

Suloko
Augustus
WAL
f c

DIK RUTIN



LAPORAN KEGIATAN

**PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI DOSIS SENG
TERHADAP RESPON PROLIFERASI LIMFOSIT MENCIT
BALB/C YANG DIINOKULASI *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Oleh :

Dr. Hartati Eko Wardani
Dr. Tri Indah Winarni
Dr. Diana Nurhayati, MKes

Dibiayai dengan dana DIK Rutin Universitas Diponegoro Tahun Anggaran 2004 sesuai dengan Perjanjian Tugas Pelaksanaan Penelitian Para Dosen Universitas Diponegoro, Nomor :1269a/J07.11/PG/2004, Tanggal 5 Mei 2004

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
OKTOBER 2004**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DIK RUTIN**

1. a. Judul : Pengaruh Pemberian Berbagai Dosis Seng Terhadap Respon Proliferasi Limfosit Mencit Balb/C Yang Diinokulasi *Salmonella typhimurium*
b. Kategori : I (Pengembangan IPTEKS)
2. Ketua Peneliti
a. Nama Lengkap dan Gelar : dr. Hartati Eko Wardani
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. Pangkat/ Golongan/NIP : III/a, 132 255 162
d. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
e. Fakultas/Jurusan : Kedokteran
f. Universitas : UNIVERSITAS DIPONEGORO
g. Bidang Ilmu yang diteliti : Kesehatan
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Bioteknologi, Mikrobiologi dan Biokimia UNDIP
5. Bila penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan
a. Nama Instansi : -
b. Alamat : -
6. Jangka Waktu penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya yang diperlukan : Rp. 3.000.000,00 (Tiga Juta Rupiah)

Semarang, 30 Oktober 2004

Ketua Peneliti



dr. Hartati Eko Wardani
NIP. 132 255 162

Mengetahui
Dekan FK UNDIP



dr. Kabulrachman, SpKK(K)
NIP. 130 354 867

Menyetujui,

Ketua Lembaga Penelitian UNDIP



Prof. Dr. I. Riwanto, SpBD
NIP. 130 529 454

ii

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	403/KI/ER/1e
gl.	6 April 2005

RINGKASAN

PENGARUH PEMBERIAN BERBAGAI DOSIS SENG TERHADAP RESPON PROLIFERASI LIMFOSIT MENCIT BALB/C YANG DIINOKULASI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

(Hartati Eko Wardani, Tri Indah Winarni, Diana Nurhayati, 2004, 25 halaman)

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

Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui mekanisme respon imun yang terjadi pada demam tifoid manusia, misalnya dengan cara menginfeksi hewan coba, seperti mencit, dengan *S. typhimurium*. Gejala dan perjalanan penyakit yang tampak pada mencit terinfeksi *S. typhimurium* analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia. Untuk itu inokulasi *S. typhimurium* pada mencit dapat diterima secara luas sebagai model eksperimental untuk demam tifoid manusia.

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

Seng adalah salah satu mineral yang mempunyai efek positif terhadap sistem imun, antara lain sebagai inhibitor apoptosis, mengaktifkan hormon timulin, dan menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK. Studi in vitro membuktikan bahwa seng dapat memacu produksi IL-1 β , IL-6, IFN- γ , dan TNF- α oleh monosit.

Pemberian seng dosis tinggi dan/ atau jangka panjang juga dapat menurunkan respon imun tubuh, antara lain menurunkan kadar IFN- α , konsumsi oksigen oleh neutrofil, serta aktivitas NADPH oksidase dan enzim iNOS, yang kesemuanya akan dapat menurunkan kemampuan fagositik dan bakterisidal fagosit. Melalui penekanannya terhadap mineral-mineral lain, seperti besi dan tembaga, seng juga dapat menekan sistem

imun. Defisiensi besi dapat menurunkan fungsi lekosit PMN, jumlah limfosit, aktivitas sel NK, dan produksi IL-2 oleh limfosit, sedangkan defisiensi tembaga dapat menurunkan produksi timulin, dan aktivitas mikrobisidal fagosit, dan sitotoksisitas sel NK.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis seng 30 mg/kg (ppm), 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinokulasi *S. typhimurium*, khususnya terhadap respon proliferasi limfosit.

Penelitian ini menggunakan rancangan *post-test only control group design*. Subjek penelitian berupa 40 ekor mencit Balb/C jantan umur 8 – 10 minggu, berat badan 20-40 gram, dari Laboratorium Bioteknologi PAU UGM Yogyakarta. Subjek diadaptasikan selama 1 minggu, dibagi secara acak menjadi empat kelompok, sesuai dosis seng pada pakan, yaitu kelompok dosis 30, 60, 120, dan 240 ppm. Pakan diberikan secara *ad libitum* selama 10 hari. Mencit diinfeksi dengan 3×10^4 *S. typhimurium* intraperitoneal pada hari ke-8. Mencit dibunuh pada hari ke-11 untuk diperiksa respon proliferasi limfosit di organ lien (dinilai dari berat lien dan jumlah relatif limfoblast). Variabel dianalisis dengan *one way Anova* dan *Post Hoc LSD*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa berat lien mencit yang diberi seng dosis tinggi tidak berbeda bermakna dengan yang diberi seng dosis normal ($p = 0,303$) dan jumlah relatif limfoblas mencit yang diberi seng dosis tinggi tidak berbeda bermakna dengan yang diberi seng dosis normal ($p=0,231$). Kesimpulannya, pemberian seng dosis tinggi pada mencit Balb/C yang diinokulasi *S. typhimurium* tidak memperbaiki respon proliferasi limfosit mencit.

Penelitian ini mempunyai banyak kelemahan baik pada desain penelitian maupun variabel yang perlu diteliti. Untuk itu perlu dilakukan penelitian-penelitian lanjutan dan perbaikan pada desain, antara lain :

1. Pengambilan sampel perlu dilakukan pada fase ke-4 (*fase clearance*) post infeksi.
2. Pemberian pakan per sonde untuk memastikan asupan seng mencit
3. Penelitian kadar mineral seperti seng, tembaga dan besi; kadar hormon timulin darah.

SUMMARY

THE EFFECT OF VARIOUS DOSAGES OF ZINC SUPPLEMENTATION ON LYMPHOCYTE PROLIFERATION RESPONSE OF BALB/C MICE INOCULATED BY *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

(Hartati Eko Wardani, Tri Indah Winarni, Diana Nurhayati, 2004, 25 pages)

Typhoid fever disease, nowadays has been a serious health problem especially in developing countries. Body has immunity system to overcome incoming foreign antigens, including *Salmonella typhi*, a bacteria to cause typhoid fever. The effective immunity system in eliminating intracellular bacteria like *S. typhi* is spesific cellular immunity system.

Many researches have been conducted to find out tho ongoing immunity response mechanism in typhoid fever, for instance by infecting experiment animal like mice with *S. typhimurium*. The symptoms and patogenecities seen in *S. typhimurium* infected mice are analogue with typhoid fever caused by *S. typhimurium* in human. Therefore, the inoculation of *S. typhimurium* on mice can be accepted widely as experimental model for human typhoid fever.

S. typhimurium infection to mice activates majority of TCD4⁺ and TCD8⁺ cells, however, the proliferation and expansion increase slightly. If the T lymphocyte proliferation is low, sitokins produced (especially IFN- γ) will not be enough to activate macrophage, therefore the phagocytosis and killing ability toward *S. typhimurium* or *S. typhi* decrease. This is why typhoid fever patients is not only given antibiotic therapy but also additional supplement beneficial for immunity system.

Zinc is one of minerals which has positive effect on immunity system, like becoming apoptosis inhibitor, activating timulin hormone, and stimulating the production of IFN- γ on NK cells. In vitro studies proved that zinc zinc can stimulate the production of IL-1 β , IL-6, IFN- γ , and TNF- α on monocyte.

High dosage and / or zinc supplémentation also can decrease the body immunity response, such as decreasing IFN- α concentration, oxygen consumption in neutrofil, and the activity of NADPH oxidase and iNOS enzymes. The forementioned can decrease the phagocytic and bactericidal ability of phagocyte. When pressing other minerals, like iron and copper, zinc can also press immunity system. Iron deficiency can lower the function of PMN leucocyte, number of lymphocyte, NK cell activity, and IL-2 production of

lymphocyte, while copper deficiency can lower timulin hormone, phagocyte microbicidal activity, and NK cell cytotoxicity.

The objective of the research is to find out the effect of various dosages of zinc supplementation : 30, 60, 120, and 240 ppm on cellular immunity response of Balb/C mice inoculated by *S. typhimurium* especially to their lymphocyte proliferation response.

This research uses post-test only control design. The subjects of research are 40 male Balb/C mice aged 8 – 10 weeks, weighed 20 – 40 grams, which were obtained from Biotechnology Laboratory of PAU UGM Yogyakarta. Subjects were adapted for a week, then divided randomly into four groups based on the zinc dosage contained in their food that are 30, 60, 120, and 240 ppm. The food was given ad libitum for 10 days. The mice were infected with 3×10^4 *S. typhimurium* intraperitoneally on the 8th days. The mice were killed on the 11th day to be examined their lymphocyte proliferation response in lien (which is measured by the lien weight and the relative amount of lymphoblast). Variables were analyzed with one way Anova Post Hoc LSD.

The finding of this research shows that the lien weight of mice given with high dosage zinc does not have significant difference from that given normal dosage zinc ($p=0,303$) and the relative amount of lymphoblast of the mice given high dosage zinc does not have significant difference from that with normal dosage ($p 0,231$). The conclusion is, high dosage zinc supplementation to Balb/C mice inoculated by *S. typhimurium* does not repair their lymphocyte proliferation response.

This research has many shortcomings either in research design or variables neede to be observed. Therefore, it is necessary to do advanced researches and design improvement such as :

1. Sample choosing needs to be performed at 4th phase (clearance phase) post infection
2. Feeding tube is necessary to be used to ensure zinc intake of mice
3. Research about minerals quantity such as zinc, iron, and copper; and about timulin hormone quantity.

PRAKATA

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

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan pada staf pengajarnya untuk melakukan penelitian.
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro yang telah membiayai penelitian ini dengan memberikan dana DIK Rutin .
3. dr. Edi Dharmana, PhD dan Dr. dr. Hertanto WS yang senantiasa memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penelitian ini.
4. Kepala Laboratorium Biokimia, Bioteknologi, dan Mikrobiologi Universitas Diponegoro beserta staf yang telah membantu dan memberikan kesempatan bagi penulis untuk memanfaatkan fasilitas laboratorium dalam pelaksanaan penelitian.
5. Semua pihak yang tak dapat disebutkan satu persatu.

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

Semarang, Oktober2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	iii
PRAKATA.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
IV. METODE PENELITIAN.....	10
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
VII. DAFTAR PUSTAKA.....	24
VIII. LAMPIRAN.....	26

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sisa Pakan Mencit	15
Tabel 2. Tabel Rata-Rata Asupan Pakan Per Mencit Per Hari	16
Tabel 3. Rata-rata Asupan Seng Mencit Per Hari	16
Tabel 4. Tabel Deskripsi Asupan Seng Mencit	17
Tabel 5. Tabel Uji <i>Post Hoc LSD</i> terhadap Asupan Seng	18
Tabel 6. Tabel Deskripsi Berat Lien	19
Tabel 7. Tabel Deskripsi Jumlah Limfosit	20
Tabel 8. Uji <i>Mann Whitney</i> terhadap Jumlah Limfosit	21
Tabel 9. Tabel Deskripsi Jumlah Relatif Limfoblas	22

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Diagram Boxplot Asupan Seng Mencit	17
Gambar 2. Diagram Boxplot Berat Lien	18
Gambar 3. Diagram Boxplot Jumlah Limfosit	20
Gambar 4. Diagram Boxplot Jumlah Relatif Limfoblast	22

DAFTAR LAMPIRAN

1. Lampiran Data
2. Lampiran Statistik

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Penyakit demam tifoid sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang serius terutama di negara-negara berkembang. Penyakit yang disebabkan oleh kuman *Salmonella typhi* ini dapat menyebabkan perdarahan dan perforasi usus, bahkan menimbulkan komplikasi seperti hepatitis, meningitis, nefritis, miokarditis, bronchitis, pneumonia, osteomielitis, parotitis, dan lain-lain. Pemakaian antibiotika yang tepat memang dapat menekan kejadian komplikasi ini, namun angka kejadian demam tifoid yang relaps dan resisten terhadap antibiotik makin banyak di beberapa negara endemis. Sekitar 3-5% penderita biasanya menjadi karier asimtomatik dalam jangka waktu yang lama.¹

Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara *host* dan mikroba. Tubuh mempunyai sistem imun dalam mengatasi antigen asing yang masuk, termasuk *S. typhi*, yang merupakan kuman batang bergerak, gram negatif, dan bersifat fakultatif intraseluler.¹ Mekanisme respon imun tersebut meliputi sistem imun alami / non spesifik dimana sel-sel fagosit sangat berperan, dan sistem imun spesifik. Sistem imun spesifik yang efektif dalam mengeliminasi *S. typhi* adalah sistem imun spesifik seluler. Mekanisme sistem imun seluler terdiri dari (1) *killing* mikroba yang terfagositosis sebagai hasil dari aktivasi makrofag oleh sitokin-sitokin limfosit T (terutama IFN- γ) dan (2) lisis sel yang terinfeksi oleh CD8⁺ CTLs².

Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui mekanisme respon imun yang terjadi pada demam tifoid manusia, antara lain dengan cara menginfeksi hewan coba, seperti mencit, dengan *S. typhimurium*. Hal ini disebabkan karena gejala dan perjalanan penyakit yang tampak pada mencit terinfeksi *S. typhimurium* analog dengan

demam tifoid yang disebabkan oleh *S. typhi* pada manusia. Untuk itu inokulasi *S. typhimurium* pada mencit dapat diterima secara luas sebagai model eksperimental untuk demam tifoid manusia³.

Infeksi *S. typhimurium* pada mencit dapat menginduksi aktivasi limfosit baik TCD4 maupun TCD8 dengan kuat, namun proliferasi dan ekspansinya hanya meningkat sedikit. Bila proliferasi limfosit T rendah, maka sitokin-sitokin yang dihasilkannya (terutama IFN- γ) tidak cukup banyak untuk mengaktivasi makrofag, sehingga kemampuan fagositosis dan *killing* makrofag terhadap *S. typhi* akan menurun.³ Inilah yang menjadi alasan mengapa penderita demam tifoid disamping diberi terapi antibiotika perlu diberi suplemen tambahan.

Salah satu suplemen yang mempunyai efek positif terhadap sistem imun adalah seng. Berbagai penelitian telah membuktikan tentang efek positif seng terhadap sistem imun, antara lain sebagai inhibitor apoptosis sel, mengaktifkan hormon timulin (hormon yang diperlukan untuk diferensiasi, proliferasi dan maturasi limfosit T) dan menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK (sitokin yang diperlukan untuk mengaktivasi makrofag). Untuk itulah seng banyak dipakai sebagai terapi preventif maupun kuratif untuk penyakit-penyakit infeksi.^{4,5,6} Gaworski dan Sharma membuktikan bahwa pemberian seng 250 ppm (5 kali dosis optimal seng untuk mencit) per hari lewat makanan selama satu bulan pada mencit secara bermakna dapat meningkatkan respon limfosit terhadap PHA dan *pokeweed mitogen*.⁷

Namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian seng dosis tinggi dan/atau jangka panjang dapat menurunkan respon imun tubuh.⁸ Mekanisme penurunan respon imun tersebut dapat terjadi secara langsung, maupun tidak langsung, yaitu melalui interaksinya dengan mineral-mineral lain, seperti besi dan tembaga. Sementara telah

diketahui, bahwa besi dan tembaga juga mempunyai efek terhadap sistem imun. Bila terjadi penekanan terhadap absorpsi mineral tersebut, maka sistem imun juga akan terganggu.^{9,10} Pemberian seng pada 11 laki-laki dewasa sebanyak 300 mg/hari (20 kali RDA) selama 6 minggu menyebabkan penurunan respon limfosit terhadap PHA dan penurunan kemotaksis dan fagositosis PMN di sirkulasi.¹¹

Hasil penelitian tentang efek pemberian seng terhadap respon imun yang masih kontroversial tersebut menimbulkan kekhawatiran, apakah pemberian suplemen seng sebagai terapi demam tifoid justru akan menurunkan respon imun seluler penderita dibandingkan dengan yang tidak diberi suplemen. Sebagai langkah awal, peneliti ingin mencari efek pemberian seng pada mencit yang diinfeksi *S. typhimurium* terhadap respon imun selulernya. Untuk itu, pada penelitian ini akan dicari pengaruh pemberian seng melalui makanan dengan berbagai dosis terhadap respon imun seluler mencit Balb/C yang diinokulasi *S. typhimurium*.

B. PERUMUSAN MASALAH

Apakah pemberian makanan dengan dosis seng 30 mg/kg (ppm), 60 ppm, 120 ppm, dan 240 ppm dapat mempengaruhi respon imun seluler mencit Balb/C yang diinokulasi *S. typhimurium*?