edukator diabetes dalam perawatan mandiri. Dalam: Askandar Tjokropawiro, Hendromartono, Ari Sutjahjo , dkk (eds) *Naskah lengkap Surabaya diabetes update-VI*. Surabaya,1999.
3. American Diabetes Association. *Clinical practice recommendation 2003*.
4. Yao LB. The epidemiologi of diabetes mellitus. *Asia Pasific Journal of Clinical Nutrition*. 1995;4:326(abstract)
5. Cooppan R. Infection and diabetes. In: Marble A, Krall LP, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS (eds) *Joslin's diabetes mellitus.12<sup>th</sup> ed*. Philadelphia. Lea and Febiger. 1985:737-47
6. Sarwono Waspadji . Aspek imunologi kaki diabetes. Dalam: Siti Setiati , Ari W Sudoyo, Idrus Alwi , dkk (eds) *Naskah lengkap pertemuan ilmiah tahunan ilmu Penyakit dalam 2000*. Jakarta. Pusat informasi dan penerbitan bagian ilmu penyakit dalam FKUI. 2000:121-39
7. Sentochnik DE, Eliopoulos GM. Infection and diabetes. In: Kahn CR, Weir GC(eds) *Joslin's diabetes mellitus. 13<sup>th</sup> ed*. Philadelphia. Lea and Febiger. 1994:867-71
8. Sarwono Waspadji. *Telaah mengenai hubungan faktor metabolik dan respon imun pada pasien diabetes melitus tipe 2: kaitannya dengan ulkus/ganggren diabetes*. Ringkasan disertasi. Jakarta. Progam pasca sarjana Universitas Indonesia. 2000.
9. Bagdade JD, Steward M, Walters E. Impaired granulocyte adherence. *Diabetes*. 1978; 27: 677-81
10. Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*. 1978; 27: 889-94
11. Dziatiowiak H, Kowalska M, Denys A. Phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetic children. *Diabetes*. 1982;31:1041-3

12. Niewoehher CB, Allen JL, Boosalis M, et al. The role of zinc supplementation in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 1986;81:63-8
13. Marhoffer W, Stein M, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leucocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:256-60
14. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le-goff MC, Allanic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetes patients. *Diabetic medicine.* 1997;14:29-34
15. Moradian AD, Norman DC, Morley JE. The effect of zinc status on the immune function of diabetic rats. *Diabetologia.* 1998;31:703-7
16. Muchova J, Liptakova A, Orzaghova Z, Garaiova I, Tison P, Cersky J, et al. Antioxidant system in polymorphonuclear leucocytes of type 2 DM. *Diabetic Medicine* 1999;16:74-8
17. Williams NR, Jayshri RW, West JA, et al. Plasma granulocyte and mononuclear cell copper and zinc in patient with diabetes mellitus. *Analyst.* 1995;120:887-90
18. Chen MD, Lin PY, Tsou CT, et al. Selected metal status in patients with noninsulin dependent diabetes mellitus. *Biol.trace elem.res.* 1995;50:119-24
19. Heick NB, Scott MD, Rowe J. Zinc supplementation attenuates insulin secretory activity in pancreatic islets of the ob/ob mouse. *Diabetes* 1985;34:179-84
20. Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, et al. Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J med* 1983;75:273-7
21. Moradian AD, Morley JE. Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 1987;45:877-95
22. Walter RM, Hare JYU, Olin KL, et al. Copper, zinc, mangan and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 1991; 14: 1050-6
23. Moradian AD, Fails M, Hoogwerf B, et al. Selected vitamin and minerals in diabetes. *Diabetes care.* 1994;17: 464-79
24. Isbir T, Tamer L, Taylor, et al. Zinc, copper and magnesium status in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1994;26:41-5
25. Jacobus A. *Status mineral seng(Zn) dan magnesium(Mg) penderita diabetes melitus tipe 2 dengan regulasi gula darah baik dan jelek.* Tesis PPDS I Penyakit dalam FK UNDIP. 2000
26. Levine AS, Mc Clain CJ, Handwerger, et al. Tissue zinc status of genetically diabetic

- and streptozosin induced diabetic mice. *Am J Clin Nutr.* 1983;37:328-6
27. Duchateau J, Delepesse G, Vrijew R, Collet H. Beneficial effect of oral zinc supplementation on the immune respon of old people. *Am J Med.* 1981; 70: 1001-4
  28. King LE, Fraker PJ. Flow cytometric analysis of the phenotypic distribution of splenic lymphocytes in zinc deficient adult mice. *J. Nutr.* 1991; 121: 1433-8
  29. Prasad AS, Beck FWJ, Grabowski SM, Kaplan J, Mathog RH. Zinc deficiency: changes in cytokine production and T-cell subpopulations in patients with head and neck cancer and in noncancer patients. *Proc Assoc.Am.Physc.* 1997;1:68-77
  30. Prasad AS. Effect of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J.Infect Dis.* 2000;182(Supp1):S62-8
  31. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, etal. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subject aged  $\geq$  90 yr. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 590-8
  32. Gibson RS. Assesment of trace element status. Dalam: Gibson RS9ed) *Principal of nutritional assesment.* Oxford. Oxford University press. 1990:542-53
  33. Siti Boedina K. *Imunologi: diagnosis dan prosedur laboratorium.* Jakarta. Penerbit FKUI. 1996
  34. Darmono. Diagnosis dan klasifikasi diabetes melitus. Dalam; Sjaifoellah Noer, Sarwono Waspadji, Muin Rahman (eds) *Buku ajar ilmu penyakit dalam Jilid I.* Edisi ketiga. Jakarta. Balai penerbit FKUI.1996;590-6
  35. Herowitz HB. Imunofisiologi. Dalam Belanti FJ (ed) *Imunologi III* (terjemahan). Yogyakarta. Gajahmada University Press. 1993:126-72
  36. Subowo. *Imunologi klinik.* Bandung. Tarsito. 1993: 1-73
  37. Abbas AH, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology.* 3<sup>rd</sup>ed. Philadelphia. WB Saunders Company. 1991
  38. Karmani NR, Douglas SD. Structure and development of the immune system. Dalam: Stites DP, Terr AI (eds) *Basic human immunology.* 1<sup>st</sup> ed. Connecticut. Prentice hall. 1991;9-33.
  39. Matondang CS. Notoatmojo H. Mekanisme imun penyakit infeksi. Dalam: Arwin AAP, Matondang CS (eds) *Buku ajar alergi imunologi anak.* Jakarta. Ikatan Dokter Anak Indonesia. 1996:95-9

40. Mills J, Drustz DJ. Mechanism of immunity to infection. Dalam: Stites DP, Terr AI (eds) *Basic and clinical immunology*. Norwalk. Appleton & Lange. 1991: 729-44
41. Parslow TG. The immune response. Dalam Stites DP, Terr AI, Parslow TG: *Medical immunology*, 9<sup>th</sup> ed. Connecticut. Appleton and Lange. 1997:63-73
42. Babior BM. Function of neutrophils and mononuclear phagocytes. In: Plum F(ed) *Cecil textbook of medicine. Vol 1*. 19<sup>th</sup> ed. Philadelphia. WB Saunders. 1992:898-903
43. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immune biology*. 5<sup>th</sup> ed. New York. Churchill Livingstone. 2001
44. Yang KD, Hill HR. Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention and therapy. *J. Pediatr.* 1991; 119:343-54
45. Pier GB. Molecular mechanism of bacterial pathogenesis. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (eds) *Harrison's principles of internal medicine. Vol 1*. 13<sup>th</sup> ed. New York. McGraw Hill. 1994:589-92
46. Pozzilli P, Signore A, Leslie RDG. Infections, immunity and diabetes. Dalam Alberti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA, Keen H(eds): *International textbook of diabetes mellitus*, 2<sup>nd</sup> ed. New York. John Wiley and Sons. 1997:1232-41
47. Djokomoeljanto R. Fungsi PMN pada diabetes. *Kumpulan makalah diabetes mellitus 1999*.
48. Mills CF. *Zinc in human biology*. London. Springer-Verlag. 1989;337-49
49. Sandstrom B. Zinc. Dalam: Garrow JS, James WPT (eds) *Human nutrition and dietetics*, 9<sup>th</sup> ed. London. Churchill Livingstone. 1993:188-93
50. Cousins RJ, Hempe JM. Zinc. Dalam: Brown ML (ed) *Present knowledge in nutrition*, 6<sup>th</sup> ed. Washington, d.c. ILSI press. 1996:251-67
51. Martin DW. Air dan mineral. Dalam: Mayes PA, Granner DK, Rodwell DW(eds) *Biokimia*(terjemahan). 1987:719-32
52. Arquilla ER, Packer S, Tarmas W, Miyamoto S. The effect of zinc on insulin metabolism. *Endocrinology*. 1978;4:1440-9
53. Pidduck HG, Wien PJ, Evans DAP. Plasma zinc and copper in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1970; 19: 234-40.
54. Walker AF. *Role of selected vitamins, minerals and trace element in diabetes mellitus*. Vitabiotics.

55. Keusch GT. Nutrition and infection. In: Schaechter M, Medolf G, Eisenstein BI.(eds) *Microbial disease*. 2<sup>nd</sup> ed Baltimore. Williams and Wilkins.1993:891-8
56. Fraker PJ, King LE, Garvy BA, Medina CA. The immunopathology of zinc deficiency in human and rodents. A possible role for programmed cell death. Dalam: Klurfeld DM(ed) *Nutrition and immunology*. New York. Plenum press. 1993:267-83
57. Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. Micronutrients and innate immunity. *The Journal of Infectious Disease*. 2000;182(Supp1):S5-10
58. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, et al. *Current protocols in immunology*. Vol 2. New York. John wiley & Sons. 1994:14.6.1-13
59. Hadi M. Aspek nutrisi pada usia lanjut. Dalam: Boedhi D(ed) *Naskah lengkap temu ilmiah nasional I dan konferensi kerja III Pergemi*. Semarang. Balai penerbit UNDIP. 2002:41-6
60. Standstead HH, Henriksen LK, Greger JI, et al. Zinc nutriture in the elderly in relation to taste acuity, immune respon and wound healing. *Am J Clin Nutr*. 1982; 36:1046-59.
61. Soeharyo H. Infection problems in the elderly. Dalam: Boedhi D (ed) *Naskah lengkap temu ilmiah nasional I dan konferensi kerja III pergemi*. Semarang. Balai penerbit UNDIP, 2002:461-72
62. Sturnilo W. Zinc metabolism and immune function in healthy elderly people. *Am J Clin Nutr*. 1994; 13:280-5
63. Habib. *Hubungan fungsi fagositosis leukosit polimorfonuklear dengan kadar gula darah puasa pada pengidap diabetes mellitus tipe 2*. Laporan penelitian. Fakultas Pasca Sarjana UGM. 2002.
64. Silman E, Harun A, Kresno SB, Baratawijaya KG. Penurunan kemampuan pembentukan oksigen radikal oleh neutrofil setelah rangsang bakteri pada penderita diabetes mellitus. (Abstrak). *Konggres Nasional IV Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia*. Bandung. 2001.
65. Sudigdo A, Sofyan I. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Jakarta. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI. 1995
66. Lameshow S, Hosmer DW, Klar J. (Terjemahan Pramono D) *Besar sampel dalam penelitian kesehatan*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.1997.