



**EFEKTIVITAS ZAT GIZI MIKRO SENG (Zn)
SEBAGAI IMUNOSTIMULAN TERHADAP
PRODUKSI *REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATE*
(ROI) PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI
*Salmonella typhimurium***

skripsi
disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

Oleh
Zumikhah
4450405039

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
2010**

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Efektivitas Zat Gizi Mikro Seng (Zn) Sebagai Imunostimulan terhadap Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella tyohimurium*” disusun sebagai hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.

Semarang, Agustus 2010

Zunikhah
4450405039

PERPUSTAKAAN
UNNES

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul :

Efektivitas Zat Gizi Mikro Seng (Zn) Sebagai Imunostimulan terhadap
Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) pada Mencit Balb/c yang
Diinfeksi *Salmonella tyohimurium*

disusun oleh

nama : Zunikhah

NIM : 4450405039

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA Unnes pada
tanggal Agustus 2010.

Panitia:

Ketua

Sekretaris

Drs. Kasmadi Imam S, M. Si
NIP.195111151979031001

Dra. Aditya Marianti, M.Si
NIP. 196712171993032001

Penguji Utama

Dr. Drh. R. Susanti, M. P
NIP. 196903231997032001

Anggota Penguji/
Pembimbing I

AnggotaPenguji/
Pembimbing II

Ari Yuniastuti, S. Pt. M.Kes
Kes
NIP. 196806021998032001

dr. Nugrahaningsih WH, M.
NIP. 196907091998032001

ABSTRAK

Zunikhah. 2010. Efektivitas Zat Gizi Mikro Seng (Zn) sebagai Imunostimulan terhadap Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Ari Yuniastuti, S. Pt, M. Kes dan dr. Nugrahaningsih WH, M. Kes.

Demam tifoid merupakan penyakit akut yang selalu ada di masyarakat (endemik) di Indonesia. Bila musim sedang berganti di Indonesia, sering ditemukan penyakit tifus yang merupakan penyakit usus halus. Seng berperan pada perkembangan dan fungsi normal yang memperantarai imunitas nonspesifik seperti netrofil dan sel *natural killer* (NK), mampu berperan sebagai imunostimulator. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efektivitas zat gizi mikro seng sebagai imunostimulan dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) pada mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Desain penelitian menggunakan *The Post Test Only Randomized Control Group Desain*. Sampel 24 ekor mencit balb/c jantan dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (dosis perlakuan 78 ppm/ekor/hari; 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari) secara intraperitoneal selama 14 hari dengan masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus. Variabel bebas adalah pemberian seng dengan berbagai dosis, variabel tergantung adalah produksi ROI makrofag yang diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) *Reduction Assay*, dan variabel kendali adalah berat badan, jenis kelamin dan umur. Semua mencit diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* sebanyak 10^5 intraperitoneal pada hari ke-8. Akhir perlakuan mencit dibunuh pada hari ke-15 dan dilakukan pemeriksaan kadar ROI. Hasil pemeriksaan dianalisis dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji statistik Mann Whitney U menunjukkan bahwa kelompok kontrol berbeda dengan kelompok P1 dan P2 tetapi kontrol tidak berbeda dengan P3. P1 berbeda dengan P2, tetapi P2 tidak berbeda dengan P3 ($P < 0.05$).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis seng 78 ppm/ekor/hari merupakan dosis yang efektif sebagai imunostimulan terhadap produksi ROI pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

Kata Kunci : efektivitas, imunostimulan, *Reactive Oxygen Intermediate*, seng (Zn)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Efektivitas Zat Gizi Mikro Seng (Zn) Sebagai Immunostimulan Terhadap Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* Pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium* “. Segala hambatan, tantangan, dan kemudahan merupakan nikmat tersendiri sebagai pengalaman dan pembelajaran batin yang tiada terkira bagi penulis.

Sebagai manusia biasa yang banyak kekurangan, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak mungkin tersusun dengan baik tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak yang dengan ikhlas telah merelakan waktu, tenaga, pikiran dan materi demi membantu penulis dalam menyusun skripsi ini. Untuk itu, dengan segala kerendahan hati penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan menyelesaikan studi strata 1 Jurusan Biologi FMIPA UNNES.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberi ijin untuk melaksanakan penelitian dalam penyusunan skripsi.
3. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kemudahan administrasi dalam penyusunan skripsi.
4. Ibu Ari Yuniastuti, S. Pt, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan skripsi serta dorongan dengan penuh kesabaran dalam menyusun skripsi.
5. Ibu dr. Nugrahaningsih WH, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan skripsi serta dorongan dengan penuh kesabaran dalam menyusun skripsi.
6. Ibu Dr. Drh. R. Susanti, MP, selaku Dosen Penguji yang telah dengan sabar memberikan bimbingan dan arahan penulis dalam menyusun skripsi.
7. Ibu Ir. Tuti Widianti, M.Biomed, selaku dosen wali yang telah memberi motivasi dan membimbing dalam menempuh perkuliahan.

8. Bapak dan ibu dosen Jurusan Biologi FMIPA UNNES yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
9. Bapak dan ibu serta kedua kakakku (Iim dan Ika) yang banyak mencurahkan bantuan moril maupun materiil.
10. Teman-teman satu penelitian yang telah membantu dalam penelitian : Ima, Desi dan Nurul.
11. Teman-teman “bio 05” dan seluruh mahasiswa Biologi Unnes angkatan 2005 atas kebersamaan, keceriaan, dukungan dan semangat dalam belajar. Selamat berjuang dan tetap semangat.
12. Keluarga besar kos pernata “ Ani, Ela, Isti, Kanik, Lintan, Lia, Faya, Alfi, Coty atas kebersamaan, keceriaan, dukungan dan semangat kepada penulis.
13. Sahabat-sahabatku : Silma, Putik, Ifitah, Ika, Eka, Farda atas kebersamaan, keceriaan, dukungan dan semangat kepada penulis.
14. Semua pihak yang telah berkenan membantu penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini baik moril maupun materiil, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Tidak ada sesuatupun yang dapat penulis berikan kecuali ucapan terima kasih dan untaian doa setulus hati, “Semoga segala amal kebaikan yang telah diberikan berbagai pihak kepada penulis mendapatkan imbalan dari Allah SWT”. Akhirnya penulis mengharapkan skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pada pembaca pada umumnya.

PERPUSTAKAAN
UNNES

Semarang, Agustus 2010

Penulis

Zunikhah

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
PENGESAHAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan	3
C. Penegasan Istilah	4
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS	
A. Tinjauan Pustaka	5
1. Seng	5
2. Respon Imun Terhadap Bakteri Intraseluler	7
3. <i>Salmonella typhimurium</i>	8
4. Produksi <i>Reactive Oxygen Intermediate</i> Makrofag	11
B. Kerangka Berpikir	13
C. Hipotesis	14
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Lokasi dan Waktu Penelitian	15
B. Populasi dan Sampel	15
C. Variabel Penelitian	15
D. Rancangan Penelitian	16
E. Alat dan Bahan Penelitian	17

F. Prosedur Penelitian	19
G. Metode Pengumpulan Data	20
H. Metode Analisis Data	22
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian	23
B. Pembahasan	25
BAB V PENUTUP	
A. Simpulan	30
B. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN-LAMPIRAN	33



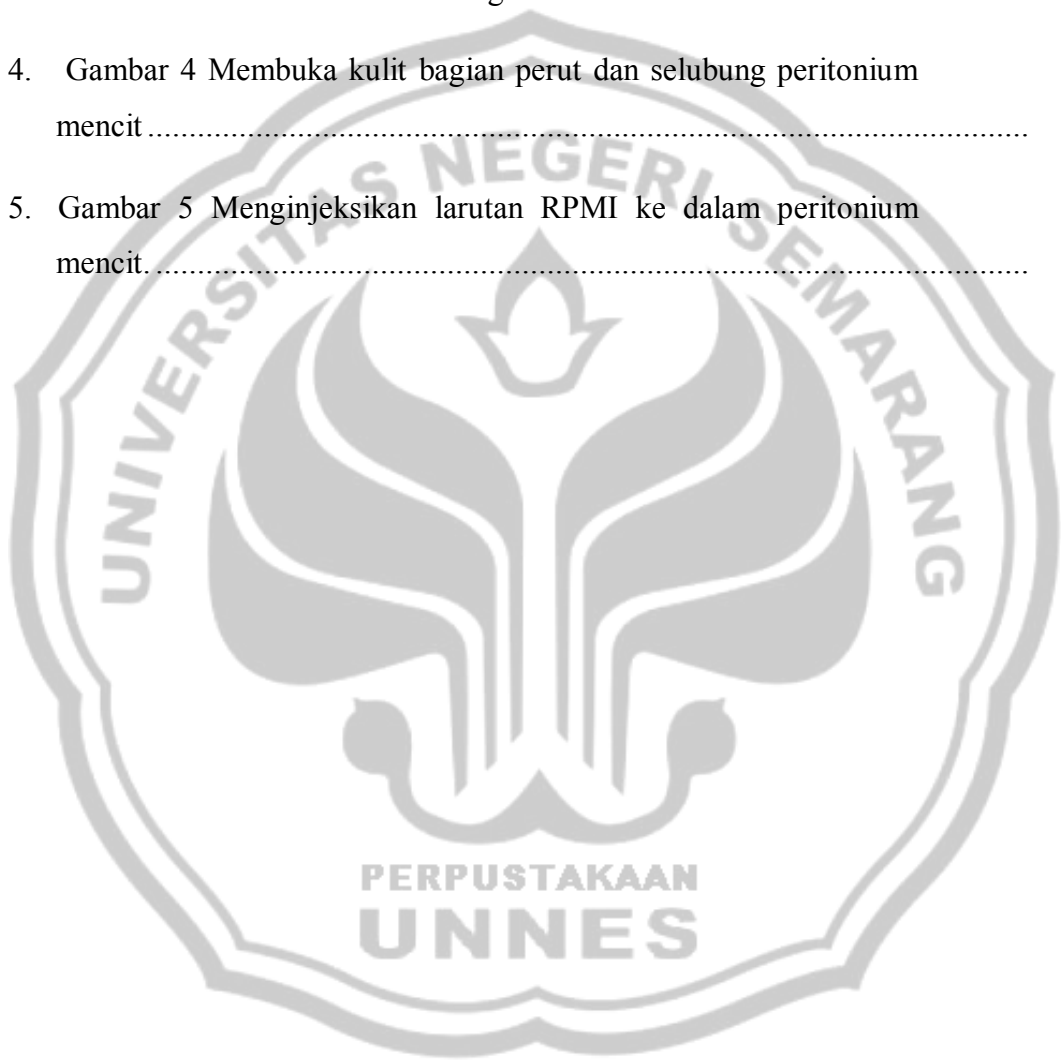
DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian	17
2. Hasil pengamatan produksi ROI pada mencit setelah perlakuan	23
3. Hasil uji <i>Mann Whitney U</i> produksi ROI.....	25



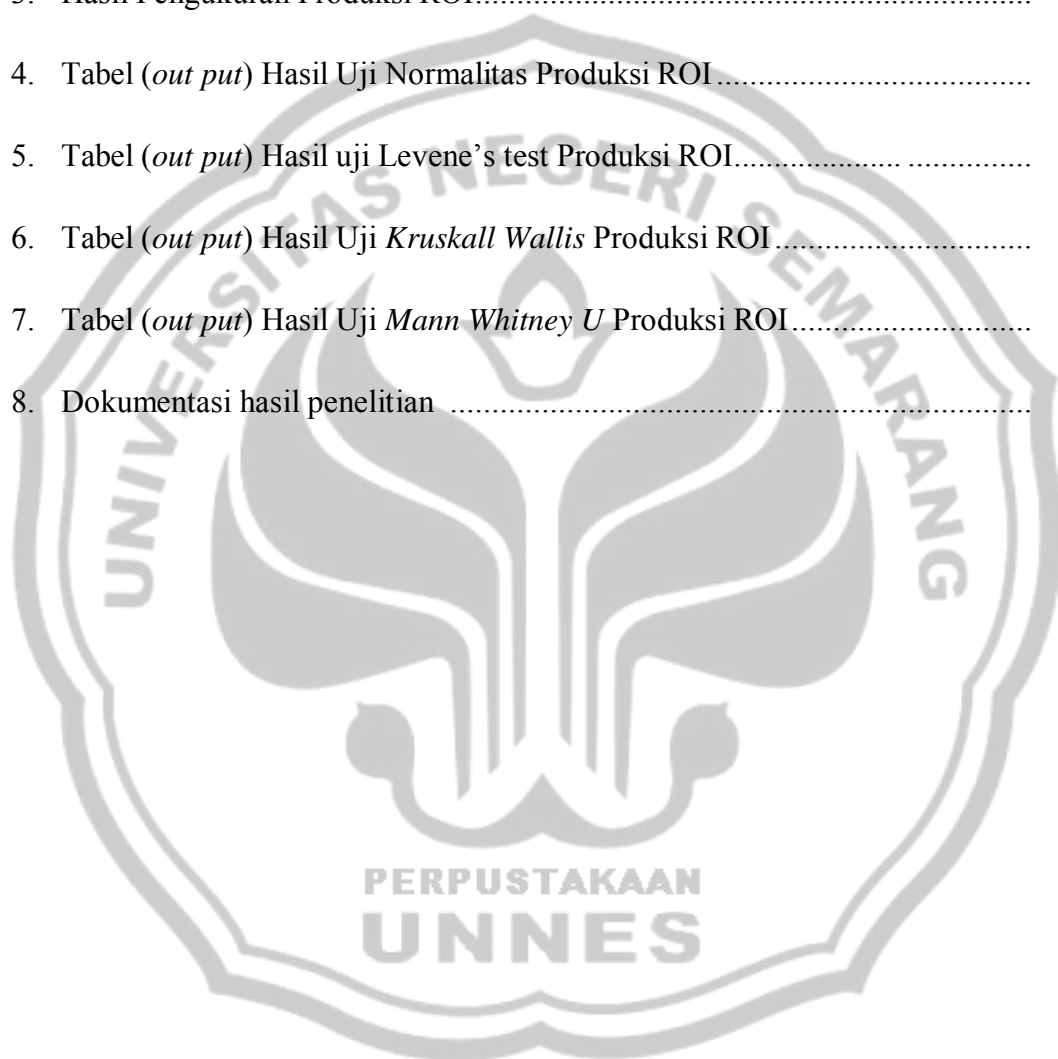
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Grafik 1 <i>Boxplot</i> produksi ROI akibat pemberian dosis seng	24
2. Gambar 2 Larutan Seng (Zn).....	45
3. Gambar 3 Mematikan mencit dengan dislokasi servix	45
4. Gambar 4 Membuka kulit bagian perut dan selubung peritonium mencit	46
5. Gambar 5 Menginjeksikan larutan RPMI ke dalam peritonium mencit.....	46



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Proses pembuatan larutan seng.....	34
2. Tabel konversi dosis antar hewan.....	35
3. Hasil Pengukuran Produksi ROI.....	36
4. Tabel (<i>out put</i>) Hasil Uji Normalitas Produksi ROI.....	38
5. Tabel (<i>out put</i>) Hasil uji Levene's test Produksi ROI.....	39
6. Tabel (<i>out put</i>) Hasil Uji <i>Kruskall Wallis</i> Produksi ROI.....	40
7. Tabel (<i>out put</i>) Hasil Uji <i>Mann Whitney U</i> Produksi ROI.....	41
8. Dokumentasi hasil penelitian	45



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit demam tifoid (bahasa Inggris: *Typhoid fever*) yang biasa juga disebut typhus atau tipes dalam bahasa Indonesianya, merupakan penyakit infeksi akut yang selalu ada di masyarakat (endemik) di Indonesia. Bila musim berganti di Indonesia, terutama di kota-kota besar, sering ditemukan penyakit tifus yang merupakan penyakit usus halus (Braunwald 2005).

Bakteri penyebab demam tifoid terutama dibawa oleh air dan makanan yang tercemar. *Salmonella typhimurium* merupakan agen yang bertanggung jawab terhadap *salmonellosis* pada mencit, penyakit yang analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* pada manusia (Gao *et al.* 1999). Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara *host* dan mikroba. Tubuh mempunyai sistem imunitas baik alamiah maupun *adaptive*, dalam mengatasi antigen asing yang masuk, termasuk *Salmonella typhimurium*. Peran fagosit dalam respon imunitas alamiah terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom dan mempunyai kemampuan untuk menghindar dari proses *killing* fagosit, seperti mencegah fusi antara fagosom dan lisosom (Abbas *et al.* 2003).

Banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui mekanisme respon imunitas pada demam tifoid manusia, misalnya dengan cara menginfeksi hewan coba seperti mencit dengan *Salmonella typhimurium*. Gejala dan perjalanan penyakit yang tampak pada mencit terinfeksi *Salmonella typhimurium* analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* pada manusia. Hal tersebut menyebabkan infeksi *Salmonella typhimurium* pada mencit dapat diterima secara luas sebagai model eksperimental untuk demam tifoid manusia (Mittrucker *et al.* 2000).

Salmonella typhimurium merupakan mikroorganisme fakultatif intraseluler yang dapat hidup bahkan berkembang biak dalam makrofag, hal ini merupakan

strategi pertahanan mikroba dan penting untuk virulensi (Kaufman 1999). Oleh karena itu diperlukan imunostimulan untuk meningkatkan kemampuan makrofag dalam mengeliminasi bakteri tersebut. Salah satu zat gizi mikro yang dapat berperan sebagai imunostimulan yaitu seng (Camnie dan Samuel 1999). Seng merupakan komponen esensial timulin *Zn facteur thymique serique* (FTS), hormon timik dalam bentuk aktif yang sangat diperlukan untuk diferensiasi dan pematangan sel T. Sebagaimana diketahui bahwa sel T bertanggung jawab terhadap sistem imunitas tubuh. Secara keseluruhan, efek defisiensi seng menyebabkan turunya fungsi imun yang ditandai dengan rendahnya aktivitas timulin, turunya fungsi sel T penolong (*helper*), terganggunya aktivitas sel pembunuh alami dan menurunnya fungsi makrofag serta netrofil. Sistem imun yang lemah tersebut akan memudahkan serangan dari berbagai patogen, termasuk virus, bakteri, jamur dan protozoa (Wahyu *et al.* 2008).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan baik pada hewan maupun manusia, membuktikan bahwa seng mempunyai peran penting dalam sistem imun tubuh melalui peran sebagai kofaktor dalam pembentukan DNA, RNA dan protein sehingga meningkatkan pembelahan seluler. Keadaan defisiensi seng secara langsung menurunkan produksi limfosit T, respon limfosit T untuk stimulasi atau rangsangan dan produksi IL-1 (Fatimah 2006).

Sel T memproduksi IFN yang dapat mengaktivasi makrofag untuk *killing* terhadap *Salmonella*. Bila tubuh terinfeksi bakteri ini maka sistem imun yang berperan terutama adalah respon imun seluler yaitu makrofag sebagai eksekutor non spesifik dan sel T sebagai mediator spesifik untuk menghancurkan mikroba intraseluler (Baratawidjaja 2002). Makrofag mampu menghancurkan bakteri yang terfagosit dengan membentuk fagolisosom. Adanya ikatan antara mikroba dengan reseptor fagosit, maka reseptor akan mengirim sinyal yang mengaktivasi beberapa enzim dalam fagolisosom untuk menghambat terjadinya *respiratory (oxidative) burst*, atau mengelak dari perangkap fagosom sehingga masih bebas dan terhindar dari proses pembunuhan (Donabedian 2006).

Fagolisosom merupakan tempat mekanisme perlawanan terhadap mikroorganisme. Makrofag merupakan salah satu dalam sistem fagosit yang

berperan baik pada sistem imun yang spesifik maupun nonspesifik. Makrofag yang teraktivasi dikarakteristikan dengan peningkatan sekresi ROI. *Respiratory burst* ini meliputi *reactive oxygen intermediate* (ROI) dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) yang bersifat toksik bagi mikroba, dengan kata lain makrofag yang teraktivasi akan membentuk ROI, RNI dan enzim-enzim yang akan membunuh bakteri yang difagosit sebagai sel efektor (Kaufman 1999). Radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil yang terbentuk ini disebut ROI. ROI sangat reaktif sehingga dapat membunuh bakteri dan menghancurkan sel-selnya (Torres *et al.* 2000)

Penelitian yang dilakukan oleh *Zinc Investigators' Collaborative Group* berhasil menemukan bahwa dengan *intake* seng 10-30 mg/hari dapat menjadi terapi adjuvan yang penting untuk mengobati terjadinya penyakit infeksi khususnya infeksi demam tifoid pada anak-anak di negara berkembang. Anak yang menderita defisiensi seng sangat rentan terhadap berbagai macam kuman patogen (Hadkinson *et al.* 2007)

Di Indonesia meskipun zat gizi mikro seng ini sudah bukan barang asing lagi, namun aplikasi untuk suatu penyakit tertentu terutama sebagai imunostimulan dalam melawan bakteri intraseluler pada penyakit tropis (salah satunya demam tifoid), yang didukung data ilmiah mungkin belum pernah dilaporkan. Bertitik tolak dari keadaan tersebut di atas, maka penelitian ini berusaha mengetahui adanya respon imun seluler yang dinilai dari kadar ROI pada mencit yang diinfeksi bakteri *Salmonella typhimurium* dan diberi sediaan seng.

B. Permasalahan

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan, permasalahan ini adalah bagaimana efektivitas zat gizi mikro seng (Zn) sebagai imunostimulan terhadap produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*?

C. Penegasan Istilah

1. Efektivitas adalah ukuran yang menyatakan sejauh mana sasaran atau tujuan yang telah dicapai berdasarkan kuantitas, kualitas dan waktu yang paling baik (KBBI 2003). Dalam penelitian ini indikator efektivitas zat gizi mikro seng adalah pengaruh dosis seng terhadap peningkatan produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI).
2. Immunostimulan adalah agen yang merangsang respon imun.
3. *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) merupakan salah satu hasil dari aktivasi makrofag yang mempunyai kemampuan untuk memfagosit (Roit *et al.* 2001). ROI dalam penelitian ini merupakan produk oksidatif makrofag yang berperan dalam mekanisme pembunuhan *Salmonella* sebagai antimikrobia yang dihitung dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) *Reduction Assay*.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan efektivitas zat gizi mikro seng sebagai immunostimulan dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*

E. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi bagi masyarakat untuk terapi pencegahan dan mengobati (adjuvan) terjadinya penyakit infeksi khususnya infeksi demam tifoid menggunakan zat gizi mikro seng dengan dosis yang tepat serta pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut tentang zat gizi mikro seng sebagai immunostimulan dan menambah informasi mengenai efektivitas seng terhadap sistem imun tubuh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. Seng

a. Peranan Seng

Seng merupakan komponen penting dari berbagai enzim. Paling sedikit 15-20 metaloenzim yang mengandung seng telah diisolasi dan dimurnikan (Winarno 2004). Seng berperan aktif dalam metabolisme karbohidrat dan merupakan komponen esensial pada hampir ratusan jenis enzim yang berbeda. Seng berfungsi sebagai kofaktor dari enzim dehidrogenase yang berikatan dengan *Nicotinamide Adenine Dinucleotida* (NAD) dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADP). Seng merupakan mineral yang menduduki urutan kedua setelah zat besi di dalam tubuh. Rerata tubuh orang dewasa mengandung 2,4–2,5 gram seng. Mikronutrien ini dapat diperoleh dari daging, kerang-kerangan, biji-bijian, sereal, leguminosa, telur dan susu. Di dalam tubuh, seng diperlukan sebagai kofaktor lebih dari 100 enzim yang berperan dalam metabolisme karbohidrat dan energi, degradasi dan sintesis protein, sintesis asam nukleat, biosintesa heme, transpor CO₂, replikasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), transkripsi *Ribonucleic Acid* (RNA), pertumbuhan dan aktivasi sel (Solomon 2001).

Seng merupakan salah satu zat gizi mikro yang sangat dibutuhkan oleh tubuh meski dalam jumlah relatif kecil. Tubuh mengandung 2-2,5 gram seng yang tersebar di hampir semua organ tubuh, terutama di hepar, pankreas, ginjal, otot dan tulang. Di dalam cairan sel, seng merupakan ion intraseluler di dalam cairan sel. Seng mempunyai kemampuan untuk membentuk kompleks yang stabil dengan rantai protein dan nukleotida, sehingga dapat menyusun banyak *metalloenzim*

yang berperan dalam metabolisme, sintesis serta degradasi karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat. Seng juga berperan dalam fungsi pertumbuhan, perkembangan, reproduksi, stabilisasi membran seng, serta imunitas (Almatsier 2003).

Defisiensi seng tidak hanya disebabkan oleh asupan seng yang rendah, namun juga karena ketersediaan biologik yang rendah, penyakit-penyakit lain seperti penyakit ginjal kronis, penyakit liver kronik, anemia sel sabit, diabetes, keganasan dan penyakit kronik lainnya serta penggunaan *chelating agent* seperti penisillamin pada penyakit Wilson. Defisiensi seng nutrisi dapat terjadi pada golongan rentan, yaitu anak-anak, ibu hamil dan menyusui, serta orang tua. Sistem organ yang dapat berpengaruh secara klinis oleh kondisi defisiensi seng berat meliputi epidermis, gastrointestinal, sistem saraf pusat, tulang, reproduksi, dan imun. Hal tersebut menimbulkan gambaran klinis seperti retardasi pertumbuhan, hipogonadisme, perubahan kulit, penurunan ketajaman rasa (*hipogeusia*), mental letargi, serta penurunan imunitas tubuh (Almatsier 2003).

b. Efek Seng Terhadap Respon Imun

Seng merupakan mineral yang menduduki urutan kedua setelah zat besi di dalam tubuh. Rerata tubuh orang dewasa mengandung 2,4–2,5 gram seng. Mikronutrien ini dapat diperoleh dari daging, kerang-kerangan, biji-bijian, sereal, leguminosa, telur dan susu. Di dalam tubuh, seng diperlukan sebagai kofaktor lebih dari 100 enzim yang berperan dalam metabolisme karbohidrat dan energi, sintesis protein, sintesis asam nukleat, biosintesa heme, transpor CO₂ replikasi DNA, transkripsi RNA, pertumbuhan dan aktivasi sel. Untuk itu, agar metabolisme dapat berjalan normal, *World Health Organization* (WHO) menganjurkan mengonsumsi sebanyak 7 mg seng/hari bagi orang dewasa, sementara di negara maju seperti Amerika, Kanada dan Australia menetapkan *Recommended Dietary Allowances* (RDA) berturut-turut sebesar 15, 10, dan 12 mg seng/hari. Indikasi defisiensi

seng biasanya didasarkan pada kadar seng plasma kurang dari 50 mg/dl dan pada rambut kurang dari 70 mg/dl (Wahyu *et al.* 2008)

Beberapa penelitian yang telah dilakukan baik pada hewan maupun manusia, membuktikan bahwa seng mempunyai peran penting dalam sistem imun tubuh melalui peran sebagai kofaktor dalam pembentukan DNA, RNA dan protein sehingga meningkatkan pembelahan selular. Keadaan defisiensi seng secara langsung menurunkan produksi limfosit T, respon limfosit T untuk stimulasi atau rangsangan dan produksi interleukin-2 (IL-2) (Fatimah 2006).

Ada dua jenis limfosit yang penting yaitu sel B yang tumbuh dan matang dalam sumsum tulang dan sel T yang diproduksi dalam sumsum tulang dan matang dalam kelenjar thimus. Sel B memproduksi antibodi yang bersirkulasi dalam saluran darah dan limfe serta antibodi tersebut akan menempel pada antigen asing yang memberi tanda (mengkodonya) supaya dapat dihancurkan oleh sel imun. Sel B adalah bagian dari jenis sel yang disebut "*antibody-mediated*" atau imunitas humoral, disebut demikian karena antibodi tersebut bersirkulasi dalam darah dan limfe (Baratawidjaja 2002).

Secara langsung, pemberian seng dosis tinggi dapat memblok produksi IFN- γ , sitokin yang diperlukan untuk mengaktivasi makrofag. Chvapil menyatakan bahwa peningkatan jumlah seng dapat menurunkan konsumsi oksigen pada neutrofil yang sejalan dengan penurunan aktivitas fagositik dan bakterisidal (Hodkinson *et al.* 2007). Zukoski *et al.* (2001) membuktikan adanya penurunan aktivitas enzim NADPH oksidase makrofag peritoneal tikus yang diberi diet tinggi seng (2000 ppm) selama 3 hari. Penurunan enzim tersebut tentunya dapat menurunkan kemampuan bakterisidal makrofag (Beisel 2002).

2. Respon Imun Terhadap Bakteri Intraseluler

Respon imun yang paling penting terhadap bakteri intraseluler. Imunitas seluler ini terdapat dua tipe reaksi yang saling melengkapi yaitu: makrofag yang teraktivasi. Bakteri intraseluler menstimulasi produksi

interferon- γ (IFN- γ) oleh *antigen presenting cell* (APC) dan TH1 dimana sitokin ini digunakan untuk mengaktivasi makrofag serta memproduksi enzim-enzim untuk membunuh bakteri yang telah difagositosis (Abbas *et al.* 2003).

Sel T sitotoksik, jika bakteri dapat bertahan hidup dalam sel fagosit, maka bakteri akan melepaskan antigennya ke dalam sitoplasma. Antigen ini kemudian menstimulasi sel T sitotoksik untuk melisis sel yang terinfeksi.

Ada dua jenis limfosit yang penting yaitu sel B yang tumbuh dan matang dalam sumsum tulang dan sel T yang diproduksi dalam sumsum tulang dan matang dalam kelenjar timus. Sel B memproduksi antibodi yang bersirkulasi dalam saluran darah dan limfe, antibodi tersebut akan menempel pada antigen asing yang memberi tanda (mengkodeanya) supaya dapat dihancurkan oleh sel imun. Sel B adalah bagian dari jenis sel yang disebut "*antibody-mediated*" atau imunitas humoral, disebut demikian karena antibodi tersebut bersirkulasi dalam darah dan limfe (Donabedian 2006).

Sel T yang dimatangkan dalam thimus juga bersirkulasi dalam darah dan limfe dan juga untuk menandai antigen asing, tetapi sel ini juga dapat langsung menghancurkan antigen asing tersebut. Sel T bertanggung jawab atas "*Cell mediated immunity*" atau imunitas seluler. Sel T merancang, mengatur dan mengkoordinasi respon imun secara keseluruhan. Sel T bergantung pada molekul permukaan yang unik yang disebut "*major histocompatibility complex*" (MHC) yang membantu untuk mengenali fragmen antigen (Roit *et al.* 2001).

3. *Salmonella typhimurium*

a. Aspek Bakteriologi

Salmonella adalah kuman batang gram negatif yang bersifat motil, tidak membentuk spora, anggota *Enterobacteriaceae* dan tidak berkapsul. Kuman ini sering bersifat patogen untuk manusia bila masuk melalui mulut. Manifestasi yang cukup penting yang disebabkan oleh *Salmonella*

adalah demam tifoid (Jawetz *et al.* 2001). Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki elektron yang tak berpasangan (Suryohudoyo 2000).

Salmonella mempunyai beberapa antigen O yang berasal dari somatik polisakarida dan antigen H yang berasal dari protein flagel. Beberapa *Salmonella* mempunyai antigen simpai (kapsul) Vi yang dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan dapat dihubungkan dengan virulensi. Kapsul yang dimiliki oleh *Salmonella* ini tidak dapat dihancurkan oleh antibodi, tetapi sebaliknya *Salmonella* yang diopsonisasi akan dihancurkan oleh netrofil.

b. Epidemiologi

Salmonella menyebabkan penyakit infeksi sistemik yang disebut demam tifoid. Penularan penyakit ini adalah melalui jalur fekal oral yang pada umumnya menyebar melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi *Salmonella* yang biasanya dibawa oleh karier kronik (Jawetz *et al.* 2001).

Kondisi sanitasi lingkungan sangat berpengaruh pada penyebab demam tifoid. Sanitasi lingkungan yang baik, sistem penyediaan air bersih yang memadai dan kebersihan individu yang baik akan sangat mengurangi insidensi demam tifoid. Penyakit ini masih merupakan masalah kesehatan yang cukup serius di banyak negara. WHO memperkirakan dari sekitar 16,6 juta kasus hampir sekitar 600.000 kasus berakhir dengan kematian. Di Asia Tenggara angka insidensi tertinggi terjadi di Indonesia dengan lebih dari 1000 kasus per 100.000 penduduk (Jawetz *et al.* 2001).

c. Fase-fase pada Infeksi *Salmonella*

Salmonella typhimurium merupakan bakteri gram negatif yang mempunyai faktor virulensi utama berupa lipopolisakarida (LPS) yang dapat menstimulasi respon imun pada inang (Abbas *et al.* 2003). Infeksi

oleh bakteri ini terjadi dari memakan makanan yang terkontaminasi dengan feses yang mengandung bakteri *Salmonella typhimurium* dari organisme pembawa (*hosts*). Setelah masuk dalam saluran pencernaan maka bakteri ini akan menyerang dinding usus yang menyebabkan kerusakan dan peradangan. Infeksi dapat menyebar ke seluruh tubuh melalui aliran darah karena dapat menembus dinding usus ke organ-organ lain seperti hati, paru-paru, limpa, tulang-tulang sendi, plasenta dan dapat menembusnya sehingga menyerang fetus pada wanita hamil, dan juga membrane yang menyelubungi otak. Substansi racun yang diproduksi dan dilepaskan oleh bakteri ini dapat mempengaruhi keseimbangan tubuh (Braunwald 2005).

Infeksi *Salmonella* secara sistemik diperkirakan melalui fase-fase berikut:

1) Fase pertama

Infeksi intraperitoneal terjadi dalam beberapa jam, terjadi distribusi mikroorganisme ke berbagai tempat. Mikroorganisme ditemukan di hati dan limpa sekitar 3-8 jam setelah infeksi.

2) Fase Kedua

Pada fase ini selama hari pertama infeksi disebut sebagai tahap eksponensial. Netrofil sangat penting pada tahap ini, karena netrofil akan menghancurkan bakteri yang masuk ke hepatosit. Netrofil akan menghambat pertumbuhan *Salmonella*.

3) Fase Ketiga

Setelah 3-7 hari, terjadi pertumbuhan pesat mikroorganisme di hati dan limpa kemudian pertumbuhan menetap (laten). Pada fase ini limfosit tidak begitu penting. Makrofag berperan dalam meningkatkan daya bunuh bakteri intrasel oleh sel lain (sel NK atau granulosit) dengan cara memproduksi sitokin-sitokin. Fase ini juga disebut "plate and phase".

4) Fase Pembersihan

Fase ini terjadi selama minggu ke-3 infeksi yang melibatkan aktivasi limfosit. Pada fase ini sel T CD₄⁺ memperantarai terjadinya

pembersihan saluran di hati dan limpa. Menurut Kauter (1998) demam tidak berbeda antara pria dan wanita, dan tertinggi terjadi pada anak-anak sedangkan pada orang dewasa hanya terjadi infeksi ringan yang sembuh sendiri dan menjadi kebal. Insidensi demam tifoid pada pasien yang berumur 12 dan 30 tahun adalah 70-80%, antara umur 30 dan 40 tahun sekitar 10-20%, hanya sekitar 5-10% untuk umur di atas 40 tahun (Kauter 1998).

4. Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI)

Imunitas terhadap *Salmonella* melibatkan proses fagositosis oleh makrofag teraktivasi, dimana aktivasi terjadi melalui salah satu sitokin yang dihasilkan sel T yaitu IFN yang merangsang dan mengaktifkan makrofag untuk memproduksi sitokin metabolit asam arachidonic dan berbagai substansi pembunuh kuman, termasuk ROI, *Nitrit Oxyde* (NO) serta enzim lisozim yang disekresikan ke dalam fagosom (Le *et al.* 1999).

Makrofag teraktivasi mengubah oksigen menjadi ROI yang merupakan agen pengoksidasi reaktif yang menghancurkan mikroba. Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik berperan fungsional dan fagositosis maupun perannya sebagai APC. Dalam melakukan kedua peran tersebut, bantuan mediator endogen seperti sitokin sudah pasti dibutuhkan (Gray 2004).

Makrofag diproduksi di sumsum tulang sel induk mieloid melalui stadium promonosit. Sel yang belum berkembang sempurna ini kemudian masuk ke dalam aliran darah sebagai monosit, apabila meninggalkan sirkulasi dan sampai di jaringan akan menjadi sel matang kemudian menetap di jaringan sebagai makrofag. Sel-sel ini antara lain terdapat di paru-paru sebagai makrofag alveolar, di hati sebagai sel kupfer, melapisi sinusoid limpa dan kelenjar limfe, sebagai sel mesangial dalam glomerulus, sel mikroglia di otak dan sel osteoklas dalam tulang. Kehadirannya di sepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh dengan mudah. Masa hidup makrofag dapat mencapai beberapa bulan bahkan tahun, jauh lebih

panjang dibandingkan dengan sel-sel polimorfonuklear (PMN) yang hanya hidup selama 2-3 hari. Makrofag memfagosit partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati (Gray 2004).

Proses pengaktifan makrofag bukanlah proses tunggal. Untuk melihat apakah makrofag teraktivasi maka dilakukan pengukuran tertentu misalnya kemampuan *killing* terhadap mikroba. Pengukuran lain misalnya adalah kemampuan *killing* terhadap sel tumor. Aktivasi makrofag diakibatkan adanya peningkatan transkripsi gen-gen tersebut maka makrofag dapat melakukan fungsi yang tidak dapat dilakukan oleh sel yang sama dalam keadaan istirahat. Fungsi tersebut antara lain adalah *killing* bakteri yang sudah difagositosis. Sitokin aktivator makrofag, tetapi makrofag juga diaktifkan oleh kontak dengan limfosit T melalui CD⁴⁰ (Karp 1999).

Killing terhadap bakteri menyangkut proses fagositosis dan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Sitokin seperti IFN-g akan meningkatkan baik endositosis maupun fagositosis oleh monosit. Fagositosis terhadap partikel tertentu dapat ditingkatkan dengan opsonisasi bakteri yaitu dengan melapisi bakteri dengan molekul imunoglobulin G (IgG) atau komplemen. IFN-g menyebabkan ekspresi reseptor dengan ikatan kuat terhadap bagian Fc dari IgG pada makrofag akan melakukan pembunuhan dengan pembentukan ROS melalui jalur ROI (Le *et al.* 1999).

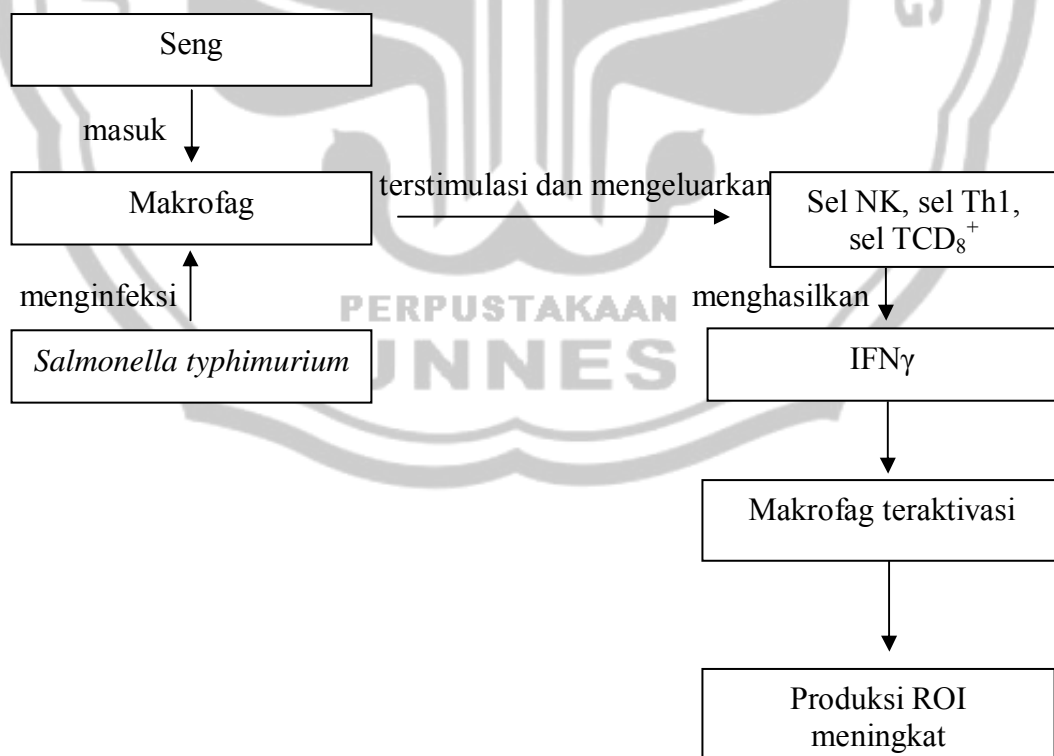
Tidak seperti makrofag manusia, makrofag mencit mempunyai mekanisme mikrobisidal kedua yang sangat penting. Pada perlakuan makrofag mencit yang diberi IFN-g dengan kombinasi LPS, TNF atau IL-1, sel tersebut akan mengekspresikan *Nitric Oxide Species* (NOS) dengan sangat tinggi untuk memproduksi NO. NOS akan berikatan dengan molekul ko-faktor tetrahidrobiopterin. Dikatakan bahwa molekul ko-faktor ini tidak terdapat pada makrofag manusia tetapi mungkin ada pada netrofil atau beberapa tipe sel lain pada manusia. Ikatan NOS dan ko-

faktor ini akan mengubah L-arginin dengan bantuan oksigen untuk membentuk citrulin dan NO. NO ini bersifat toksik untuk bakteri dan sel-sel tumor serta dapat menghambat replikasi virus. Jalur ini diaktivasi oleh IFN-g dan dipicu oleh adanya TNF (Muller *et al* 1999).

Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan berbagai metabolit seperti *reactive oxygen intermediate* (ROI) dan *reactive nitrogen intermediate* (RNI) yang dapat meningkatkan mekanisme *killing* dari makrofag. Makrofag dapat dipicu oleh substansi seperti partikel opsonin dan aktivator dari protein kinase C untuk menskresi ROI (Le *et al.* 1999).

B. Kerangka Berpikir

Berdasarkan sumber-sumber kepustakaan dan hasil penelitian di atas, seng berperan sebagai imunostimulan berpengaruh terhadap produksi ROI, maka disusun kerangka berpikir mencit Balb/c yang diberi dan tanpa diberi dosis seng sebagai berikut.



C. Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan tinjauan pustaka di atas, maka hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah bahwa seng berperan efektif sebagai imunostimulan terhadap produksi *reactive oxygen intermediate* (ROI) pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama kurun waktu \pm 3 bulan.

B. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah mencit strain Balb/c.

2. Sampel

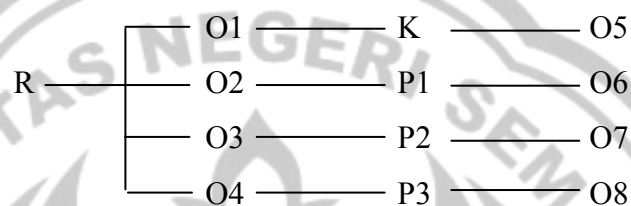
Sampel penelitian ini adalah 24 ekor mencit strain Balb/c jantan berusia 8-10 minggu dengan berat 20-30 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta. Sampel dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok yaitu kelompok I sebagai kontrol dan kelompok yang lain (II, III, IV) sebagai kelompok perlakuan dengan pemberian dosis seng. Tiap kelompok terdiri dari 6 ekor.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian seng dengan dosis 78 ppm/ekor/hari, 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari.
2. Variabel tergantung : Produksi ROI makrofag yang diperiksa dengan menggunakan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) *Reduction Assay*.
3. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah strain, berat badan, umur dan jenis kelamin mencit.

D. Rancangan Penelitian

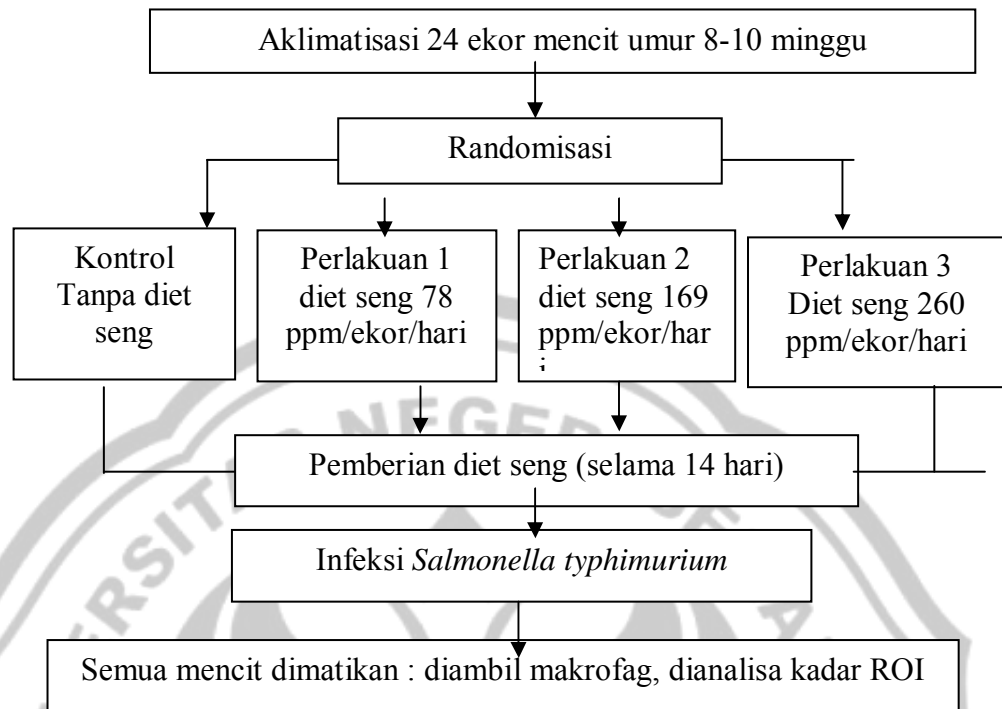
Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik, dengan desain *The Post Test Only Randomized Control Group Design* yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian berbagai dosis seng terhadap 24 ekor mencit Balb/c. Keduapuluh empat ekor hewan uji dibagi menjadi 4 kelompok secara acak dan masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor. Adapun penelitian ini dirancang dengan rancangan sebagai berikut :



Keterangan :

- R : randomisasi
- O1 : kelompok kontrol diberi perlakuan K.
- O2 : kelompok perlakuan 1 diberi perlakuan P1.
- O3 : kelompok perlakuan 2 diberi perlakuan P2.
- O4 : kelompok perlakuan 3 diberi perlakuan P3.
- K : tanpa pemberian dosis seng.
- P1 : dengan pemberian seng dosis 78 ppm/ekor/hari.
- P2 : dengan pemberian seng dosis 169 ppm/ ekor/ hari.
- P3 : dengan pemberian seng dosis 260 ppm/ ekor/ hari.
- O5 : pemeriksaan produksi ROI kelompok kontrol.
- O6 : pemeriksaan produksi ROI kelompok perlakuan 1.
- O7 : pemeriksaan produksi ROI kelompok perlakuan 2.
- O8 : pemeriksaan produksi ROI kelompok perlakuan 3

ALUR PENELITIAN



E. Alat dan Bahan

1. Alat-Alat Penelitian

Tabel 1. Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini

No	Nama alat	Fungsi
1	Mikroskop cahaya original	Mengamati persentase makrofag dan menghitung jumlah makrofag yang membentuk formazan
2	Sprit disposable dan jarum 1cc, 10cc dan ukuran 18 atau 20 gauge	Menginjeksikan bakteri <i>Salmonella typhimurium</i> secara intraperitoneal
3	Timbangan elektrik ohous dengan ketelitian 0.01 gram	Menimbang dosis seng
4	Tabung reaksi biasa dan gelas ukur diameter 16x150 mm	Tempat mengukur pada saat pembuatan larutan seng
5	Kandang hewan coba local	Tempat mencit selama penelitian
6	Seperangkat alat-alat bedah local	Mengambil makrofag
7	Pipet 25ml dan 50ml	Mengambil bahan yang berupa cair
8	Bilik hitung <i>Neubauer Improve</i>	Menghitung presipitat
9	<i>Nitriblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay</i>	Memeriksa produksi ROI makrofag

10	Tabung sentrifuse 15ml	Tempat makrofag saat dicuci dalam sentrifugasi
11	Mikropipet 25 μ l dan 50 μ l	memasukkan bahan pencuci substrat makrofag dan mengambil supernatan dari substrat makrofag yang telah dicuci
12	Sentrifuse dilengkapi pengatur suhu	mencuci substrat makrofag
13	<i>Falcon blue max</i> 15ml	Tempat cairan pada saat disentrifus
14	<i>Polypropelene conical tube</i>	tempat larutan seng, supaya lebih mudah pada saat mengambil larutan seng ke dalam sonde suplementasi seng pada mencit secara per oral.
15	Sonde lambung local	Inkubasi sel makrofag
16	Inkubator CO ₂ 5%	Alas/dasar <i>mikroplate</i>
17	<i>Cover slips</i>	isolasi makrofag
18	<i>Microplate 9 well</i>	

2. Bahan Penelitian

- a. Mencit jantan Strain Balb/c berusia 8-10 minggu dengan berat badan 20-30 gram.
- b. Dosis seng 78 ppm/ekor/hari, 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari.
- c. Strain *Salmonella typhimurium* virulen (*phage type* 510) diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta untuk menimbulkan gejala demam tifoid.
- d. Aquades steril
- e. Media *Salmonella shigella* (ss) agar
- f. Alkohol 70% untuk membersihkan kulit bagian perut dan selubung peritonium mencit.
- g. Larutan Suspensi dengan Pulvis Gum Arab (PGA).
- h. Pakan mencit berupa pellet dan air minum berupa air ledeng yang diberikan secara *ad libitum*.
- i. *Park Memorial Assay* (PMA)

- j. NaCl fisiologis sebagai pencuci sel bila cairan terkontaminasi darah.
- k. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) komplet sebagai medium kultur.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Penelitian

Persiapan 24 ekor mencit strain Balb/c yang berumur 8-12 minggu, kandang mencit berbentuk kotak lengkap dengan pakan dan minumnya, dosis seng 78 ppm/ekor/hari, 169 ppm/ekor/hari, 260 ppm/ekor/hari dan 10^5 *Salmonella typhimurium*.

b. Penghitungan Dosis

Pemberian seng normal pada manusia berkisar antara 107-231 mg/hari, hal ini ekuivalen dengan 14-30 mg/Kg (Janet *et al.* 2000). Dosis seng yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 30 mg (batas bawah), 65 mg (batas tengah) dan 100 (batas atas). Penelitian ini menggunakan batas bawah 30 karena seng dalam tubuh manusia dalam keadaan normal (tanpa adanya infeksi) adalah 30 mg. Penggunaan batas atas 100 mg karena menurut Janet (2000) perubahan konsentrasi seng ketika sangat tinggi (100 mg/Kg) maka tubuh tidak dapat mengakumulasi seng.

Pemberian seng untuk mencit adalah berpedoman pada dosis yang biasa dibutuhkan manusia dan konversi untuk mencit. Faktor konversi dosis dari manusia ke mencit adalah 0,0026 (Kusumawati 2004).

$$0,0026 \times 30 = 0,078 \text{ mg} = 78 \text{ ppm/ekor/hari}$$

$$0,0026 \times 65 = 0,169 \text{ mg} = 169 \text{ ppm/ekor/hari}$$

$$0,0026 \times 100 = 0,26 \text{ mg} = 260 \text{ ppm/ekor/hari}$$

Pemberian dosis seng dalam bentuk ppm (cair) tujuannya untuk mempermudah pemberian seng 0,078 mg (serbuk) tiap hari pada mencit.

2. Tahap Pelaksanaan

- a. Aklimatisasi mencit Balb/c selama 7 hari.
- b. Mencit Balb/c percobaan sebanyak 24 ekor dikelompokkan secara acak

menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok 6 ekor kemudian ditimbang berat badan awal mencit serta kandang mencit ditandai dengan label.

- c. Dosis seng dipersiapkan dan dilaksanakan penelitian.
- d. Masing-masing kelompok diberi perlakuan selama 14 hari secara per oral serta diberi pakan dan minum *ad libitum*.
- e. Penginjeksian *Salmonella* diberikan intraperitoneal pada hari ke-8 setelah pemberian seng.
- f. Selanjutnya mencit dimatikan pada hari ke-15 setelah pemberian seng untuk diisolasi makrofag dan menghitung skor derajat pembentukan formazan.

G. Metode Pengumpulan Data

Pengambilan data dilakukan dengan isolasi makrofag dan pemeriksaan produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) dengan cara reduksi NBT.

1. Isolasi makrofag
 - a. Mencit dimatikan dengan dislokasi servix kemudian diletakkan dalam posisi telentang
 - b. Kulit bagian perut dan selubung peritoniumnya dibuka dan dibersihkan dengan alkohol 70%.
 - c. 10 ml larutan RPMI dingin diinjeksikan ke dalam rongga peritonium.
 - d. Peritonium dipijat sambil menepuk-nepuk pelan untuk mendapatkan makrofag.
 - e. Cairan disedot kembali sampai habis dan memasukkan dalam tabung falcon 15 ml.
 - f. Cairan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm pada suhu 4⁰C selama 10 menit.
 - g. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan NaCl fisiologis.
 - h. Supernatan dibuang dan ditambahkan 3 ml medium RPMI komplet yang terdiri dari RPMI 1640, FBS 10% ditambah penicilin dan streptomycin.

- i. Sel-sel dihitung dengan hemositometer setelah dilarutkan dalam 3% asam asetat untuk melisis sel-sel darah merah, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium komplet RPMI sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan 2.5×10^6 sel/ml
 - j. Sel dikulturkan dalam medium komplet di dalam *mikroplate* 24 yang bawahnya datar dan dasarnya diberi kaca benda (*coverslip*), setiap sumuran 200 μ l (kepadatan 5×10^5 sel/ml) selanjutnya diinkubasikan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37⁰C selama 30 menit kemudian ditambahkan medium RPMI 2 kali dan medium komplet 1 ml tiap sumuran serta inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.
2. Pemeriksaan produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) dengan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) *reduction assay*.
- a. Makrofag yang telah didapat kemudian distimulasi dengan *Park Memorial Assay* (PMA) sehingga muncul presipitat formazon.
 - b. Selanjutnya presipitat formazon tersebut di atas diteteskan ke dalam kamar hitung *Neubauer* yang sudah ada kaca penutupnya untuk dilihat di bawah mikroskop pada kotak mula-mula dengan perbesaran lemah, kemudian dengan perbesaran kuat.
 - c. Persentase pada tiap sel makrofag dihitung sebanyak 50 sel dengan memilih lima bujur sangkar (4 di sudut dan 1 di tengah) dari 25 bujur sangkar pada daerah hitung *Neubauer*. Pada ke lima bujur sangkar tersebut masing-masing terdiri atas 16 bujur sangkar kecil.
 - d. Menentukan derajat presipitat, dengan kriteria, derajat 1 : presipitat <25%, derajat 2 : presipitat 25-50%, derajat 3 : 50-75% dan derajat 4 : presipitat >75%.

H. Metode Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu berupa hasil produksi ROI selanjutnya dilakukan analisis statistik deskriptif dan analitik. Data dari variabel tergantung (produksi ROI) dianalisis secara deskriptif untuk dihitung nilai

kecendrungan sentral (mean dan median) serta sebaran (standard deviasi). Selanjutnya untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov*.

Distribusi data tidak normal sehingga dilakukan uji nonparametrik dengan *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U*. Nilai signifikansi dalam penelitian apabila variabel yang dianalisa memiliki $p < 0,05$.



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Dengan adanya anion superoksid/O₂ pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat formazan. Hasilnya dibaca di bawah mikroskop cahaya, diukur persentase dan derajatnya per 50 makrofag kemudian dibuat rata-rata dan dinyatakan dalam derajat 1-4.

Berdasarkan analisis data penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data hasil penelitian sebagaimana tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil pengamatan produksi ROI pada mencit setelah perlakuan

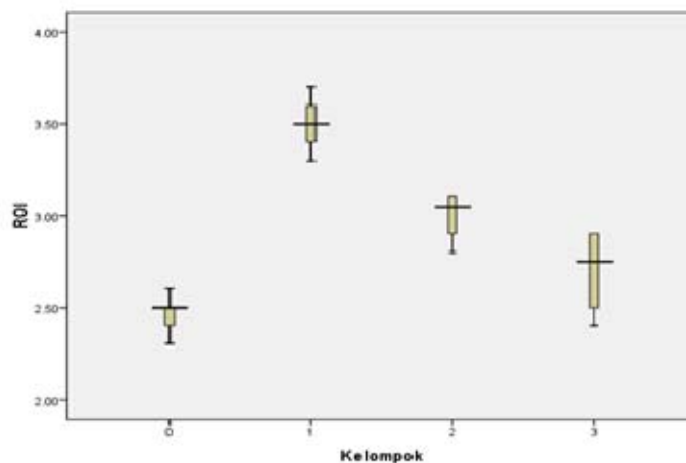
Kelompok	N	Jumlah produksi ROI
Kontrol	6	(2.52±0.108) ^a
P1	6	(3.53±0,164) ^b
P2	6	(3.04±0,136) ^c
P3	6	(2.72±0,213) ^{a,c}

Keterangan: superscrib yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata.

Keterangan :
Kontrol : Tanpa diberi dosis seng.
Perlakuan P1 : Diberi dosis seng 78 ppm/ekor/hari.
Perlakuan P2 : Diberi dosis seng 169 ppm/ekor/hari.
Perlakuan P3 : Diberi dosis seng 260 ppm/ekor/hari.

Rerata jumlah produksi ROI tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan P1, yaitu 3.53 sedangkan terendah pada kelompok kontrol yaitu 2.52. Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa produksi ROI untuk masing-masing kelompok reratanya berbeda. Rerata produksi ROI tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan P1.

Grafik produksi ROI tiap kelompok perlakuan



Gambar 1. Grafik *box plot* produksi ROI tiap kelompok perlakuan

Nilai median yang digambarkan pada grafik box plot menunjukkan bahwa median produksi ROI paling tinggi kelompok 1, diikuti kelompok 2, diikuti kelompok 3 dan paling rendah pada kelompok 0 (kelompok kontrol). Uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh untuk tiap kelompok K, P1, P2 dan P3 tingkat signifikansinya diatas 0,05 (0,117; 0,200; 0,138; 0,200 lebih besar dari 0,05), maka dapat dikatakan bahwa distribusi data tidak normal, sehingga menggunakan uji statistik nonparametrik.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas data tiap kelompok perlakuan dengan *Levene's test*. Hasil dari uji tersebut bahwa produksi ROI $P=0,365$ maka dikatakan bahwa data tiap kelompok perlakuan adalah homogen, oleh karena itu digunakan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan produksi ROI pada seluruh kelompok perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U* untuk mengetahui perbedaan diantara tiap kelompok perlakuan.

Berdasarkan uji *kruskal Wallis* terlihat bahwa keseluruhan kelompok dari variabel produksi ROI mempunyai perbedaan yang bermakna dengan nilai ($p < 0.05$) dimana kelompok yang diberi dosis seng produksi ROInya

lebih tinggi dari kelompok kontrol. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan yang bermakna masing-masing kelompok, dilakukan uji *Mann Whitney U* dan hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3 Hasil Uji *Mann Whitney U* Produksi ROI*)

Kelompok	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol	-	0,004**	0,004**	0,107
P1	0,004**	-	0,004**	0,004**
P2	0,004**	0,004**	-	0,016
P3	0,107	0,004**	0,016	-

* Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6

**Signifikan, berbeda nyata pada taraf uji 5%

Kontrol : berbeda nyata dengan P1 dan P2, tidak berbeda nyata dengan P3

P1 : berbeda nyata dengan P2, P3 dan kontrol

P2 : P2=P3

Tabel 3 di atas menunjukkan bila kelompok kontrol dibanding kelompok P1 dan P2 terdapat perbedaan yang nyata ($p=0,004$). Namun kelompok kontrol tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ($p=0,107$) karena $p>0,05$. Kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ($p=0,016$). Pada kelompok kontrol (mencit Balb/c yang hanya diberi pakan standart dan diinfeksi *Salmonella typhimurium*) produksi *Reactive Oxygen Intermediate* tetap ada meski dalam jumlah yang relatif rendah.

B. Pembahasan

Dalam penelitian ini menggunakan mencit Balb/c jantan, berumur 8-12 minggu dan pemilihannya dilakukan secara acak. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa pemberian dosis seng 78 ppm/ekor/hari, 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari berpengaruh signifikan pada produksi ROI mencit Balb/c.

Pada mencit Balb/c yang diberi dosis seng, mencit mengalami infeksi *Salmonella typhimurium* yang masuk dalam tubuh ditunjukkan dengan adanya peningkatan produksi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI). Makrofag yang teraktivasi akan memperlihatkan antara lain peningkatan produksi enzim lisosom, peningkatan aktivitas fagositosis dan adanya peningkatan produksi

ROI dan NO (Chan *et al.* 2001). *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan *Salmonella typhimurium* sebagai antimikrobal (Tjahajati *et al.* 2004) yang produksinya diinduksi bersama-sama oleh sitokin IFN- γ dan TNF $-\alpha$ (Chan dan Kaufmann 1994).

Makrofag teraktivasi mengubah oksigen menjadi ROI yang merupakan agen pengoksidasi reaktif yang menghancurkan mikroba. Pada penelitian ini produksi ROI pada kelompok mencit yang diberi seng pada dosis 260 ppm/ekor/hari tidak berbeda nyata dengan kelompok mencit tanpa pemberian dosis seng. Aktivitas makrofag peritoneum mencit yang mensekresi ROI diukur dengan NBT *reduction assay*. Reduksi NBT menunjukkan adanya lonjakan respirasi yang diikuti dengan pembentukan anion superoksida (O_2^-) yang akan mereduksi NBT membentuk formazan berwarna biru yang tidak terlarut.

Hasil dari uji lanjut *Mann Whitney U* terlihat bahwa kelompok P1 berbeda nyata dengan kontrol, hal ini menunjukkan bahwa pemberian seng meningkatkan ekspresi dan fungsi molekul permukaan limfosit T (misalnya *ICAM-1*) sehingga memperbaiki interaksi antar sel dan kemampuannya menangkap langsung superantigen. Adanya infeksi yang berupa *Salmonella* melibatkan proses fagositosis oleh makrofag teraktivasi, dimana aktivasi terjadi melalui salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel T yaitu IFN yang merangsang dan mengaktifkan makrofag untuk memproduksi sitokin, metabolit asam *arachidonic* dan berbagai substansi pembunuh kuman, termasuk ROI, NO serta enzim-enzim yang disekresikan ke dalam fagosom (Kresno 2001).

Hasil uji *Mann Whitney U* terlihat bahwa kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3. Hal ini menunjukkan bahwa Produksi ROI dari makrofag pada semua kelompok mencit setelah mengalami peningkatan sampai puncak tertentu, selanjutnya mengalami penurunan. Hasil ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Triyono (2001) yang menunjukkan bahwa produksi ROI makrofag pada mencit yang diinfeksi

dengan *Salmonella typhimurium* akan meningkat pada puncak tertentu, kemudian mengalami penurunan. Penelitian tersebut juga memperlihatkan bahwa gambaran aktivitas makrofag yang terjadi sejalan dengan gambaran kadar IFN- γ serum, yaitu pada saat tercapainya puncak aktivitas makrofag ternyata juga terjadi puncak kenaikan kadar IFN- γ serum dan pada saat kadar IFN- γ turun maka aktivitas makrofag juga mengalami penurunan (Gandahusada 2000).

Aktivitas sekresi ROI dari makrofag pada kelompok P1 produksi ROInya lebih tinggi dibanding kelompok kontrol hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis seng dapat meningkatkan aktivitas makrofag untuk mensekresi ROI secara *in vitro*. Dosis seng meningkatkan ROI melalui sistem imun yang spesifik. Dalam Gandahusada (2000) dinyatakan bahwa pada infeksi *Salmonella typhimurium*, immunoglobulin M (IgM) mulai terbentuk beberapa hari setelah infeksi primer dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi, kemudian menurun dan meningkat dalam waktu 1-3 bulan. Immunoglobulin G (IgG) dapat dideteksi beberapa hari setelah munculnya IgM dan mencapai puncaknya ± 2 bulan setelah infeksi dan jumlah IgG yang tinggi ini dapat bertahan selama berbulan-bulan untuk kemudian mengalami penurunan dan dapat ditemukan seumur hidup dalam konsentrasi rendah. Berdasarkan pada respon imun yang dinyatakan oleh Gandahusada tersebut maka pemberian dosis seng yang merupakan komponen imunogenik dari *Salmonella typhimurium* pada mencit kemungkinan juga akan menimbulkan respon imun yang serupa.

Interaksi antara opsonin mikroorganisme dan membran fagosit tidak hanya menghasilkan ingesti tetapi juga menyebabkan *metabolic burst*, yang sangat karakteristik dengan peningkatan kebutuhan oksigen dan menghasilkan anion superoxide (H_2O_2), yang keduanya memiliki aktivitas mikrobisidal kuat (Leijh *et al* 1996). Pentingnya sistem untuk pemusnahan mikrobakterial dapat terlihat jelas pada pasien yang memiliki *defect* (kelainan) pada aktivitas mikrobisidal pada granulosit dan monosit seperti pada penderita *chronic granulomatous disease* (Guun-Moore *et al.* 2001).

Kelompok perlakuan produksi ROI nya lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, disebabkan oleh pemberian ajuvan berupa pemberian dosis seng. Menurut Smith (2005), ajuvan jika ditambahkan pada suatu imunogen akan menyebabkan lepasnya imunogen tersebut secara perlahan-lahan dalam bentuk tetes-tetes emulsi, sehingga dapat merangsang respons imun secara lebih efektif. Dengan demikian pemberian dosis seng akan menyebabkan respons imun lebih efektif jika dibandingkan dengan pemberian pakan standar.

Pemberian dosis seng pada dosis 78 ppm/ekor/hari produksi ROI mengalami peningkatan tetapi pada dosis seng 169 ppm/ekor/hari dan dosis seng 260 ppm/ekor/hari mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Chvapil yang menyatakan bahwa peningkatan jumlah seng dapat menurunkan konsumsi oksigen pada neutrofil yang sejalan dengan penurunan aktivitas fagositik dan bakterisidal. Zukoski *et al* (2001) juga membuktikan adanya penurunan aktivitas enzim NADPH oksidase makrofag peritoneal tikus yang diberi diet tinggi seng (2000 ppm) selama 3 hari. Penurunan enzim tersebut tentunya dapat menurunkan kemampuan bakterisidal makrofag (Beisel 2002).

Tingginya produksi ROI dihubungkan dengan usaha mencit dalam pemusnahan *Salmonella typhimurium* yang masuk dalam tubuh, hal ini disebabkan oleh makrofag yang teraktivasi antara lain akan memperlihatkan peningkatan aktivitas fagositosis, secara fisik terjadi perubahan bentuk atau ukuran dari makrofag, dan adanya peningkatan produksi ROI dan NO (Chan ED *et al.* 2001). *Reactive Oxygen Intermediate* dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan *Salmonella typhimurium* sebagai antimikrobia yang produksinya diinduksi bersama-sama oleh sitokin IFN- γ dan TNF- α . Dikatakan bahwa interaksi antara opsonin mikroorganisme dan membran fagosit tidak hanya menghasilkan ingesti tetapi juga menyebabkan *metabolic burst*, yang sangat karakteristik dengan peningkatan kebutuhan oksigen dan

menghasilkan anion superoksida (H_2O_2), yang keduanya memiliki aktivitas mikrobisidal kuat (Leijh PCJ *et al.* 2006).

Produksi ROI pada semua kelompok termasuk kontrol, akan meningkat setelah dilakukan infeksi *Salmonella typhimurium*. Hal ini membuktikan bahwa infeksi dengan *Salmonella typhimurium* dapat memicu respon imun pada tubuh mencit. Abbas *et al.* (2000) menyatakan bahwa infeksi oleh *Salmonella typhimurium* akan diikuti dengan perkembangan respon imun baik yang nonspesifik maupun yang spesifik yaitu humoral maupun selular. Respon imun nonspesifik berkembang pada awal infeksi. Pada stadium ini *Salmonella* akan mengaktifasi makrofag untuk menghasilkan IL-12 kemudian IL-12 akan merangsang sel NK untuk menghasilkan IFN- γ yang selanjutnya akan mengaktifasi makrofag. Makrofag pada respon imun yang spesifik akan diaktifasi oleh limfosit T melalui sinyal interaksi CD 40L-CD 40 dan melalui IFN- γ . Sel ini apabila teraktifasi antara lain akan menunjukkan aktivitas produksi ROI.

Berdasarkan pada gambaran hasil penelitian tersebut dengan mengingat bahwa infeksi *Salmonella typhimurium* dapat merangsang produksi IFN- γ maka sangat mungkin jika peningkatan dan penurunan produksi ROI makrofag pada penelitian ini dipengaruhi oleh peningkatan dan penurunan kadar IFN- γ . Menurut Denker & Gazzinelli (2008), pada infeksi *Salmonella typhimurium* selain dihasilkan faktor-faktor yang mengaktifasi respons imun (misalnya IL-12, TNF- α) juga dihasilkan faktor-faktor yang mengatur respons imun (misalnya IL-4, IL-10). Peningkatan dan penurunan kadar IFN- γ dapat dipengaruhi oleh 2 macam faktor tersebut.

BAB V

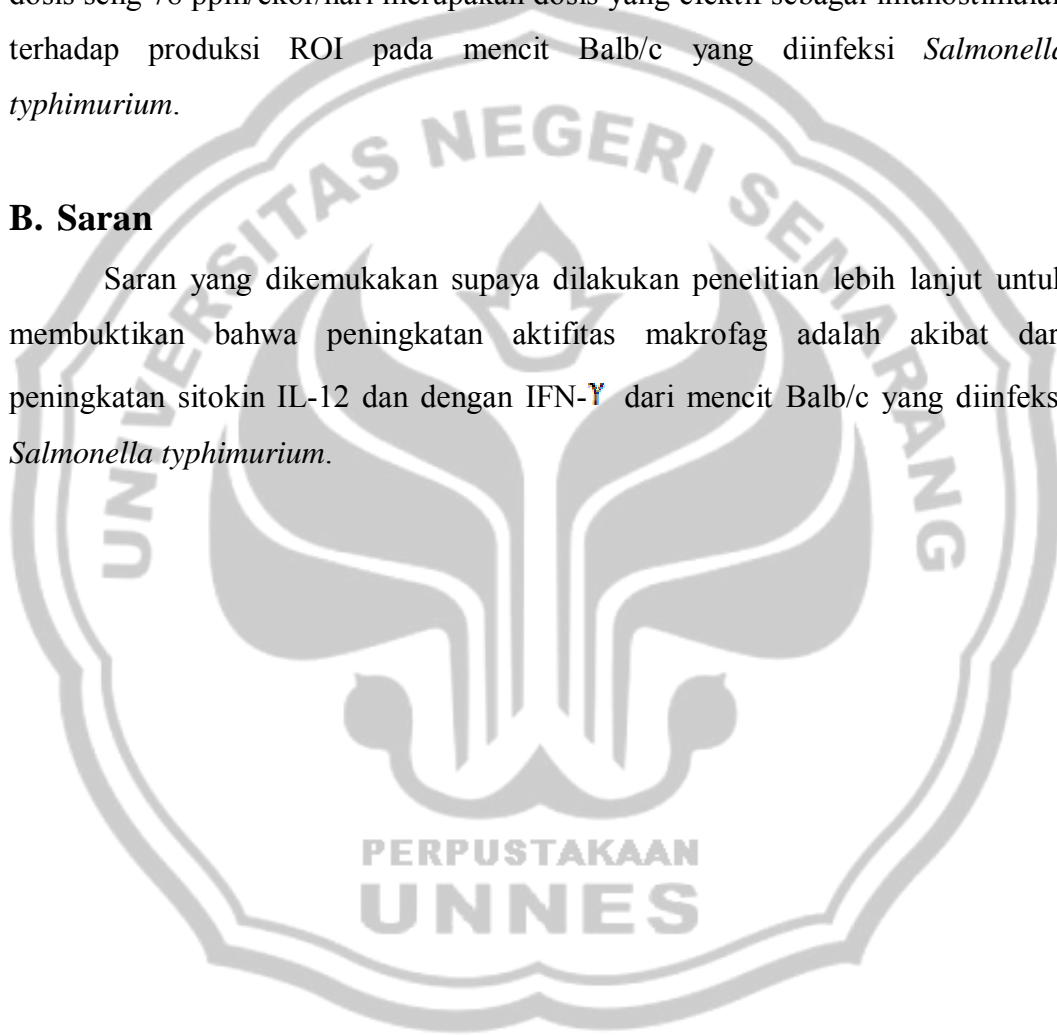
SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian dosis seng 78 ppm/ekor/hari merupakan dosis yang efektif sebagai imunostimulan terhadap produksi ROI pada mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

B. Saran

Saran yang dikemukakan supaya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa peningkatan aktifitas makrofag adalah akibat dari peningkatan sitokin IL-12 dan dengan IFN- γ dari mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

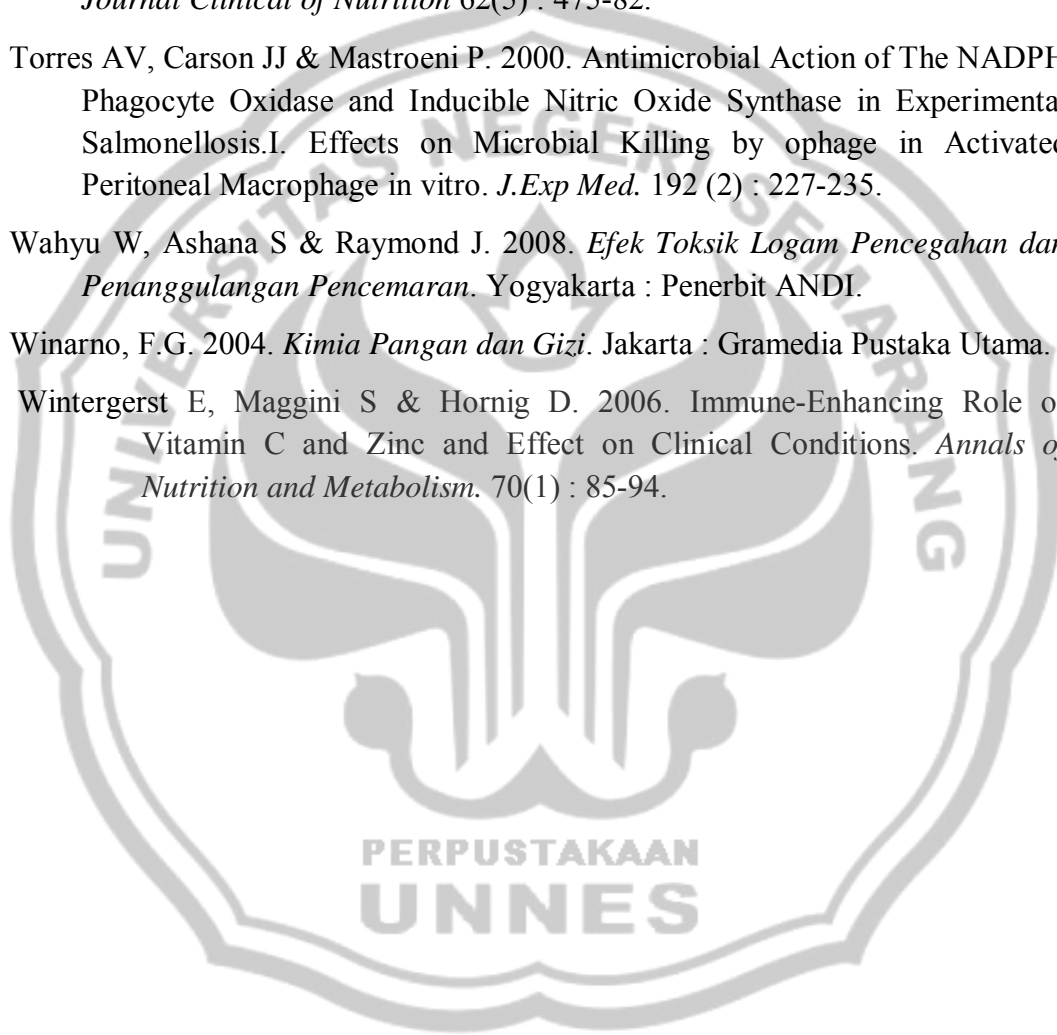


DAFTAR PUSTAKA

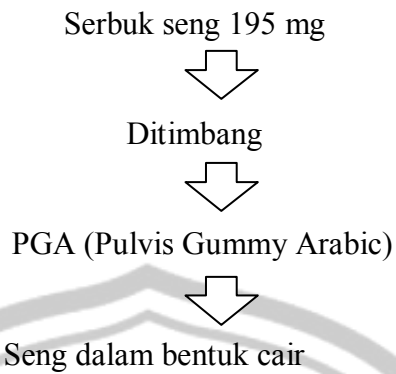
- Abbas AK & Lichmant AH. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition Philadelphia : Saunders.
- Almatsier S. 2003. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta : Penerbit Gramedia Pustaka Utama.
- Baratawidjaja KG. 2002. *Imunologi Dasar Edisi 5*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Beissel. 2002. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemaman (carrisyn). *Int. J Immunopharmacol* 40(10) : 967-974.
- Braunwald. 2005. *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition*. New York : Penerbit Harrison's.
- Camnie FL & Samuel IM. 1999. *Principles of Internal Medicine thirteenth edition*. New York : Penerbit MC Graw-Hili.
- Donabedian H. 2006. Nutritional Therapy and Infectious Diseases: a Two-Edged Sword. *Nutrition Journal*. 72(2) : 5-21.
- Fatimah. 2006. Respon Imunitas yang Rendah pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara Kedokteran*. 10(1) : 47-53.
- Gandahusada S. 2000. *Salmonellosis : Epidemiologi, Patogenesis dan Diagnostik*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gao XM, Tite JP & Lipscombe M. 1999. *Salmonella typhimurium* strains that invade nonphagocytic cells resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun*. 60(9) : 3780-9.
- Gray D & Springer T. 2004. *Host Defense Against Infection*. dalam: Janeway CA, Travers P eds. *Immunobiology The Immune System In Health And Disease*. London : Current Biology Ltd. Garland Publishing Inc.
- Guun-Moore DA, Jenkins PA & Lucke VM. 2001. Feline Tuberculosis : a literature review and discussion of 19 cases by unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec*. 138:276-80
- Hodkinson C, Kelly M & Alexander H. 2007. Effect of Zinc Supplementation on the Immune Status of Healthy Older Individuals Aged 55-70 Years: The ZENITH Study. *The Journals of Gerontology: Series A : Biological sciences and medical sciences* 11(2) : 598-609.

- Hanafiah KA. 1999. *Rancangan Percobaan : Teori dan Aplikasi*. Jakarta : Penerbit CV. Rajawali.
- Jawetz, Melnik & Adelberg's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology)*. Jakarta : Penerbit Salemba.
- Janet CK, David MS & Leslie RW. 2000. Zinc Homeostasis In Human. *Journal of Nutritional*; 130(1) 1360S-1366S.
- Karnen GB. 2002. *Imunologi*. Jakarta : Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Karp G. 1999. *The Immune Response Cell and Molecular Biology 2nd edition*. New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Karsinah, Lucky HM & Suharto. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Binarupa Aksara.
- Kaufman HE. 1999. *Immune Response to Intracellular Bacteria*. In : *Clinical Immunology Principle and Practice*. St. Louis: Mosby.
- Kauter M. 1998. *Experimental Studies On Pathogenesis Of Salmonella Infection (Thesis)*. Jakarta : Khatolick Universities Nijmegen.
- Kusumawati D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Leijh PCJ, Furh RV, Zwet TLV. 2001. *In vitro Determination of Phagocyte and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocyte*. in : *Cellular Immunology*. London : Blackwell Scientific Publication.
- Le TP & Hoffman SL, 1999. *Typoid Fever*. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, *Tropical Infectious Disease Principles, Pathogen & Practice*. New York : Churchill Livingstone.
- Mittrucker HW, Kohler A & Kaufmann SHE. 2000. Characteriation of the Marine T-lymphocyte Response to Salmonella Enteritica Serovar Typhimurium infection. *Journal infect Immun*: 70 (1) :199-203.
- Muller M, Althaus R & Frohlich D. 1999. Reduced antilisterial activity of TNF-deficient bone marrow-derived macrophages is due to impaired superoxide production. *Eur J Immunol* 60(5) : 3089-97
- Parslow TG. 2001 . *The Immune Response*. In : *Medical Immunology, 9th ed*. New Jersey : Prentice Hall Int. Inc.
- Roit I, Brostoff J & Male D. 2001. *Immunology Sixth Edition*. Toronto : Mosby Elsivier Science Limited.

- Scheffler WC. 2000. *Statistika Untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu yang Bertautan*. Bandung : Penerbit ITB.
- Smith JR. 2005. Produksi Serum Hiperinum. Dalam Burges GW. *Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian* (terjemahan). Yogyakarta : Gajah Mada University Press.
- Solomon NM & Jacob RA. 2001. Studies on The Bioavaibility of Inc Human effect of Heme and Nonheme Ion on The Absorbtion of Zinc. *American Journal Clinical of Nutrition* 62(5) : 475-82.
- Torres AV, Carson JJ & Mastroeni P. 2000. Antimicrobial Action of The NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis.I. Effects on Microbial Killing by ophage in Activated Peritoneal Macrophage in vitro. *J.Exp Med.* 192 (2) : 227-235.
- Wahyu W, Ashana S & Raymond J. 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Yogyakarta : Penerbit ANDI.
- Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Wintergerst E, Maggini S & Hornig D. 2006. Immune-Enhancing Role of Vitamin C and Zinc and Effect on Clinical Conditions. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 70(1) : 85-94.



Lampiran 1 Proses Pembuatan Larutan Seng



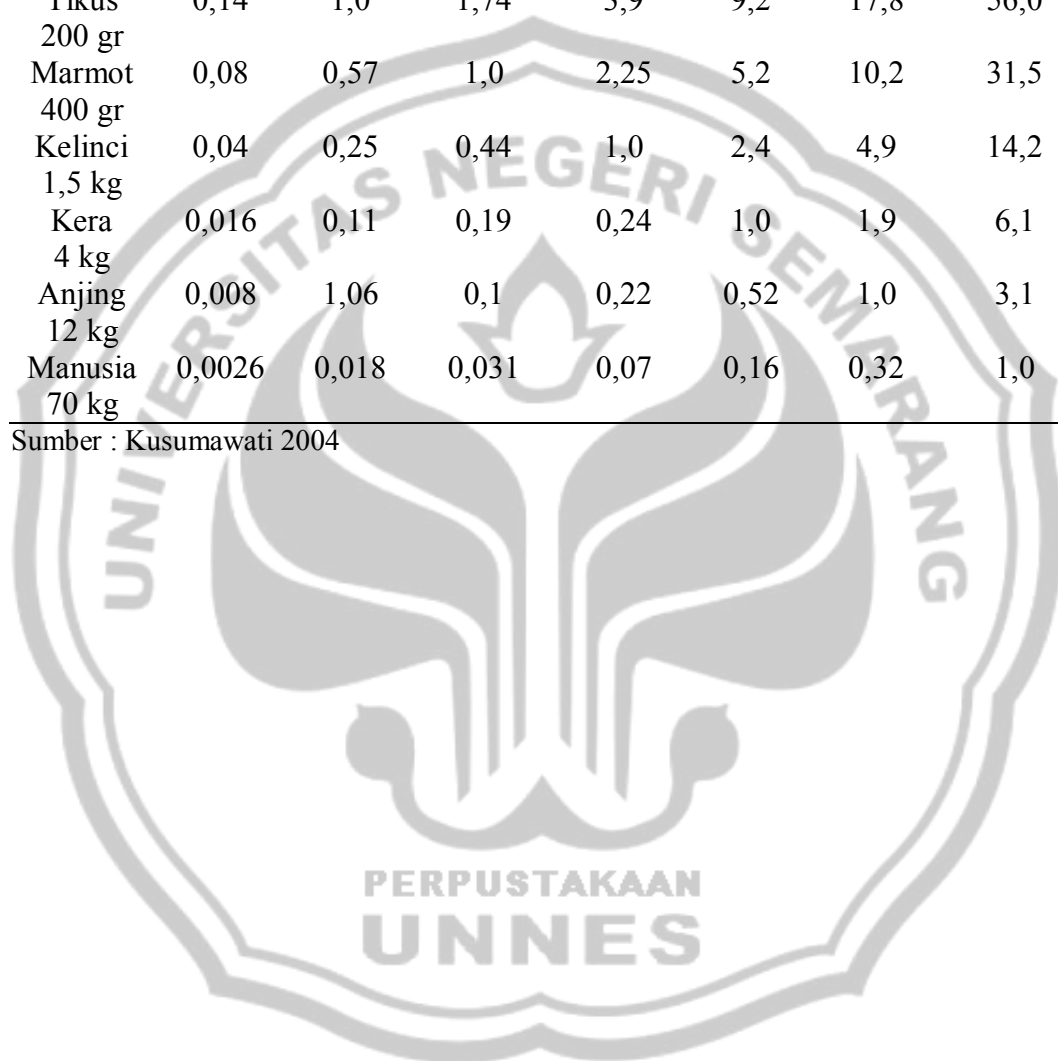
- Keterangan :
- Perlakuan 1 : 9,75 mg + PGA 0,625 mg + aquades sampai dengan 125 ml
 - Perlakuan 2 : 21,125 mg + PGA 1,25 mg + aquades sampai dengan 125 ml
 - Perlakuan 3 : 32,5 mg +PGA 1,875 mg + aquades sampai dengan 125 ml



Lampiran 2 Tabel Konversi Dosis Antar Hewan

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	64,1	142,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	2,4	4,9	14,2
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,24	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	1,06	0,1	0,22	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,16	0,32	1,0

Sumber : Kusumawati 2004



Lampiran 3 Hasil Pengukuran Produksi ROI

Table kadar *Reactive Oxygen Intermediate* pada tiap kelompok (dalam μM)

Kelompok	Kontrol	X_i	P1	X_i	P2	X_i	P3	X_i
1	2.44	0.08	3.3	0.23	2.96	0.08	2.82	-0.1
2	2.66	-0.14	3.4	0.13	3.12	-0.08	2.4	0.32
3	2.56	-0.04	3.54	-0.01	2.82	-0.22	2.96	-0.24
4	2.58	-0.06	3.56	-0.03	3.05	-0.01	2.56	0.16
5	2.36	0.16	3.76	-0.23	3.18	-0.14	2.9	-0.18
6	2.56	-0.04	3.64	-0.11	3.15	-0.11	2.7	0.02
Jumlah	15.18		4.24		18.28		16.34	
Rerata	2.52		3.53		3.04		2.72	

$X_i = \bar{X} - X$			
X_i^2 kontrol	X_i^2 P1	X_i^2 P2	X_i^2 P3
0.0064	0.0529	0.0064	0.01
0.0196	0.0169	0.0064	0.1024
0.0016	0.0001	0.0484	0.0576
0.0036	0.0009	0.0001	0.0256
0.0256	0.0529	0.0196	0.0324
0.0016	0.0121	0.0093	0.0004

$$SX = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Keterangan :

SX : deviasi standard dari suatu sampel

\bar{X} : mean aritmatika

X_i : nilai dari data (variabel x)

n : banyaknya data x dalam suatu sampel

$$\begin{aligned} SX_{\text{kontrol}} &= \sqrt{\frac{(0.08)^2 + (-0.14)^2 + (-0.04)^2 + (-0.06)^2 + (0.16)^2 + (-0.04)^2}{6-1}} \\ &= \sqrt{\frac{0,0584}{6-1}} \\ &= 0,108 \end{aligned}$$

$$SX_{P1} = \sqrt{\frac{(0.023)^2 + (0.13)^2 + (-0.01)^2 + (-0.03)^2 + (-0.23)^2 + (-0.11)^2}{6-1}}$$

$$\begin{aligned} &= \sqrt{\frac{0,1358}{6-1}} \\ &= 0,164 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SX_{P_2} &= \sqrt{\frac{(0,08)^2 + (-0,08)^2 + (-0,22)^2 + (-0,01)^2 + (-0,14)^2 + (-0,11)^2}{6-1}} \\ &= \sqrt{\frac{0,0186}{6-1}} \\ &= 0,136 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SX_{P_3} &= \sqrt{\frac{(-0,1)^2 + (0,32)^2 + (-0,24)^2 + (0,16)^2 + (-0,18)^2 + (0,02)^2}{6-1}} \\ &= \sqrt{\frac{0,2284}{6-1}} \\ &= 0,213 \end{aligned}$$



Lampiran 4 Tabel (out put) Hasil Uji Normalitas Produksi ROI**Tests of Normality**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	df	Sig.
ROI	0	.293	6	.117
	1	.167	6	.200*
	2	.285	6	.138
	3	.183	6	.200*

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.



Lampiran 5 Tabel (out put) Hasil uji Levene's Produksi ROI

Case Processing Summary

kelompok	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
ROI 0	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
1	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
2	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
3	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ROI	Based on Mean	1.117	3	20	.366
	Based on Median	1.068	3	20	.385
	Based on Median and with adjusted df	1.068	3	18.743	.387
	Based on trimmed mean	1.119	3	20	.365

Lampiran 5 Tabel (out put) Hasil Uji Kruskal Wallis Produksi ROI

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Ranks

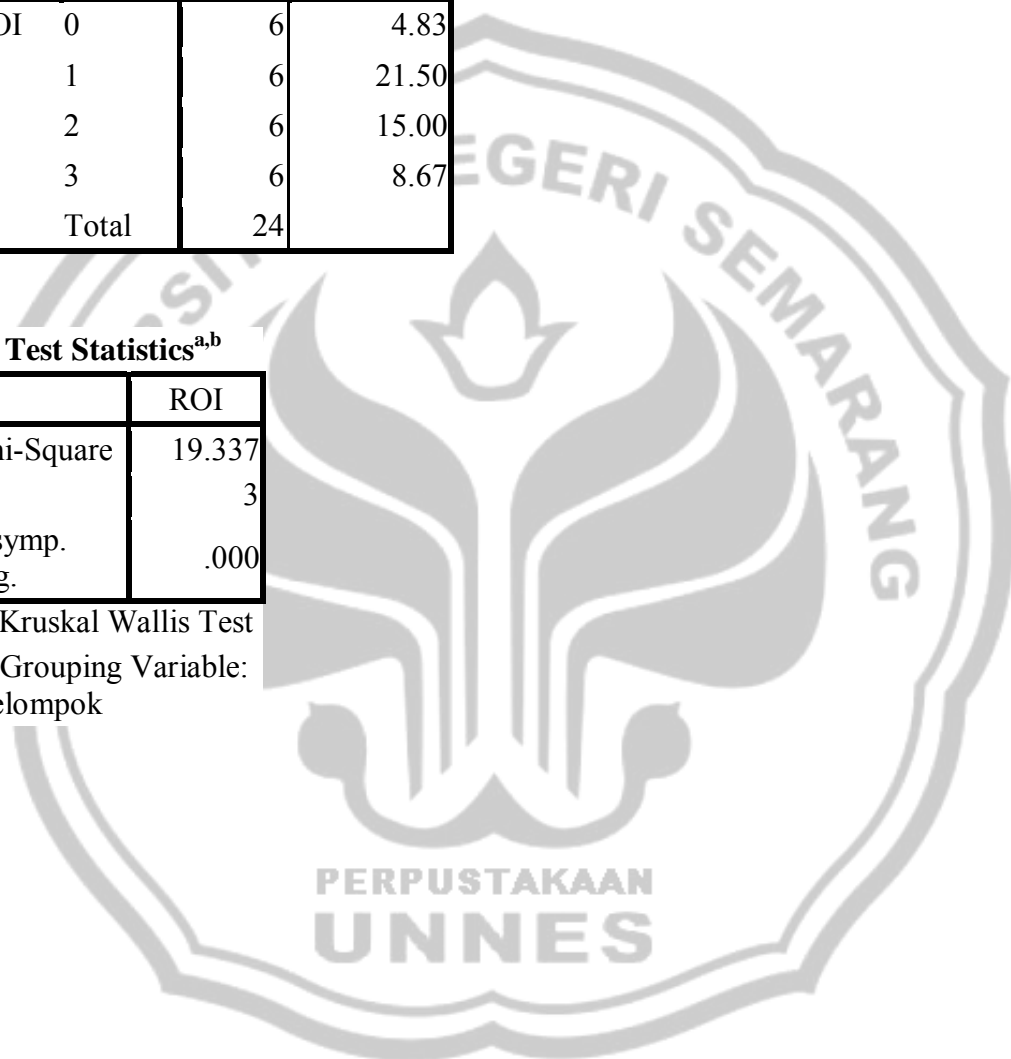
Kelompok	N	Mean Rank
ROI 0	6	4.83
1	6	21.50
2	6	15.00
3	6	8.67
Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	ROI
Chi-Square	19.337
df	3
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Kelompok



Lampiran 6 Tabel (out put) Hasil Uji Mann Whitney U Produksi ROI

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI 0	6	3.50	21.00
1	6	9.50	57.00
Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI 0	6	3.50	21.00
I 2	6	9.50	57.00
Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI	0	6	4.83	29.00
	3	6	8.17	49.00
	Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-1.613
Asymp. Sig. (2-tailed)	.107
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI 1	6	9.50	57.00
2	6	3.50	21.00
Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI 1	6	9.50	57.00
3	6	3.50	21.00
Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ROI 2	6	9.00	54.00
3	6	4.00	24.00
Total	12		

Test Statistics^b

	ROI
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	24.000
Z	-2.410
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Lampiran 7 Dokumentasi Hasil Penelitian



Gambar 2 Larutan Seng (Zn)



Gambar 3 Mematikan mencit dengan dislokasi servix

