

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI VAKSINASI
BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN PROLIFERASI LIMFOSIT PADA
MENCIT BALB/c**

ARTIKEL PENELITIAN

Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh Program Pendidikan Sarjana Fakultas
Kedokteran

Oleh

Kristyaningsih

G2A001104

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006**

LEMBAR PENGESAHAN

ARTIKEL ILMIAH

**Pengaruh Pemberian Vaksinasi BCG, Stres, dan Kombinasi Vaksinasi BCG – Stres
Terhadap Kemampuan Proliferasi Limfosit pada Mencit Balb/c**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

Kristiyaningsih
G2A001104

Telah dipertahankan di depan tim penguji Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
Semarang pada tanggal 17 Juli 2006

Tim Penguji

LEMBAR PENGESAHAN

Telah disetujui oleh dosen pembimbing, karya tulis ilmiah dari :

Nama : Kristiyaningsih

NIM : G2A 001 104

Fakultas : Kedokteran

Universitas : Universitas Diponegoro

Judul : Pengaruh Pemberian Vaksinasi BCG, Stres, dan Kombinasi

Vaksinasi BCG – Stres Terhadap Kemampuan Proliferasi Limfosit pada Mencit Balb/c

Bidang Keilmuan : Fisika

Pembimbing : Dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes

Tanggal Penyajian : 10 Juli 2006

EFFECT ADMINISTRATION OF BCG VACCINE, STRESS, AND COMBINATION OF BCG VACCINE – STRESS TO PROLIFERATION ABILITY OF LYMPHOCYTE IN BALB/C MICE.

Kristiyaningsih¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRACT

Background: Previous study proved that mice with stress, lymphocytes proliferation was lower than control. BCG vaccination is known as an immunostimulator, was able to increase of lymphocytes proliferation.

Objective: This study was emphasized on the effects of stress and the use of BCG vaccination in lymphocyte proliferation.

Method: Laboratory Experimental study was used Post-Test Only Control Group Design. The 24 female BALB/c mice (6-8 weeks with weight $21,88 \pm 1,75$ gram). Were divided into four groups and received standart lab diet daily. The first group (Control group) received no other additional treatment, while the second group (BCG group) received intra-peritoneal injection of 0,1 cc BCG at day 1st and 11th. The third group (EFS group) received stress with electrical foot shock (EFS) at day 12th until 21st and the fourth group (EFS+BCG group=EB group) received intra-peritoneal injection of BCG at day 1st and 11th and received stress with electrical foot shock at day 12th until 21st. At the day 21st, all groups were intravenously injected with 10^4 live *L. monocytogenes* (LD50= 2×10^5 bacteria) obtained from Balai Laboratorium Kesehatan Semarang and sacrificed at day 26th. Number of lymphoblast/ 200 cells and the number of spleen lymphocytes/ cc and spleen weight were measured. Within group difference of data were analyzed by One-Way ANOVA. Difference between groups was analyzed by Post Hoc Test Bonferroni.

Result: There were significant differences in the number of lymphoblast/ 200 cells and the number of spleen lymphocytes/ cc and spleen weight between EFS group and EFS+BCG group. The number of lymphoblast/ 200 cells and the number of spleen lymphocytes/ cc and spleen weight in stress lower than stress vaksin BCG group.

Conclusion: It could be concluded that stress an immunosuppressive effect, while additional treatment with BCG was able to restore immune response indicated by the increased of lymphocytes proliferation in female BALB/c mice.

Key words: Lymphoblast, lymphocyte, Stress, BCG

¹⁾ Undergraduate Student, Medical Faculty, Diponegoro University, Semarang

²⁾ Lecturer, Medical Physic Department, Diponegoro University, Semarang

PENGARUH PEMBERIAN VAKSINASI BCG, STRES, DAN KOMBINASI VAKSINASI BCG – STRES TERHADAP KEMAMPUAN PROLIFERASI LIMFOSIT PADA MENCIT BALB/c.

Kristiyaningsih¹⁾, Dwi Pudjonarko²⁾

ABSTRAK

Latar Belakang: Pada penelitian sebelumnya mencit yang mendapat stres, proliferasi limfosit lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Disisi lain ada imunostimulator yaitu BCG yang dapat meningkatkan respon imunitas seluler.

Tujuan: Penelitian ini untuk membuktikan adanya perbedaan proliferasi limfosit pada mencit stres karena renjatan listrik yang mendapat vaksinasi BCG dibandingkan dengan yang tidak diberi vaksinasi BCG.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan Post-Test Only Control Group Design yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Sample penelitian adalah 24 ekor mencit betina strain BALB/c (umur 6-8 minggu dengan berat rata-rata $21,88 \pm 1,75$ gram) dibagi menjadi empat kelompok dan masing-masing mendapat makanan standar setiap hari. Pada Kelompok Kontrol, mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok EFS mendapatkan stres dengan *electrical foot shock*(EFS) mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Dan kelompok (EFS+BCG) mendapat injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11 dan stres dengan *electrical foot shock* mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Pada hari ke-21 semua kelompok diinjeksi intravena dengan 10^5 Listeria monocyogenes hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang dan pada hari ke-26 semua mencit dibunuh untuk pemeriksaan. Selanjutnya berat lien mencit ditimbang dan dihitung jumlah limfoblas/ 200 sel serta limfosit lien/cc. Dilakukan uji One-Way ANOVA untuk melihat adanya perbedaan pada keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni

Hasil: Adanya perbedaan bermakna jumlah limfoblas dan jumlah limfosit lien pada mencit BALB/c yang diberi stress sebagai penurunan proliferasi limfosit lalu diberi vaksinasi BCG yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Ternyata jumlah limfoblas dan jumlah limfosit lien per cc lebih rendah pada kelompok mencit yang mendapat stres tanpa vaksinasi BCG dibanding yang kelompok Stress -BCG.

Simpulan: Pemberian stres menekan proliferasi limfosit pada mencit BALB/c. Upaya penggunaan BCG dapat meminimalkan efek tersebut dengan meningkatkan proliferasi limfosit yang tertekan akibat stres.

Kata kunci: Limfoblas, limfosit, stress, BCG

¹⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

²⁾ Staf, Pengajar Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

PENDAHULUAN

Stres merupakan keadaan yang sering kita jumpai dalam kehidupan sehari-hari. Setiap orang pasti pernah mengalami keadaan yang disebut sebagai stres. Dalam hubungan dengan konteks kehidupan kita, stres berarti keadaan yang merupakan akibat uji atau ancaman terhadap kapasitas adaptif kita, sesuatu yang mengganggu keseimbangan dinamik atau homeostatik tubuh kita.¹ Berbagai hal yang dapat menyebabkan terjadinya stres disebut stresor.^{2,3,4}

Pada berbagai studi hewan percobaan didapatkan bahwa stresor yang diberikan dapat menyebabkan gangguan fungsi sistem imun tubuh terutama respon imun seluler.¹ Gangguan respon imun seluler tersebut dapat berupa respon imun spesifik proliferasi limfosit atas pengaruh mitogen, penurunan kemampuan fagositosis makrofag, perubahan keseimbangan Th1 dan Th2, sekresi sitokin dan ekspresi reseptor sitokin.¹ Pada penelitian dengan

menggunakan stresor berupa kejutan pada hewan percobaan terjadi penurunan aktivitas limfosit, meningkatkan kadar hormon kortikosteroid, dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit infeksi virus.⁵ Pada penelitian lain didapatkan bahwa stres dapat mensupresi sirkulasi T cell dalam tubuh.

Pada manusia stres dapat mempengaruhi sistem pertahanan tubuh dan meningkatkan kerentanan terhadap penyakit dan infeksi.¹ Dalam penelitian ini digunakan stresor berupa alat *electric foot shock* karena intensitasnya dapat terukur dengan tepat, penjalaran arus listrik dari kaki ke seluruh tubuh dan pemulihan setelah renjatan tidak ada efek ikutan.³

Listeria monocytogenes merupakan bakteri intraseluler yang banyak digunakan sebagai model dalam mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan menghindari mekanisme bakterisidal oleh makrofag. Pada manusia, bakteri ini menyebabkan meningo-encephalitis.⁶

Fungsi limfosit secara umum adalah mengatur dan bekerja sama dengan sel-sel lain dalam sistem retikuloendotelial untuk menimbulkan respon imun spesifik. Didalam jaringan limfoid primer (sentral), limfosit berproliferasi dan berdiferensiasi tanpa ketergantungan pada antigen. Dua organ yang merupakan organ limfoid primer adalah kelenjar timus dan sumsum tulang disanalah terjadi proses pematangan limfosit-T dan limfosit-B. Sedangkan dalam jaringan limfoid sekunder (perifer), limfosit tersensitisasi berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor serta menyusun sel yang memproduksi antibodi atas rangsangan antigen. Beberapa organ limfoid sekunder yaitu lien, kelenjar limfe dan *MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue)* juga *SALT (Skin Associated Lymphoid Tissue)*.^{7,8,9}

Disisi lain ada imunopotensiator yang telah banyak dipelajari untuk menambah reaktivitas imunologis. Imunopotensiator tersebut adalah *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan yaitu strain *Bacillus Calmette-Guerin (BCG)*.^{10,11,12} BCG dapat mengubah beberapa komponen respon imun, mengubah beberapa tipe sel dan mendorong efek positif (stimulasi) atau efek negatif (inhibisi) tergantung pada sistem imunitas dan bagaimana menggunakannya.¹³ Vaksinasi BCG tidak hanya memacu respon imun yang diperantarai sel T saja tetapi juga

meningkatkan kemampuan sel T dalam bereaksi terhadap antigen BCG dengan meningkatkan jumlah limfosit.

Secara

invitro BCG akan meningkatkan limfosit T CD4+ yang terbukti dengan didapatinya dalam jumlah banyak sel-sel blast CD4+ dalam kultur.ⁱ Puncak proliferasi limfosit terjadi 2 minggu setelah vaksinasi.¹⁴ Djamiatun dkk melaporkan pemberian 0,1 cc BCG produksi Biofarma dengan booster 10 hari berikutnya dengan dosis sama pada mencit BALB/c akan meningkatkan secara bermakna kemampuan fagositik dan daya bunuh makrofag limpa terhadap *Staphylococcus aureus*, disamping itu juga terjadi peningkatan produksi TNF- α dari makrofag peritoneal.¹⁵

Penelitian ini berusaha menjelaskan seberapa jauh vaksinasi BCG dapat mempengaruhi proliferasi limfosit pada mencit yang mendapat stress renjatan listrik. Pada penelitian ini dilakukan infeksi dengan organisme *Listeria monocytogenes* yang telah banyak dijadikan model dalam bereksperimen untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Kunci utama mekanisme ini adalah limfosit T yang tersensitisasi dan makrofag yang teraktivasi.^{16,17}

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian.¹⁸ Sampel penelitian ini adalah 24 ekor mencit yang didapat dari PUSVETMA (=Pusat Veterinaria Farma) Surabaya. Untuk menghindari bias dalam penelitian dilakukan kontrol hal-hal berikut:¹⁹ faktor keturunan mencit (diambil mencit yang secara genetik sifatnya sama, yaitu mencit jenis BALB/c, umur

mencit (6-8 minggu), jenis kelamin (betina), berat badan sebelum percobaan (21,88 \pm 1,75 gram) penempatan kandang (ditempatkan pada tempat yang sama dan dikandangkan secara individual), kebersihan (frekuensi dan kualitas pembersihan dilakukan sama untuk tiap mencit), cara pemberian makanan (pada jam-jam yang sama dengan berat yang sama secara *adlibitum*), faktor kesehatan (mencit harus sehat), begitu pula dengan ventilasi

dan pencahayaan diperlakukan sama, semua mencit diberi pakan standar. Mencit kemudian dibagi menjadi 4 kelompok acak. Pada kelompok Kontrol, mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok EFS mendapatkan stres dengan electrical foot shock mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Dan kelompok EFS + BCG mendapat injeksi 0.1cc BCG secara intraperitoneal pada hari ke-1 dan ke-11 dan stres dengan electrical foot shock mulai hari ke-12 sampai hari ke-21. Pada hari ke-21 semua kelompok diinjeksi 0.1cc secara intravena dengan $10^{5.5}$ *Listeria monocytogenes* hidup ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Semua mencit dibunuh dengan pembiusan chloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher pada hari ke-26.

Lien diambil secara aseptis untuk penghitungan limfoblas dan limfosit serta dilakukan penimbangan dengan timbangan elektronik. Lien dihancurkan menggunakan pinset. Kemudian dengan menggunakan pipet Pasteur, suspensi dipindahkan ke tabung pemusing untuk dilakukan isolasi splenosit. Sel-sel dihitung menggunakan hemacytometer (limfosit/cc). Buat sediaan hapus dan dilakukan pengecatan Giemsa. Pembacaan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan cara menghitung jumlah limfoblas dari 200 sel (limfosit+limfoblas) pada area homogen.

Analisa terhadap variabel-variabel penelitian ini distri businya normal maka memakai parameter uji One-Way ANOVA. Dilakukan tes homogenitas hasilnya homogen maka dilanjutkan Post Hoc Test Bonferroni. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 13.00 for Windows.^{20,21,22} Nilai kemaknaan pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Cara melihat proliferasi limfosit dilakukan penghitungan jumlah limfoblas per 200 sel (limfosit+limfoblas). Pada penelitian ini didapatkan jumlah limfoblas paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapatkan vaksinasi BCG yaitu sebesar $(52,83 \pm 4,35)$ limfoblas per 200 sel. Sedangkan jumlah limfoblas paling rendah didapatkan pada kelompok EFS $(31,33 \pm 15,07)$ limfoblas per 200 sel. Setelah dilakukan analisa statistik dengan

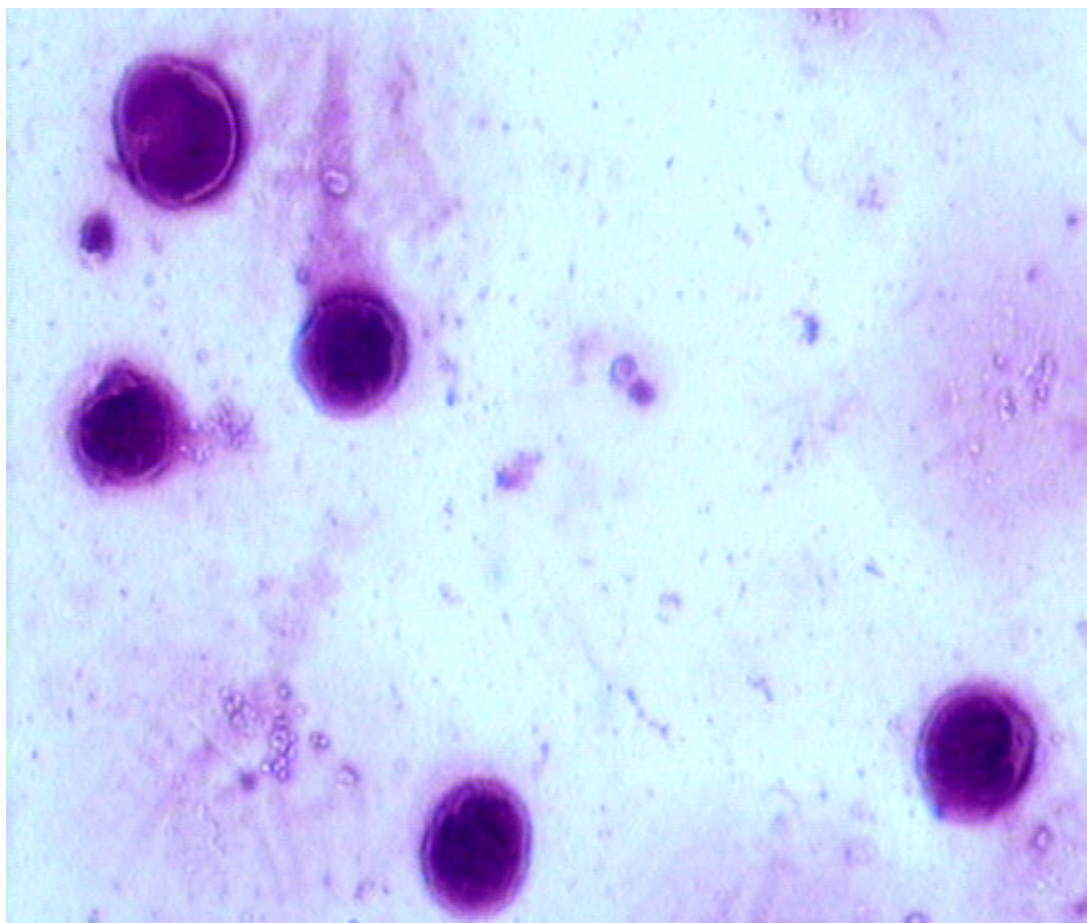
menggunakan parameter uji Anova ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,009$) jumlah limfoblas per 200 sel. Perbedaan jumlah limfoblas per cc antar kelompok percobaan dianalisis lebih lanjut dengan Post Hoc Test Bonferroni seperti yang tersaji dalam (tabel 2) dan hasil variabilitas pengukurannya terdapat pada (gambar 1.)

Tabel 1. Hasil Perhitungan Parameter Proliferasi Limfosit.

Kelompok Percobaan		N	Rerata	Simpang Baku	F	P
Jumlah Limfoblas	KONTROL	6	37,00	16,44	5,088	0,009 *
	EFS	6	31,33	15,07		
	BCG	6	52,83	4,35		
	EFS+BCG	6	52,50	6,89		

* Bermakna

one way anova

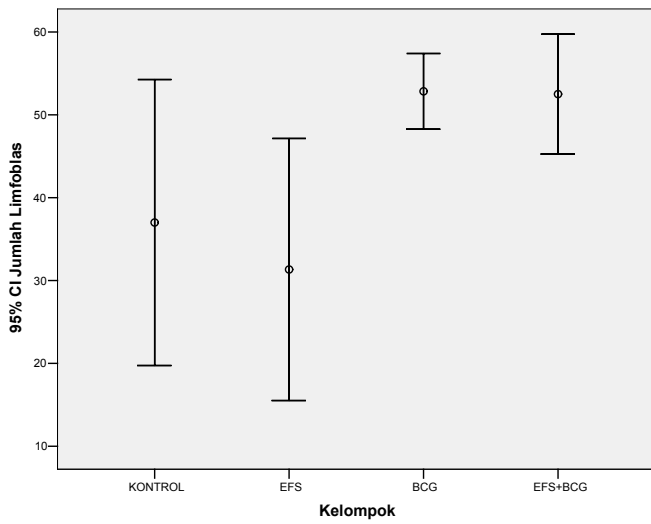


Tabel 2. Hasil Post Hoc Test Bonferroni Parameter Proliferasi Limfosit Antar Kelompok Perlakuan.

POST HOC TEST BONFERRONI		KONTROL	BCG	EFS	EFS + BCG	RERATA
Jumlah Limfoblas	KONTROL	-	p= 0,190	p= 1,000	p= 0,210	-
	BCG	p= 0,190	-	p= 0,031*	p= 1,000	21,500*
	EFS	p= 1,000	p= 0,031*	-	p= 0,035*	-21,500*,-21,167*
	EFS+BCG	p= 0,210	p= 1,000	p= 0,035*	-	21,167*

* Bermakna

Apabila jumlah limfoblas kelompok EFS dibandingkan dengan Kontrol maka tidak didapatkan perbedaan ($p=1,000$) tetapi berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok BCG ($p=0,031$) dan EFS+BCG ($p=0,035$). Jumlah limfoblas pada kelompok EFS+BCG didapatkan sebesar ($52,50 \pm 6,89$) limfoblas per 200 sel yang berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok EFS ($p=0,035$) tetapi tidak berbeda dengan kelompok KONTROL ($p=0,210$) dan BCG ($p=1,000$). Didapatkan jumlah limfoblas lebih rendah pada kelompok mencit BALB/c yang diberi stres tanpa vaksinasi BCG dibanding yang mendapat vaksinasi BCG dan perbedaan bermakna.



Gambar 1. Grafik Variabilitas Hasil penghitungan limfoblas per 200 sel.

PEMBAHASAN

Rendahnya jumlah limfoblas pada kelompok EFS ini dapat diterangkan dari beberapa hasil penelitian yang mendapatkan bahwa stres akan menekan proliferasi limfosit yang distimulasi mitogen untuk sel B dan T. Sedangkan tingginya proliferasi limfosit pada kelompok BCG dapat diterangkan dari penelitian yang menyatakan bahwa vaksinasi BCG tidak hanya memacu respon imun yang diperantarai sel T saja tetapi juga meningkatkan kemampuan sel T dalam beraksi terhadap antigen BCG dengan meningkatkan jumlah limfosit. Secara invitro BCG akan meningkatkan limfosit T CD4+ yang terbukti dengan didapatinya dalam jumlah banyak sel-sel blas CD4+ dalam kultur.¹⁵ Proliferasi limfosit terjadi 2 minggu setelah vaksinasi.¹⁴

Dalam keadaan inflamasi, proliferasi limfosit dapat meningkatkan berat lien. Dalam penelitian ini semua mencit diinokulasi dengan *Listeria monocytogenes* sehingga terjadi reaksi inflamasi.

Melihat hal tersebut bahwa pemberian vaksinasi BCG pada kelompok mencit yang mendapatkan stres akan menyebabkan rerata hasil penghitungan proliferasi limfositnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapatkan stres saja sehingga tampaknya BCG dapat

mempengaruhi proliferasi limfosit yang tertekan akibat stres.

SIMPULAN

Pengaruh stres menekan proliferasi limfosit pada mencit BALB/c. Upaya penggunaan BCG dapat meminimalkan efek tersebut dengan meningkatkan proliferasi limfosit yang tertekan akibat stres.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Dosen pembimbing dan konsultan. Kepala dan Staf Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Kepala dan Staf Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Kepala dan Staf Laboratorium Kesehatan Semarang atas bantuan dan kesempatan yang diberikan untuk menggunakan fasilitas laboratorium atas terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja,KG.Imunologi Dasar.Edisi5.Jakarta.Balai Penerbitan FKUI.2002:59-62,190-192
2. Rice,Phillip L.Stress And Health:Principle and practice for coping and wellness.Califonia.Brooks/Cole Publishing Company asific Grove.1984:20-21,50-51
3. Koehler,Hannah.Stress and immune system.[on line] URL:
<http://www.econ.uiuc.edu/~harco/bio/stress.html>.1994
4. Dohm,J.E.Metz,A.Stress mechanism of immunosuppression.Vet immunolimmunopathol.1991 nov;30 (1):89-109
5. Soebowo.Imunobiologi.Bandung.Angkasa.1993
6. Jawetz E,Melnick JL,Adelberg E.A.brook GF,Butel Js,Orsntor LN.Microbiologi Kedokteran.Editor:Irawati S.Edisi 20.Jakarta:EGC.1996:243-245
7. Karnen GB. Imunologi dasar ed 2, Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1991.

8. Suromo Lisyani. *Imunologi dasar. Patologi Klinik I jilid II*. Semarang: Bagian patologi klinik Universitas Diponegoro, 2005. pp 45-48.
9. Guyton Arthur C, Hall Jhon E. *Fisiologi Kedokteran*. 9th ed. Jakarta: EGC, 1996: 555-566.
10. Shanahan JF. *Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology*. 9th ed. Missouri: Mosby Yearbook, 1994:321-30.
11. Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM. *Zinsser microbiology*. 19th ed. New York Prentice Hall International, 1993.
12. Male D. *Immunology*. 2nd ed. London: Gower Medical Publication, 1993:49-54.
13. Lowry PW, Ludwig TS, Adams JA, Fitzpatrick ML, Grant SM, Andrle GA, Offerdahl MR, Cho SN, Jacobs DR Jr. Cellular Immune responses to four doses of percutaneous baccile Calmette-Guerin in healthy adults. *J Infect Dis* 1998 Jul;178(1):138-46.
14. Yaqoob P, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines. *Cytokines* 1995;7:548-53.
15. Djamiatun K, Dharmana E, Kristina T, Indar R. Pengaruh Vitamin A dan BCG pada Produksi TNF- α dan aktivitas fagositik Makrofag Terhadap Staphylococcus Aureus. Laporan Akhir Tahun I Risbin Iptekdok, 1998.
16. Ryan JL. Bacterial Disease. Dalam. Stites DP, Terr Al eds. *Basic and Clinical Immunology*. 8 ed. Connecticut: Appleton & Lange. 1994: 627-36.
17. Hokama Y, Nakamura RM. *Immunology and immunopathology basic concepts*. 1st ed. Boston: Little, Brown and Company. 1982.
18. Pratiknya AW. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan*. Cetakan I. Jakarta: CV Rajawali, 1986: 147-65.
19. Hadi Sutrisno. *Metodologi Research jilid 4*. edisi ke-8. Yogyakarta: Andi Offset. 1995:433-36.
20. Santosa Singgih. *SPSS (Statistical Product and Service Solution)*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.

1999:300-80.

21. Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA COMPUTER Semarang. Panduan Lengkap: SPSS 6.0 for Windows. Semarang: Wahana Komputindo & Andi Offset. 1997:123-88, 380-85.
22. Chandra Budiman. Pengantar Staistik Kesehatan. Jakarta: EGC, 1995: 1-96.
