



LAPORAN PENELITIAN

PENGARUH DIET MINYAK IKAN KAYA OMEGA-3 TERHADAP RESPON KEKEBALAN TUBUH SERTA UPAYA PENGGUNAAN BCG UNTUK MENGATASI EFEK NEGATIF YANG DITIMBULKANNYA

Oleh:

dr. DWI PUDJONARKO, M.Kes
dr. NENI SÜSILANINGSIH, M.Si
dr. HERMINA SUKMANINGTYAS, M.Kes

**Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Lanjutan
Nomor: 16/ P2IPT/ DPPM/ PHBL/ III/ 2004 Tanggal 1 Maret 2004**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
NOVEMBER 2004**

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR PENELITIAN HIBAH BERSAING XI

A. Judul Penelitian : PENGARUH DIET MINYAK IKAN KAYA OMEGA-3 TERHADAP RESPON KEKEBALAN TUBUH DAN UPAYA PENGGUNAAN BCG UNTUK MENGATASI EFEK NEGATIF YANG DITIMBULKANNYA.

B. Ketua Peneliti
 a. Nama lengkap dan gelar : dr. Dwi Pudjonarko, M Kes.
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 c. Gol/ pangkat dan NIP : IIIc/ Penata, NIP: 132 137 931
 d. Bidang Keahlian : Imunologi
 e. Fakultas/ jurusan : Kedokteran/ Umum
 f. Perguruan Tinggi : Universitas Diponegoro

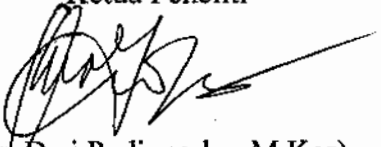
C. Tim Peneliti


| NO | NAMA | KEAHLIAN | FAKULTAS/ JURUSAN | PERGURUAN TINGGI |
|----|------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| 1. | Dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes | Imunologi | Kedokteran/ umum | Universitas Diponegoro |
| 2. | Dr. Neni Susilaningsih, M.Si | Imunologi/ Histologi | Kedokteran/ umum | Universitas Diponegoro |
| 3. | Dr. Hermina S, M.Kes | Imunologi | Kedokteran/ umum | Universitas Diponegoro |

D. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun
 Biaya yang diperlukan
 Sumber dari Dikti : Rp 70.000.000,-
 Sumber lain : -
 Total biaya : Rp 70.000.000,-
 (Tujuh Puluh Juta Rupiah)

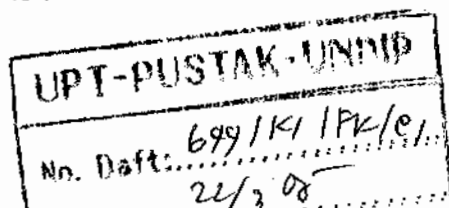
Semarang 1 November 2004

Ketua Peneliti


 (dr. Dwi Pudjonarko, M Kes)
 NIP. 132 137 931


 Mengetahui
 Kepala Fakultas Kedokteran
 Universitas Diponegoro
 dr. Kab. Alrachman, SpKK(K)
 NIP. 130 354 867


 Menyetujui
 Ketua Lembaga Penelitian
 Universitas Diponegoro
 dr. I. Riwanto, SpB, SpBD
 NIP. 130 529 454



RINGKASAN

Minyak ikan kaya omega-3 banyak digunakan sebagai suplemen makanan pada orang-orang tua terutama untuk penderita rematoid arthritis dan penyakit-penyakit kardiovaskuler. Meskipun ada keuntungannya tetapi dilaporkan juga bahwa penggunaan minyak ikan kaya omega-3 dalam jangka waktu tertentu dapat menurunkan respon imunitas seluler. Disisi lain ada imunostimulator yaitu BCG yang sudah biasa digunakan dan terbukti dapat meningkatkan respon imunitas seluler melalui respon tipe I. Penelitian ini berusaha membuktikan adanya perbedaan respon imunitas seluler pada mencit dengan diet minyak ikan yang mendapat vaksinasi BCG dan yang tidak mendapat vaksinasi BCG. Pada tahun pertama, respon imunitas seluler dilihat dari proliferasi limfosit, aktivitas makrofag (yang diukur dari jumlah jimfosit T yang berikatan dengan makrofag dan konsentrasi produksi NO makrofag) serta hasil hitung kuman dari organ hepar (cfu/ gram), sedangkan pada tahun kedua dinilai perbedaan konsentrasi IFN- γ makrofag, konsentrasi IFN- γ limfosit, kemampuan fagositosis makrofag dan *survival* pada mencit tua yang telah mengalami immunosenescence.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *The Post Test – Only Control Group Design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai objek penelitian. Sampel penelitian pada tahun kedua adalah 72 ekor mencit jantan strain BALB/c, umur 12-13 bulan, dengan berat badan rata-rata 30 gram, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Sampel dibagi menjadi 2 bagian besar yaitu untuk penelitian laboratoris sebanyak 24 ekor (seperti dilakukan juga pada penelitian tahun pertama) dan untuk pengamatan *survival* sebanyak 48 ekor. Masing-masing bagian dibagi menjadi 4 kelompok percobaan dengan rancangan acak lengkap (*Completely Randomized Design*), randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Semua mencit mendapatkan makanan standar. Pada Kelompok Kontrol (K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (BCG) divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-14 dan ke-24. Kelompok Minyak Ikan (MI) mendapat diet 5% minyak ikan kaya ω -3, sedangkan kelompok Minyak Ikan + BCG (MB) mendapat diet 5% minyak ikan kaya ω -3 dan divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-14 dan ke-24. Pada hari ke-28, mencit disuntik secara intravena dengan 10^4 *Listeria monocytogenes* hidup sedangkan yang diamati untuk *survival* disuntik secara intravena dengan 10^6 *Listeria monocytogenes* hidup yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Mencit dibunuh dengan pembiusan

chloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher pada hari ke-33, sedangkan kelompok *survival* terus diamati sampai hari ke 28.

Hepar mencit diambil secara aseptis untuk penghitungan kuman dalam cfu/ gram. Penghitungan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada media *blood agar* setelah inkubasi gerusan hepar selama 24 jam. Penggerusan hepar dilakukan dengan *grinder* dan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan NaCl 0,9% untuk ditanam dalam media *blood agar*. Penghitungan koloni yang tumbuh dilakukan dengan menggunakan *Colony Counter*.

Lien juga diambil secara aseptis untuk penghitungan limfoblas dan limfosit. Lien dihancurkan menggunakan pinset. Kemudian dengan menggunakan pipet Pasteur, suspensi sel dipindah ke tabung pemusing. Setelah sel-sel yang menggumpal mengendap selama 5 atau 6 menit, suspensi sel dipindahkan ke tabung lain dan dipusingkan sel pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml lysing buffer pada suhu ruang (+25°C) untuk melisis eritrosit, lalu dipusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pellet dicuci 2x dengan RPMI untuk selanjutnya dipusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Sel-sel dihitung menggunakan hemacytometer (limfosit/ cc) sehingga didapatkan jumlah 3×10^7 sel/ml. Teteskan 1 tetes pada object glass, untuk dibuat sediaan hapus, keringkan di udara. Fiksasi dengan metanol. Cat dengan Giemsa. Baca dengan mikroskop cahaya, hitung jumlah limfoblas dari 200 sel (limfosit+limfoblas) pada area homogen. Sel dengan kepadatan 3×10^7 sel/ml yang lainnya dikultur dalam medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penisilin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), glutamine (1 mM) dan 10% FBS selama 72 jam dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C. Kultur ini dipanen untuk pemeriksaan interferon-γ limfosit.

Pemeriksaan Jumlah Limfosit T yang berikatan dengan makrofag diperoleh dengan mengisolasi makrofag peritoneal mencit. Makrofag kemudian diinkubasi 37°C selama 2 jam dalam tabung dengan alas datar yang bawahnya diberi kaca benda. Setelah PEL dipisahkan, makrofag disentrifus 800g dengan suhu 20°C selama 5 menit bersama *heat killed Listeria monocytogenes* dan diinkubasi lagi 37°C selama 1 jam. PEL dicampurkan kembali dengan makrofag setelah dilakukan pencucian kuman menggunakan PBS dan disentrifus 50g selama 4 menit pada suhu 4°C. Setelah itu dilakukan inkubasi 37°C selama 1 jam. Kaca benda dapat

diambil dan difiksasi dengan metanol untuk selanjutnya dilakukan pengecatan menggunakan Giemsa 20% selama 20 menit. Penghitungan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag dilakukan dengan melihat preparat dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000X dan menghitung jumlah limfosit T yang berikatan dengan 100 makrofag.

Pemeriksaan produksi NO makrofag diperoleh dengan mengisolasi makrofag peritoneal mencit. Makrofag kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, dengan kadar CO₂ 5% selama 2 jam dalam *plate 96 wells* dengan pengambilan sampel secara triplikate. Setelah diganti medium, makrofag dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C, dengan kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dan dibaca menggunakan *Automated Microplate Reader* SLT LABINSTRUMENS Model 16 570. Supernatan kultur ini juga digunakan untuk pemeriksaan interferon- γ makrofag dengan metode ELISA.

12 ekor mencit/ kelompok penelitian yang disiapkan untuk *survival* tetap dipelihara selama 4 minggu. Selama pemeliharaan dilakukan pencatatan mencit-mencit yang mati setiap 12 jam.

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Dari uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan bahwa data pada tahun pertama berdistribusi normal. Maka selanjutnya 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 dan Tamhane*. Untuk melihat adanya korelasi masing-masing variabel yang diukur, dianalisis dengan menggunakan uji korelasi *Pearson's product moment*. Dari uji normalitas untuk data tahun kedua didapatkan konsentrasi IFN- γ limfosit dan fagositosis makrofag berdistribusi normal, sedangkan konsentrasi IFN- γ makrofag tidak. Maka selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* terhadap konsentrasi IFN- γ limfosit dan fagositosis makrofag untuk melihat adanya perbedaan pada keempat kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test Tamhane*. Sedangkan untuk konsentrasi IFN- γ makrofag dianalisis dengan *Kruskal-Wallis test*, dilanjutkan analisis perbedaan antar kelompok perlakuan yang diuji dengan *Mann-Whitney U*. *Survival* antar kelompok perlakuan dihitung dengan metode *Kaplan-Meier* perbedaan pada 4 kelompok perlakuan diuji dengan *log rank statistics*. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program

komputer SPSS 10.05 for windows. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p \leq 0,05$.

Dari penelitian ini didapatkan bahwa jumlah hitung kuman pada kelompok mencit tua BALB/c dengan diet minyak ikan saja adalah tertinggi, sedangkan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag, konsentrasi produksi NO dan proliferasi limfosit terendah serta menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok lainnya. Disisi lain, variabel-variabel tersebut tidak berbeda signifikan terhadap kelompok BCG pada kelompok mencit tua BALB/c dengan diet minyak ikan yang divaksinasi BCG. Sehingga dapat dinyatakan bahwa pengaruh Minyak Ikan adalah menekan aktivitas kekebalan seluler, dan upaya penggunaan BCG dapat meminimalkan efek tersebut dengan memperbaiki aktivitas respon seluler melalui peningkatan: proliferasi limfosit, limfosit T yang berikatan dengan makrofag dan produksi NO makrofag. Hal ini diperjelas dengan tingginya hasil hitung kuman organ hepar kelompok Minyak ikan, sedangkan kelompok Minyak Ikan + BCG hasilnya berbeda signifikan dibanding kelompok Minyak Ikan saja.

Pada tahun kedua didapatkan bahwa konsentrasi IFN- γ makrofag paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat diet minyak ikan dan paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapat vaksinasi BCG, kombinasi minyak ikan dengan BCG akan memperbaiki rendahnya konsentrasi IFN- γ makrofag yang diakibatkan diet minyak ikan secara signifikan. Disisi lain konsentrasi IFN- γ limfosit tidak berbeda secara signifikan.

Minyak ikan dapat meningkatkan fluiditas membran sehingga fagositosis makrofag yang mendapat minyak ikan paling tinggi dibandingkan kelompok lain dan perbedaannya bermakna bila dibandingkan yang mendapat BCG saja maupun kombinasi minyak ikan+BCG.

Meskipun pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan *survival rate* yang signifikan antar kelompok perlakuan, tetapi paling tingginya survival pada kelompok minyak ikan + BCG tampaknya memberikan harapan bahwa pemberian BCG akan meningkatkan *survival* terhadap infeksi dibanding yang mendapat minyak ikan saja atau BCG saja.

Meskipun tidak didukung oleh perbedaan konsentrasi IFN- γ limfosit yang menunjukkan pergeseran ke Th₁ tetapi tampaknya pertahanan tubuh tidak semata-mata oleh peningkatan imunitas seluler melalui jalur TH₁ saja, tetapi mungkin ada mekanisme pertahanan lain yang belum diteliti dalam penelitian ini. Untuk menyempurnakan konsep pemikiran pada penelitian ini maka masih perlu dilakukan penelitian lanjutan. Penelitian tersebut untuk

mengetahui mekanisme lain tersebut yaitu antara lain justru peningkatan IFN- γ makrofag akan memacu sel T CD8+ untuk melakukan sitolisis dan memacu sel-sel NK untuk melakukan fagositosis. Hasil penelitian ini tampaknya belum bisa dijadikan landasan untuk dilakukannya pengujian pada manusia mengingat masih adanya beberapa mekanisme yang belum diketahui dengan jelas.

SUMMARY

Fish oil (rich in omega-3) has been used as a food supplement by elderly. However, some reports mentioned an impairment of cellular immunity when fish oil consumed for certain period, while BCG vaccination may increase it. To highlight the use of fish oil and effort to diminish the cellular immunity impairment, this particular study is designed using old mice as a model. The study is emphasized on the effects of Fish Oil diet and the use of BCG vaccination in cellular immune responses alteration through measurement from bacterial growth (cfu/ gram) in the liver, physical binding of T lymphocytes, NO production and lymphocytes proliferation in the first year. In the second years, we measure macrophage and lymphocyte IFN- γ concentration, macrophage phagocytosis and survival.

The study adapts Laboratory Experimental and Post-Test Only Control Group Design. The 24 male BALB/c mice (12-13 months old and average weight 30 grams) were obtained from PUSVETMA = Pusat Veterinaria Farma, Surabaya. All mice were then divided into four groups and received standard lab diet daily. The first group (control group = C group) received no other additional treatment, while the second group (BCG group = BCG group) received intra-peritoneal injection of 0.1 cc BCG at day 14th and 24th. The third group (fish oil group = FO group) received 5% fish oil rich ω -3 and the fourth group (fish oil +BCG group = FB group) received 5% fish oil rich ω -3 and intra-peritoneal injection of 0.1 cc BCG at day 14th and 24th. Close to the end of study, at day 28th, all groups were intravenously injected with 10^4 live *L. monocytogenes* ($LD_{50} = 2 \times 10^5$ bacteria) obtained from Balai Laboratorium Kesehatan Semarang and sacrificed at day 33rd.

The liver was taken aseptically to measure bacterial growth (cfu/ gram). Liver was grinded and suspense for multi stage dilution in 0,9% NaCl. The suspension was cultivated in blood agar for 24 hours. Colony counter counted Colonies those growths on blood agar media. The lien was also aseptically taken to measure weight, lymphocytes proliferation, and lymphocytes/ cc lien suspension. Weights were measured by electronic scale. After grinded by pincet in 0,9 % NaCl, suspension was take into centrifuge tube. Wait for cells cloth for 5-6 minutes and move suspension to another centrifuge tube to centrifuge for 200g, 10 minutes in 4°C temperature. Pellet was resuspended in 2 ml lyses buffer at 25°C and centrifuged for 200g, 10 minutes in 4°C temperature again. Exile supernatant and wash pellet 2 times by RPMI

followed by centrifuged for 200g, 10 minutes in 4°C temperature. Cells were count by haemocytometer (lymphocyte/ cc) to get 3×10^7 cells/ cc density. Put a drop on object glass and make spreading object. After dry, get methanol fixation and stained by Giemsa. Read on light microscope by count lymphoblast/ 200 cells. Another 3×10^7 cells/ cc were cultured in complete medium (RPMI 1640 contained penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), glutamine (1 mM) and 10% FBS) for 72 hours in CO₂ incubator (37°C temperature). Supernatant was harvested to get IFN-γ Lymphocytes concentration.

Physical binding of T lymphocytes was count by isolation of mice peritoneal macrophage. Macrophages were incubated for 37°C (2 hours) in the flat base tube with round object glass. After separate PEL. (Peritoneal Exudates Lymphocytes), macrophages were centrifuged for 800g; 20°C temperature; 5 minutes include heat killed *Listeria monocytogenes*. Incubated again for 37°C; 1 hour. Take round object glass and give methanol fixation. Stained by giemsa and count for lymphocyte T binding on 100 macrophages. Macrophage NO production was count by isolation of mice peritoneal macrophage. Macrophages were incubated for 37°C (2 hours) in 96 wells plate (triplicate). After substitute medium, macrophages were cultured for 24 hours in 5% CO incubator; 37°C. Macrophage NO production was measured by Griess method and read by Automated Microplate Reader (SLT LABINSTRUMENS Model 16 570). The same supernatant also used to get IFN-γ macrophages concentration. Other mice that prepared to examine survival were followed up until 4 weeks. The deaths of mice were registered every 12 hours.

In the first year, data distributions were normally, so within group difference of data were analyzed by One Way ANOVA. Post Hoc Test Bonferroni and Tamhane analyzed difference between groups. Correlation between variables was analyzed by Pearson's product moment. In the second year, not all of data distributions were normally. Therefore, we used Kruskal-Wallis test and One Way ANOVA. Differences between groups were analyzed by Post Hoc Test Bonferroni or Tamhane or Mann-Whitney U. Survival was measured by Kaplan-Meier and log rank statistics. Analysis supported by computer software SPSS 10.05 for windows. The result was significant if $p \leq 0,05$.

The results of the first year show that there are significant differences in the liver bacterial growth, the physical binding of T lymphocytes, the NO production and lymphocytes proliferation ($p < 0,05$) among the groups. The highest number of bacterial growth, the lowest

number of physical binding of T lymphocytes, and the lowest NO production and lymphocytes proliferation is found in the FO group. In contrast, there are no significant differences on the number of bacterial growth, physical binding of T lymphocytes, and NO production, between FB group and B group ($p > 0,05$). Therefore, it could be concluded that fish oil is immunosuppressive, while additional treatment with BCG can restore immune response through macrophage activation in aged male BALB/c mice.

The results of second years show there are significant differences in IFN- γ macrophage concentration and macrophage phagocytosis ($p < 0,05$) among the group. The lowest IFN- γ macrophage concentration was found in the FO group but the highest was found in the BCG group. Combination of Fish Oil and BCG can restore IFN- γ macrophage concentration. In contrast, there were no significant different on the IFN- γ lymphocytes concentration among the group. The Fish oil could increase membrane fluidity, therefore the highest macrophages phagocytosis was found in FO group than BCG or FB group. Although there were no significant differences on survival rate among the group, the highest survival rate of FB could give the expectation that combination of Fish Oil and BCG increase survival against infection than FO or BCG only.

According to the result of the study, the immunity against infections does not only by increase TH₁ responses but also by another mechanism do not covered in this study yet. Therefore, we need another study before conducts this experiment in humans.

PRAKATA

Penulis memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah Swt atas berkah, rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian yang berjudul “Pengaruh Diet Minyak Ikan Kaya Omega-3 Terhadap Respon Kekebalan Tubuh Dan Upaya Penggunaan BCG Untuk Mengatasi Efek Negatif Yang Ditimbulkannya” dapat selesai tepat pada waktu yang ditentukan. Penulis juga bersyukur karena sampai saat ini masih diberikan kesempatan oleh-Nya untuk terus mengembangkan pengalaman dan ilmu pengetahuan yang berguna bagi peradaban manusia. Dengan selesainya penelitian ini diharapkan dapat memacu penelitian-penelitian lain dengan tema sejenis.

Dapat terlaksananya penelitian ini adalah berkat bantuan dari berbagai pihak, antara lain:

1. Ditbinlitabmas Dirjen Dikti Depdiknas, sebagai pemberi dana.
2. Prof. DR. Dr. I. Riwanto, SpB, SpBD, selaku ketua Lembaga Penelitian Undip
3. Prof. Dr. Kabulrachman, SpKK(K), selaku Dekan FK Undip
4. DR. Dr. Hertanto WS, MS, selaku Koordinator penelitian FK Undip
5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan hingga terlaksananya penelitian ini mulai dari perencanaan, pelaksanaan, analisa sampai pembuatan laporan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah Swt melimpahkan berkat dan rahmatNya kepada semua pihak yang telah banyak membantu dan semoga penelitian ini dapat bermanfaat dan dapat menambah pengetahuan bagi yang membutuhkannya. Bila ada hal-hal yang kurang berkenan, kami atas nama tim peneliti, mohon maaf yang sebesar-besarnya.

Semarang, November 2004

Penulis,

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN | ii |
| RINGKASAN DAN SUMMARY | iii |
| PRAKATA | xi |
| DAFTAR ISI | xii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvii |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 4 |
| TUJUAN UMUM | 4 |
| TUJUAN KHUSUS | 4 |
| MANFAAT PENELITIAN | 5 |
| III. TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| III.1. MINYAK IKAN | 6 |
| III.1.1. PENGARUH MINYAK IKAN TERHADAP IMUNITAS | 6 |
| III.1.2. PENGARUH MINYAK IKAN PADA LIMFOSIT | 8 |
| III.1.3. PENGARUH MINYAK IKAN PADA MAKROFAG | 8 |
| III.1.4. PENGARUH MINYAK IKAN PADA SEL-SEL DENDRITIK | 9 |
| III.2. VAKSIN BCG SEBAGAI IMUNOPOTENSIATOR | 10 |
| III.3. PROSES PEMBENTUKAN IMUNITAS TUBUH | 11 |
| III.3.1. LANGKAH PENGENALAN (RECOGNITION) | 11 |
| III.3.2. LANGKAH AKTIVASI | 13 |
| III.3.3. LANGKAH PELAKSANAAN EFEKTOR | 16 |
| III.3.4. FUNGSI DAN PERTUMBUHAN SUBSET SEL T YANG MENGHASILKAN SITOKIN BERBEDA | 17 |
| III.3.5. MAKROFAG TERAKTIVASI | 20 |
| III.4. IMMUNOSENESCENCE | 23 |
| IV. METODE PENELITIAN | 24 |
| IV.1. RANCANGAN PENELITIAN | 24 |
| IV.2. POPULASI DAN SAMPEL | 25 |
| IV.2.1. POPULASI | 25 |
| IV.2.2. SAMPEL | 26 |
| IV.3. VARIABEL PENELITIAN | 27 |
| IV.4. BAHAN DAN MATERI | 28 |
| IV.5. ALAT/ INSTRUMEN PENELITIAN | 29 |
| IV.6. TEMPAT PENELITIAN | 29 |
| IV.7. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA | 30 |
| IV.8. ALUR KERJA | 33 |
| IV.9. PEMERIKSAAN | 34 |
| IV.9.1. PROSEDUR PENGAMBILAN SAMPEL DARI HEWAN PERCOBAAN | 34 |
| IV.9.2. PROSEDUR PEMERIKSAAN JUMLAH LIMFOSIT T YANG BERIKATAN DENGAN MAKROFAG | 35 |
| IV.9.3. PROSEDUR PEMERIKSAAN NO | 36 |
| IV.9.4. PROSEDUR PEMERIKSAAN HITUNG KUMAN | 37 |
| IV.9.5. PROSEDUR PEMERIKSAAN PROLIFERASI LIMFOSIT | 38 |

| | |
|---|-----------|
| IV.9.6. PROSEDUR PEMERIKSAAN INTERFERRON- γ MAKROFAG & LIMFOSIT..... | 39 |
| IV.9.7. PROSEDUR PEMERIKSAAN FAGOSITOSIS MAKROFAG DENGAN LATEX BEADS..... | 40 |
| IV.9.8. PENGAMATAN SURVIVAL..... | 41 |
| IV.10. ANALISA DATA..... | 41 |
| V. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 42 |
| TAHUN PERTAMA..... | 42 |
| 1. <i>Hitung kuman organ hepar</i> | 42 |
| 2. <i>Jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag</i> | 45 |
| 3. <i>Konsentrasi Produksi NO makrofag</i> | 48 |
| 4. <i>Proliferasi Limfosit</i> | 51 |
| 5. <i>Asosiasi antar variabel-variabel penelitian</i> | 56 |
| TAHUN KEDUA..... | 58 |
| 1. <i>Konsentrasi produksi interferon - γ makrofag</i> | 58 |
| 2. <i>Konsentrasi produksi interferon - γ limfosit</i> | 60 |
| 3. <i>Kemampuan fagositosis makrofag</i> | 62 |
| 4. <i>Survival</i> | 64 |
| VI. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 66 |
| VIII. DAFTAR PUSTAKA..... | 68 |
| LAMPIRAN 1. Foto Hasil Penelitian dan alat-alat yang digunakan untuk pemeriksaan..... | 73 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabel 1. | Hasil penghitungan kuman organ hepar dalam log cfu/ gram | 42 |
| Tabel 2. | Hasil Post Hoc Test Bonferroni hitung kuman antar kelompok perlakuan.. | 44 |
| Tabel 3. | Hasil penghitungan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag ... | 45 |
| Tabel 4. | Hasil Post Hoc Test Tamhane jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag antar kelompok perlakuan | 47 |
| Tabel 5. | Hasil penghitungan konsentrasi produksi NO makrofag dalam μM | 48 |
| Tabel 6. | Hasil Post Hoc Test Tamhane konsentrasi produksi NO makrofag antar kelompok perlakuan | 51 |
| Tabel 7. | Hasil penghitungan parameter proliferasi limfosit | 52 |
| Tabel 8. | Hasil Post Hoc Test Bonferroni parameter proliferasi limfosit antar kelompok perlakuan | 53 |
| Tabel 9. | Hasil Uji Korelasi Pearsons's Product moment antar variabel | 57 |
| Tabel 10. | Konsentrasi IFN- γ Makrofag (μM)..... | 58 |
| Tabel 11. | Hasil Uji beda Mann-Whitney U konsentrasi IFN- γ Makrofag antar kelompok perlakuan | 59 |
| Tabel 12. | Konsentrasi IFN- γ Limfosit (μM) | 60 |
| Tabel 13. | Hasil penghitungan fagositosis latex / 200 makrofag | 62 |
| Tabel 14. | Hasil Post Hoc Test Tamhane kemampuan fagositosis latex / 200 makrofag | 63 |
| Tabel 15. | Survival antar kelompok perlakuan | 64 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|--|----|
| Gambar 1. | Mekanisme presentasi antigen yang dilakukan oleh MHC II | 14 |
| Gambar 2. | Untuk aktivasi sel T dibutuhkan ko-stimulator pada APC | 15 |
| Gambar 3. | Aktivasi Sel T sitolisis akan menuju sel target yang mempresentasikan MHC I untuk melakukan lysis..... | 16 |
| Gambar 4. | Sel T mengaktifkan Sel B untuk menghasilkan antibody | 17 |
| Gambar 5. | Aktivasi Sel T helper diakibatkan kontak dengan sel APC yang mempresentasikan MHC II pada permukaannya | 17 |
| Gambar 6. | Fungsi sel-sel Th1 | 19 |
| Gambar 7. | Fungsi sel-sel Th2 | 20 |
| Gambar 8. | Grafik Variabilitas Hasil Hitung Kuman Organ organ Hepar antar Kelompok Perlakuan | 43 |
| Gambar 9. | Grafik Variabilitas Hasil penghitungan jumlah limfosit T yang berikatan dengan makrofag | 46 |
| Gambar 10. | Grafik Variabilitas Hasil pengukuran Konsentrasi NO makrofag | 50 |
| Gambar 11. | Grafik Variabilitas Hasil penghitungan limfoblas per 200 sel | 54 |
| Gambar 12. | Grafik Variabilitas Hasil penghitungan limfosit per cc larutan lien | 54 |
| Gambar 13. | Grafik Variabilitas Hasil penimbangan berat lien mencit | 55 |
| Gambar 14. | Grafik Variabilitas konsentrasi IFN- γ makrofag antar Kelompok Perlakuan | 59 |
| Gambar 15. | Grafik Variabilitas konsentrasi IFN- γ limfosit antar Kelompok Perlakuan | 61 |
| Gambar 16. | Grafik Variabilitas kemampuan fagositosis latex / 200 makrofag antar Kelompok Perlakuan | 63 |
| Gambar 17. | Grafik Survival antar Kelompok Perlakuan | 65 |
| Gambar 18. | Koloni <i>Listeria monocytogenes</i> yang tumbuh pada <i>Blood Agar</i> | 73 |

| | |
|--|----|
| Gambar 19. <i>Colony Counter</i> yang digunakan untuk menghitung koloni <i>Listeria monocytogenes</i> yang tumbuh pada media <i>Blood Agar</i> | 73 |
| Gambar 20. Makrofag dengan pembesaran 1000 X | 74 |
| Gambar 21. Empat buah limfosit T yang berikatan dengan makrofag pada pembesaran 1000 X | 74 |
| Gambar 22. Limfoblas yang dihitung dalam 200 sel | 75 |
| Gambar 23. <i>Plate 96 Wells</i> yang digunakan untuk kultur makrofag dan pemeriksaan NO | 75 |
| Gambar 24. <i>Automated Microplate Reader</i> yang digunakan untuk membaca <i>plate 96 wells</i> dalam pemeriksaan NO | 76 |
| Gambar 25. Preparat fagositosis makrofag pada Kelompok Kontrol (K) dengan perbesaran 400 kali | 76 |
| Gambar 26. Preparat fagositosis makrofag pada Kelompok Minyak Ikan (MI) dengan perbesaran 400 kali | 77 |
| Gambar 27. Preparat fagositosis makrofag pada Kelompok Kontrol (K) dengan perbesaran 1000 kali | 77 |
| Gambar 28. Preparat fagositosis makrofag pada Kelompok Minyak Ikan (MI) dengan perbesaran 1000 kali | 78 |
| Gambar 29. Label identitas Kit mouse IFN-gamma ELISA | 78 |
| Gambar 30. Kit mouse IFN-gamma ELISA | 79 |
| Gambar 31. Reagen-reagen dalam Kit mouse IFN-gamma ELISA | 79 |
| Gambar 32. ELISA reader yang digunakan pada penelitian tahun kedua | 80 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Foto Hasil Penelitian dan alat-alat yang digunakan untuk pemeriksaan | 73 |
|--|----|

I. PENDAHULUAN

Eicosapentaenoic acid (EPA) dan docosahexaenoic acid (DHA) adalah rantai panjang omega-3, asam lemak tak jenuh yang ditemukan pada minyak ikan. EPA/DHA yang biasanya ditemukan bersama-sama adalah nutrisi asam lemak yang saat ini sangat populer di literatur sebagai makanan tambahan. Dalam kondisi diet intake asam lemak yang serba terkontrol di laboratorium terbukti menunjukkan pengaruh yang besar pada hewan coba terhadap penyakit autoimun. Pada manusia banyak digunakan sebagai suplemen makanan pada orang-orang tua terutama untuk penderita rematoid arthritis dan penyakit-penyakit kardiovaskuler. Pemberian minyak ikan (EPA/DHA) pada penderita rematoid arthritis akan menurunkan kekakuan sendi, nyeri sendi dan memperbaiki fleksibilitas. Sebagai pencegahan penyakit kardiovaskuler direkomendasikan supaya mendapatkan suplemen minyak ikan dua sampai tiga kali setiap minggu. Apabila asam lemak darah tinggi, HDL rendah atau terjadi peningkatan resiko penyakit kardiovaskular maka dianjurkan mengkonsumsi 500 mg minyak ikan (EPA/DHA) dua kali sehari untuk memperbaiki kondisi tersebut. Dikatakan minyak ikan dapat mencegah aritmia jantung dengan cara menghambat terjadinya fibrilasi yang mengakibatkan henti jantung.^{1,2} Penelitian pada manusia menunjukkan pengaruh yang tidak begitu dramatis, sayang sekali diet dan latar belakang genetik, infeksi dan pengaruh lingkungan tidak terkontrol dan disain penelitiannya tidak begitu adekwat.³

Pengaruh diet asam lemak pada binatang yang menderita penyakit autoimun tergantung pada jenis hewan dan tipe serta banyaknya asam lemak yang dimakan. Minyak ikan khususnya DHA sangat memegang peranan terhadap naiknya suseptibilitas terhadap penyakit.⁴ Ekspresi MHC II pada sel-sel dendritik tikus rat yang diberi diet minyak ikan selama 6 minggu juga mengalami penurunan. Sedangkan sel-sel dendritik memegang peranan penting sebagai APC *invivo*.⁵

Diet minyak ikan secara signifikan dilaporkan menekan lisis sel-sel tumor target yang ditimbulkan makrofag peritoneal me.icit. "Target Cell Lines" yang digunakan pada studi ini adalah sensitifitas membunuh oleh TNF- α (sel L929)^{6,7} atau nitric Oxide (sel P815).^{8,9} Jadi penekanan sitolisis oleh makrofag yang diamati setelah pemberian minyak ikan menunjukkan bahwa minyak ikan menurunkan produksi Nitric Oxide dan TNF- α .

Beberapa kemungkinan mekanisme omega-3 dalam memperbaiki penyakit autoimun diantaranya adalah penekanan proliferasi limfosit T dan autoantibodi. Selain itu juga terjadi apoptosis dari limfosit autoreaktif, dan penurunan produksi sitokin proinflamasi oleh omega-3 dosis tinggi. Tetapi secara eksperimental, induksi penyakit autoimun yang dimediasi sel T akan semakin berat dan **pengaruh jangka panjang yang tidak diharapkan pada penggunaan minyak ikan (omega-3) adalah menurunnya imunitas.** Mekanisme yang penting pada diet asam lemak untuk memodulasi aktivitas penyakit adalah pengaruhnya pada imunoregulasi, inflamasi dan kadang-kadang mengaktifasi imunitas pada penyakit autoimun. Mekanisme dalam mempengaruhi sistem imun dan penyakit autoimun adalah melalui regulasi ekspresi gen, jalur signal transduksi, dan kerja enzim-enzim antioksidan. Selain itu juga dengan mempengaruhi produksi eikosanoid dan sitokin. Kemungkinan semua mekanisme ini berhubungan dengan imunoregulasi dan inflamasi melalui pengaruh asam lemak pada beberapa sitokin. Jumlah, tipe, keseimbangan diet asam lemak dan pemakaian nutrien antioksidan akan mempengaruhi sistem imun. Pengaruh ini dapat berakibat terjadinya imunodevasi atau immunosupresif, dan menurunkan inflamasi yang dimediasi oleh sistem imun. Pada gilirannya akan mempengaruhi suseptibilitas dan beratnya penyakit autoimun.³

Dalam ilmu imunologi dikenal beberapa substrat yang dapat memodulasi sistem imun. Salah satunya adalah yang bersifat sebagai imunopotensiator dan 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 Penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler melalui respon Type 1.¹⁴ 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.¹⁵

Dalam eksperimen, induksi infeksi dengan organisme *Listeria monocytogenes* telah banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan dapat menghindari mekanisme bakterisidal makrofag.

Sehingga makrofag merupakan pertahanan utama terhadap organisme ini. Mekanisme imun untuk melawan *Listeria monocytogenes* adalah *T-cell mediated immunity*. Kunci utama mekanisme ini adalah limfosit T yang tersensitisasi dan makrofag yang teraktivasi. Disini terlibat fungsi makrofag sebagai APC yang mengikutsertakan molekul MHC II.^{16, 17}

Pertumbuhan kuman *Listeria monocytogenes* sangat dipengaruhi oleh kemampuannya untuk bertahan dan tumbuh di dalam makrofag inang. Tetapi secara *in vivo* kuman ini mampu masuk sel-sel inang selain makrofag. Sel hepatosit merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan organisme ini. Sehingga untuk dapat dihancurkan oleh makrofag yang teraktivasi, kuman ini perlu dikeluarkan dulu dari sel hepatosit. Pengeluaran dari hepatosit dilakukan dengan penghancuran sel-sel ini oleh lekosit yang berkumpul disekitar tempat yang terinfeksi dan melakukan degranulasi ekstraseluler. Dalam penelitian histopatologi hepar, Conlan dkk melaporkan adanya sebaran netrofil dan terjadinya kehancuran sel-sel hepatosit terinfeksi secara luas setelah 48 jam inokulasi *Listeria monocytogenes*, sehingga pada keadaan ini sulit didapatkan sel hepatosit yang utuh. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel hepatosit yang terinfeksi akan dihancurkan terlebih dahulu sebelum *Listeria monocytogenes* sempat tumbuh dan berkembang biak di dalamnya. Selain netrofil, sel-sel lain yang juga berperan terhadap penghancuran sel-sel hepatosit diantaranya adalah monosit, sel NK dan sel T. Akan tetapi sebagaimana penelitian-penelitian lain, sel T belum berperan selama 48 jam pertama setelah infeksi. Pada penelitian ini juga didapati makrofag disekitar tempat infeksi. Kemampuan kuman *Listeria monocytogenes* untuk dapat berkembang biak di hepatosit dapat dilihat dari hasil kultur kuman organ hepar.¹⁸

Dengan melihat keadaan tersebut diatas maka penelitian ini berusaha menjelaskan seberapa jauh vaksinasi BCG dapat mempengaruhi imunitas seluler mencit tua yang telah mengalami *immunosenescence*. Imunitas tersebut dapat dilihat dari fungsi makrofag sebagai APC, produksi interferon- γ dan kemampuan fagositosisnya. Juga dilihat dari fungsi limfosit dalam proliferasi dan produksi interferon- γ nya. Juga dilakukan analisis dari keseluruhan rangkaian imunitas tersebut berupa kemampuan *bacterial killing* dan *survivalnya*.