EFEKTIVITAS SUPLEMENTASI MIKROMINERAL SENG (ZN) TERHADAP INDEKS FAGOSITOSIS MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella typhimurium.*

skripsi

disusun sebagai salah satu syarat

untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Biologi

Oleh:

Nurul Wahidah

4450405005

PERPUSTAKAAN UNNES

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

2010

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya mengatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul " Efektifitas Suplementasi Mikromineral Seng (Zn) terhadap Indeks Fagositosis Makrofag Mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* " disusun berdasarkan 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 dibagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.

Semarang, September 2010

Nurul Wahidah
4450405005

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

PENGESAHAN

Skripsi dengan judul:

Efektivitas Suplementasi Mikromineral Seng (Zn) terhadap Indeks Fagositosis Makrofag Mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*.

disusun oleh

Nama : Nurul Wahidah

NIM : 4450405005

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi FMIPA Unnes pada tanggal 2 September 2010.

Panitia Ujian

Ketua	Sekretaris
Dr. Kasmadi Imam S., M.S	Dra. Aditya Marianti, M Si
NIP. 195111151979031001	NIP. 196712171993032001

Penguji

Dra. Retno Sri Iswari, SU
NIP. 19520207 197903 2001

Anggota Penguji/ Pembimbing Utama	Anggota Penguji/ Pembimbing pendamping
Dr. drh. R. Susanti, M.P	drh. Wulan Christijanti, M.Si
NIP. 19690323 199703 2001	NIP. 19680911 199603 2001

PERPUSTAKAAN UNNES

ABSTRAK

Wahidah, Nurul. 2010. Efektivitas Suplementasi Mikromineral Seng (Zn) terhadap Indeks Fagositosis Makrofag Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Dr. drh. R. Susanti, MP dan drh. Wulan Christijanti, M.Si.

Typus merupakan satu dari lima penyakit penyebab kematian tertinggi di Indonesia dengan angka kematian sebesar 20.000 jiwa pertahun. Typus pada manusia disebabkan oleh infeksi *S. typhi* sedangkan pada mencit disebabkan oleh *S. typhimurium*, mekanisme infeksi keduanya relatif sama. Penelitian menggunakan mencit Balb/c karena respon imunnya mudah untuk diamati. Garis pertahanan pertama terhadap infeksi *S. typhimurium* adalah makrofag. Aktivasi makrofag dalam menghadapi *S. typhimurium* dapat ditingkatkan oleh IFN-γ yang diproduksi sel NK dan Th1. Fungsi sel-sel imun tersebut dapat meningkat melalui pemberian suplementasi mikromineral seng. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas pemberian zat gizi mikromineral seng terhadap indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium.*

Mencit Balb/c jantan berumur 8-10 minggu dikelompokkan secara random menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit. Mencit diaklimatisasi dengan kondisi laboratorium kemudian diberikan perlakuan dengan mikromineral seng. Pada kelompok kontrol tidak diberikan suplementasi seng, sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan suplementasi seng dengan dosis 0,078; 0,169; dan 0,260 mg /ekor/hari. Pada hari ke-8 semua mencit diinfeksi dengan 10^5 CFU *S. typhimurium* secara intraperitoneal dan tetap diberikan suplementasi mikromineral seng. Pada hari ke-15 semua mencit dibunuh dan dilakukan isolasi makrofag kemudian dihitung indeks fagositosisnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata indeks fagositosis mencit Balb/c pada kelompok kontrol = 1,744; perlakuan 1 = 4,283; perlakuan 2 = 1,955, dan perlakuan 3 = 1,777. Hasil analisis *One Way ANAVA* menunjukkan adanya perbedaan antara antara kelompok kontrol dengan perlakuan ($p<0,05$). Hasil uji lanjut dengan menggunakan *Bonferroni* menunjukkan perbedaan yang bermakna pada K-P1 ($p<0,05$), P1-P2 ($p<0,05$), dan P1-P3 ($p<0,05$). Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada K-P2 ($p>0,05$), K-P3 ($p>0.05$), dan P2-P3($p>0,05$).

Pemberian suplementasi mikromineral seng dengan dosis 0,078; 0,168; dan 0,260 mg/ekor/hari berpengaruh terhadap indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa suplementasi mikromineral seng dosis 0,078 mg/ekor/hari merupakan dosis optimum dalam meningkatkan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

Kata kunci : efektivitas, seng, *S. typhimurium*, makrofag.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahnya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini dapat selesai karena adanya bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan mengikuti pendidikan di Universitas negeri Semarang.
2. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan izin penelitian.
3. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang, yang telah memberikan motivasi dan petunjuk dalam menyelesaikan studi.
4. Dr. drh. R. Susanti, MP, selaku pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan sehingga terselesainya skripsi ini.
5. drh. Wulan Christijanti, M.Si, selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan sehingga terselesainya skripsi ini.
6. Dra. Retno Sri Iswari, SU, selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan dan petunjuk dalam penyelesaian skripsi ini.
7. Ari Yuniastuti, S.Pt, M.Kes, atas pengarahan dan kesempatan yang diberikan untuk menimba ilmu sehingga terselesainya skripsi ini.
8. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi FMIPA UNNES yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
9. Staff laboratorium Biokimia jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang, Balai Laboratorium Kesehatan Kota Semarang, LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.
10. Kedua orang tua penulis dan keluarga besar yang selalu memberikan motivasi, nasehat, kasih sayang, dan doa tiada henti demi keberhasilan penulis

.

Sahabat sejati penulis, Abel, Choty, Lina, Iis dan Fefe yang selalu memberikan motivasi tiada henti meskipun telah terpisahkan ruang dan waktu. Semoga persahabatan kita akan selalu terjaga seperti saat ini.

11. Sahabat seperjuangan penulis, Tya, Vita, Ika, Rinda, Niken, dan Santi serta teman-teman Biologi angkatan 2005.
12. Jasmine Curly yang senantiasa menjadi sumber motivasi bagi penulis.

Penulis menyadari sepenuhnya karena keterbatasan dan kedangkalan pengetahuan penulis sehingga skripsi ini masih terdapat kekurangan dan masih belum sempurna. Oleh karena itu dengan penuh kerendahan hati penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak guna menyempurnakan skripsi ini.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang berkepentingan dan bagi pembaca pada umumnya.

Semarang, September 2010

Penulis

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI ii
PENGESAHAN iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN iv
ABSTRAK v
KATA PENGANTAR vi
DAFTAR ISI viii
DAFTAR TABEL x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xii
BAB I PENDAHULUAN
A. Latar Belakang 1
B. Permasalahan 4
C. Penegasan Istilah 4
D. Tujuan Penelitian 5
E. Manfaat Penelitian 5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS
A. Tinjauan Pustaka 6
B. Hipotesis 16
BAB III METODE PENELITIAN
A. Lokasi dan Waktu Penelitian 17
B. Populasi dan Sampel 17
C. Variabel Penelitian 17
D. Rancangan Penelitian 18
E. Alat dan Bahan Penelitian 18
F. Prosedur Penelitian 19

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN UNNES

G. Pengumpulan Data 23
H. Analisis Data 24
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN
A. Hasil Penelitian 28
B. Pembahasan 31
BAB V SIMPULAN DAN SARAN
A. Simpulan 36
B. Saran 36
DAFTAR PUSTAKA 37
LAMPIRAN 41

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Alat dan bahan penelitian 18

2. Aklimatisasi dan pemberian perlakuan 21

3. Indeks fagositosis makrofag setelah perlakuan 24

4. Rumus One Way ANAVA 25

5. Indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c setelah perlakuan 28

6. Hasil uji normalitas indeks fagositosis makrofag 29

7. Hasil uji homogenitas indeks fagositosis makrofag 30

8. Hasil *One Way ANAVA* indeks fagositosis makrofag 30

9. Hasil uji *Post Hoc* indeks fagositosis makrofag 31

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Seng dan sistem imun..... 16

2. Skema pengambilan makrofag dari hewan coba 21

3. Skema prosedur isolasi dan kultur makrofag mencit 22

4. Skema pemeriksaan fagositosis makrofag 23

5. Makrofag yang memfagosit 11 buah lateks (perbesaran 1000x)..... 29

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Data Hasil Pengamatan Indeks Fagositosis Makrofag 41
2. Hasil Analisis Statistik indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* 42
3. Foto Penelitian 44

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Typus merupakan penyakit sistemik akut yang disebabkan oleh beberapa jenis Salmonella yaitu Salmonella typhi (S. typhi), Salmonella paratyphi A, dan Salmonella paratyphi B. Demam yang disebabkan oleh S. typhi cenderung lebih berat dari bentuk infeksi Salmonella yang lain. Penderita typus di Indonesia diperkirakan berjumlah 800 per 100 ribu penduduk per tahun dan terjadi hampir sepanjang tahun terutama pada musim panas. Penyakit ini ditemukan pada semua umur terutama pada anak usia 5-9 tahun dan lebih sering diderita anak laki-laki daripada perempuan dengan perbandingan 2-3 : 1. Gejala utama dari typus antara lain demam yang berkepanjangan (lebih dari 7 hari), gangguan pencernaan, dan gangguan susunan dari syaraf pusat/kesadaran (Kadang 2004). Biaya yang dibutuhkan untuk mengobati typus di Indonesia diperkirakan sebesar 60 juta US dollar pertahun. Penyakit ini merupakan satu dari lima penyakit penyebab kematian tertinggi di Indonesia dengan angka kematian sebesar 20.000 jiwa pertahun (Ali 2006).

Pemerintah sudah melakukan berbagai upaya dalam mencegah typus antara lain melalui kegiatan imunisasi terhadap balita, anak usia sekolah maupun orang dewasa. Pada aspek lain pemerintah juga berusaha memperbaiki infrakstuktur guna menciptakan lingkungan yang lebih sehat. Selain itu

pemerintah telah mensosialisasikan upaya pencegahan melalui himbauan melakukan cuci tangan secara benar, membiasakan mengkonsumsi makanan dan minuman yang telah dimasak hingga matang, serta menjaga kebersihan lingkungan (Ali 2006).

Pemerintah memiliki beberapa kendala dalam mengatasi typus, antara lain banyaknya dana yang dibutuhkan untuk merehabilitasi lingkungan, banyaknya jumlah perumahan kumuh, tidak tersedianya sistem pembuangan limbah manusia, terbatasnya air sehat, dan kurangnya kesadaran masyarakat (Ali 2006). Kebiasaan masyarakat yang salah dengan tidak mencuci tangan sebelum makan melainkan

sesudah makan juga menjadi penyebab sulitnya mencegah typus. Selain itu masyarakat memiliki kecenderungan untuk mengkonsumsi makanan murah dan menarik tanpa memperhatikan tingkat kebersihannya (Rejeki 2008).

Berbagai upaya yang telah dilakukan oleh pemerintah belum memberikan hasil yang maksimal karena imunisasi dan rehabilitasi lingkungan yang selama ini dilakukan memerlukan biaya yang besar. Oleh karena itu perlu upaya pencegahan dari aspek yang lain (Ali 2006). Adapun aspek tersebut adalah dengan memperkuat sistim pertahanan tubuh masing-masing individu melalui pemberian suplementasi yang mudah didapat. Salah satu contoh suplemen yang sesuai dengan kriteria tersebut adalah seng. Seng merupakan mikromineral yang mudah ditemui diberbagai makanan seperti biji-bijian, serealia, kerang dan daging. Zat ini merupakan immunomodulator yang dapat memperkuat sistim imun dalam mencegah dan menghadapi penyakit (Reviana 2004). Penelitian mengenai seng terhadap sistim imun pernah dilakukan untuk mengobati typus, akan tetapi dalam

penelitian ini pemberian seng bertujuan untuk mencegah terjadinya typus dengan harapan akan diperoleh hasil yang lebih efektif. Seng yang digunakan dalam penelitian sebelumnya adalah seng dosis tinggi sehingga tidak berpengaruh terhadap indeks fagositosis makrofag. Oleh karena itu dosis seng digunakan dalam penelitian ini adalah dosis aman bagi tubuh. Untuk menerapkan penggunaan suplementasi seng kepada manusia diperlukan uji preklinis terlebih dahulu.

Salmonella typhi masuk ke tubuh manusia melalui makanan dan air yang tercemar. Pada saat masuk saluran pencernaan sebagian *S. typhi* akan mati oleh asam lambung dan sebagian yang lain akan menembus ileum (usus halus). Selanjutnya terjadi komplikasi perdarahan dan perforasi intestinal, *S.typhi* menembus lamina propia, masuk aliran limfe dan masuk aliran darah melalui duktus torasikus. Bakteri *S. typhi* dapat mencapai hati melalui sirkulasi portal dari usus, selain itu juga dapat bersarang di plak Peyeri (jaringan limfoid usus halus), limpa, hati dan bagian-bagian lain sistem retikuloendotelial. Bakteri *S. typhi* dapat memproduksi endotoksin yang merangsang sintesis zat pirogen dan leukosit pada jaringan yang meradang sehingga terjadi demam (Mansjoer *et. al* 1999).

Garis pertahanan pertama terhadap infeksi *S. typhi* atau *S. typhimurium* adalah makrofag. Makrofag mencegah masuknya bakteri tersebut pada tubuh hospes dan mempunyai reseptor pada membran sel untuk tujuh macam residu gula. Saat reseptor berikatan dengan residu, makrofag diaktifkan dan kemudian menghasilkan sitokin. Sitokin inilah yang berfungsi sebagai pengatur respon imun tubuh (Ahmad 2008). Sitokin dapat ditingkatkan produksinya melalui pemberian imunomodulator yang dalam penelitian ini adalah seng (Baratawidjaja 2000).

Seng dikenal sebagai suatu *trace element* (elemen-elemen dalam jumlah kecil dan mutlak diperlukan untuk memelihara kesehatan) yang *essensial* bagi pertumbuhan dan maturasi seksual manusia. Seng juga diketahui berperan dalam sistem imun baik nonspesifik maupun spesifik. Defisiensi seng pada manusia dapat menurunkan pertahanan tubuh dan mengakibatkan tubuh mudah terserang infeksi terutama diare, pneumonia, dan malaria. Selain berperan dalam sistem pertahanan tubuh, seng juga berfungsi sebagai bagian dari metaloenzim serta menstabilkan struktur komponen organik dan membran sel (Ambarwati 2003).

Seng berperan pada perkembangan dan fungsi normal imunitas nonspesifik seperti netrofil dan sel *Natural Killer* (NK). Defisiensi seng juga mempengaruhi perkembangan imunitas spesifik mulai dari pertumbuhan dan fungsi tertentu limfosit T seperti aktivasi, produksi sitokin oleh sel *T Helper-1* (Th-1) dan Th-2, perkembangan limfosit B serta produksi antibodi, khususnya *Imunoglobulin* G (lgG). Defisiensi seng dapat berpengaruh terhadap produksi sitokin dan fagositosis makrofag (Armin 2005). Suplementasi seng juga dapat menstimulasi produksi *Interferon-γ* (IFN-γ) oleh sel NK, suatu sitokin yang diperlukan untuk mengaktivasi makrofag. Secara *in vitro* seng dapat memacu produksi *interleukin-1β* (IL-1β), IL-6, IFN-γ, dan *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) oleh monosit. TNF-α dapat menginduksi produksi IFN-γ pada fase awal infeksi (Shankar and Prasad 1998). Melalui pemberian suplementasi seng diharapkan akan meningkatkan kemampuan fagositosis makrofag dalam menghadapi invasi *S. typhimurium*, sehingga dapat mencegah timbulnya demam tifoid pada mencit Balb/c.

Typus pada manusia disebabkan oleh infeksi *S. typhi* sedangkan pada mencit disebabkan oleh *S. typhimurium*, mekanisme infeksi keduanya sama. Pada penelitian digunakan mencit Balb/c karena mencit ini memiliki respon imun yang mudah untuk diamati. Adapun kuman yang digunakan untuk menginfeksi mencit Balb/c adalah *S. typhimurium* karena kuman ini akan menimbulkan typus pada mencit Balb/c yang analog dengan manusia (Sawitri 2003).

B. Permasalahan

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan dalam penelitian ini adalah :

Bagaimanakah efektivitas pemberian zat gizi mikromineral seng terhadap indeks fagositosis makrofag mencit strain Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* ?

C. Penegasan Istilah

Untuk menghindari penafsiran yang berbeda mengenai pemahaman isi penelitian ini, perlu adanya batasan-batasan terhadap beberapa istilah berikut ini:

1. *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium merupakan bakteri gram negatif yang hidup pada saluran pencernaan terutama pada usus. Bakteri ini menyebabkan penyakit typus pada mencit Balb/c. Bakteri *S. typhimurium* yang digunakan dalam penelitian adalah strain *Salmonella* virulen (phage type 510) yang diperoleh dari laboratorium Biologi Balai Laboratorium Kesehatan Yogjakarta.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN UNNES

2. Indeks Fagositosis Makrofag

Indeks fagositosis yang dimaksud dalam penelitian ini adalah persentase jumlah partikel lateks yang difagosit oleh 200 makrofag dinyatakan sebagai indeks fagositosis (Coligan *et. al* 1991).

3. Efektivitas Suplementasi Seng

Maksud efektivitas suplementasi seng dalam penelitian ini adalah pemberian suplementasi mikromineral seng untuk mencari dosis yang paling efektif dalam meningkatkan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas pemberian zat gizi mikromineral seng terhadap indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c dalam menghadapi infeksi *S. typhimurium.*

E. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai efektivitas dosis mikromineral seng dalam meningkatkan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

PERPUSTAKAAN UNNES

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Typus oleh *Salmonella typhi*

Typus merupakan penyakit infeksi akut usus halus. Menurut Undang-Undang No 6 tahun 1992, penyakit ini termasuk penyakit menular dan menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah. Typus jarang ditemui secara endemik di Indonesia akan tetapi sering dijumpai secara sporadis (terpencar-pencar dalam suatu daerah) (Anjarwati 2005).

Typus pada manusia disebabkan oleh adanya *S. typhi* yang masuk ke tubuh bersama makanan atau minuman yang tercemar. Saat *S. typhi* masuk ke saluran pencernaan dan melewati lambung, sebagian *S. typhi* mati oleh HCl (asam klorida/asam lambung). HCl bersifat asam sehingga akan menghambat masuknya *S. typhi*. Akan tetapi apabila *S. typhi* masuk bersama cairan, maka akan terjadi pengenceran HCl pada lambung, sehingga akan mengurangi daya hambat terhadap *S. typhi* tersebut. Bakteri *S. typhi* yang dapat lolos dari daya hambat HCl akan memasuki folikel-folikel limfe yang terdapat di dalam lapisan mukosa atau submukosa usus kemudian bereplikasi. Setelah berhasil melewati usus halus, bakteri tersebut masuk ke kelenjar getah bening selanjutnya masuk ke pembuluh darah (Mansjoer *et al.* 1999). Darah akan mengedarkan *S. typhi* ke beberapa organ kemudian berkembang biak di dalam jaringan getah bening intestinal dan

PERPUSTAKAAN UNNES

dikeluarkan bersama tinja. Setelah masa inkubasi selama 10-14 hari, penderita akan mengalami demam, rasa tidak enak badan, sakit kepala, *brady cardia* (perlambatan denyut jantung), dan *myalgia* (nyeri otot) (Brooks *et al.* 2005).

Gejala typus tidak khas dan bervariasi tergantung pada sistem organ yang terinfeksi. Secara klinis penderita akan mengalami demam lebih dari seminggu, terlihat segar pada siang hari, namun akan mengalami demam tinggi pada malam hari. Selain itu lidah penderita nampak kotor, bagian tengahnya berwarna putih dan pinggirnya merah. Pada umumnya lidah akan terasa pahit sehingga penderita cenderung ingin makan makanan yang asam dan pedas. Penderita akan mengalami mual berat hingga muntah. Hal ini disebabkan oleh perkembangbiakan *S. typhi* di hati dan limpa, sehingga terjadi pembengkakan dan akhirnya menekan lambung kemudian menimbulkan rasa mual. Rasa mual yang berlebihan tersebut akan menghambat masuknya makanan ke dalam saluran pencernaan. Pada tubuh penderita, *S. typhi* dapat mengganggu penyerapan cairan sehingga menyebabkan diare. Selain itu penderita juga akan merasa lemas, pusing, dan sakit perut (Hasuki 2007).

Penelitian ini bersifat preklinis dengan menggunakan mencit Balb/c yang mudah diamati respon imunnya, sehingga bakteri yang digunakan adalah *S. typhimurium*. Mekanisme infeksi *S. typhimurium* pada mencit Balb/c analog dengan typus pada manusia (Sawitri 2003). *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, dan tidak berspora. Bakteri *S. typhimurium* tumbuh dengan baik pada suhu di atas 24^0C, terhambat pertumbuhannya pada suhu 10^0C, dan tidak tumbuh pada suhu di bawah 5^0C

(Subronto 2003). Bakteri ini tumbuh optimum pada pH 6-8 dan terhambat pertumbuhannya pada pH asam (Lin *et al*. 2005).

Apabila masuk ke dalam tubuh, *S. typhimurium* akan menempel atau melekat pada sel epitel. Bakteri *S. typhimurium* mempunyai pili atau adhesin untuk melekat pada reseptor sel inang. Setelah mencapai usus halus *S. typhimurium* akan melakukan penetrasi ke dalam epitel hingga sampai lamina propria (Karsinah *et al*. 1994).

Salmonella mempunyai beberapa struktur antigen yaitu antigen somatik (O), antigen flagel (H) dan antigen Vi. Antigen O yang dilepas saat bakteri lisis akan membentuk LPS (endotoksin) yang mampu merangsang reaksi imunologi. Antigen Vi bersifat invasif dan memiliki kemampuan untuk hidup intraseluler. Ciri utama bakteri intraseluler adalah dapat hidup dan berkembangbiak dalam sel hospes (Shulman dan Phair 1994:208-304). Respon imunitas utama terhadap bakteri tersebut adalah sel fagosit (monosit dan makrofag) dan sel NK (Baratawidjaja 2004). Selain itu untuk mengeliminasi bakteri tersebut juga dibutuhkan peranan dari mekanisme imun spesifik (Anjarwati 2005).

PERPUSTAKAAN UNNES

2. Respon Imun terhadap *Salmonella typhi*

Respon imun merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh terhadap bahaya zat asing dari lingkungan. Berdasarkan responnya dalam menghadapi zat asing, respon imun dibagi menjadi dua yaitu sistim imun spesifik dan nonspesifik. Sistim imun nonspesifik merupakan respon terhadap zat asing yang tidak memerlukan sensitifitas sebelumnya dan tidak mengalami peningkatan seperti

halnya sistim imun spesifik. Komponen sistim imun nonspesifik terdiri atas pertahanan fisis, mekanis, pertahanan biokimia, pertahanan humoral (komplemen, IFN, *C-Reactive Protein* [CRP]), serta pertahanan seluler (monosit, makrofag, neutrofil). Respon imun spesifik merupakan respon terhadap benda asing yang didasari dengan kemampuan memori dan spesifisitas. Komponen sistim imun spesifik terdiri atas sistim imun humoral (sel B) dan seluler (Sel T) (Abbas *et. al* 1994).

Terdapat perbedaan mendasar antara respon imun terhadap patogen ekstraselular dan intraseluler. Bagi patogen ekstraselular sistem imun ditujukan untuk menghancurkan patogen dan menetralisir produknya. Akan tetapi dalam menghadapi patogen intraseluler ada dua mekanisme yang berperan. Antara lain dengan mengaktifkan sel T untuk menghancurkan sel yang terinfeksi atau mengaktivasi makrofag untuk menghadapi patogen tersebut. Sebagai contoh adalah sel T melepas sitokin yang akan mengaktivasi makrofag untuk menghancurkan patogen yang telah mengalami endositosis (Basuki 2005).

Makrofag merupakan sel fagosit yang hampir ditemui pada setiap organ di seluruh tubuh, terutama pada jaringan ikat longgar (Efendi 2003). Makrofag berasal dari sel prekursor dalam sumsum tulang, dimana pada tahap pertama promonosit akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi ke dalam jaringan ikat dan mengalami pematangan disebut makrofag. Pada jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis yang lebih banyak. Makrofag yang terdapat pada jaringan ikat longgar disebut makrofag atau histiosit, di dalam darah disebut

monosit, di glomerulus disebut mesangial, di otak disebut mikroglia, di tulang disebut osteoklas dan di lapisan sinusoid hati dikenal sebagai sel kuppfer (Nanta 2009).

Makrofag memiliki dua fungsi utama antara lain sebagai fagosit profesional dan sebagai *Antigen Precenting Cells* (APC). Sebagai fagosit profesional makrofag akan memfagosit antigen, sedangkan sebagai APC makrofag akan mempresentasikan antigen pada limfosit (Baratawidjaya 2004).

Sel makrofag yang berfungsi sebagai sel APC pada *Major Histocompability Complex I* (MHC I) akan mengaktivasi sel *T citotoxic* (Tc) (Nanta 2009). Makrofag juga mempunyai reseptor untuk antibodi dan mampu menghancurkan antigen yang khas terhadap antibodi tersebut. Pada proses infeksi limfosit T akan menghasilkan sejumlah limfokin yang menarik makrofag ke tempat yang membutuhkan dan mengaktifkannya. Makrofag yang aktif akan mengeluarkan beberapa substansi penting yaitu: enzim-enzim, lisozim, elastase, kolagenase, komplemen dan sitokin (Efendi 2003).

Sitokin yang disekresikan makrofag antara lain; Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 dan TNFα. Interleukin-1, IL-6 dan TNF α bekerja sinergis untuk meningkatkan aktivasi sel T dan respon radang akut. Interleukin-8 membantu menarik neutrofil ke tempat infeksi. Selain itu interleukin-8 juga dapat menginduksi produksi IFNγ, koaktivasi Th1, dan perkembangan sel NK. Interleukin-12 bertugas mengaktivasi sel NK serta memicu deferensiasi Th0 menjadi Th1 dan Th2. Interleukin-12 juga meningkatkan kemampuan bakterisidal fagosit, meningkatkan produksi IFN-γ dan meningkatkan sintesis NO.

Interleukin-15 penting untuk respons inflamasi, fungsi antimikrobial neutrofil, stimulasi dan perkembangan CD^{8+} (prekursor sel Tc), survival, dan fungsi sel NK. Makrofag yang aktif akan mengeluarkan *Reactive Oxygen Independent* (ROI) dan *Reactive Nitrogen Independent* (RNI) yang dapat meningkatkan mekanisme bakterisidal (Lestarini 2008).

Sel makrofag yang berfungsi sebagai fagosit profesional, akan bekerja dalam 5 fase yaitu *kemotaksis* (leukosit polimorfonuklear dan monosit), *adhesi* (partikel diselimuti opsonin), *ingesti* (penelanan), *degranulasi* (fusi fagosom dan lisosom) dan *killing* (pembunuhan) (Sarjadi 2001). Apabila bakteri tidak mempunyai mekanisme *survival*, fagosom yang mengandung bakteri akan mengadakan fusi dengan kompartemen lisosom. Bakteri akan dicerna dalam waktu 15-30 menit. Bakteri *S. typhimurium* memiliki strategi untuk melindungi diri terhadap *intracellular killing* antara lain dengan bersembunyi dalam endosom sehingga memerlukan pemberian imunomodulator untuk meningkatkan kemampuan fagositnya (Basuki 2005).

Makrofag yang bertugas sebagai sel fagosit mampu membunuh kuman melalui dua mekanisme yaitu proses oksidatif (*respiratory burst*) dan nonoksidatif. Proses oksidatif terjadi akibat penggunaan oksigen, peningkatan proses *Hexose Monophosphate Shunt* (HMPS), produksi *hydrogen peroksida* (H_2O_2) dan produksi beberapa senyawa seperti *superoxide anion, hydroxyl radicals, single oxygen,* dan *myeloperoxidase*. Reaksi-reaksi ini menghasilkan metabolit oksigen yang toksik untuk membunuh kuman. Proses nonoksidatif berlangsung dengan bantuan berbagai protein seperti *hydrolytic enzyme,*

defensins (cationic protein), lysozyme, lactoferrin dan *nitric oxide synthase* (NOS). Aktivitas NOS memerlukan bantuan IFNγ dan TNFα tipe I untuk meningkatkan produksi Nitrit Oksida (NO) oleh makrofag di organ limfe (Sarjadi 2001).

Nitrit Oksida merupakan elektron yang tidak berpasangan dan sangat reaktif, dapat berdifusi ke dalam membran sel secara bebas. Makrofag yang dirangsang oleh IFNγ, TNFα, interleukin dan LPS akan menstimulasi produksi NO. NO dapat diubah menjadi ion nitrosonium (NO^{+}), anion nitroksil (NO^{-}) atau menjadi anion peroksinitrit ($ONOO^{-}$). Anion peroksinitrit merupakan suatu antioksidan yang dapat merusak lipid, protein, dan DNA bakteri. Donor NO (nitrat organik atau sodium nitroprusid) merupakan senyawa yang dapat diurai menjadi NO dan dapat berfungsi vasodilator atau zat antiproliferasi (Sahat 2006). NO merupakan implikasi respon terhadap bakteri intraseluler yang ditandai dengan melimpahnya NO di bagian luar fagosom. Interaksi antara ROI dan NO dapat berinteraksi dengan membentuk antimikroba yang lebih *toxic* seperti *peroksi nitrit* yang dapat meningkatkan daya bunuh makrofag (Lestarini 2008).

Respon imun terhadap *Salmonella* meliputi sistem imun spesifik dan nonspesifik. Sistem imun nonspesifik berfungsi untuk mengidentifikasi dan melawan mikrobia, serta sebagai petanda bagi sistim imun spesifik. Respon imun nonspesifik dimulai dengan pengenalan lipopolisakarida (LPS) diikuti pengambilan dan penghancuran bakteri oleh sel fagosit yang memfasilitasi proteksi penderita terhadap infeksi. Peran ini dilakukan oleh makrofag, sel NK dan neutrofil (Lestarini 2008).

Salmonella mampu mengaktifkan sistem imun seluler host yang diperankan oleh makrofag dan sel NK sebagai eksekutor imun nonspesifik serta sel T sebagai mediator imun spesifik. Makrofag yang diaktivasi oleh produk mikrobial dapat berperan sebagai fagosit profesional dan APC. Selanjutnya makrofag akan mensekresi IL-12 yang membantu diferensiasi sel Th0 menjadi Th1. Sel Th1 dan sel NK akan mensekresi IFNγ sebagai faktor pengaktivasi makrofag sekaligus dapat meningkatkan ekspresi MHC II pada permukaan APC (Baratawidjaya 2006).

Sitokin memegang peranan penting dalam mengendalikan atau membunuh patogen intraseluler oleh makrofag. Cara kerja sitokin belum diketahui, akan tetapi sitokin diketahui dapat menyebabkan bakteri tidak dapat lolos dari sasaran dalam lisosom. Interferon-γ dapat menghalangi patogen melarikan diri ke dalam sitosol dan mengurungnya dalam vakuola fagosom yang asidik sehingga menjadi lebih sensitif terhadap efek toksik ROI dan RNI. Interferon-γ juga mempercepat pematangan fagosom yang mengandung patogen dan fusinya dengan lisosom. Proses ini terjadi melalui asidifikasi fagosom, yang berhubungan dengan peningkatan proton ATP-ase dalam fagosom, sehingga dapat membunuh bakteri lebih banyak (Basuki 2005).

3. Seng dan Sistem Imun

Seng merupakan zat gizi essensial yang diperlukan oleh setiap sel dalam tubuh. Seng tidak dapat dikonversikan dari zat gizi lain sehingga harus tersedia dalam makanan. Zat ini dapat ditemukan dalam seluruh organ, jaringan, cairan

dan sekresi tubuh. Bentuk utama dari zat ini berupa ion dimana 95% ditemukan di dalam sel (Hayati 2002).

Penyerapan seng terjadi pada bagian atas usus halus. Pada plasma darah 30% seng berikatan dengan 2 *alfa makroglobulin*, 66% berikatan dengan *albumin* dan 2% membentuk senyawa kompleks dengan *histidin* dan *sistein*. Komplek *seng-albumin* disebut ligan seng makromolekul utama sedangkan kompleks *seng-histidin* dan *seng-sistein* adalah ligan mikromolekul yang berfungsi untuk menstransport seng ke seluruh jaringan termasuk ke hati, otak, dan sel-sel darah merah (Hsu & Hsich, 1981). Pada pankreas, seng digunakan untuk memproduksi enzim pencernaan. Kelebihan seng akan disimpan dalam hati dalam bentuk *metalotionein* (Mutiara 2004).

Banyaknya seng yang diserap tubuh adalah 15-40%. Absorbsi seng dipengaruhi oleh status seng dalam tubuh. Apabila banyak seng yang dibutuhkan, maka jumlah seng yang diserap akan lebih banyak (Mutiara 2004). Absorbsi seng melibatkan peranan *transferin*, yang juga merupakan alat transportasi besi. Apabila perbandingan antara besi dan seng lebih dari 2:1, *transferin* yang tersedia untuk seng berkurang, sehingga menghambat penyerapan seng. Sebaliknya dosis tinggi seng juga akan menghambat penyerapan besi (Almatsier 2006).

Seng diekskresikan melalui feses, urin, keringat serta jaringan tubuh yang dibuang, seperti kulit, sel dinding usus, cairan haid dan mani (Almatsier 2001). Jumlah seng yang dibuang melalui urin adalah 0,3-0,7 mg sedangkan melalui keringat adalah 1-3 mg (Guthrie 1986).

Seng berperan dalam stabilisasi struktur molekul membran dan organel lainnya. Sebagai antioksidan seng mampu mencegah kerusakan sel dan menstabilkan struktur dinding sel (Hayati 2002). Akan tetapi dalam jumlah tertentu seng yang masuk pada bakteri akan menghambat pembentukan lipoprotein dan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri tersebut. Seng dapat menyebabkan kematian pada bakteri dengan melakukan penetrasi pada komponen dinding sel bakteri sehingga akan merusak komponen tersebut dan memudahkan masuknya senyawa antibakteri. Selain itu seng juga berinteraksi dengan beberapa komponen penting sel bakteri dan mengganggu proses metabolisme. Kombinasi senyawa antibakteri dan seng dapat meningkatkan aktivitas bakterisidal (Winarsi *et. al* 2007).

Manfaat lain dari seng adalah berperan dalam proses sintesis dan degradasi senyawa zat-zat gizi makro seperti karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu seng diperlukan dalam proses transkripsi dan translasi serta sangat diperlukan bagi 200 macam enzim (Hayati 2002). Seng juga dapat membantu kerja beberapa hormon yaitu hormon kesuburan, prolaktin, tiroid, adrenal, dan timus. Hormon timulin di kelenjar timus dapat merangsang produksi sel limfosit T (Sugiarto 2009). Defisiensi seng juga berpengaruh terhadap sistim imun seluler dan nonspesifik (Ambarwati 2003).

Defisiensi seng pada sistem imunitas seluler akan menghambat penurunan jumlah $CD8^+$ dan CD73 (diperlukan untuk aktivitas pengenalan aktogen dan proliferasi sel). Seng merupakan kofaktor penting dari timulin sebagai pengatur deferensiasi sel T imatur pada kelenjar timus, pengatur fungsi sel T matur di

perifer, memodulasi pelepasan sitokin oleh sel mononuklear darah perifer, memodulasi proliferasi kombinasi sel T $CD8^+$ dan IL-2, serta menginduksi ekspresi reseptor IL-2 yang berafinitas tinggi pada sel T matur. Defisiensi seng dapat menyebabkan atrofi kelenjar timus dan limfopenia. Hal ini disebabkan adanya perubahan produksi limfosit dan hilangnya sel prekursor limfosit akibat proses apoptosis sel. Fungsi sel T helper ($CD4^+$) dalam imunitas seluler juga dipengaruhi oleh seng. Defisiensi seng akan menurunkan produksi Th1 yaitu IFN-γ dan IL-2. Suplementasi seng berpengaruh positif pada sistim imunitas seluler, yaitu memperbaiki sel T sitotoksik di kelenjar timus dan perifer, serta memperbaiki produksi sel Th, yaitu IL-2 dan IFN-γ (Ambarwati 2003). Pemberian suplementasi seng akan meningkatkan produksi IFN-γ dari sistim imun seluler yang berpengaruh terhadap aktivasi makrofag.

Fungsi imunitas nonspesifik akan terganggu dengan adanya perubahan kadar seng. Secara *invivo* penurunan kadar seng dapat menyebabkan gangguan pada aktivitas sel NK, penurunan jumlah granulosit, gangguan fagositosis makrofag dan neutrofil, serta proses *oksidatif burst*. Seng diperlukan oleh sel NK untuk mengenali MHC kelas 1 pada target sel T melalui reseptor pada sel NK yang berfungsi untuk proses NK *cell-mediated killing* (Ambarwati 2003).

Ada beberapa penelitian yang menunjukan bahwa seng berpengaruh terhadap sistim imun, antara lain hasil penelitian As'ad dan Yusuf tahun (2003) menunjukkan bahwa pemberian suplemen seng berpengaruh terhadap lama dan beratnya diare melalui peningkatan kekebalan tubuh terutama imunitas lokal yang menggunakan TNF-α sebagai biomarker. Pada hasil penelitian Raqib *et. al* (2004)

diketahui bahwa pemberian suplementasi seng pada penderita *shigellosis* akut akan meningkatkan respon proliferasi limfosit dan produksi IgG, sedangkan pada penelitian Rahman dkk (2005) menunjukkan bahwa terapi suplementasi seng pada *shigellosis* akut akan memperbaiki respon antibodi serta meningkatkan jumlah limfosit B dan plasma sel. Duran dkk (1987) melakukan penelitian terhadap 32 bayi penderita marasmus. Hasilnya menunjukan bahwa pemberian suplementasi seng dapat meningkatkan berat badan dan jumlah Ig A. Pemberian suplementasi seng pada bayi penderita *Low Birth Weight* (LBW) di Brazil dapat meningkatkan berat badan bayi, mengurangi resiko diare, dan batuk. (Lira *et al.* 1998). Pemberian mikromineral seng sangat penting bagi tubuh untuk mencegah terjadinya defisiensi seng.

Defisiensi seng diklasifikasikan menjadi buruk, moderat dan marginal/ringan. Defesiensi seng buruk disebabkan adanya gangguan penyerapan dalam tubuh yang ditandai dengan gejala dermatitis dan anorexia. Defisiensi seng moderat ditandai dengan adanya penurunan seng plasma, retardasi pertumbuhan dan penurunan tingkat imunitas. Defisiensi seng marginal terjadi apabila berkaitan dengan stressor lain (misalnya fase pertumbuhan cepat) (Golub *et.al*.,1995).

Defisiensi seng pada bayi dan anak-anak berhubungan dengan pola pemberian makan, gangguan penyerapan, genetik, enterohepatika acrodermatitis (Golub *et.al*.,1995). Defisiensi seng pada ibu hamil akan menyebabkan terjadinya LBW pada bayi sehingga berpengaruh pada sistim imun, kesehatan dan pertumbuhan pada bayi setelah dilahirkan (Lira *et. al.* 1998). Menurut Mutiara (2004) defisiensi seng pada manusia dan hewan percobaan dapat menurunkan

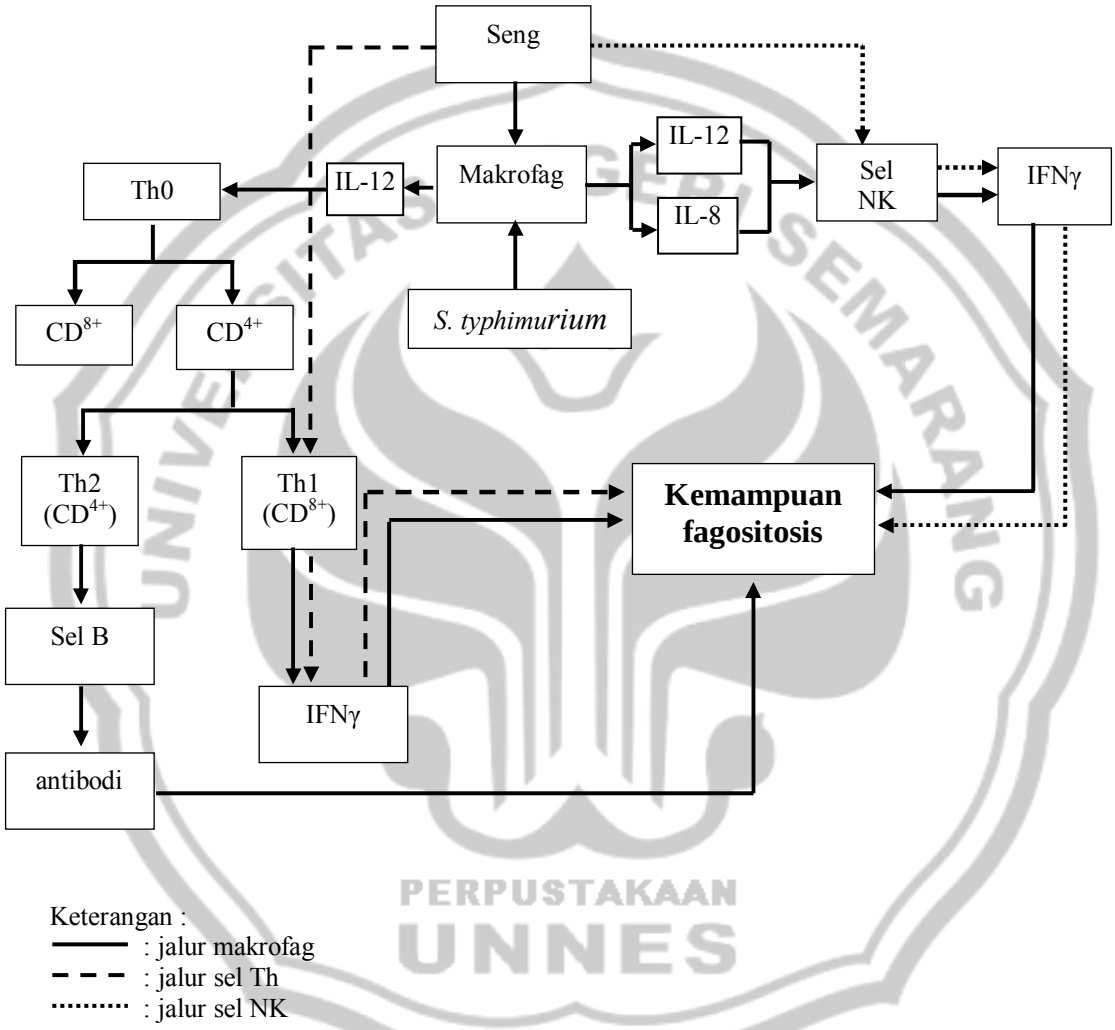
pertumbuhan otak, ketidaknormalan ketajaman rasa dan penciuman, perubahan tingkah laku dan gangguan kognitif. Seng diperlukan untuk sintesis *flavin mononucleotida* (FMN) yang digunakan untuk metabolisme *monoamin oxidase* (MAO). MAO adalah enzim yang sangat penting dalam sintesis neurotransmitter dalam otak.

Secara ringkas ada tiga jalur mekanisme seng dalam meningkatkan aktivasi makrofag. Pada jalur yang langsung melibatkan makrofag, pemberian suplementasi seng akan meningkatkan produksi sitokin pada saat makrofag terinfeksi bakteri yang dalam penelitian ini adalah *S. typhimurium* (Armin 2005). Sitokin tersebut adalah IL-12 dan IL-8 yang akan menginduksi sel NK untuk memproduksi IFN-γ. Pada sisi lain IL-12 yang dihasilkan makrofag akan memicu deferensiasi sel Th0 menjadi Th1 dan Th2, serta meningkatkan produksi IFN-γ oleh Th1 (Lestarini 2008). Th2 akan memicu sel B untuk memproduksi antibodi (Baratawidjaja 2000). Pada jalur yang melibatkan sel Th1, pemberian suplementasi seng akan meningkatkan produksi IL-2 dan IFN-γ (Ambarwati 2003). Sedangkan pada jalur yang melibatkan sel NK, pemberian suplementasi seng akan meningkatkan produksi IFN-γ pada sel tersebut. Antibodi dan Interferon-γ yang dihasilkan dari berbagai jalur diatas sangat diperlukan untuk meningkatkan kemampuan fagositosis (Shankar dan Prasad 2008).

4. Kerangka Pikir

Berdasarkan sumber kepustakaan yang telah dijelaskan di atas, pemberian suplementasi seng berpengaruh terhadap indeks fagositosis mencit Balb/c yang

diinfeksi *S. typhimurium* dengan cara meningkatkan produksi sitokin pada makrofag serta IFN-γ pada sel Th1 dan sel NK. Maka disusun kerangka pikir seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Seng dan sistem imun.

B. Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan telaah pustaka yang telah dipaparkan di atas, hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah pemberian zat gizi

mikromineral seng efektif meningkatkan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium.*

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia jurusan Biologi FMIPA UNNES, Balai Laboratorium Kesehatan Kota Semarang, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Yogyakarta dan PAU Bioteknologi UGM Yogyakarta. Waktu penelitian dilakukan selama bulan juni-juli 2009.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/c, sedangkan sampel dari penelitian ini adalah mencit strain Balb/c jantan berumur 8-10 minggu dengan berat 20-30 gram dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penentuan jumlah sampel menggunakan rumus besar sampel penelitian eksperimental dari federer, yaitu $(t - 1) (r - 1) \geq 15$, dimana t adalah jumlah perlakuan dan r adalah ulangan. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit Balb/c. Maka jumlah mencit Balb/c yang digunakan adalah 24 ekor.

PERPUSTAKAAN UNNES

C. Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini ada 4 variabel yaitu :

1. Variabel bebas : pemberian suplementasi mikromineral seng dengan dosis 0,078; 0,169; dan 0,260 mg/ekor/hari.

2. Variabel tergantung : indeks fagositosis makrofag.
3. Variabel kendali : berat badan, jenis kelamin, umur, jenis pakan, dan ukuran kandang.
4. Variabel rambang : keadaan kandang dan keadaan lingkungan penelitian.

D. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain *Post Test Randomized Control Design* pola rancangan acak lengkap (RAL). Sampel dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok setiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit Balb/c. Kelompok K sebagai kontrol dan 3 kelompok yang lain (P1, P2, dan P3) sebagai kelompok perlakuan dengan pemberian suplementasi mikromineral seng dosis 0,078; 0,169; dan 0,260 mg/ekor/hari.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terlihat pada Tabel 1:

Tabel 1. Alat dan Bahan Penelitian

Alat/Bahan	Fungsi
Alat	
Kandang mencit	Tempat pemeliharaan mencit Balb/c.
Spuit dengan sonde (lokal)	Untuk memasukkan suplementasi mikromineral seng ke tubuh hewan coba.
Spuit jarum (terumo)	Untuk menyuntikkan larutan ke tubuh hewan coba.
Tabung falcon (falcon)	Untuk menampung larutan hasil aspirasi (RPMI yang disedot kembali) dari tubuh hewan coba.
Mesin sentrifuse (labofuge 400 R)	Untuk memisahkan pellet dan supernatan.
Hemositometer (Neubauer)	Untuk menghitung kepadatan sel makrofag sebelum dikultur.
Mikroplate 24 (Iwaki)	Tempat untuk mengkultur makrofag secara *invitro*.

Inkubator $C0_2$ (VWR scientific)	Menyediakan unsur abiotik bagi kultur makrofag.
Obyek glass (Sail Brand)	Tempat meletakkan makrofag yang telah disuspensi dengan lateks, untuk kemudian dilihat indeks fagositosisnya.
Mikroskop (Nikon)	Untuk melihat indeks fagositosis makrofag.
Handcounter (Kenko)	Untuk menghitung kepadatan dan indeks fagositosis makrofag.
Bahan	
Mencit strain Balb/c	Sebagai hewan coba.
Isolat *Salmonella typhimurium* dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.	Sebagai agen infeksi penyebab typus pada mencit Balb/c.
Pakan standart	Makanan untuk hewan coba.
Air minum	Minuman untuk hewan coba.
Seng fisiologis (seng dalam larutan *Pulvis Gummy Arabicum* [PGA])	Untuk meningkatkan indeks fagositosis mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*. PGA berfungsi sebagai agen suspensi.
Alkohol 70%	Sebagai desinfektan.
NH_4CL	Sebagai buffer.
larutan *Roswell Park Memorial Institude* (RPMI) 1640.	Untuk menarik makrofag dari peritoneum mencit.
Fettal Bovine Serum (FBS)	Sebagai medium pada makrofag.
RPMI komplit (RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin 1 mM, PBS 10%, Penisilin 50 unit dan streptomisin 50µg/ml)	Sebagai medium pada kultur makrofag.
Phosphat Bovine Serum (PBS)	Menghilangkan partikel yang tidak terfagosit.
Metanol absolut	Fiksasi makrofag.
Giemsa 20%	Mewarnai makrofag.

PERPUSTAKAAN UNNES

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Serbuk seng ditimbang kemudian disuspensi dengan larutan PGA hingga sesuai dengan dosis perlakuan. Dosis 30 mg ditetapkan sebagai batas bawah atau dosis P1, hal ini sesuai dengan Kiichgessner yang membuktikan bahwa dosis ini merupakan dosis yang konstan di dalam tubuh. Kemudian diketahui bahwa konsentrasi seng di dalam tubuh yang sangat rendah (<10 mg) atau

sangat tinggi (>100 mg) akan menyebabkan tubuh tidak dapat mengakumulasi seng (King *et al*. 2000). Sehingga ditetapkan 100 mg sebagai batas atas atau dosis P3, selanjutnya dicari dosis median antara 30 mg dan 100 mg yaitu 65 mg. Dosis 65 mg tersebut kemudian ditetapkan sebagai dosis P2.

Pemberian seng untuk mencit berpedoman pada konversi dosis yang biasa digunakan dari manusia ke mencit, yaitu= 0,0026 (Donatus 1994). Dosis yang didapatkan dari hasil konversi tersebut adalah sebagai berikut:

0,0026 x 30 mg = 0,078 mg/ekor/hari.

0,0026 x 65 mg = 0,169 mg/ekor/hari.

0,0026 x 100 mg = 0,260 mg/ekor/hari.

Hasil yang diperoleh kemudian disuspensikan pada buffer PGA sebanyak 1 ml untuk setiap dosisnya. PGA berfungsi sebagai agen suspensi yang bertugas mendispersikan seng dan meningkatkan viskositas sehingga kecepatan pengendapannya bisa diperkecil. PGA diperoleh dari tanaman akasia, memiliki warna kekuningan, kental, lengket, transparan, bersifat asam lemah, tidak larut dalam etanol dan eter, akan tetapi larut dalam air.

b. Memilih hewan uji (mencit strain Balb/c jantan) sejumlah 24 ekor, umur 8-10 minggu.

c. Menyiapkan kandang mencit lengkap dengan tempat pakan dan minum.

d. Menyiapkan *S. typhimurium* dengan dosis 10^5 CFU (*Coloni Forming Unit*). Jumlah *S. typhimurium* dihitung berdasarkan jumlah koloni yang terlihat pada media agar dikalikan dengan faktor pengenceran. Apabila jumlahnya telah

memenuhi 10^5 CFU maka *S. typhimurium* dapat digunakan sebagai agen penginfeksi.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Aklimatisasi dan pemberian perlakuan.

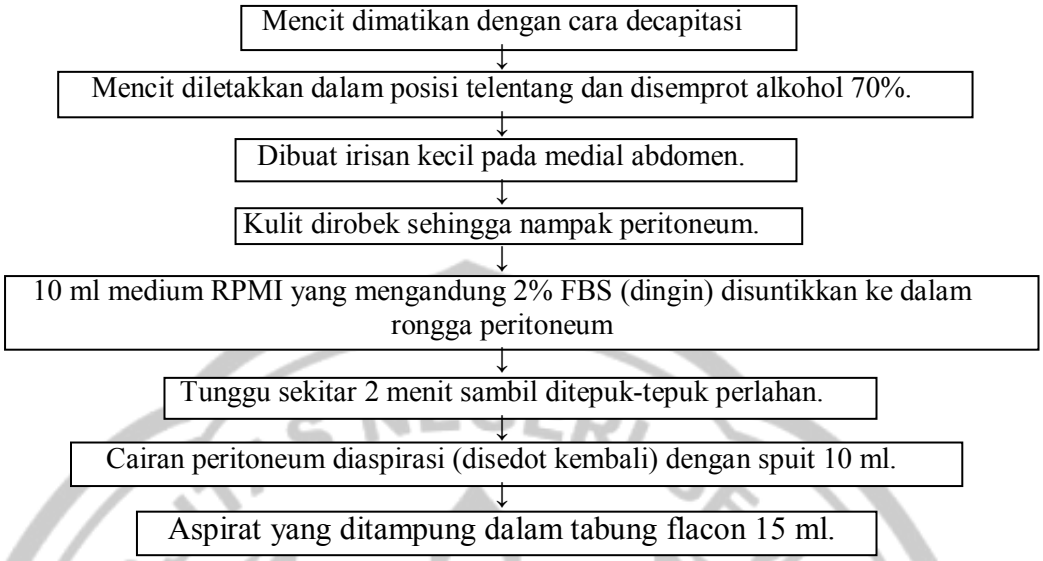
Mencit strain Balb/c yang berjumlah 24 ekor dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kemudian diberikan perlakuan seperti pada Tabel 2 :

Tabel 2. Aklimatisasi dan Pemberian Perlakuan.

Hari Ke-	Perlakuan
	Mencit dikondisikan dengan kondisi lingkungan penelitian.
1-7	Variasi suplementasi seng/ekor/hari. Kelompok kontrol = 0 mg/ekor/hari. Kelompok 1 = 0,078 mg/ekor/hari. Kelompok 2 = 0,169 mg/ekor/hari. Kelompok 3 = 0,260 mg/ekor/hari. Diberikan suplementasi seng terlebih dahulu untuk mempersiapkan sistem imun dalam menghadapi infeksi *S. typhimurium*.
8	Semua mencit diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal, suplementasi seng tetap diberikan.
9-14	Melanjutkan pemberian suplementasi seng.
15	Semua mencit dibunuh untuk diisolasi makrofag.

PERPUSTAKAAN UNNES

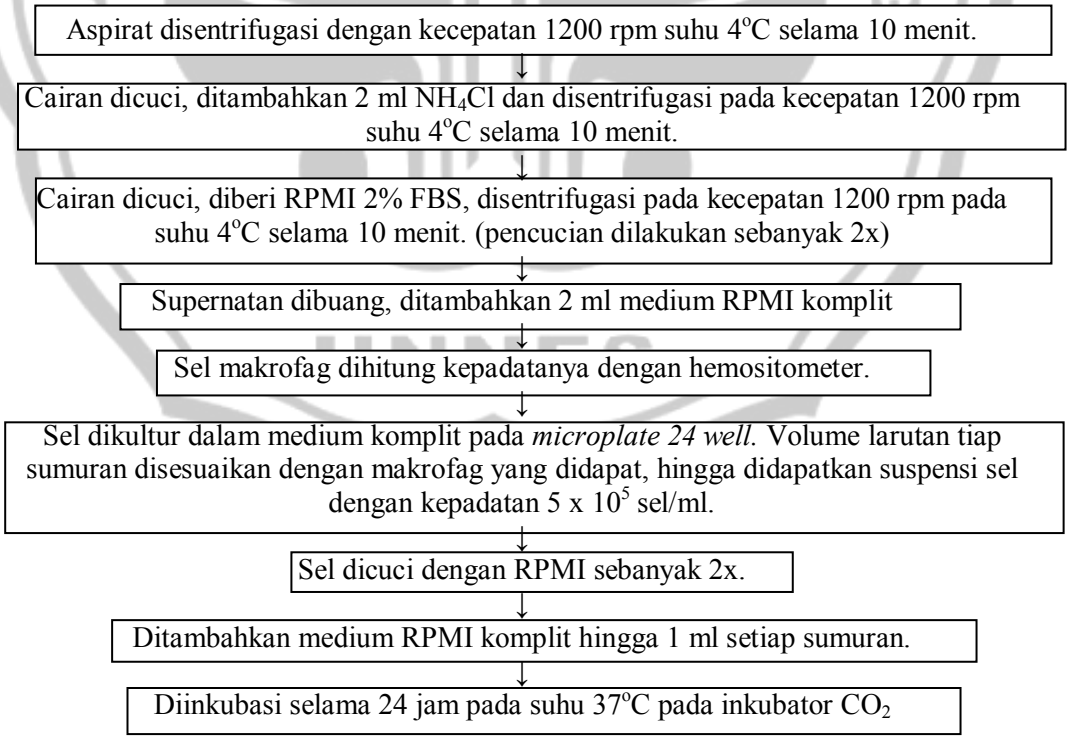
b. Pengambilan makrofag dari hewan coba.



Gambar 2. Skema pengambilan makrofag dari hewan coba.

c. Prosedur isolasi dan kultur makrofag mencit

Prosedur untuk mendapatkan makrofag 5 x 10^5 sel/ml adalah sebagai berikut :



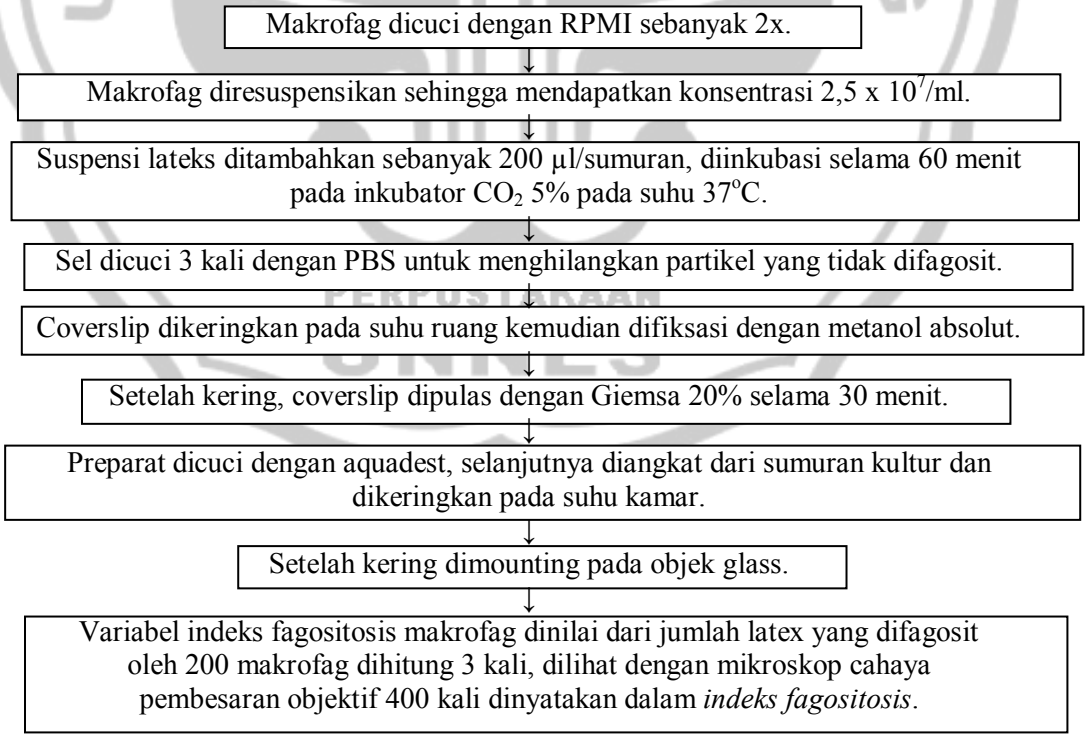
Gambar 3. Skema prosedur isolasi dan kultur makrofag mencit.

Jumlah kepadatan makrofag hasil isolasi biasanya jauh lebih banyak dari 5 x 10^5 sel/ml dan bervariasi. Maka untuk mendapatkan makrofag dengan kepadatan 5 x 10^5 sel/ml harus diawali dengan menghitung jumlah kepadatan makrofag hasil isolasi terlebih dahulu. Setelah itu volume makrofag yang akan diambil untuk kultur ditentukan dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Volume makrofag yang diambil } (\mu l) = \frac{(5 \times 10^5) \times 1000\ \mu l}{\text{Jumlah makrofag hasil isolasi}}$$

Volume makrofag yang diambil dari masing-masing perlakuan berbeda dan biasanya lebih kecil dari 1.000 µl. Setelah diketahui volumenya, makrofag dimasukkan ke dalam sumuran kemudian ditambahkan RPMI hingga volumenya mencapai 1.000 µl.

d. Pemeriksaan fagositosis makrofag dengan lateks bead.



Gambar 4. Skema pemeriksaan fagositosis makrofag.

G. Pengumpulan data

Indeks fagositosis dari penelitian dihitung dari persentase jumlah partikel latex yang difagosit oleh 200 makrofag, dihitung 3 kali dan dilihat dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali (Coligan *et. al* 1991).

$$\text{Indeks fagositosis makrofag} = \frac{\#\ \text{partikel lateks pada 200 makrofag}}{200\ \text{makrofag}} \times 100\%$$

Setelah dilakukan penghitungan terhadap indeks fagositosis data-data yang diperoleh disusun ke dalam Tabel 3.

Tabel 3. Indeks fagositosis makrofag setelah perlakuan.

Kelompok	Perhitungan Indeks Fagositosis Makrofag						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
K							
P1							
P2							
P3							

H. Analisis data

Data diperoleh dari indeks fagositosis makrofag pada masing-masing sampel yang digunakan. Untuk mengetahui normal atau tidaknya penyebaran data dilakukan uji *Kolmogorov Smirnov* karena jumlah sampel yang digunakan tidak lebih dari 30. Setelah itu dilakukan *Levene Test* untuk melihat pola distribusi data. Kemudian untuk melihat pengaruhnya, analisis data dilanjutkan dengan menggunakan *One Way ANAVA* dan *Uji Post Hoc* dengan menggunakan *Bonferroni* (Santoso 2002). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for windows* dimana rumus manual adalah sebagai berikut :

1. Kolmogorov Smirnov

   $KS = FN_{(Yi-1)} - F0_{(Yi)}$

   Keterangan :

   KS = Nilai KS hitung

   Fn(Yi-1) = Frekuensi persentase kumulatif pada waktu sebelum i

   F0(Yi) = Frekuensi data sebaran normal pada saat i

   Nilai KS_{hitung} yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan nilai KS Tabel. Apabila nilai KShitung < KSTabel sebaran data normal.

2. Lavene Test

$$L = \frac{(N-k)\sum ni(\bar{V}i - \bar{V}k)^2}{(k-1)\sum\sum(\bar{V}ij - \bar{V}i)^2}$$

$$Vij = |Xij - \bar{X}|$$

Keterangan :

L = Nilai Levene hitung

X = Nilai data residual

$\bar{X}$ = Rata-rata data residual

N = Jumlah sampel

K = Jumlah kelompok

Nilai Levene hitung yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan LeveneTabel atau dapat juga menggunakan nilai perbandingan signifikansi dengan alpha 5 %. Apabila nilai Levene hitung < Levene Tabel atau P *value* > 5%, maka ragam data homogen.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN UNNES

3. One Way ANAVA

Untuk mengetahui pengaruh pemberian suplemen Zn terhadap fagositosis makrofag mencit, dilakukan analisis varian (ANAVA) satu jalan dengan taraf kepercayaan 95% (Schefler 1987).

Tabel 4. Rumus One Way ANAVA.

Sumber varian	Db	JK	KT	F_{Hit}	F_{Tab}
Perlakuan	T-1	JKP	KTP	KTP/KTG	5 %
Galat	T(t-1)	JKG	KTG		
Total	(r) (t)-1	JKT			

Keterangan :

Db : derajat kebebasan

JK : jumlah kuadrat

KT : kuadrat tengah

F : nilai frekuensi

$t_{(1-1/2)}$: treatment

r : replikasi atau ulangan

Faktor koreksi

$$FK = \frac{(\sum\sum X)^2}{N}$$

Jumlah kuadrat (JK)

$$JKT = \sum\sum X_{ij}{}^2 - FK$$

$$JKP = JKT - FK$$

Kuadrat tengah (KT)

$$KTP = \frac{JKP}{db}$$

$$KTG = \frac{JKG}{db}$$

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN UNNES

F hitung

$$F_{hit} = \frac{KTP}{KTG}$$

Untuk dapat menerima atau menolak hipotesis, maka F hitung hasil perhitungan harus dikonsultasikan dengan F tabel. Apabila Fh>Ft pada taraf signifikan 95 % menunjukkan bahwa hasil pengujian signifikan, sehingga hipotesis diterima. Selanjutnya untuk mengetahui suplementasi seng berpengaruh terhadap fagositosis makrofag dilakukan uji Post Hoc dengan menggunakan Bonferroni.

4. Bonferroni

Uji bonferroni ini digunakan untuk melihat standart error antara dua kelompok perlakuan sehingga terlihat perbedaannya. Rumus dari uji bonferroni adalah sebagai berikut :

$$SE(\overline{Yi} - \overline{Yj}) = s\sqrt{\frac{1}{ni} + \frac{1}{nj}}$$

SE : Standart Error

s : Standart deviation

Apabila nilai standart error lebih kecil dari 0,05 maka dua kelompok perlakuan yang diujikan dengan bonferroni dikatakan berbeda bermakna.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN UNNES

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

Rerata indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diberi suplementasi mikromineral seng cenderung mengalami peningkatan dibandingkan mencit Balb/c yang tidak mendapatkan suplementasi mikromineral seng. Rerata indeks fagositosis mencit Balb/c pada kelompok perlakuan P1, P2 dan P3 berbanding terbalik dengan dosis seng yang diberikan. Semakin besar dosis suplementasi seng yang diberikan, semakin kecil indeks fagositosisnya (Tabel 5).

Tabel 5 Indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c setelah perlakuan*)

Kelompok	Perhitungan Indeks Fagositosis Makrofag (%)						Rerata (%)
	1	2	3	4	5	6	
K	1,761	1,640	1,760	1,964	1,017	2,324	1,744
P1	5,013	3,871	4,102	3,465	4,612	4,637	4,283
P2	2,150	2,225	1,965	2,180	1,845	1,363	1,955
P3	1,502	1,600	2,125	2,120	1,595	1,720	1,777

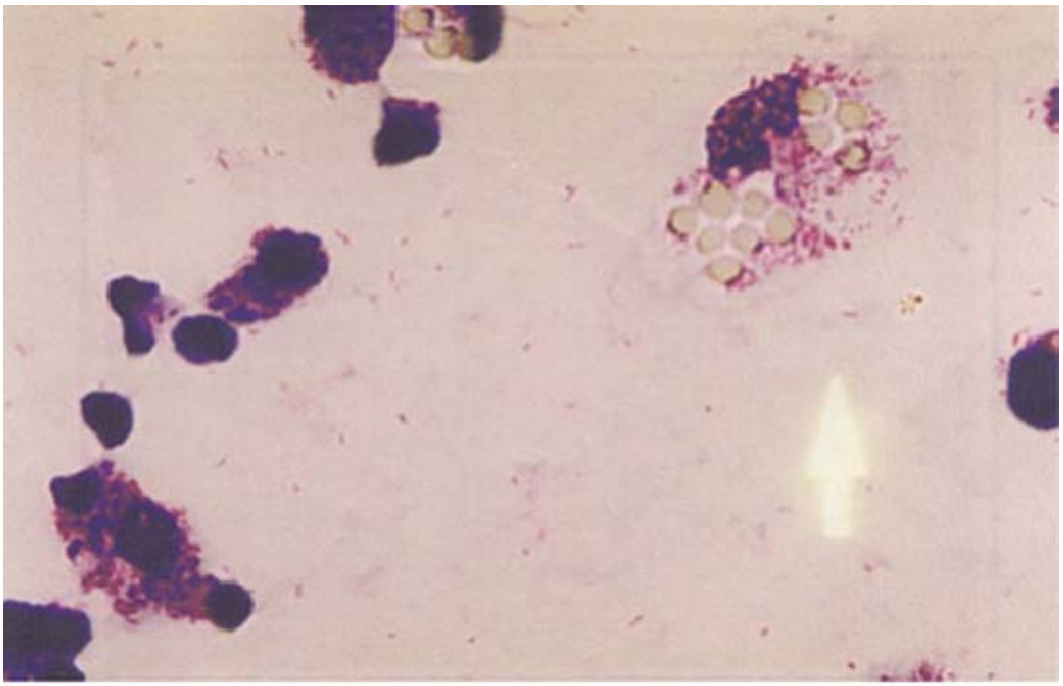
Keterangan :

K : tanpa suplementasi mikromineral seng.
P1 : diberikan perlakuan dengan suplementasi mikromineral seng dosis 0,078 mg/ekor/hari.
P2 : diberikan perlakuan dengan suplementasi mikromineral seng dosis 0,169 mg/ekor/hari.
P3 : diberikan perlakuan dengan suplementasi mikromineral seng dosis 0,260 mg/ekor/hari.

*) Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1

Indeks fagositosis makrofag dihitung berdasarkan persentase jumlah partikel lateks yang difagosit oleh 200 makrofag (Coligan *et. al* 1991). Fagositosis

makrofag ditandai dengan menempel atau masuknya partikel lateks pada makrofag yang telah diwarnai dengan Giemsa (Gambar 5).



Gambar 5 Makrofag yang memfagosit 11 buah lateks (perbesaran 1000x).

Untuk mengetahui pengaruh suplementasi seng terhadap indeks fagositosis makrofag, maka data yang diperoleh pada Tabel 5 dianalisa dengan menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows*.

PERPUSTAKAAN UNNES

1. Uji Normalitas

Hasil uji normalitas pada Tabel 6 menunjukkan bahwa sebaran data indeks fagositosis mencit Balb/c pada kelompok kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3 terdistribusi normal ($p>0,05$).

Tabel 6 Hasil uji normalitas indeks fagositosis makrofag *).

Kelompok Perlakuan	Kolmogorof-Smirnov		
	Statistic	Df	Sig.
K	,582	6	,888**)
P1	,532	6	,940**)
P2	,556	6	,917**)
P3	,608	6	,853**)

*) Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.
**) p>0,05 : data terdistribusi normal.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas varians menunjukkan nilai signifikansi (p>0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa data dari populasi bersifat homogen atau tidak berbeda antara populasi satu dengan lainnya (Tabel 7).

Tabel 7 Hasil uji homogenitas indeks fagositosis makrofag*).

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,505	3	20	,244**)

*) Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.
**) p>0.05 : data bersifat homogen.

Berdasarkan dua analisis data di atas, diketahui bahwa data populasi bersifat homogen dan memiliki sebaran data normal, maka selanjutnya dilakukan uji beda menggunakan *One Way ANAVA*.

PERPUSTAKAAN UNNES

3. Uji Beda

Uji beda dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian suplementasi mikromineral seng terhadap indeks fagositosis mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

Tabel 8 Hasil *One Way ANAVA* indeks fagositosis makrofag*)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.342	3	9.114	52.544	.000**)
Within Groups	3.469	20	.173		
Total	30.811	23			

*) Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.
**) p<0.05 : terdapat perbedaan.

Hasil uji statistik pada Tabel 8 menunjukkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol dengan perlakuan (p<0,05) sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian suplementasi mikromineral seng berpengaruh terhadap indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium.*

Untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna pada masing-masing kelompok dilanjutkan uji *Post Hoc* dengan *Bonferroni* seperti pada Tabel 9.

Tabel 9 Hasil uji *Post Hoc* indeks fagositosis makrofag pada setiap kelompok perlakuan dengan menggunakan *Bonferroni**)

selisih rerata	K	P1	P2	P3
K	-	-	-	-
P1	0,000**)	-	-	-
P2	1,000	0,000**)	-	-
P3	1,000	0,000**)	1,000	-

*) Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.
**) p<0,05 : terdapat perbedaan yang bermakna.

PERPUSTAKAAN UNNES

Data pada Tabel 9 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara indeks fagositosis makrofag kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 (p<0,05), akan tetapi tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan 2 (p>0,05) dan 3 (p>0,05). Indeks fagositosis makrofag pada kelompok perlakuan 1 menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan 2 (p<0,05) dan 3 (p<0,05). Indeks fagositosis pada kelompok

perlakuan 2 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan 3 ($p>0,05$).

B. Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian suplementasi mikromineral seng berpengaruh terhadap kemampuan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium* ($p<0,05$) (Tabel8).

Salmonella typhimurium adalah bakteri intraseluler fakultatif berukuran 1-3 µm x 0,5-0,8 µm, dimana salah satu ciri utamanya adalah dapat hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit. Mikroba ini menemukan tempat untuk bersembunyi sehingga tidak terjangkau antibodi dalam sirkulasi. Untuk mengatasinya diperlukan respon imun yang berbeda dengan mikroba ekstraseluler, yaitu dengan menggunakan peran imunitas seluler seperti makrofag (Baratawidjaja 2006).

Makrofag merupakan respon imun nonspesifik paling awal dalam menghadapi serangan berbagai organisme karena dapat memberikan respon imun langsung terhadap antigen meskipun belum pernah terpapar antigen itu sebelumnya. Fagosit makrofag dapat menghambat replikasi organisme yang terkurung di dalamnya (Sawitri 2003). Makrofag yang digunakan untuk penelitian berasal dari makrofag yang tersebar bebas di sepanjang cairan peritoneum dan memiliki diameter 21 µm. Kehadirannya disepanjang kapiler memungkinkan untuk menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh dengan mudah (Baratawidjaja 2000).

Makrofag yang teraktivasi dapat melakukan beberapa fungsi efektor, antara lain aktivasi limfosit, mikrobisidal, tumorisidal, inflamasi, serta demam dan reorganisasi jaringan (Murder *et. al* 1998). Aktivasi makrofag dalam menghadapi *S. typhimurium* dapat ditingkatkan dengan memberikan immunomodulator (Reviana 2004).

Adanya pengaruh terhadap indeks fagositosis pada makrofag disebabkan karena seng merupakan immunomodulator yang dapat meningkatkan dan menekan sistem imun (Reviana 2004). Pemberian suplementasi mikromineral seng akan menstabilkan membran sel dan organel-organel di dalam makrofag (Hayati 2002). Seng juga akan meningkatkan produksi sitokin makrofag pada saat terinfeksi bakteri yang dalam penelitian ini adalah *S. typhimurium* (Armin 2005). Sitokin tersebut adalah IL-8 dan IL-12. Interleukin 8 dan 12 bertugas mengaktifkan sel NK sehingga meningkatkan produksi IFN-γ. Interleukin-12 memiliki tugas tambahan yaitu bersinergi dengan IL-2 yang bertindak sebagai *growth factor* untuk memicu deferensiasi sel Th0 menjadi Th1 dan Th2 (Lestarini 2008). Selanjutnya seng akan mempengaruhi Th1 untuk meningkatkan produksi IL-2 dan IFN-γ (Ambarwati 2003). Kemudian seng juga akan menginduksi sel NK untuk meningkatkan produksi IFN-γ (Shankar dan Prasad 2008). Interferon-γ yang dihasilkan dari berbagai sumber di atas kemudian digunakan untuk mengaktifkan makrofag sehingga terstimulasi untuk menghasilkan TNF-α. Tumor Nekrosis Factor-α dapat merangsang produksi sitokin pada sel T dan sel NK sehingga dapat mengaktifkan makrofag yang lain (Baratawidjaja 2000).

Fungsi lain dari IFN-γ adalah dapat menghalangi *S. typhimurium* melarikan diri ke dalam sitosol dan mengurungnya dalam vakuola fagosom sehingga menjadi lebih sensitif terhadap efek toksik ROI dan RNI. Interferon-γ juga mempercepat pematangan fagosom yang mengandung patogen dan fusinya dengan lisosom sehingga dapat membunuh bakteri lebih banyak (Basuki 2005).

Peningkatan produksi sitokin-sitokin tersebut disebabkan karena seng berperan sebagai kofaktor enzim DNA dan RNA polimerase. Enzim DNA polimerase berperan dalam replikasi DNA. Enzim RNA polimerase berperan dalam mempercepat proses transkripsi DNA menjadi pita mRNA. Selanjutnya pita mRNA tersebut ditranslasi menjadi protein yang dalam penelitian ini adalah sitokin (Pilliang 1997).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa indeks fagositosis makrofag pada kelompok P1 mengalami perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, P2, dan P3 (Tabel 9). Hal ini berkaitan dengan pengaturan homeostasis seng dalam saluran pencernaan. Mekanisme yang terlibat didalamnya adalah absorbsi seng dan sekresi endogenous. Walaupun hati memegang peranan penting dalam metabolisme seng, namun belum diketahui secara jelas mekanisme yang terjadi dalam hati (Huwae 2006). Penyerapan seng diatur oleh *metalotionein* yang disintesis di dalam sel dinding saluran pencernaan. Apabila konsumsi seng tinggi maka di dalam sel dinding cerna seng akan diubah menjadi *metalotionein* sebagai simpanan, sehingga akan mengurangi absorbsi seng. *Metalotionein* diduga mempunyai peranan dalam mengatur kandungan seng di dalam cairan intraseluler (Almatsier 2006). Dosis P1 (0,078 mg/ekor/hari) merupakan dosis yang sesuai

dengan kebutuhan tubuh dalam menghadapi infeksi *S. typhimurium* sehingga seluruh seng yang diberikan dapat diadsorbsi dengan sempurna.

Akan tetapi apabila dosis dinaikkan seperti pada P2 (0,169 mg/ekor/hari) maka kelebihan seng akan diubah menjadi *metalotinein* sebagai simpanan, sehingga akan mengurangi adsorbsi seng. Karena seng yang diadsorbsi berkurang maka kebutuhan seng pada makrofag, sel T, dan sel NK tidak bisa terpenuhi dengan segera dan harus menunggu suplai seng dari perombakan metalotinein terlebih dahulu sehingga akan menurunkan fungsi sistim imun. Oleh karena itu pemberian suplementasi seng pada dosis ini tidak menunjukkan hasil yang berbeda bermakna, bahkan semakin menurun apabila dibandingkan dengan dosis P1. Sama halnya dengan P2, pemberian suplementasi seng pada kelompok P3 (0,260 mg/ekor/hari) juga justru semakin menurunkan indeks fagositosis makrofag bahkan mendekati kontrol. Hal ini disebabkan karena jumlah seng yang diberikan jauh lebih tinggi dari kebutuhan, sehingga *metalotinein* yang disimpan juga lebih banyak dan semakin menghambat adsorbsi seng untuk langsung masuk pada jaringan yang membutuhkan. Oleh karena itu pemberian suplementasi seng pada kelompok P3 juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

Penelitian-penelitian tentang seng telah banyak dilakukan, antara lain sebagai berikut :

1. Pemberian 8% vitamin B1 dan 1 mMol seng sulfat dapat meningkatkan kadar polisakarida pada jamur sitake. Apabila jamur tersebut diberikan pada mencit maka akan meningkatkan proliferasi limfosit secara maksimal (Sasmito 2005).

2. Efek pemberian suplementasi seng 11 mg, besi 20 mg dan multivitamin yang diberikan setiap hari selama 3 bulan terhadap anak usia 6-24 bulan akan meningkatkan nilai z-score panjang badan menurut umur (Thu *et. al* 1999).
3. Efek suplementasi seng 20 mg dan mikronutrein lain berpengaruh terhadap penampilan neuropsikologis dan pertumbuhan anak usia 6-9 tahun di Cina. (Sandstead *et. al* 2000)
4. Pemberian suplementasi seng 10 mg setiap hari pada anak usia 4-36 bulan di Vietnam yang mengalami gagal tumbuh dapat meningkatkan pertumbuhan dan sirkulasi insulin *like growth factor I* (LGF-I) (Ninh *et al*. 1996).
5. Pemberian suplementasi mikromineral seng 20 mg dan besi 20 mg pada anak kerdil usia 6-24 bulan akan meningkatkan nilai z-core panjang badan anak sebesar 0,14 (Nasution 2000).

Fagositosis makrofag yang efektif pada invasi *S. typhimurium* secara dini dapat mencegah timbulnya typus. Makrofag yang teraktivasi akan meningkatkan aktivitas antimikrobia yang berguna untuk killing bakteri pada proses selanjutnya. Makrofag yang aktif juga mengekspresikan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang mengkatalisis produksi NO dari arginin (Sawitri 2003). NO dapat berperan sebagai antiproliferasi terhadap *S. typhimurium* yang masuk dalam makrofag (Sahat 2006). Selain itu makrofag juga dapat memproduksi ROI melalui jalur *respiratory burst* (Sawitri 2003). Interaksi antara ROI dan NO dapat membentuk antimikroba yang lebih *toxic* seperti *peroksi nitrit* yang dapat meningkatkan efek bakterisidal makrofag (Lestarini 2008). Oleh karena itu selain meneliti kemampuan fagositosis makrofag untuk mencegah invasi *S. typhimurium* pada

jaringan, sebaiknya juga dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai produksi ROI, NO serta bakterisidal dari makrofag untuk menyempurnakan penelitian. NO berperan dalam menghambat proliferasi *S. typhimurium* sehingga dapat mencegah kambuhnya typus. ROI sangat reaktif dalam menghancurkan dinding sel bakteri, sedangkan bakterisidal berguna untuk memastikan kemampuan killing bakteri dari makrofag.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan uraian hasil dan pembahasan, dapat ditarik simpulan sebagai berikut:

1. Pemberian suplementasi mikromineral seng berpengaruh terhadap indeks fagositosis mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.
2. Pemberian suplementasi mikromineral seng sebesar 0,078 mg/ekor/hari merupakan dosis paling efektif untuk meningkatkan indeks fagositosis mencit balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

B. Saran

Untuk menyempurnakan hasil penelitian sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sintesis NO dan ROI serta killing bakteri oleh makrofag.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

DAFTAR PUSTAKA

Abbas AK, Litchman AH, Pober JS. Cellular Immunology. 1994. *Cellular and Molecular Immunology,* 2nd ed. Philadelphia: WB Sanders Comp

Ahmad RZ. 2008. Pemanfaatan Cendawan untuk Meningkatkan Produktivitas dan Kesehatan Ternak. *Jurnal Litbang Pertanian* 27(3) : 84-92

Ali S. 2006. Typhoid Fever Aspec of Enviroment Host and Pathogen Interaction (*Thesis*). Jakarta : Atma Jaya

Almatsier, S. 2006. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia : Jakarta

Ambarwati FD. 2003. Seng dan Imunitas. *Gizimindo* 6 : 19-21

Anjarwati RS. 2005. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit Balb/C yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* (*Skripsi*). Semarang: Universitas Diponegoro.

Armin SA. 2005. Zat Gizimikro Zink, dari Aspek Molekuler sampai pada Program Kesehatan Masyarakat. *Suplement* 26 (3):73-77

As'ad S dan Yusuf I. 2003. The Effect of Zinc Supplementation of the TNF-α Profil and Diarrea in Severely Malnourished Children of Low Income Family. *Medical journal of Indonesia.* 12 (4) : 247-251

Basuki PS. 2005. Infeksi Bakteri Intraseluler pada Anak (*Thesis*). Surabaya : UNAIR

Bratawidjaja KG. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-6. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Brooks GF, SB Janet, dan AM Stephen. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Terjemahan. Jakarta : Salemba Medika

Coligan JE, Kruisbeek AM, Marguiles DH, Stevach EM, and Stober W. 1991. *Current Protocol in Immunology* Volume 2. New York : John Wiley and Sons Inc.

Donatus L A. 1994. *Petunjuk Praktikum Toksikologi*. Edisi I. Yogyakarta : Lab. Farmakologi dan Toksikologi. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.

Duran CS, G Heresi, M Fisberg and R Uauy. 1987. Controlled of trial zinc supplementation during recovery from malnutrition : effect on growth and immune function. *American Journal of Clinical Nutrition* 45:602-608

Efendi Z. 2003. Daya Fagositosis Makrofag pada Jaringan Longgar Tubuh. *Online at* http://library.usu.ac.id/download/fk/histologi-zukesti1.pdf *[Accessed 6 februari 2009]*

Golub, M.S., Keen, C.L., Gershwin, M.E., Hendrickx, A.G. 1995. Developmental Zinc Deficiensy and Behaviorral. *American Journal of Clinical Nutrition*. 125:2263S-2271S.

Guthrie HA. 1986. *in Introductory Nutrition*. St. louis, Toronto, London : The C.V. Mosby Company.

Hasuki I. 2007. Seluk Beluk Penyakit Tifus Dalam Majalah Nakita. *On line at* http://www.mail-archive.com/milis-nakita@news.gramedia-majalah.com/ *[Accessed 13 Maret 2009]*

Hayati AW. 2002. Konsumsi Pangan dan Seng, serta Determinan Kasus Seng Ibu Hamil di Kecamatan Leuwiliang dan Cibungbulang Kabupaten Bogor (*Thesis*). Bogor : Institude Pertanian Bogor.

Hsu JM. & HS Hsich. 1981. The Current Status of Zinc, Copper, Selenium and Chromium in aging : in J.M. Hsu &R Davis (Eds). *Hanbook Of Generatric Nutrition. Noyes Publication. New Jersey.*

Huwae FJ. 2006. Hubungan antara Kadar Seng dengan Memori Jangka Pendek pada Anak Sekolah Dasar (*Tesis*). Semarang : Universitas Diponegoro

Kadang JK. 2004. Pengenalan Demam Tifoid. *On line at http://* www.tripod.lycos.com *[Accessed 13 Maret 2009]*

Karsinah, Lucky HM, Suharto, dan Mardiastuti HW. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.

King JG, DM Shames, and LR Woodhouse. 2000. Zinc and health : current status and future direction. *The Journal of Nutrition* 130 : 1360s-0366s

Lestarini IA. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri L* terhadap Respon Imunitas Seluler Mencit balb/c yang dinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* (*Tesis*). Semarang : Universitas Diponegoro.

Lin J, Lee IS, Frey J, Slonczewski JL, and Foster JW. 2005. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium, Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Jurnal Bacterial* (14):4097-104.

Lira PIC, A Ashworth, and SS Morris. 1998. Effect of zinc supplementation on the morbidity, immune function, and growth of low-birth-weight, full-term infants in northeast Brazil. *American Journal of Clinical Nutrition* 68(suppl):418S–24S

Mansjoer A, T Kusputi, S Rakhmi, IW Wahyu, dan SW Wiwiek. 1999. *Kapita Selekta Kedokteran*. Edisi Ketiga Jilid Pertama. Jakarta : Media Aesculaptius.

Murder M, M Mallo, K Eichman, and M Modolel. 1998. Murine macrophages secrete interferon-γ upon combined stimulation with IL-12 and IL-8. *J. Exp. Med* 187(12):2103-2108

Mutiara E. 2004. Mekanisme Keterkaitan Zinc dan Fungsi Otak. (*Disertasi*). Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Nanta F. 2009. Sistem Komplemen. *On line at* http://farmasiforyou.wordpress.com *[Accessed 28 Juli 2009]*

Piliang, W.G. 1997. *Nutrisi Mineral*. Edisi Ke-2 . Bogor : IPB Press..

Rahman MJ, P Sarker, SK Roy, SM Ahmad, J Chisti, T Azim, M Mathan, D Sack, J Andersson and R Raqib. 2005. Effects of zinc supplementation as adjunct therapy on the systemic immune responses in shigellosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2) : 495-502

Raqib R, SK Roy, MJ Rahman, T Azim, SS Ameer, J Chisti and J Andersson. 2004. Effect of zinc supplementation on immune and inflammatory responses in pediatric patients with shigellosis. *American Journal of Clinical Nutrition,* 79(3) : 444-450

Rejeki S. 2008. Demam tifoid pada anak: apa yang perlu diketahui?. *On line at* : http://www.medicastore.com. *[Accessed 15 Juni 2010]*

Reviana C. 2004. Peranan Mineral Seng (Zn) Bagi Kesehatan Tubuh. *On line at :* http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/14_PerananMineralSeng.pdf/14_PerananMineralSeng.html *[Accessed 13 Maret 2009]*

Sahat D. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Hedyotis corimbosa* Dosis Bertingkat terhadap Produksi Nitric Oxide Makrofag Mencit balb/c yang

diinfeksi dengan *Salmonella typhimurium* (*Skripsi*). Semarang : Universitas Diponegoro.

Santoso S. 2002. SPSS versi 12. *Mengolah Data Statistik secara Profesional*. Jakarta : PT Elex Media Komputindo.

Sarjadi. 2001. *Patologi Umum.* Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.

Sawitri, E. 2003. Pengaruh Ekstrak *Allium sativum* terhadap Daya Tahan Mencit Balb/c yang diinfeksi *Lisceria Monocytogenes* (*Tesis*). Semarang : Universitas Diponegoro.

Schefler WC. 1987. *Statistika Untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran, dan Ilmu yang Bertautan*. Bandung : Penerbit ITB

Shankar AH dan Prasad AS. 1998. Zinc and immune function : the biological basis of altered resistance of infection. *American Journal of Clinical Nutrition*; 68 (Suppl) : 447S-463S.

Shulmant ST dan Phair JP. 1994. *Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi*. Yogyakarta : Fakultas Kedokteran UGM.

Subronto. 2003. *Ilmu Penyakit Ternak I.* Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Sugiarto S. 2009. Brain dan Zincum. *On line at http:// www.doitsoteam.blogspot.com [Accessed 3 Oktober 2009]*

Winasri H, Hernayanti, dan A Purwanto. 2007. Potensi Fortifikasi Zinc pada Virgin Coconut Oil sebagai Antibakteri Penyebab *Candida Vagina*. *Media Medika Indonesia*, 42(2) : 56-61

PERPUSTAKAAN UNNES

Lampiran 1 Data Hasil Pengamatan Indeks Fagositosis Makrofag.

No	Kelompok	Indeks Fagositosis Makrofag
1	Kontrol	1.761
2		1.640
3		1.760
4		1.964
5		1.017
6		2.324
7	Perlakuan 1	5.013
8		3.871
9		4.102
10		3.465
11		4.612
12		4.637
13	Perlakuan 2	2.150
14		2.225
15		1.965
16		2.180
17		1.845
18		1.363
19	Perlakuan 3	1.502
20		1.600
21		2.125
22		2.120
23		1.595
24		1.720

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES

Lampiran 2 Analisis Statistik indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang diinfeksi *S. typhimurium*.

1. Hasil uji normalitas data.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Perlakuan1	Perlakuan2	Perlakuan3
N		6	6	6	6
Normal Parameters[a]	Mean	1.74433	4.28333	1.95467	1.77700
	Std. Deviation	.430044	.572378	.323794	.276434
Most Extreme Differences	Absolute	.237	.217	.227	.248
	Positive	.151	.124	.202	.248
	Negative	-.237	-.217	-.227	-.226
Kolmogorov-Smirnov Z		.582	.532	.556	.608
Asymp. Sig. (2-tailed)		.888	.940	.917	.853

a. Test distribution is Normal.

2. Analisis deskriptif

Descriptives

indeks_fagosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	1.7443	.43004	.17556	1.2930	2.1956	1.02	2.32
2	6	4.2833	.57238	.23367	3.6827	4.8840	3.46	5.01
3	6	1.9547	.32379	.13219	1.6149	2.2945	1.36	2.22
4	6	1.7770	.27643	.11285	1.4869	2.0671	1.50	2.12
Total	24	2.4398	1.15741	.23626	1.9511	2.9286	1.02	5.01

PERPUSTAKAAN UNNES

3. Hasil uji homogenitas varians.

Test of Homogeneity of Variances

indeks_fagosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.505	3	20	.244

4. Hasil uji *One Way ANAVA*

ANOVA

indeks_fagosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.342	3	9.114	52.544	.000
Within Groups	3.469	20	.173		
Total	30.811	23			

5. Hasil uji *Post Hoc* dengan menggunakan *Bonferroni*

Multiple Comparisons

Dependent Variable:indeks_fagosit

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Bonferroni	1	2	-2.53900*	.24045	.000	-3.2428	-1.8352
		3	-.21033	.24045	1.000	-.9142	.4935
		4	-.03267	.24045	1.000	-.7365	.6712
	2	1	2.53900*	.24045	.000	1.8352	3.2428
		3	2.32867*	.24045	.000	1.6248	3.0325
		4	2.50633*	.24045	.000	1.8025	3.2102
	3	1	.21033	.24045	1.000	-.4935	.9142
		2	-2.32867*	.24045	.000	-3.0325	-1.6248
		4	.17767	.24045	1.000	-.5262	.8815
	4	1	.03267	.24045	1.000	-.6712	.7365
		2	-2.50633*	.24045	.000	-3.2102	-1.8025
		3	-.17767	.24045	1.000	-.8815	.5262

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

PERPUSTAKAAN
UNNES

Lampiran 3 Foto Penelitian

Gambar 1. Mencit Balb/c.

Gambar 2. Zat gizi mikromineral seng dalam buffer PGA.

Gambar 3. Pemberian mikromineral seng secara peroral.

Gambar 4. Isolat *Salmonella typhimurium*.

Gambar 5. Injeksi *S. typhimurium* intraperitoneal pada mencit Balb/c.

Gambar 6. RPMI komplit

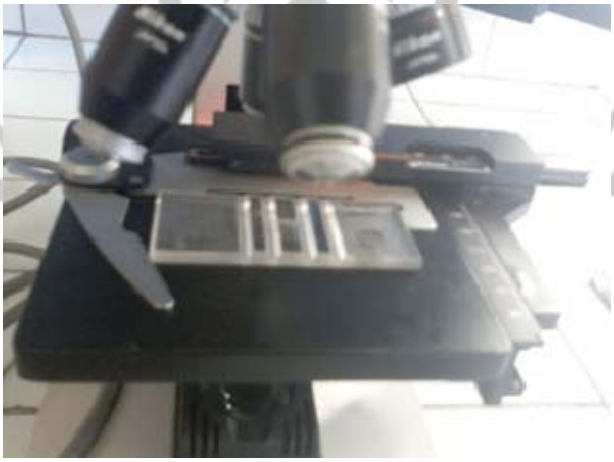
Gambar 7. NH_4CL dan PBS

Gambar 8. Injeksi RPMI dan PBS 2% ke peritoneum mencit Balb/c.

Gambar 9. Menepuk-tepuk peritoneum mencit Balb/c yang telah diisi RPMI komplit dan PBS 2% untuk melarutkan makrofag.

Gambar 10. Mesin sentrifuse.

Gambar 11. Mencuci makrofag dengan menggunakan PBS.



Gambar 12. Penghitungan makrofag pada neubauer dengan mikroskop perbesaran 400 kali

Gambar 13. Lateks bead.

Gambar 14. Coverslip dan mikroplate.

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG
PERPUSTAKAAN
UNNES