

**PERUBAHAN KADAR INTERLEUKIN 2, JUMLAH RELATIF
SEL T CD4⁺ DAN CD8⁺, DAN HISTOPATOLOGI USUS HALUS
MENCIT (BALB/c) *SPLENECTOMY* PAPARAN *Salmonella typhi***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh :

NURVALINA WAHYUNI

0510910045-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PERUBAHAN KADAR INTERLEUKIN 2, JUMLAH RELATIF SEL T CD4⁺ DAN CD8⁺, DAN HISTOPATOLOGI USUS HALUS MENCIT (BALB/c) *SPLENECTOMY* PAPARAN *Salmonella typhi*

oleh :

NURVALINA WAHYUNI
0510910045-91

Setelah dipertahankan di depan Mejlis penguji
pada tanggal 30 Desember 2009
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Muhaimin Rifa'i, PhD.MED.Sc
DES

NIP. 19680626 199702 1 001

Prof. Dr. Aulanni'am, drh.,

NIP. 19600903 198802 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sri Rahayu, M.Kes
NIP. 19620528 198701 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nurvalina Wahyuni
NIM : 0510910045-91
Jurusan : Biologi
Penulisan Skripsi berjudul :

PERUBAHAN KADAR INTERLEUKIN 2, JUMLAH RELATIF SEL T CD4⁺ DAN CD8⁺, DAN HISTOPATOLOGI USUS HALUS MENCIT (BALB/c) *SPLENECTOMY* PAPARAN *Salmonella typhi*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukuman dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 30 Desember 2009

Yang menyatakan

(Nurvalina Wahyuni)

NIM. 0510910045-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Perubahan Kadar Interleukin 2, Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (BALB/c) *Splenectomy* Paparan *Salmonella typhi*

Nurvalina Wahyuni¹, Muhaimin Rifa'i¹, Aulanni'am²

¹Jurusan Biologi, ²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, 2009

ABSTRAK

Splenectomy adalah tindakan pengangkatan organ limpa akibat adanya ketidaknormalan fungsi organ tersebut. Pasien pasca *splenectomy* akan rentan terhadap infeksi dan memerlukan kompensasi jumlah limfosit untuk menangani bakteri patogen yang masuk dalam tubuh. IL-2 merupakan salah satu agen kompensator yang berperan dalam faktor perkembangan limfosit T. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan *S. typhi* terhadap kadar IL-2, jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ serta mengetahui pengaruh penetrasi *S. typhi* terhadap usus halus mencit BALB/c *splenectomy*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kelompok perlakuan (kontrol, *splenectomy*, paparan *S. typhi* (10⁹sel/ml), dan *splenectomy*-paparan *S. typhi* 10⁹sel/ml). Pengukuran kadar IL-2 serum mencit dilakukan menggunakan ELISA ($\lambda=405$ nm). Perhitungan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ menggunakan *flow cytometry*, dan efek penetrasi *S. typhi* pada usus halus mencit diamati dengan metode Hematoxilin-Eosin. Hasil penelitian menunjukkan paparan *S. typhi* pada mencit *splenectomy* maupun *nonsplenectomy* mampu meningkatkan kadar IL-2 (*splenectomy* (1,567 ng/ml), paparan *S. typhi* (1,352 ng/ml), *splenectomy*-paparan *S. typhi* (1,252 ng/ml), dan kontrol (0,494 ng/ml)), yang menunjukkan adanya pertahanan dari sistem imun tubuh ketika terdapat ketiadaan limpa dan penetrasi bakteri. Hasil analisis jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *mesenteric lymph node* menunjukkan bahwa paparan *S. typhi* tidak berpengaruh terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada semua mencit perlakuan. Penetrasi *S. typhi* pada usus halus mencit *splenectomy*-paparan *S. typhi* menunjukkan tingkat penetrasi terparah dibandingkan kelompok lainnya, yang ditunjukkan dengan adanya kerusakan struktur epitel dan basal jaringan usus halus dan banyaknya koloni bakteri yang ada di dalam jaringan tersebut.

Kata kunci : Kadar IL-2, *S. typhi*, sel T CD4⁺ dan CD8⁺, *splenectomy*

The Alteration of Interleukin 2 Concentration, Relative Amount of CD4⁺ T Cells and CD8⁺, and Histopatology of Small Intestine Mice (*Mus musculus* BALB / c) Splenectomy *Salmonella typhi* Exposure

Nurvalina Wahyuni¹, Muhaimin Rifa'at¹, Aulanni'am²

¹Biology Department, ²Chemistry Department, Mathematic and Science Faculty, University of Brawijaya, Malang, 2009

ABSTRACT

Splenectomy is an organ removal of the spleen due to organ function abnormality. In post splenectomy, patients were vulnerable to infection and require compensation for the amount of lymphocytes to handle pathogens that invade the body. IL-2 is one of the compensators agents involved in development of T lymphocytes. The purpose of this experiment are to determine the effect of *S. typhi* exposure to the levels of IL-2, the relative amount of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the effect of *S. typhi* penetration at small intestine of splenectomized BALB/c mice. This experiment use Complete Random Design with 4 treatment groups (control, splenectomy, *S. typhi* exposure (10⁹cell/ml), and splenectomy-*S. typhi* exposure 10⁹cell/ml). Measurement of IL-2 levels in serum of mice performed using ELISA ($\lambda=405$ nm), number of CD4⁺ T cells and CD8⁺ calculated by flow cytometry and the effects *S. typhi* penetration in the small intestine of mice was observed with Hematoxylin-Eosin method. The results showed that *S. typhi* exposure in splenectomized and nonsplenectomized mice can increase levels of IL-2 (control = 0,494 ng/ml, *splenectomy-S. typhi* exposure = 1,252 ng/ml, *S. typhi* exposure = 1,352 ng/ml, and splenectomy = 1,567 ng/ml), which indicates the existence of the body's immune system in the absence of spleen and it's when exposure by bacteria. The analysis results of the number CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the mesenteric lymph nodes showed that *S. typhi* exposure in all treatment mice does not affect on the relative amount of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *S. typhi* penetration in the small intestine of splenectomy-*S. typhi* exposure mice showed the worst penetration than other groups, indicated by the damage of intestinal tissue structure and the number of bacteria colonies in the small intestine tissue.

Key words: CD4⁺ and CD8⁺ T cells, levels of IL-2, *S. typhi*, splenectomy

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah memberikan kelimpahan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya kepada penulis sehingga skripsi yang berjudul “Perubahan Kadar Interleukin 2, Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (BALB/c) *Splenectomy* Paparan *Salmonella typhi*” dapat terselesaikan. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad Shalallahu ‘alaihi wa Sallam yang telah memberikan petunjuk dan memberikan tauladan bagi umat manusia tentang keutamaan berilmu.

Proses penelitian dan penyelesaian penelitian ini tentunya tidak lepas dari, bimbingan, dukungan, doa, serta bantuan dari banyak pihak. Sehubungan dengan hal tersebut maka penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih kepada

- Bapak, Ibu, adik, dan keluarga besar penulis yang senantiasa mendo'akan dan memberikan dukungan
 - Bapak Muhaimin Rifa'i, PhD.MED.Sc dan Ibu Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing atas nasehat, bimbingan, bantuan dan berbagai masukan serta kesabaran membimbing selama penelitian dan penulisan skripsi
 - Bapak Widodo, PhD.MED.Sc , Bapak Dr. Ir. M. Sasmito Djati, M.S, dan Bapak Irfan Mustafa, S.Si, M.Si selaku penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun sehingga skripsi ini menjadi lebih baik
 - Ibu Dr. Sri rahayu, M.Kes selaku ketua Jurusan dan Ibu Dr. Sri widyarti, MSi selaku ketua laboratorium Biologi Molekuler atas nasehatnya
 - Keluarga Ibu Gus Wahyuni atas dukungan moral dan do'a
 - Fatma Ayatiliulil Albab selaku teman seperjuangan dalam penelitian atas kerjasama, kekompakan, saran dan kritik ketika penelitian dan penulisan skripsi
 - Dedy K, Bekti D.L, Miranti A, Antonius C, Afidatul M, Lailatul H, Farid MR, Adi N.C, A. Tamyis, Anang P, Susiati dan teman-teman Bio'05 yang senantiasa kompak dan saling mendukung
 - Rekan-rekan Bio dan WG 17E serta semua pihak yang berperan dalam kelancaran penelitian dan penyelesaian skripsi ini,
- Penulisan skripsi ini tentunya masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan oleh penulis. Semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Malang, 30 Desember 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Batasan Masalah.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Organ Limpa dalam Sistem Imun.....	4
2.2 <i>Splenectomy</i>	5
2.3 <i>Salmonella typhi</i> sebagai Antigen	7
2.4 Respon Sistem Imun Tubuh terhadap Antigen.....	8
2.5 Interleukin 2 (IL-2).....	9
2.6 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	11
2.7 <i>Flow cytometry</i>	12
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Cara Kerja	13
3.2.1 Rancangan Penelitian	13
3.2.2 <i>Splenectomy</i> Mencit (<i>Mus musculus</i> BALB/c)	13
3.2.3 Persiapan dan Paparan <i>Salmonella typhi</i> melalui Injeksi Intraperitoneal	14
3.2.4 Analisis Hematologi Mencit Perlakuan	15
3.2.5 Isolasi Bakteri <i>Salmonella typhi</i> dari Darah Mencit.....	15
3.2.6 Dislokasi Leher Mencit BALB/c.....	16
3.2.7 Isolasi Serum dari Mencit Perlakuan.....	16

3.2.8 Pengukuran Kadar IL-2 dengan <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	16
3.2.9 Perhitungan Jumlah Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ dengan <i>Flow cytometry</i>	17
3.2.10 Pengamatan Histopatologi Organ Usus Halus Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin	18
3.2.11 Pengamatan.....	19
3.2.12 Analisis Data.....	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Analisis Kadar Interleukin 2 (IL-2) dengan Metode ELISA	20
4.2 Analisis Jumlah Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ Menggunakan <i>Flow cytometry</i>	24
4.3 Analisis Histopatologi Usus Halus terhadap Penetrasi <i>S. typhi</i> pada Usus Halus Mencit.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Letak organ limpa	5
Gambar 2.2	Tahap-tahap <i>Splenectomy</i>	6
Gambar 2.3	Peran interleukin 2 dalam sistem imun tubuh.....	10
Gambar 2.4	Stimulasi proliferasi sel T oleh interleukin 2.....	11
Gambar 4.1	Perbandingan rata-rata kadar IL-2 pada masing-masing perlakuan ($P < 0,05$).....	21
Gambar 4.2	Persentase rata-rata jumlah relatif sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada masing-masing <i>mesenteric lymph node</i> mencit perlakuan dari hasil <i>flow cytometry</i>	25
Gambar 4.3.	Histopatologi usus halus mencit bagian epitel.....	30
Gambar 4.4.	Histopatologi usus halus mencit bagian basal	32
Gambar 4.5.	Histopatologi usus halus mencit bagian <i>payer's patch</i>	33
Gambar 4.6.	Respon sistem imun pada bagian usus halus ketika terjadi infeksi bakteri	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kelaikan Etik Penelitian	43
Lampiran 2	Alur Kerja Penelitian	44
Lampiran 3	Kerangka Konsep Penelitian	45
Lampiran 4	Skema Prosedur <i>Splenectomy</i> mencit (<i>Mus musculus</i> BALB/c)	46
Lampiran 5	Perhitungan Dosis Injeksi Anestesi	47
Lampiran 6	Skema Prosedur Persiapan dan Injeksi <i>S. typhi</i>	48
Lampiran 7	Skema Prosedur Pembuatan Pola Pertumbuhan Bakteri <i>S. typhi</i>	49
Lampiran 8	Skema Prosedur Isolasi bakteri <i>S. typhi</i> dari darah Mencit	50
Lampiran 9	Skema Prosedur Pengukuran Kadar Interleukin 2 (IL-2) dengan ELISA	51
Lampiran 10	Skema Prosedur Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ <i>Flow Cytometry</i>	52
Lampiran 11	Skema Prosedur Pengamatan Histopatologi Organ Usus Halus Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin	54
Lampiran 12.	Kompisisi Reagen dan Media yang Digunakan	56
Lampiran 13.	Kurva Standar dan Pertumbuhan Bakteri <i>S. typhi</i>	58
Lampiran 14.	Uji Konfirmasi <i>S. typhi</i> dalam Media SS Agar, KIA & LIA dan BSA dari Darah Mencit	59
Lampiran 15.	Kurva Standar IL-2	60
Lampiran 16.	Hasil Analisis Ragam (ANOVA) dan Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Peningkatan Kadar IL-2 pada Serum Mencit	61
Lampiran 17.	Hasil Analisis Ragam (ANOVA) Jumlah Sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺ pada <i>Mesenteric lymph node</i> Mencit	62
Lampiran 18.	Hasil (<i>Output</i>) Analisis Ragam (ANOVA) dan Hasil Uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Peningkatan Kadar IL-2 pada Serum Mencit melalui <i>Software</i> Program SPSS for Windows Release Versi 13.0.	63
Lampiran 19	Rerata Berat Badan Mencit Seminggu Sebelum Perlakuan Hingga Akhir Perlakuan	64
Lampiran 20.	Perbandingan Komponen Darah 1 Minggu setelah <i>Splenectomy</i> dan 1 Minggu setelah Injeksi <i>S. typhi</i> ...	67

DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Istilah/singkatan

Keterangan

A_{600}	: pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 600 nm
<i>Affixing</i>	: proses penempelan pita-pita jaringan pada kaca obyek setelah pemotongan
Atrophiin sulfat	: larutan obat untuk premedikasi
BALB/c	: galur mencit yang digunakan dalam penelitian
<i>Booster</i>	: tindakan memasukkan kembali (injeksi ulang) antigen pada tubuh hewan coba
CD4 ⁺	: molekul permukaan sel (penanda <i>cluster of differentiation</i> 4) yang akan berikatan dengan MHC II
CD8 ⁺	: molekul permukaan sel (penanda <i>cluster of differentiation</i> 8) yang akan berikatan dengan MHC I
<i>Clearing</i>	: proses penjernihan (pembersihan) jaringan dari alkohol
Dehidrasi	: proses pembersihan molekul air yang terdapat di dalam jaringan
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
<i>Embedding</i>	: proses penanaman organ ke dalam masa paraffin (titik didih 56-58°C)
FITC	: <i>Fluorescence isothiocyanate</i>
<i>Flow cytometry</i>	: metode atau alat yang digunakan untuk menghitung jumlah sel T CD4 ⁺ dan CD8 ⁺
IFN- γ	: interferon gamma
IgA	: immunoglobulin A
Inokulasi	: menambahkan atau memindahkan bakteri ke dalam medium kultur
Isolat	: satu jenis bakteri yang telah murni
Ketamin	: obat untuk agen anastesi umum (obat bius)
MHC I dan II	: <i>Major Histocompatibility Complex</i> I dan II
<i>Mounting</i>	: proses pemberian perekat preparat pada kaca obyek
<i>Pour plate</i>	: metode pembiakan bakteri dengan cara medium tumbuh dituangkan dalam cawan petri setelah bakteri dituangkan terlebih dahulu

Sel T : sel limfosit T
Xylazin : obat anestesi untuk membantu kerja dari ketamin

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



repository.ub.ac.id

Perubahan Kadar Interleukin 2, Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺, dan Histopatologi Usus Halus Mencit (BALB/c) *Splenectomy* Paparan *Salmonella typhi*

Nurvalina Wahyuni¹, Muhaimin Rifa'i¹, Aulanni'am²

¹Jurusan Biologi, ²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, 2009

ABSTRAK

Splenectomy adalah tindakan pengangkatan organ limpa akibat adanya ketidaknormalan fungsi organ tersebut. Pasien pasca *splenectomy* akan rentan terhadap infeksi dan memerlukan kompensasi jumlah limfosit untuk menangani bakteri patogen yang masuk dalam tubuh. IL-2 merupakan salah satu agen kompensator yang berperan dalam faktor perkembangan limfosit T. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh paparan *S. typhi* terhadap kadar IL-2, jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ serta mengetahui pengaruh penetrasi *S. typhi* terhadap usus halus mencit BALB/c *splenectomy*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kelompok perlakuan (kontrol, *splenectomy*, paparan *S. typhi* (10⁹ sel/ml), dan *splenectomy*-paparan *S. typhi* 10⁹ sel/ml). Pengukuran kadar IL-2 serum mencit dilakukan menggunakan ELISA ($\lambda=405$ nm). Perhitungan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ menggunakan *flow cytometry*, dan efek penetrasi *S. typhi* pada usus halus mencit diamati dengan metode Hematoxilin-Eosin. Hasil penelitian menunjukkan paparan *S. typhi* pada mencit *splenectomy* maupun *nonsplenectomy* mampu meningkatkan kadar IL-2 (*splenectomy* (1,567 ng/ml), paparan *S. typhi* (1,352 ng/ml), *splenectomy*-paparan *S. typhi* (1,252 ng/ml), dan kontrol (0,494 ng/ml)), yang menunjukkan adanya pertahanan dari sistem imun tubuh ketika terdapat ketiadaan limpa dan penetrasi bakteri. Hasil analisis jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *mesenteric lymph node* menunjukkan bahwa paparan *S. typhi* tidak berpengaruh terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada semua mencit perlakuan. Penetrasi *S. typhi* pada usus halus mencit *splenectomy*-paparan *S. typhi* menunjukkan tingkat penetrasi terparah dibandingkan kelompok lainnya, yang ditunjukkan dengan adanya kerusakan struktur epitel dan basal jaringan usus halus dan banyaknya koloni bakteri yang ada di dalam jaringan tersebut.

Kata kunci : Kadar IL-2, *S. typhi*, sel T CD4⁺ dan CD8⁺, *splenectomy*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

The Alteration of Interleukin 2 Concentration, Relative Amount of CD4⁺ and CD8⁺ T Cells, and Histopatology of Small Intestine Mice (*Mus musculus* BALB / c) Splenectomy *Salmonella typhi* Exposure

Nurvalina Wahyuni¹, Muhaimin Rifa'i¹, Aulanni'am²

¹Biology Department, ²Chemistry Department, Mathematic and Science Faculty,
University of Brawijaya, Malang, 2009

ABSTRACT

Splenectomy is an organ removal of the spleen due to organ function abnormality. In post splenectomy, patients were vulnerable to infection and require compensation for the amount of lymphocytes to handle pathogens that invade the body. IL-2 is one of the compensators agents involved in development of T lymphocytes. The purpose of this experiment are to determine the effect of *S. typhi* exposure to the levels of IL-2, the relative amount of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the effect of *S. typhi* penetration at small intestine of splenectomized BALB/c mice. This experiment use Complete Random Design with 4 treatment groups (control, splenectomy, *S. typhi* exposure (10⁹cell/ml), and splenectomy-*S. typhi* exposure 10⁹cell/ml). Measurement of IL-2 levels in serum of mice performed using ELISA ($\lambda=405$ nm), number of CD4⁺ T cells and CD8⁺ calculated by flow cytometry and the effects *S. typhi* penetration in the small intestine of mice was observed with Hematoxylin-Eosin method. The results showed that *S. typhi* exposure in splenectomized and nonsplenectomized mice can increase levels of IL-2 (control = 0,494 ng/ml, *splenectomy-S. typhi* exposure = 1,252 ng/ml, *S. typhi* exposure = 1,352 ng/ml, and splenectomy = 1,567 ng/ml), which indicates the existence of the body's immune system in the absence of spleen and it's when exposure by bacteria. The analysis results of the number CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the mesenteric lymph nodes showed that *S. typhi* exposure in all treatment mice does not affect on the relative amount of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *S. typhi* penetration in the small intestine of splenectomy-*S. typhi* exposure mice showed the worst penetration than other groups, indicated by the damage of intestinal tissue structure and the number of bacteria colonies in the small intestine tissue.

Key words: CD4⁺ and CD8⁺ T cells, levels of IL-2, *S. typhi*, splenectomy

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Limpa adalah salah satu organ yang berperan dalam imunitas tubuh. Komponen imunitas tubuh, seperti sel limfosit dan makrofag yang berada di dalam limpa membantu mengenali dan membunuh bakteri patogen serta antigen lain yang masuk ke dalam tubuh (Abbas dan Lichtman, 2005). Infeksi oleh bakteri patogen dan beberapa penyakit yang berhubungan dengan kanker dapat menyebabkan ukuran limpa menjadi lebih besar daripada ukuran normal. Hal tersebut dapat membahayakan organ tubuh lainnya sehingga perlu dilakukan pengangkatan limpa (*splenectomy*) (Ode, 2006).

Splenectomy dapat menyebabkan beberapa infeksi akibat hilangnya makrofag dan komponen imunitas lainnya, seperti sel-sel limfosit yang berada di dalam limpa (Newland, 2005). Peningkatan infeksi oleh bakteri, seperti *Salmonella typhi* dan *Haemophilus influenzae* dapat mengakibatkan peningkatan kematian pasien pasca *splenectomy* (Deodhar dan Kakkar, 2004). Berdasarkan data yang telah dicatat pada tahun 1996, dari 19680 pasien yang mengalami *splenectomy*, 630 pasien pasca *splenectomy* mengalami infeksi dan sebanyak 1,4 % pasien yang terinfeksi tersebut meninggal (Todar, 2005). Umumnya pasien pasca *splenectomy* mengalami kerusakan dasar pada fungsi imunitas tubuh yang biasa disebut *overwhelming postsplenectomy infection syndrome*, sehingga pasien lebih rentan terhadap infeksi bakteri (Witztum, 2002).

Infeksi bakteri dapat terjadi melalui makanan ataupun udara yang pada akhirnya dapat menyebabkan infeksi pada pasien pasca *splenectomy*. *Salmonella typhi* adalah salah satu jenis bakteri yang memiliki jalur infeksi melalui makanan maupun minuman yang kurang bersih. Bila bakteri tersebut telah masuk dalam tubuh, maka *Salmonella typhi* akan menyerang bagian-bagian tubuh yang berperan dalam imunitas tubuh. Bagian tubuh yang menjadi tujuan utama bakteri tersebut, diantaranya usus halus, *payer's patches*, limpa, dan hepar (Clark *et al.*, 1996). *S. typhi* merupakan bakteri yang memiliki karakteristik yang berbeda dengan bakteri patogen lainnya. Bakteri ini memiliki karakteristik kombinasi yang menyebabkan bakteri tersebut menjadi salah satu bakteri patogen efektif. Spesies ini juga merupakan organisme Gram negatif yang mengandung endotoksin

yaitu antigen Vi yang menyebabkan peningkatan virulensi bakteri tersebut dan bakteri ini juga dapat hidup secara intraseluler (Srinivasan, 2004). *S. typhi* juga memiliki protein faktor virulen yang disebut sebagai sitolisin yang berada pada bagian membran terluar bakteri dan bersifat lebih toksik (Kuehnl *et al*, 2005).

Respon imun terhadap bakteri, virus, dan benda asing yang masuk ke dalam tubuh dapat dilakukan oleh sitokin, sel, dan organ serta bagian imunitas tubuh lainnya. Interleukin 2 (IL-2) merupakan salah satu sitokin yang meregulasi *adaptive immunity* dan *growth factor* untuk sel T. Sitokin ini bekerja pada sel T untuk proliferasi sel T terutama CD4⁺. Selanjutnya sel T CD4⁺ akan mensistesis IL-2 ketika terdapat infeksi mikroba atau stimuli antigen. Sitokin ini juga bekerja pada sel B sebagai *growth factor* yang memicu sintesis antibodi. IL-2 juga dapat meningkatkan sintesis sitokin lainnya seperti interferon gamma (IFN- γ) yang berperan dalam aktivasi makrofag. Aktivasi makrofag akan memicu proses fagositosis bakteri patogen serta antigen yang masuk ke dalam tubuh oleh makrofag. Selain IFN- γ , IL-2 juga dapat meningkatkan sintesis IL-4 yang berperan dalam menstimuli produksi IgE. Pengaruh lain dari IL-2, yaitu memiliki efek antivirus dan antibakteri (Damayanti, 2006).

Ketiadaan limpa sebagai salah satu organ perifer yang berperan dalam sistem imun tubuh, dimungkinkan akan mempengaruhi jumlah sel-sel yang terlibat dalam sistem imun tubuh, seperti IL-2 yang berperan dalam proliferasi sel T dan pemicu sintesis sitokin lain (IL-4 dan IFN γ) yang sangat penting dalam respon imun tubuh. Selain itu, penetrasi *S. typhi* pada usus halus dan mekanisme kompensasi sel-sel yang terlibat pada sistem imun khususnya yang berhubungan dengan IL-2 dan *splenectomy* sampai saat ini belum banyak diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang kadar IL-2 sebagai respon imunitas tubuh terhadap infeksi *S. typhi* pasca *splenectomy*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka masalah yang akan dikaji pada penelitian ini adalah

1. Bagaimanakah pengaruh paparan *S. typhi* terhadap kadar IL-2 mencit BALB/c *splenectomy* ?
2. Bagaimanakah pengaruh paparan *S. typhi* terhadap jumlah relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ mencit BALB/c *splenectomy*?

3. Bagaimanakah pengaruh penetrasi *S. typhi* terhadap usus halus pada mencit BALB/c *splenectomy* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mengetahui pengaruh paparan *S. typhi* terhadap kadar IL-2 pada mencit BALB/c *splenectomy*
2. Mengetahui pengaruh paparan *S. typhi* terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ mencit BALB/c *splenectomy*
3. Mengetahui efek penetrasi *S. typhi* terhadap jaringan usus halus mencit BALB/c *splenectomy*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai studi pendahuluan untuk mengembangkan metode yang tepat dalam penanganan infeksi yang terjadi pasca *splenectomy* sehingga mampu memperkecil angka kematian pasien akibat infeksi pasca *splenectomy*.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah

1. Metode penelitian telah mendapatkan sertifikat laik etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 18
2. Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus* BALB/c) betina dengan umur 12 minggu
3. Perubahan kadar IL-2 pada serum mencit BALB/c perlakuan diukur dengan metode ELISA
4. Perubahan jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *mesenteric lymph node* mencit BALB/c perlakuan dihitung dengan *flow cytometry*
5. Penetrasi *S. typhi* pada jaringan usus halus mencit BALB/c perlakuan diamati dengan pewarnaan hematoxilin-eosin
6. Pengukuran komponen darah menggunakan *sysmex-KX21*

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

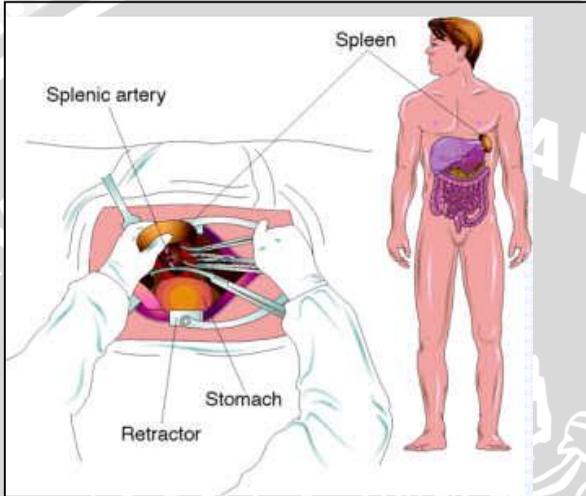
2.1 Organ Limpa dalam Sistem Imun

Sistem imun terdiri atas organ-organ dan jaringan limfoid, termasuk sumsum tulang, kelenjar timus, kelenjar getah bening, limpa, tonsil, adenoid, apendiks, dan pembuluh-pembuluh darah. Semua komponen sistem imun sangat penting dalam produksi limfosit (Hyde, 2000). Masing-masing organ tersebut memiliki peran dan tugas dalam sistem imunitas tubuh. Timus adalah organ sebagai tempat pematangan sel T (Abbas and Lichman, 2005). *Lymph node*, dalam sistem limfatik memiliki peran dalam hal pertahanan tubuh. Organ ini tidak berperan dalam menghasilkan sel darah putih, tetapi hanya sebagai tempat penyimpanan sel darah putih. *Lymph node* juga berperan dalam menghasilkan antibodi oleh sel B yang terdapat di dalam *lymph node* (Sigbio, 2008).

Limpa berwarna ungu gelap, memiliki bentuk seperti kacang, terletak pada bagian kiri atas abdomen, dan dekat dengan tulang rusuk (Gambar 2.1). Berat limpa pada orang dewasa sekitar 113-141 g. Limpa berperan penting dalam fungsi imun dengan menangkap dan memproses antigen, *homing*, dan melakukan proliferasi limfosit serta mengaktifkan makrofag. Organ ini juga merupakan tempat dalam menghasilkan antibodi, khususnya untuk melawan antigen dari bakteri (Witztum, 2002). Menurut Higashijima, *et al.* (2009) bahwa limpa merupakan organ limfoid dengan ukuran besar yang menghasilkan berbagai macam sitokin yang mengalir hingga ke hati melalui pembuluh dan vena portal untuk meningkatkan sitotoksitas *natural killer cell* (*NK cell*) pada hati.

Limpa memiliki peran penting tidak hanya pada sistem imun tetapi juga pada sistem sirkulasi. Menurut Norris, *et al.* (2002) fungsi limpa meliputi peranan dalam sistem imun, regulasi aliran darah ke hati, penyaringan substansi darah dan penyimpanan sel darah. Penyimpanan sel darah pada orang sehat di dalam limpa sekitar 30%. Darah mengalir ke dalam limpa melalui jalur yang cukup rumit seperti spon yang disebut sinusoid. Makrofag yang terdapat di dalam limpa akan menyelubungi dan menghancurkan bahan atau substansi yang membahayakan sel darah. Selain itu, limpa juga berperan dalam membantu tubuh melawan infeksi, karena makrofag yang berada di dalam limpa membersihkan darah dari parasit dan bakteri. Limfosit

yang terdapat pada limpa menghasilkan protein khusus dalam darah. Protein ini disebut antibodi yang berguna untuk melemahkan bakteri atau virus dan organisme lain yang menyebabkan infeksi (Diagnoses-med, 2008).



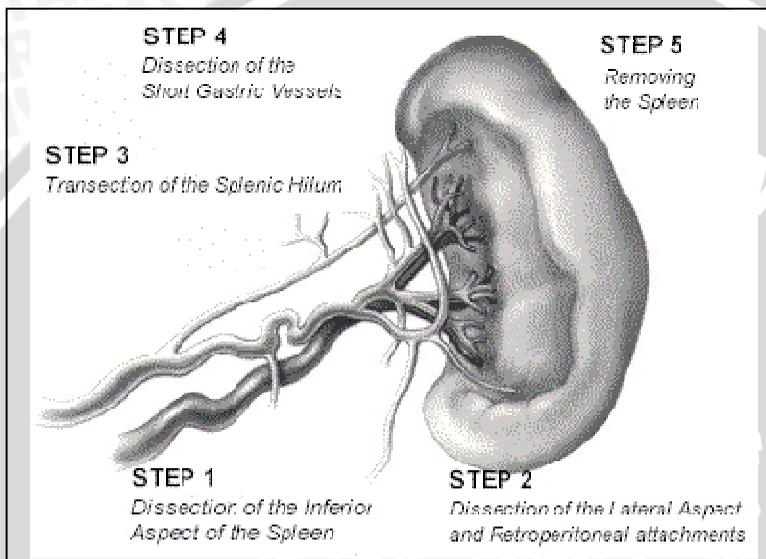
Gambar 2.1 Letak organ limpa (Odle, 2006)

Limpa adalah kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam organisme. Organ ini mengandung sel fagositik dan memiliki hubungan yang erat dengan darah yang beredar di dalam tubuh. Hal tersebut yang menjadikan limpa sebagai organ yang penting dalam menyaring mikroorganisme yang menerobos masuk dalam sistem sirkulasi. Organ ini berada di bagian kiri abdomen dan membantu tubuh untuk melawan infeksi. Bagian dalam limpa dikelilingi oleh fibrosa dan pembuluh darah sebagai jalur komunikasi bagian permukaan dan dalam limpa (Junquera *et al.*, 1995).

2.2 Splenectomy

Splenectomy adalah tindakan pembedahan dan pengambilan limpa, yang merupakan organ sistem limfatik. Proses *splenectomy* dilakukan melalui beberapa tahap dan secara hati-hati (Gambar 2.2). *Splenectomy* dilakukan setelah seorang pasien umumnya ditetapkan mengalami *hypersplenism*. Penyakit ini memiliki karakteristik perbesaran ukuran limpa secara tidak normal. Selain penyakit

tersebut, *splenectomy* juga dilakukan pada pasien yang mengalami kerusakan sel darah dan ketidaknormalan jumlah sel darah. Hal tersebut biasanya dihubungkan kerusakan fungsi limpa dan penyakit kanker tertentu, seperti leukemia dan *lymphomas* (Odle, 2006).



Gambar 2.2 Tahap-tahap *splenectomy* (Odle, 2006)

Pengambilan organ yang berhubungan dengan sistem imun seperti limpa memiliki risiko yang serius, sehingga keputusan dalam melakukan *splenectomy* bergantung pada keamanan dan diagnosis penyakit atau kondisi yang dapat mengakibatkan *hypersplenism* (Norris *et al.*, 2002). Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Millievi, *et al.* (2001) peristiwa pengambilan limpa akan menimbulkan peningkatan beberapa infeksi baik pada anak-anak maupun orang dewasa dan terdapat perubahan dalam beberapa parameter imunitas tubuh. Vaksinasi adalah salah satu strategi yang dilakukan untuk mencegah infeksi yang muncul pasca *splenectomy*. Vaksinasi dimulai dengan pemberian vaksin *pneumococcal* yang telah dikembangkan sejak pertama kali meningkatnya infeksi pasca *splenectomy* (1970an) (Deodhar dan Kakkar, 2004).

2.3 *Salmonella typhi* sebagai antigen

Antigen adalah semua jenis material yang dapat merangsang respon imun atau bahan yang dapat bereaksi dengan antibodi yang sudah ada. Antigen juga merupakan materi yang dapat diikat secara spesifik oleh molekul antibodi atau molekul reseptor pada sel T. Antibodi dapat mengenal hampir setiap molekul biologi sebagai antigen. Pengenalan antigen oleh antibodi melibatkan ikatan antibodi dengan antigen. Kekuatan ikatan antara satu antibodi dan epitop disebut afinitas antibodi. Kekuatan ikatan antibodi dengan epitop antigen keseluruhan disebut dengan aviditas (Baratawidjaja, 2004).

Sel bakteri dan virus memiliki sifat sangat imunogenik (Biotech, 2008). Seperti bakteri *Salmonella typhi* yang merupakan bakteri patogen fakultatif intraseluler yang dapat melakukan replikasi pada bagian luar maupun dalam sel inang setelah bakteri masuk ke dalam tubuh inang (Cummings *et al.*, 2005). Bakteri ini akan menyebar pada organ-organ tubuh melalui pembuluh darah dan dapat menyebabkan penyakit demam typhus (Raffatelu *et al.*, 2006). Karakteristik *Salmonella typhi* yang memiliki patogenitas yang cukup tinggi menyebabkan peningkatan kebutuhan imunitas tubuh lebih besar terhadap infeksi bakteri tersebut (Al-Ramadi *et al.*, 2006).

Semua anggota dari *Enterobacteriaceae* dari genus *Salmonella* memiliki tiga jenis antigen utama, yaitu somatik, permukaan, dan flagel. Antigen somatik (antigen O) stabil pada suhu panas dan resisten terhadap alkohol serta memiliki jumlah faktor antigenik yang banyak. Sekitar 67 faktor antigenik tersebut telah digunakan untuk identifikasi serologi. Antigen permukaan (antigen Vi) umumnya diamati pada genus lain dari bakteri enterik (*Escherichia coli* and *Klebsiella* sp.) dan dimungkinkan ditemukan pada beberapa *Salmonella*. Antigen permukaan pada *Salmonella* dimungkinkan menutupi antigen O sehingga akan menyebabkan bakteri tidak akan teraglutinasi dengan antisera O. Salah satu bagian yang spesifik dari antigen permukaan yang telah dikenal baik adalah antigen Vi. Antigen Vi hanya terdapat pada tiga jenis bakteri *Salmonella*, yaitu *typhi*, *paratyphi* C, dan *dublin*. Antigen flagel yang juga merupakan antigen *Salmonella* adalah antigen yang labil oleh panas (Todar, 2005).

Infeksi *Salmonella typhi* dapat terjadi melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Bakteri yang masuk dalam tubuh akan melewati *pylorus* dan mencapai usus halus.

Bakteri secara cepat akan masuk ke dalam epitel mukosa dan beberapa mikroorganisme akan melewati sel-sel retikulaendotelia hati dan limpa. *Salmonella typhi* dapat bertahan dan bermultiplikasi dalam sel-sel fagosit mononuklear, folikel-folikel limfoid, hati dan limpa (Prodia Laboratorium, 2006). Menurut Clark, *et al.* (1996) *Salmonella* adalah bakteri patogen enterik yang menyerang epitelium usus untuk menginisiasi penyakit. Bagian organ pada mencit yang menjadi tempat utama serangan *Salmonella* adalah *Peyer's patches*.

2.4 Respon Sistem Imun Tubuh terhadap Antigen

Fungsi sistem imun tubuh secara fisiologi adalah sebagai pertahanan serangan infeksi mikroba dan substansi asing yang dapat menimbulkan respon imun tubuh. Secara umum, mekanisme sistem imun tubuh adalah melindungi individu dari infeksi dan menghancurkan substansi asing yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit dalam tubuh. Secara umum mekanisme respon imun tubuh dibagi menjadi 2, yaitu *innate* dan *adaptive immunity* (Abbas and Lichman, 2005).

a. *Innate immunity*

Innate immunity merupakan pertahanan awal sebelum respon *adaptive immunity* terhadap serangan mikroba dan substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Mekanisme respon imun ini hanya bereaksi untuk mikroba dan bukan untuk substansi yang tidak menyebabkan infeksi pada tubuh. Prinsip dari komponen *innate immunity* adalah (1) pertahanan fisik dan kimia, seperti sel-sel epitel dan substansi antimikrobia yang dihasilkan pada permukaan sel epitel, (2) sel fagosit (neutrofil dan makrofag) dan *Natural Killer cell* (NK cell), (3) protein darah, yang terdiri dari sistem komplemen dan mediator inflamasi lain, dan (4) protein yang disebut sitokin yang mengatur dan mengkoordinasi banyak kegiatan sel dari *innate immunity*. *Innate immunity* memiliki beberapa fungsi penting, diantaranya sebagai respon awal untuk mikroba yang mencegah infeksi pada inang dan dapat membersihkan mikroba. Pengaruh mekanisme *innate immunity* sering digunakan untuk membersihkan mikroba secara merata dalam *adaptive immunity*. Selain itu mekanisme respon imun ini juga dapat membantu mengoptimalkan kerja respon *adaptive immunity* terhadap serangan mikroba yang berbeda (Abbas and Lichman, 2005).

b. *Adaptive immunity*

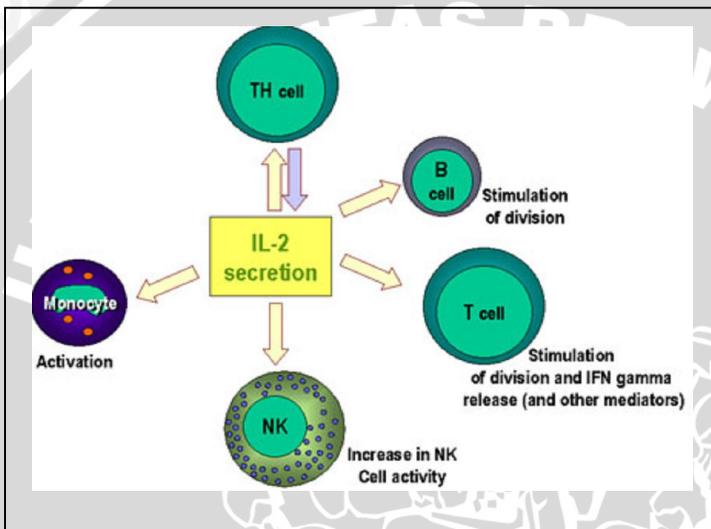
Sebagian besar infeksi virus dikontrol oleh *innate immune system*. Meskipun demikian, ketika virus mulai melakukan replikasi dan menghancurkan pertahanan *innate immunity* maka respon adaptif harus bekerja. Pertahanan *adaptive immunity* terdiri dari antibodi dan limfosit yang sering disebut sebagai respon humoral dan respon mediasi sel. Kemampuan untuk dapat merespon virus dan bakteri secara khusus dilakukan berdasarkan pada komunikasi diantara sistem *adaptive* dan *innate*. Komunikasi tersebut diperantarai oleh sitokin yang terikat pada sel dan dengan interaksi sel-sel diantara sel dendritik dan limfosit dalam *lymph node*. Interaksi ini sangat penting karena respon *adaptive* tidak dapat terjadi tanpa adanya *innate immune system* (Stanford, 2007).

Sel-sel yang termasuk dalam sistem imun *adaptive* adalah limfosit B dan T. Sel B diproduksi pada sumsum tulang yang menghasilkan antibodi. Sel T mengalami pematangan pada timus dan berdiferensiasi pada sel-sel yang terkait dalam pematangan limfosit atau terkait dalam pembunuhan virus yang menginfeksi sel-sel. Sel mediasi imunitas berperan dalam aktivasi makrofag dan *NK cells* (menghancurkan patogen), limfosit T sitotoksik (melisiskan antigen), dan mengeluarkan sitokin (berpengaruh pada fungsi sel lain). Sel T juga berperan dalam pengenalan dan membunuh sel-sel yang menginfeksi Baik humoral maupun sel mediasi sangat penting untuk pertahanan terhadap virus dan antigen lainnya. Antibodi umumnya mengikat virus dan bakteri dalam darah dan bagian permukaan mukosa sehingga mencegah penyebaran infeksi. (Stanford, 2007).

2.5 Interleukin-2 (IL-2)

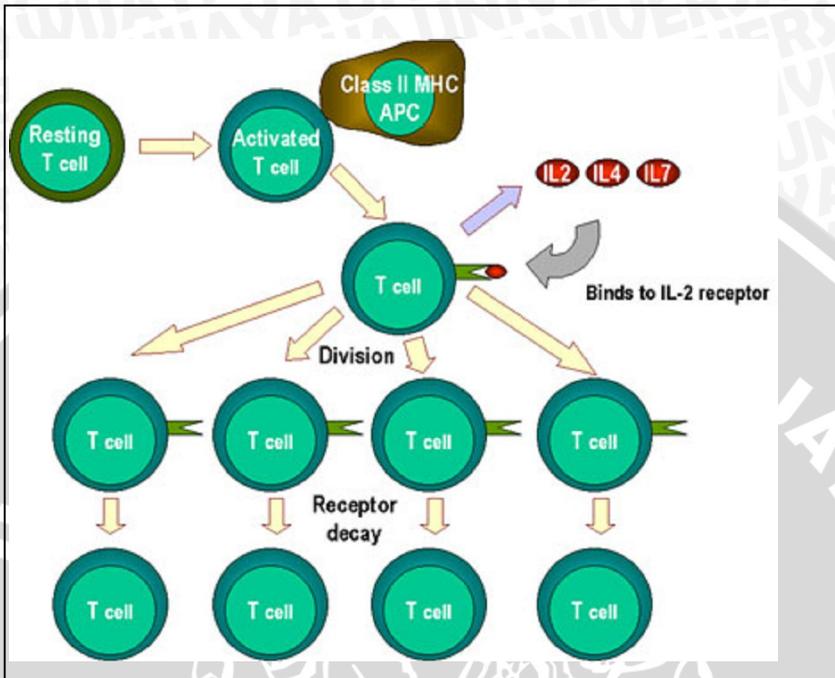
Sitokin adalah kelompok besar molekul yang terkait dalam sinyal penghubung antar sel selama respon imun. Semua sitokin adalah protein (Roiit *et al.*, 2001). Menurut Cruse dan Robert (1999) sitokin adalah protein sistem imun yang memiliki sifat sebagai respon biologi. Sitokin mengkoordinasi interaksi sistem imun antibodi dengan sel T dan memperkuat aktivitas imun. Sitokin dapat dibedakan menjadi beberapa kelompok, diantaranya monokin dan limfokin. Monokin adalah sitokin yang dihasilkan oleh monosit, yang meliputi interleukin-1, *tumor necrosis factor* (TNF), interferon α dan

β , serta *colony stimulating factors*. Limfokin adalah sitokin yang dihasilkan oleh aktivasi limfosit dan *Natural Killer Cells*, meliputi interleukin-2 dan 6, interferon- γ , *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) dan *lymphotoxin*. Sitokin tidak hanya menekan secara spesifik pada satu tipe sel target, akan tetapi banyak sitokin yang memiliki pengaruh biologi lebih dari satu sel target (Cruse dan Robert, 1999).



Gambar 2.3. Peran interleukin 2 dalam sistem imun tubuh (Mayer, 2007)

IL-2 merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel limfosit T terutama sel $CD4^+$. IL-2 juga memfasilitasi pembentukan sitokin lainnya yang dihasilkan oleh limfosit T, meliputi interferon- γ dan limfotoksin. Interaksi IL-2 dengan limfosit T terjadi melalui reaksi dengan reseptor IL-2. IL-2 juga berperan dalam memicu pertumbuhan *NK cells* dan potensi sitolitik *NK cell*, faktor pertumbuhan sel B pada manusia dan dapat meningkatkan sintesis antibodi (Gambar 2.3). Sitokin ini juga berperan dalam meningkatkan proliferasi sel T (Gambar 2.4) (Cruse dan Robert, 1999). Menurut Dutcher (2003), IL-2 adalah salah satu sitokin yang berperan sebagai regulator dari sistem imun tubuh. Aktivitas IL-2 dapat diukur dengan menggunakan serum mencit dengan *bioassay*.



Gambar 2.4. Stimulasi proliferasi sel T oleh interleukin 2 (Mayer, 2007)

2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah pengujian imun yang menggunakan ikatan enzim pada antibodi yang spesifik untuk antigen dan mendeteksi baik antibodi atau antigen. Metode ini merupakan teknik lapisan ganda yang menggunakan enzim sebagai label. Uji ELISA dibaca dengan melakukan inkubasi reaktan menggunakan sebuah substrat yang cocok untuk menghasilkan warna yang selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer (Cruse and Robert, 1999).

Metode ELISA dapat diklasifikasikan dalam beberapa tipe, yaitu ELISA langsung, tak langsung, ELISA *sandwich* (langsung dan tak langsung). Metode ELISA yang banyak digunakan adalah secara langsung dan tak langsung. ELISA secara langsung dilakukan dengan penambahan antibodi primer yang berkonjugasi dengan enzim, sedangkan untuk metode tidak langsung dilakukan dengan

penambahan antibodi primer dan sekunder. Antibodi sekunder yang ditambahkan berkonjugasi dengan enzim (Kanwar and Madan, 2000).

Metode ELISA dapat digunakan untuk mengetahui dan mendeteksi virus, bakteri, fungi, dan mikoplasma dengan mendeteksi keberadaan permukaan antigen yang tampak pada permukaan mikroba atau secara tidak langsung menentukan keberadaan patogen atau antigen spesifik antibodi dalam serum atau cairan tubuh lainnya. ELISA merupakan salah satu metode yang juga telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan jenis-jenis hormon seperti progesteron, FSH, LH, insulin, glikagon, tiroxin, dan prolaktin. Metode ini juga digunakan untuk mendeteksi keberadaan tingkat sitokin yang meliputi interleukin dan interferon (Kanwar and Madan, 2000).

2.7 Flow cytometry

Flow cytometry adalah salah satu cara analisis yang dibutuhkan untuk diagnosis dan mengamati sel, misalnya diagnosis leukimia dan mengamati sel-sel limfosit. Selain itu, *flow cytometry* juga dapat digunakan untuk menghitung dan menyortir sel. Analisis menggunakan *flow cytometry* juga dapat digunakan untuk analisis multiparameter secara bersama-sama terhadap karakteristik sel secara kimia maupun fisika. Secara umum aplikasi analisis ini dalam bidang kesehatan digunakan untuk mendeteksi *lymphomas* dalam menentukan subpopulasi sel T CD4⁺ dan limfosit T helper pada kasus AIDS (School of medicine, 2006).

Flow cytometry menggunakan prinsip menyebarkan cahaya, eksitasi cahaya, dan pemancaran molekul fluorokrom untuk menghasilkan multiparameter data yang spesifik dari partikel dan sel yang memiliki rentan ukuran diameter antara 0.5 – 40 μm . Secara hidrodinamika, sel-sel difokuskan dalam sebuah tabung yang berisi PBS sebelum ditangkap oleh sumber cahaya. Laser merupakan sumber cahaya yang sering digunakan sebagai sumber cahaya pada *flow cytometry*. *Flow cytometry* juga menggunakan prinsip pemfokusan hidrodinamika untuk mempresentasikan sel ke sumber cahaya (laser). Sampel akan dimasukkan hingga pada pusat sebuah aliran. Sel akan masuk dalam sebuah tabung yang dikombinasikan dengan aliran. Sel-sel akan mengalir satu persatu hingga pada pusat aliran. Pada tahap ini sel akan tersinari oleh laser satu-persatu (School of medicine, 2006).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Nopember 2008-Nopember 2009. Penelitian tersebut bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Mikrobiologi, dan Biologi molekuler, Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dua faktorial (*Splenectomy* dan injeksi *Salmonella typhi*), dan tiga ulangan. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* BALB/c) betina, umur 12 minggu dengan empat perlakuan (Tabel 3.1).

Tabel 3.1. Kelompok perlakuan

<i>Non Splenectomy</i>	Non Injeksi <i>S. typhi</i> (Kontrol)
	Injeksi <i>S. typhi</i> (Injeksi <i>S. typhi</i>)
<i>Splenectomy</i>	Non Injeksi <i>S. typhi</i> (<i>splenectomy</i>)
	Injeksi <i>S. typhi</i> (<i>splenectomy</i> -injeksi <i>S. typhi</i>)

Penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 18.

3.2.2 *Splenectomy* mencit (*Mus musculus* BALB/c)

Mencit (*Mus musculus* BALB/c) umur 12 minggu ditimbang sebelum dilakukan *splenectomy*. Bagian sebelah kiri abdomen mencit (bagian yang akan dibedah), dibersihkan dengan alkohol 70% dan dilakukan premedikasi dengan atrophin sulfat (atrophin sulfat 0,04 mg/kg). Sepuluh menit kemudian, mencit diinjeksi dengan xylazin (12 mg/kg berat badan) dan dilanjutkan dengan injeksi agen anaesthesi (Ketamin 60 mg/kg), 10 menit setelah injeksi xylazin. Rambut mencit kemudian dicukur dan dibedah pada bagian

hipokondrium kiri atas mencit ($\pm 1-2$ cm) secara perlahan ketika mencit berada di bawah pengaruh anaestesi. Organ limpa kemudian diambil dengan menggunakan gunting bedah tumpul dan bagian pembuluh darah diikat dengan *silk suture*. Setelah pengangkatan limpa selesai dilakukan, maka bagian tubuh mencit yang dibedah dijahit pada bagian dalam dan luar kulit menggunakan benang *cat gut*. Antiseptik diteteskan pada luka jahitan untuk mencegah terjadinya infeksi. Mencit *splenectomy* diletakkan pada *pathogen free chamber* hingga normal (sadar), suhu *pathogen free chamber* dijaga $\pm 27-30^{\circ}\text{C}$. *Splenectomy* tersebut dilakukan berdasarkan metode *Splenectomy* yang telah dilakukan oleh Kuranaga, *et al.* (2004), yaitu *splenectomy* dilakukan pada keadaan aseptis dan menggunakan agen anaestesi. Panjang bagian pembedahan secara lateral ± 1 cm. Mencit dapat digunakan untuk perlakuan selanjutnya setelah 2 minggu pasca *splenectomy*. Mencit dipelihara dalam *pathogen free chamber* hingga seluruh perlakuan berakhir.

3.2.3 Persiapan dan Paparan *Salmonella typhi* melalui Injeksi Intraperitoneal

Isolat *S. typhi* yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri yang diperoleh diremajakan pada media *Nutrient Agar Slant* (NA). Kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan menumbuhkan isolat dari NA miring dalam *Salmonella-Shigella medium* (SS) agar dan media *Klinger Iron Agar* (KIA) dan *Lysine Indole Agar* (LIA), uji pewarnaan Gram, dan uji katalase. Setelah diperoleh bakteri *S. typhi* yang murni maka dilanjutkan dengan persiapan bakteri untuk injeksi merujuk metode yang telah dilakukan oleh Debra, *et al.* (1998). Menurut Debra, *et al.* (1998), Isolat *S. typhi* yang telah diremajakan selanjutnya diinokulasi ke dalam media Luria Bertani cair (*LB Broth*) selama 24 jam pada suhu 37°C serta agitasi 120 rpm. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer ($\lambda=600$ nm). Bakteri diambil pada saat fase infeksi atau tengah fase log dengan $A_{600} = 0,35-0,5$. Penghitungan konsentrasi bakteri dilakukan dengan menggunakan hemositometer.

Pengenceran sel bakteri selanjutnya dilakukan dalam PBS (0,1 ml + 0,9 ml PBS). Sebanyak 1 ml isolat (berisi bakteri 10^9 sel) hasil pengenceran tersebut di sentrifugasi 13000 rpm, 5 menit, 4°C . Pelet hasil sentrifugasi kemudian diresuspensi dengan 100 μl PBS dan

selanjutnya dilakukan injeksi ke tubuh mencit secara intraperitoneal. Bakteri yang diinjeksikan sebanyak 10^9 sel/ml yang merupakan dosis akut. Injeksi *Salmonella* dosis akut 10^8 - 10^{10} sel/ml mengakibatkan peningkatan ekspansi sel pada jaringan (Srinivasan *et al.*, 2004). Injeksi dilakukan dua minggu setelah *splenectomy* dan dilakukan injeksi ulang bakteri (*booster*) dua minggu setelah injeksi bakteri yang pertama. Mencit dipelihara dalam *pathogen free chamber*. Menurut Srinivasan, *et al.* (2004) untuk membuat mencit terinfeksi *Salmonella* dapat dilakukan dengan menginjeksikan bakteri yang telah dikultur ke tubuh mencit secara oral, intravena, atau intraperitoneal. Mempelajari respon imun untuk infeksi *Salmonella*, biasanya digunakan dosis penelitian yang lebih tinggi.

3.2.4 Analisis Hematologi Mencit Perlakuan

Uji hematologi dilakukan untuk mengetahui komponen darah termasuk serum, eritrosit, trombosit dan komponen darah perifer lainnya. Uji ini dilakukan satu minggu setelah *splenectomy* dan satu minggu setelah *booster* antigen. Uji hematologi pasca *splenectomy* dilakukan dengan pengambilan sampel darah dari bagian ujung ekor mencit yang dipotong, sedangkan pada akhir perlakuan sampel darah diambil dari bagian jantung dan ditampung dalam tabung hematokrit (tabung polipropilen) yang telah ditambah antikoagulan 5 ml (EDTA 0,2 M). Penghitungan rasio sel darah dilakukan dengan menggunakan Sysmex KX-21 di Poliklinik Universitas Brawijaya.

3.2.5 Isolasi Bakteri *Salmonella typhi* dari Darah Mencit

Sampel darah mencit diambil pada saat satu minggu setelah injeksi dan satu minggu setelah *booster* melalui ujung ekor mencit. Sebanyak 50 μ l darah diambil dan dilarutkan dengan 450 μ l garam fisiologis. Darah yang telah dilarutkan dalam garam fisiologis diambil 0,5 ml dan diinokulasikan ke dalam 4,5 ml media *LB broth*. Sampel tersebut selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada *waterbath* dengan agitasi 120 rpm dan suhu diatur 37°C. Sebanyak 0,1 ml suspensi diinokulasikan ke dalam cawan petri. Selanjutnya dilakukan metode cawan tuang (*pour plate*) media *Salmonella-Shigella* (SS) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Koloni bakteri yang tumbuh diamati dan selanjutnya dilakukan uji katalase serta ditumbuhkan pada media *Bismuth Sulphite Agar* (BSA)

untuk konfirmasi bakteri *S. typhi*. Koloni *S. typhi* akan ditunjukkan dengan warna koloni bakteri hitam (*black jet*).

3.2.6 Dislokasi Leher Mencit BALB/c

Mencit BALB/c dibunuh seminggu setelah *booster S. typhi* dengan cara dislokasi leher tanpa penambahan bahan kimia seperti kloroform, sehingga bahan kimia tidak mempengaruhi hasil uji selanjutnya. Mencit yang telah didislokasi leher, selanjutnya dibedah untuk pengambilan darah pada jantung, pengambilan *mesenteric lymph node* dan organ usus halus mencit.

3.2.7 Isolasi Serum dari Mencit Perlakuan

Isolasi serum dilakukan satu minggu setelah injeksi bakteri yang pertama, hari ke-3 dan satu minggu setelah *booster*. Pengambilan darah satu minggu setelah injeksi bakteri awal dan hari ke-3 setelah *booster* dilakukan melalui ekor mencit (*vena caudalis*), sedangkan pengambilan darah satu minggu setelah *booster* dilakukan melalui jantung mencit. Darah yang diambil melalui ekor dilakukan dengan memotong bagian ujung ekor mencit. Tetesan darah pertama dibuang untuk menghindari kontaminasi dan selanjutnya darah yang keluar dari ujung ekor sedikit demi sedikit ditampung dalam *tube* dan diposisikan miring. Darah yang diambil dari jantung mencit dilakukan secara hati-hati dengan menggunakan *sprit* 3 ml untuk kemudian dipindah kedalam *tube* dan diposisikan miring. Selanjutnya darah diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit hingga terbentuk dua lapisan. Darah tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3250 rpm selama 30 menit 4°C dan supernatan yang terbentuk (serum) dipindahkan ke dalam *tube* baru. Serum tersebut disimpan pada suhu -20 °C untuk perlakuan selanjutnya.

3.2.8 Pengukuran Kadar IL-2 dengan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Pengukuran kadar IL-2 dilakukan dengan menggunakan metode *indirect ELISA*. *Indirect ELISA* diawali dengan pembuatan kurva standar interleukin 2 dan dilanjutkan dengan *Coating* serum. Kurva standar IL-2 dihasilkan dengan melakukan pengenceran berseri protein standar IL- 2 (200 ng/ml). Hasil pengenceran yang diperoleh dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran untuk kurva standar (200 µl/well). *Coating* serum dilakukan dengan penambahan serum

dan *coating buffer* dengan perbandingan volume 1:1 (50 μ l/*well*). Dilakukan inkubasi pada suhu 4°C semalam. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS-Tween (200 μ l/*well*), masing-masing 3 x 3 menit. Selanjutnya diblok dengan BSA 1% dalam PBS (50 μ l/*well*) dan dilanjutkan dengan inkubasi 1 jam pada suhu ruang. Dilakukan pencucian kembali dengan PBS-Tween (200 μ l/*well*), masing-masing 3 x 3 menit. Ditambahkan antibodi primer (Rabbit anti Mouse IL-2) (Santa Cruz Biotechnology) dalam BSA 1% (1: 500) (50 μ l/*well*) dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Kemudian dicuci dengan PBS-Tween (200 μ l/*well*), masing-masing sebanyak 3 x 3 menit. Ditambahkan antibodi sekunder (Goat anti Rabbit IgG AP conjugated) (Santa Cruz Biotechnology) dalam TBS dengan perbandingan 1:1000 (50 μ l/*well*). Kemudian dilakukan inkubasi dalam suhu ruang selama 1 jam. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS-Tween (200 μ l/*well*), masing-masing sebanyak 3 x 3 menit. Masing-masing *well* selanjutnya ditambahkan substrat *para-Nitro Phenylphosphatase* (pNPP) dalam dietanolamin 10% (50 μ l/*well*), diinkubasi 30 menit suhu ruang. Dilakukan penambahan NaOH 3 M (50 μ l/*well*) sebagai *stop reaction* dan diinkubasi selama 10 menit. Setelah 10 menit, warna yang terbentuk dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang (λ) 405 nm.

3.2.9 Perhitungan Jumlah Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dengan Flow cytometry

Analisis jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dengan *flow cytometry* menggunakan organ *mesenteric lymph node* yang segar. Organ *mesenteric lymph node* diambil dan digerus dengan bagian pangkal *sprit* dengan ditambah PBS 1 ml. Hasil gerusan, kemudian di saring menggunakan *millipore* (diameter 100 μ m). Homogenat *mesenteric lymph node* dipindahkan ke dalam *tube* dan disentrifugasi 3200 rpm, 4°C selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet hasil sentrifugasi diresuspensi dengan 1 ml PBS steril dan dihomogenkan. Homogenat selanjutnya diambil sebanyak 100 μ l dan diletakkan ke dalam *tube* steril yang telah dilapisi dengan *aluminium foil*. Homogenat selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3200 rpm, 4°C selama 2 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang dan pelet ditambahkan antibodi *anti mouse CD4⁺ FITC conjugated* dan *anti mouse CD8⁺ PE conjugated* (1:500) (BD Bioscience, Pharmingen, USA), diinkubasi selama 15 menit. Pelet yang telah ditambah

antibodi kemudian ditambahkan 1 ml PBS steril dan dimasukkan ke dalam tabung sampel mesin *flow cytometry* (flow cytometry BD Xcalibur). Program mesin *flow cytometry*, kemudian diatur sesuai parameter yang ingin dianalisis, meliputi banyaknya jumlah sel, label antibodi yang digunakan, dan nama sampel. Jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang dihitung selanjutnya dianalisis menggunakan *software* BD Cell.

3.2.10 Pengamatan Histopatologi Organ Usus Halus Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin

Organ usus halus difiksasi dengan 4% paraformaldehid selama 1 minggu pada suhu ruang. Organ usus halus selanjutnya dicuci dengan PBS selama 15 menit. Organ tersebut kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70 % (24 jam), 80%, 90%, 95% (@ 30 menit), dan 100%, 3x30 menit. Dilanjutkan dengan *clearing* organ menggunakan xilol (2x30 menit). Tahap selanjutnya adalah infiltrasi organ dimasukkan ke dalam xilol : paraffin (1:1) selama 30 menit. Organ kemudian dimasukkan kedalam parafin murni (56⁰C) selama 15 menit. Kemudian dilakukan *embedding* menggunakan parafin yang dituang dalam kotak *embedding* ukuran 3x1,5x1cm³. Organ dibiarkan selama 24 jam hingga paraffin mengeras kemudian blok paraffin yang terbentuk ditempelkan pada balok kayu (*holder*) dan disimpan pada lemari es 4⁰C. Selanjutnya dilakukan pemotongan blok paraffin yang berisi organ usus halus (*sliding*) menggunakan mikrotom putar dengan ketebalan 5 µm. Hasil *sliding* diletakkan pada kaca obyekt (*affixing*) yang telah diolesi *meyerhoff* albumin dan ditetesi ethanol 10%, kemudian direntangkan diatas *hot plate* sampai merenggang. Setelah merenggang, sisa ethanol diserap dengan *tissue* dan diinkubasi 24 jam pada oven suhu 37⁰C.

Gelas objek yang berisi potongan organ dideparafinasi dalam xilol dan rehidrasi dalam ethanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 30%, @ 5 menit) dan selanjutnya dicuci dengan aquadest selama 5 menit. Gelas objek diwarnai dengan hematoxilin selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan kemudian diwarnai dengan eosin selama 5 menit. Gelas objek kemudian dicuci dengan air mengalir 5 menit dan didehidrasi dalam ethanol bertingkat (80%, 90%, 95% dan 100% selama 2 x 5 menit). Kemudian dilanjutkan *clearing* dalam xilol 3 x 5 menit dan *mounting* dengan entelan dilakukan sebelum gelas objek ditutup dengan gelas

penutup. Preparat yang telah jadi selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop binokuler (OLYMPUS).

3.2.11 Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi parameter kualitatif dan kuantitatif. Parameter kualitatif meliputi penetrasi *Salmonella typhi* pada usus halus dengan pewarnaan Hematoxilen-Eosin. Sedangkan parameter kuantitatif meliputi kadar IL-2 di dalam serum, persentase CD4⁺ dan CD8⁺ serta jumlah komponen sel darah. Kadar IL-2 di ukur dengan membaca hasil ELISA menggunakan *ELISA reader* panjang gelombang 405 nm. Persentase sel T CD4⁺ dan CD8⁺ dihitung menggunakan *flow cytometry*, sedangkan komponen sel darah dihitung dengan menggunakan Sysmex KX-21.

3.2.12 Analisis Data

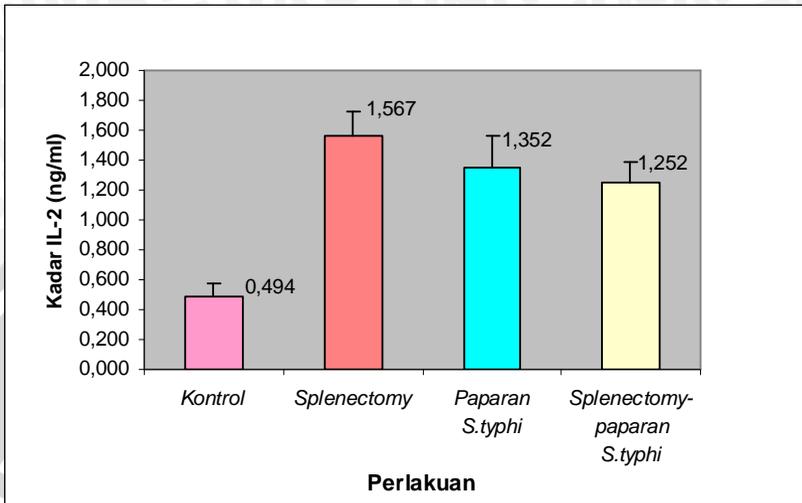
Analisis data yang diperoleh dilakukan secara statistik dengan analisis ragam *Analysis of Variance* (ANOVA). Hasil yang berbeda nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji *Tukey* ($\alpha=0,05$) melalui *software* program *SPSS for Windows Release* versi 13.0. Data hasil analisis diinterpretasikan secara kuantitatif deskriptif.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kadar Interleukin 2 (IL-2) dengan Metode ELISA

Interleukin 2 adalah salah satu sitokin yang berperan dalam sistem imun tubuh untuk menangani antigen dalam tubuh. Pengukuran kadar IL-2 bertujuan untuk mengetahui respon imun tubuh akibat pengaruh *splenectomy* dan paparan *S. typhi* terhadap IL-2 khususnya sebagai sitokin antiviral dan antibakterial. Pengukuran kadar IL-2 dilakukan dengan pengambilan sampel serum dari darah mencit tiga hari setelah *booster*. Hasil pengukuran kadar IL-2 pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar IL-2 yang signifikan ($P < 0,05$) antar perlakuan. Hasil data tersebut juga menunjukkan bahwa perlakuan *splenectomy*, paparan *S. typhi*, dan *splenectomy*-paparan *S. typhi* berpengaruh secara signifikan ($p < 0,05$) terhadap peningkatan kadar IL-2 pada mencit perlakuan (Lampiran 16) dan perlakuan *splenectomy* mempunyai kadar IL-2 tertinggi.

Perbandingan kadar IL-2 pada semua serum mencit perlakuan ditunjukkan pada Gambar 4.1. Gambar tersebut menunjukkan bahwa kadar IL-2 pada masing-masing perlakuan bervariasi dengan kadar tertinggi secara berurutan pada kelompok mencit perlakuan *splenectomy* (1,567 ng/ml), paparan *S. typhi* (1,352 ng/ml), *splenectomy*-paparan *S. typhi* (1,252 ng/ml), dan kontrol (0,494 ng/ml). Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa IL-2 berperan penting dalam merespon adanya bakteri yang masuk dalam tubuh serta hilangnya organ limfoid sekunder yang penting dalam sistem imunitas tubuh. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Cao, *et al.* (2003), diketahui bahwa terjadi peningkatan kadar sitokin Th1 limfosit yang signifikan ($p < 0,05$) pada darah perifer, seperti IL-2 dan IFN- γ dan peningkatan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ setelah *splenectomy*. Interleukin 2 dan IFN- γ berperan penting dalam aktivasi makrofag dan meningkatkan fagositosis serta membantu menstimuli produksi sitokin lain yang terkait dalam mengatasi infeksi bakteri *E.coli* pada usus halus mencit *splenectomy* (Ikuta *et al.*, 2004). Menurut Wijayanti (2003) imunitas seluler terhadap infeksi bakteri melibatkan peran sel Th1 yang mensekresi IL-2 dan IFN- γ . Aktivitas sitokin-sitokin tersebut akan meningkat seiring dengan tingginya tingkat infeksi oleh bakteri.



Gambar 4.1 Perbandingan rata-rata kadar IL-2 pada masing-masing perlakuan ($P < 0,05$)

Peningkatan kadar IL-2 pada ketiga perlakuan terhadap kontrol dapat disebabkan adanya upaya pertahanan dari sistem imun tubuh untuk mengatasi ketiadaan limpa serta adanya penetrasi bakteri yang meningkat dalam tubuh. Kadar IL-2 yang meningkat juga dapat dipicu adanya produksi IL-2 tersebut oleh seluruh sel T khususnya sel T CD4⁺ yang berada pada organ-organ limfoid lainnya sebagai upaya kompensasi sistem imun tubuh. Interleukin 2 merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel T khusus (CD4⁺) setelah aktivasi oleh antigen (Lelchuk *et al.*, 2006).

Kadar IL-2 pada perlakuan *splenectomy* memiliki rata-rata kadar tertinggi dibandingkan perlakuan paparan *S. typhi*, dan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan *splenectomy* berpengaruh dalam meningkatkan IL-2 sebagai respon imun tubuh akibat ketiadaan organ limpa. Beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa *splenectomy* dapat meningkatkan kerentanan pasien terhadap infeksi bakteri pasca *splenectomy* (Ikuta *et al.*, 2004). Oleh karena itu, peningkatan kadar IL-2 pada mencit yang mengalami *splenectomy* dipengaruhi oleh respon imunitas tubuh sebagai upaya menjaga homeostasis tubuh terhadap ancaman infeksi bakteri setelah *splenectomy*.

Kadar IL-2 yang lebih rendah pada perlakuan *splenectomy*-injeksi *S. typhi* dibandingkan perlakuan *splenectomy* dapat dipengaruhi oleh banyaknya sitokin dan komponen imunitas tubuh lainnya selain IL-2 yang berperan dalam mengatasi ketiadaan limpa dan penetrasi bakteri pada usus halus mencit perlakuan paparan *S. typhi* dan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Oleh karena itu, tidak hanya IL-2 yang banyak diproduksi tetapi dimungkinkan terdapat sitokin lainnya seperti IL-4, interferon- γ (IFN- γ), dan sel-sel imunitas lainnya yang berperan di dalamnya, sehingga pada perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi* dan paparan *S. typhi* kadar IL-2 lebih rendah daripada perlakuan *splenectomy* walaupun tidak signifikan.

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Albab (2009) menggunakan perlakuan yang sama, menunjukkan adanya peningkatan kadar IL-4 pada serum mencit perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Selain hal tersebut, penetrasi bakteri *Salmonella* pada saluran pencernaan mamalia diketahui dapat memicu produksi sitokin pro-inflamasi, seperti IL-6, IL-1, *chemokine*, seperti IL-8, dan T helper tipe 1 (Th1), seperti IL-2 dan IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-15, dan IL-18 (Eckmann and Kagnoff, 2001; Coburn *et al.*, 2007). Sel Th1 sebagian besar berperan dalam memperantarai imunitas seluler melawan bakteri dan virus intraseluler, dengan cara meningkatkan mekanisme fagositosis ketika terjadi inflamasi (Romagnani, 2000; Rodri'guez-Sa'inz *et al.*, 2002; Corthay, 2006). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Wijayanti (2003), diketahui bahwa ada peningkatan kadar IL-2 dan IFN- γ pada serum dan supernatan limfosit limpa pada mencit yang diimunisasi bakteri. IL-2 adalah sitokin yang memiliki pengaruh yang luas pada sistem imun dan memiliki peran penting dalam mengatur respon imun (menstimuli produksi sitokin, *NK cell*, dan aktivasi makrofag) dan homeostasis tubuh (Gaffen dan Liu, 2004).

Data hasil penelitian tersebut juga dapat menjelaskan bahwa terdapat mekanisme kompensasi sistem imun tubuh pada organ lain untuk tetap mempertahankan kesetimbangan imunitas tubuh akibat hilangnya organ penting sistem imun (limpa). Hal tersebut dapat diketahui berdasarkan peningkatan kadar IL-2 pada mencit *splenectomy* dan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Data tersebut dapat menunjukkan bahwa terdapat suatu sistem pertahanan tubuh untuk mencegah dan menghadapi infeksi bakteri yang masuk ke dalam tubuh pasca *splenectomy*. Menurut Mrusek, *et al.* (2005) limpa adalah

salah satu organ limfoid sekunder yang penting dalam imunitas tubuh, tetapi *lymph node*, *payer's patch*, *mesenteric lymph node*, dan tonsil juga merupakan organ limfoid sekunder yang berperan penting dalam sistem imun tubuh dalam melawan antigen. Selain organ limfoid, organ lain seperti hepar juga berperan dalam meningkatkan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri. Pertahanan tubuh terhadap serangan bakteri dan virus tidak hanya direspon dengan adanya sitokin-sitokin dan *chemokine*, tetapi masih terdapat *antiviral memory CD8⁺ T cell* yang juga berperan dalam membantu menghadapi serangan bakteri dan virus. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Mrusek, *et al.* (2005) dapat diketahui bahwa pada mencit *splenectomy* yang terinfeksi virus juga banyak ditemukan *antiviral memory CD8⁺ T cell* pada organ lain seperti sumsum tulang, *lymph node*, paru, dan hepar yang menunjukkan adanya upaya sistem imunitas tubuh untuk mempertahankan homeostasis tubuh.

Higashijima, *et al.* (2008) menjelaskan bahwa limpa adalah organ limfoid dengan ukuran besar yang menghasilkan berbagai jenis sitokin. Sitokin yang dihasilkan oleh limpa tersebut akan menyebar ke hepar melalui *splenic* dan vena portal yang akhirnya meningkatkan sitotoksitas *NK cells* di dalam hepar. Hal tersebut yang memungkinkan hepar merupakan organ yang berperan dalam kompensasi sistem imun tubuh ketika terjadi *splenectomy*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Higashijima, *et al.* (2008) menunjukkan adanya peningkatan fungsi makrofag pada perlakuan *splenectomy* yang dipapar bakteri. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa penyuntikan bakteri secara intravena pada mencit *splenectomy* mampu meningkatkan fagositosis sel Kupffer pada hepar dan menurunkan translokasi bakteri pada mencit perlakuan *splenectomy* dengan mengatur respon sel Kupffer untuk endotoksin bakteri.

Splenectomy pada mencit memungkinkan akan menyebabkan sel-sel yang berperan dalam sistem imun yang berada di dalam limpa beralih fungsi pada bagian hepar. Hepar merupakan organ yang memiliki peranan penting sebagai sistem pertahanan awal ketika terjadi serangan antigen dan dimungkinkan juga berperan sebagai *cellular backup system* sebelum bakteri melakukan translokasi. Translokasi yang diakibatkan adanya penetrasi bakteri pada bagian usus hingga pada bagian sistem sirkulasi pada mencit *splenectomy*. Di dalam hepar mencit normal, terdapat sekitar 70-80% *macrophage*

lineage cells sebagai sel Kupffer serta terdapat IFN- γ dan *NK cells* dalam jumlah besar. Hal ini mengindikasikan bahwa hepar memiliki kemampuan yang berperan dalam pertahanan akibat serangan berbagai bakteri dan virus. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa proses pemulihan akibat infeksi bakteri di dalam tubuh mencit *splenectomy* akan dilakukan oleh hepar sebagai organ kompensasi akibat ketiadaan limpa (Higashijima *et al.*, 2008).

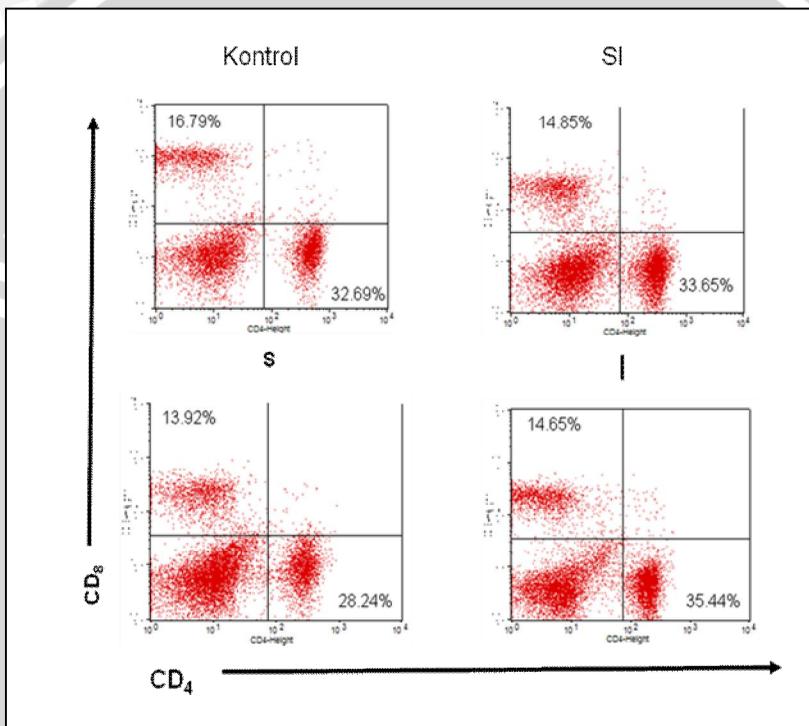
Ikuta, *et al.* (2004) juga menyatakan bahwa *splenectomy* tidak mengurangi pertahanan tubuh terhadap serangan bakteri. Proses pertahanan, perbaikan atau pemulihan tubuh akan dilakukan dengan adanya kompensasi sistem imun pada organ lain, seperti hepar. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ikuta, *et al.* (2004), dapat diketahui bahwa terjadi peningkatan ketahanan tubuh mencit *splenectomy* yang telah dipapar bakteri *E. coli*. Gangguan pada saluran pencernaan mencit *splenectomy* akibat dari injeksi *E. coli* secara signifikan juga mengalami penurunan. Selain itu, terdapat pengaruh positif terhadap fungsi makrofag dalam hepar pada mencit *splenectomy*. Berdasarkan hal tersebut dapat menunjukkan bahwa terdapat organ lain dalam tubuh yang berperan dalam pertahanan dari serangan bakteri atau virus ketika salah satu organ imfoid sekunder tidak ada.

4.2 Analisis Jumlah Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ Menggunakan Flow cytometry

Jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang dianalisis pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imunitas tubuh akibat adanya penetrasi bakteri *S. typhi* dan untuk mengetahui hubungan antara produksi sitokin IL-2 dengan keberadaan jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada tubuh mencit perlakuan khususnya pada organ *mesenteric lymph node*. Hal ini berkaitan dengan beberapa pernyataan yang menyebutkan bahwa sel T memiliki kemampuan sebagai faktor pertumbuhan IL-2 (*T-cell growth factor IL-2*) (Villegas *et al.*, 2002). Hasil perhitungan persentase jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ *mesenteric lymph node* menggunakan *flow cytometry* menunjukkan adanya perubahan jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada semua perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol, meskipun tidak signifikan ($p > 0,05$) (Lampiran 10).

Persentase jumlah relatif sel T CD4⁺ pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4.2. Jumlah relatif sel T CD4⁺

pada mencit kontrol sebanyak 32,65% dan ketika terdapat perlakuan *splenectomy* terjadi penurunan jumlah relatif sel T CD4⁺ sebesar 28,24% (4,41%). Mencit paparan *S. typhi* dan *splenectomy*-paparan *S. typhi* menunjukkan adanya peningkatan jumlah relatif sel T CD4⁺, mencit paparan *S. typhi* sebesar 35,44% (2,75%), sedangkan pada mencit *splenectomy*-paparan *S. typhi* terjadi peningkatan jumlah relatif sel T CD4⁺ sebesar 33,65% (1 %).



Gambar 4.2 Persentase rata-rata jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada masing-masing *mesenteric lymph node* mencit perlakuan dari hasil *flow cytometry* (SI = *splenectomy*-paparan *S. typhi*, S = *splenectomy*- tanpa paparan *S. typhi*, I = Tanpa *splenectomy*-paparan *S. typhi*)

Jumlah relatif sel T CD8⁺ pada masing-masing perlakuan juga dapat diketahui pada gambar 4.2. Hasil analisis tersebut menunjukkan adanya penurunan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol walaupun tidak signifikan ($p > 0,05$) (Lampiran 17). Jumlah relatif sel T CD8⁺ pada mencit kontrol

sebesar 16,79%. Selanjutnya terjadi penurunan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada perlakuan *splenectomy* sebesar 2,87% (13,92%), perlakuan paparan *S. typhi* sebesar 2,14% (14,65%), dan pada perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi* terjadi penurunan jumlah relatif sel T CD8⁺ sebesar 1,94% (14,85%).

Perubahan jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ yang tidak signifikan ($P>0,05$) pada masing-masing perlakuan (Lampiran 17) menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan pada masing-masing mencit perlakuan tidak berpengaruh terhadap jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ *mesenteric lymph node*. Hal ini dapat dikarenakan usus halus masih mampu mengatasi adanya serangan bakteri yang masuk dengan persediaan sel-sel imunitas yang terdapat dibagian usus dan *payer's patch*. Meskipun telah diketahui bahwa terjadi migrasi sel-sel imunitas tubuh menuju organ yang mengalami infeksi, akan tetapi hal tersebut akan terjadi bila sel-sel imunitas yang terdapat di dalam organ yang mengalami infeksi tidak mampu mengatasi infeksi yang terjadi.

Menurut Manzano, *et al.* (2002) fungsi utama dari usus halus adalah menyerap nutrisi makanan. Selama penyerapan tersebut, usus halus berhadapan dengan berbagai jenis antigen yang berasal dari makanan, bakteri yang secara alami berada pada usus, dan serangan mikroorganisme lainnya. Hal tersebut membutuhkan tenaga yang cukup besar dan sistem pertahanan yang selektif. Pada usus halus, terdapat tiga populasi limfosit utama yaitu dibagian epitelium usus, lamina propria dan *payer's patch* yang berperan sebagai pertahanan penting ketika terjadi serangan bakteri pada bagian usus halus. Limfosit intraepitelial adalah sel-sel yang berada di atas membran dasar epitel diantara sel-sel epitelial kolumnar mukosa (*microfold cell* atau *M cells*). Bagian tersebut, terdapat sekitar 90% jumlah sel T CD8⁺ pada mencit dan sekitar 50-80% pada manusia yang memiliki fungsi dasar sebagai sel sitotoksik. Sedangkan pada bagian lamina propria umumnya terdapat sel T CD4⁺ sekitar 60-70%. Pada lamina propria juga terdapat kurang lebih 20-40% tipe sel yang merupakan diferensiasi dari sel B yang tinggi pada saat tahap perkembangan sel plasma. Selain hal tersebut, juga terdapat limfosit *payer's patch* yang memiliki peranan penting dalam menginduksi respon imun pada usus. *Payer's patch* memiliki peran utama yaitu bekerja sama dalam diferensiasi sel B untuk menghasilkan antibodi (IgA) yang dibantu oleh sel T CD4⁺ yang mensekresi sitokin.

Perlakuan *splenectomy*, paparan *S. typhi*, *splenectomy*-paparan *S. typhi* yang diberikan pada mencit dapat mengakibatkan timbulnya respon imun untuk menjaga homeostasis tubuh akibat hilangnya limpa dan adanya penetrasi *S. typhi* dalam tubuh mencit. Respon imun tersebut melibatkan respon imun humoral dan seluler serta respon *innate immunity* di dalam tubuh. Penurunan dan peningkatan jumlah relatif sel T CD4⁺ pada *mesenteric lymph node* mencit perlakuan dapat pula disebabkan oleh persebaran jumlah sel T CD4⁺ yang tidak merata pada masing-masing organ limfoid. Perubahan jumlah relatif sel T CD4⁺ juga dapat dipengaruhi oleh tingkat penetrasi dan infeksi bakteri atau virus pada organ tertentu. Jumlah relatif sel T CD4⁺ pada penelitian ini dimungkinkan sangat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan pada masing-masing mencit perlakuan.

Penurunan jumlah relatif sel T CD8⁺ pada semua perlakuan terhadap kontrol serta terhadap jumlah relatif sel T CD4⁺ dapat dipengaruhi oleh peran respon imun seluler yang lebih dominan dalam mengatasi peningkatan jumlah penetrasi bakteri yang masuk ke dalam usus halus mencit. Hal ini dapat diketahui berdasarkan jumlah kadar IL-2 yang lebih besar daripada jumlah kadar IL-4 dalam serum mencit (Albab, 2009). Peningkatan jumlah relatif sel T CD4⁺ pada *mesenteric lymph node* dimungkinkan terkait dengan fungsi dari sel T CD4⁺ dalam mengatasi bakteri intraseluler. Fungsi utama sel T CD4⁺ adalah meningkatkan respon imun Th1 dalam merespon serangan patogen intraseluler dan mendukung Th2 yang terkait dalam respon humoral untuk mengatasi serangan patogen ekstraseluler (Hurst *et al.*, 1999).

Respon sistem imun tubuh dalam mengatasi penetrasi *S. typhi* di dalam usus halus, dimungkinkan dilakukan dengan produksi sel T CD4⁺ dalam jumlah lebih banyak agar dapat menstimuli produksi sitokin-sitokin proinflamasi untuk mengatasi serangan bakteri intraseluler. Selain hal tersebut, sebesar 10 % dari fungsi sel T CD4⁺ dapat berperan dalam *NK cells* yang dapat membantu mengatasi penetrasi bakteri. Meskipun demikian, sel T CD8⁺ juga dibutuhkan untuk mengontrol sitokin-sitokin proinflamasi dan membantu kerja sel T CD4⁺ ketika respon sel T CD4⁺ tidak mampu mengatasi serangan bakteri. Sel T CD8⁺ merupakan sel limfosit yang berperan sebagai agen pembunuh bakteri dan virus yang melakukan infeksi dalam tubuh (Abbas dan Lichtman, 2005).

Infeksi *Salmonella* akan menginduksi sel T CD4⁺ spesifik antigen *Salmonella*, sel T CD8⁺, dan respon sel B serta semua sel-sel imunitas tubuh yang dapat berkontribusi untuk perlindungan tubuh. Aktivasi sel T spesifik untuk flagela *Salmonella* akan meningkatkan sel T CD4⁺ spesifik *Salmonella* untuk mengekspresikan CD69 permukaan setelah infeksi bakteri *Salmonella* dan selanjutnya akan diproduksi IL-2 secara maksimal (Ravindran dan Stephen, 2005). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Mittrucker dan Kaufmann (2000) selama infeksi primer *Salmonella*, sel T spesifik *Salmonella* pada awalnya akan menyebar di area sel T dari jaringan limfoid dan hanya tampak dalam pengamatan pada tahap akhir adanya penetrasi sel B. Hal tersebut dapat menjelaskan bahwa keikutsertaan sel B dalam menangani penetrasi bakteri yang ada sebagai tahap sekunder setelah peran sel T dalam menangani bakteri.

Bakteri yang masuk dalam jumlah banyak, menyebar dan melakukan replikasi intraseluler di dalam inang menyebabkan terjadinya peningkatan berbagai jenis respon imun sebagai mekanisme pertahanan tubuh. Pada bagian epitelium intestinal terdapat sistem pertahanan yang kuat untuk mengatasi infeksi bakteri. Serangan bakteri *Salmonella* yang menginduksi respon proinflamasi yang sangat kuat akan merangsang produksi sitokin-sitokin proinflamasi. Produksi sitokin tersebut akan diikuti dengan aktivasi neutrofil, makrofag, dan dendritik sel. *Adaptive immune responses* merupakan respon imun tubuh yang sangat penting dalam mengatasi penetrasi *Salmonella* dalam inang. Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ adalah sel-sel yang banyak disintesis selama infeksi *Salmonella*. Peranan sel T CD4⁺ dalam mengatasi infeksi *Salmonella* lebih dibutuhkan. Hal tersebut dikarenakan sel T CD4⁺ lebih berperan dalam proses pembersihan bakteri dalam inang (Cummings *et al.*, 2005). Berdasarkan penelitian Cummings, *et al.* (2005) terdapat protein yang merupakan subunit flagela *Salmonella* yang disebut FliC yang secara spesifik akan dikenali oleh sel T CD4⁺ sehingga akan menimbulkan respon imun khusus pada sel T CD4⁺ yang dapat menghentikan penetrasi bakteri tersebut.

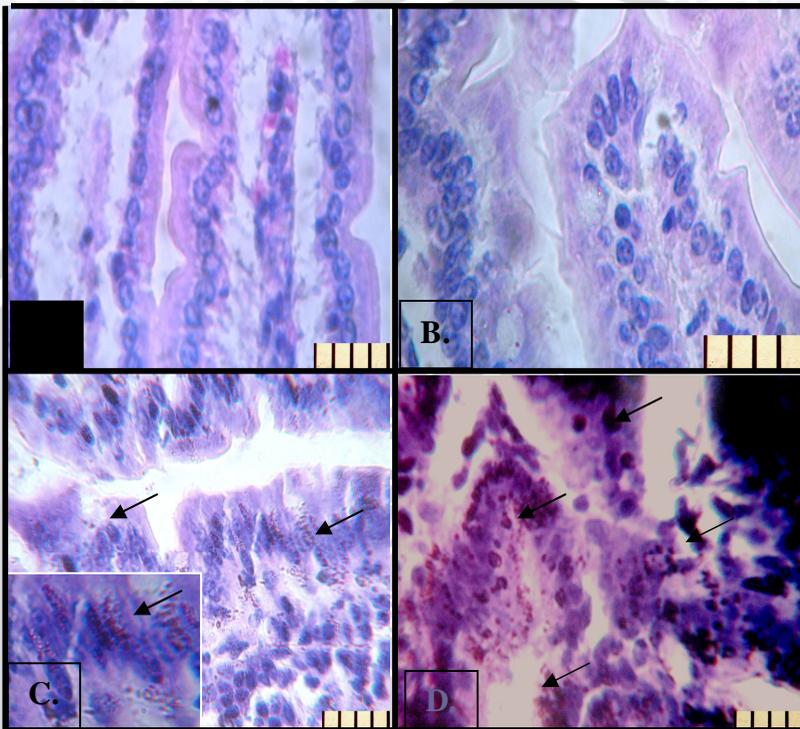
4.3 Analisis Histopatologi Usus Halus terhadap Penetrasi *S. typhi* pada Usus Halus Mencit

Salmonella typhi adalah bakteri enterobakter yang banyak terdapat di dalam usus halus ketika bakteri telah masuk ke dalam tubuh inang. Bakteri tersebut akan menembus pertahanan epitel usus dan masuk pada bagian mukosa usus selanjutnya akan menyebar ke bagian *payer's patches* (Monack *et al.*, 2000). Selain hal tersebut, bakteri *S. typhi* ini juga dapat menyebabkan penyakit sistemik, seperti *thiphoid* dan bakteri akan menyebar pada organ-organ dari sistem retikulaendotelia, seperti limpa dan hati (Everest *et al.*, 1999).

Berdasarkan hasil analisis preparat usus halus mencit pada penelitian ini diketahui, bahwa perlakuan paparan *S. typhi*, *splenectomy*, dan *splenectomy*-paparan *S. typhi* setelah akhir perlakuan menunjukkan adanya penetrasi bakteri pada jaringan usus halus dengan tingkat penetrasi yang berbeda-beda. Hasil analisis terhadap preparat dari ketiga kelompok perlakuan menunjukkan tingkat penetrasi bakteri *S. typhi* paling tinggi terjadi pada mencit perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi*, diikuti mencit kelompok paparan *S. typhi*, dan *splenectomy* bila dibandingkan dengan kontrol (Gambar 4.3 dan 4.4.). Walaupun demikian, keberadaan bakteri *S. typhi* di dalam jaringan usus halus berdasarkan hasil penelitian ini, masih membutuhkan analisis lebih lanjut menggunakan metode pewarnaan khusus *S. typhi* untuk dapat mengamati secara pasti keberadaan per individu (per sel) dari *S. typhi* di dalam jaringan usus halus mencit perlakuan. Hal ini dikarenakan pada hasil penelitian ini hanya dapat diamati koloni dari *S. typhi* saja.

Hasil analisis penetrasi bakteri pada jaringan usus halus mencit kelompok *splenectomy*-paparan *S. typhi* menunjukkan bakteri *S. typhi* banyak melakukan penetrasi pada bagian basal jaringan (Gambar 4.4.) dan menyebar ke bagian jaringan usus lainnya. Bakteri masuk dan menyebar pada sel-sel *paneth*, goblet, dan epitel usus, tetapi belum tampak adanya penetrasi pada bagian *payer's patch* (Gambar 4.5.). Berdasarkan Gambar 4.4.), dapat pula diketahui bahwa bakteri tidak hanya melakukan penetrasi masuk ke dalam sel-sel penyusun usus seperti sel goblet tetapi juga tampak seperti melakukan replikasi atau perbanyak diri di dalamnya. Bakteri kemudian akan keluar dari jaringan usus dan memungkinkan bakteri untuk menyebar kembali ke bagian jaringan lainnya. Adanya

replikasi bakteri pada jaringan usus tersebut yang memungkinkan jaringan usus tampak lebih gelap seperti noda hitam.



Gambar 4.3. Histopatologi usus halus bagian epitel (1000X), (A)Kontrol, (B) *Splenectomy*, (C) Paparan *S. typhi*, (D) *Splenectomy*-paparan *S. typhi* (1 sklala = 1 μ m)

Penetrasi bakteri *S. typhi* pada mencit paparan *S. typhi* menunjukkan tingkat penetrasi yang tinggi tetapi tidak lebih parah dari perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi* (Gambar 4.3.). Penetrasi bakteri pada mencit paparan *S. typhi* memiliki pola yang sama dengan penetrasi bakteri pada mencit perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Bakteri banyak terdapat pada bagian basal dan tampak pula telah menyebar pada bagian jaringan usus lainnya (Gambar 4.3. dan 4.4.) dan belum masuk ke dalam bagian *payer's patch* (Gambar 4.5.).

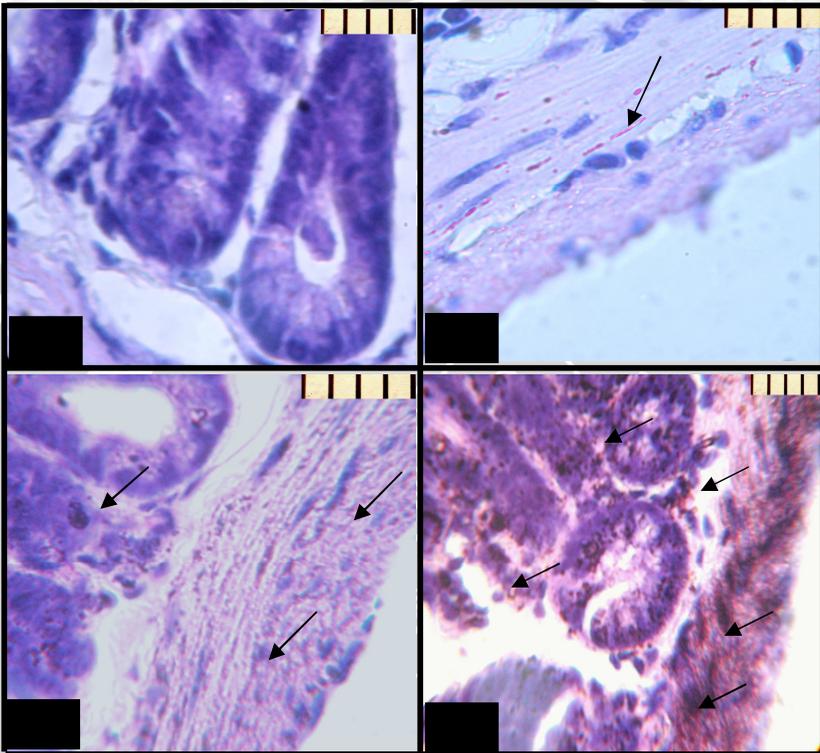
Preparat usus halus mencit perlakuan *splenectomy* menunjukkan adanya beberapa bakteri yang tampak pada bagian

basal dan epitel tetapi jumlahnya sedikit (Gambar 4.3. dan 4.4). Hal ini dapat terjadi karena di dalam tubuh khususnya pada bagian usus banyak bakteri yang secara alami hidup sebagai mikroflora yang memiliki peranan penting dalam proses perombakan makanan dalam sistem pencernaan, misalnya *Escherichia coli*. Mikroflora juga memiliki peranan penting dalam melindungi bagian permukaan mukosa dari patogen dan menghindarkan penempelan ataupun masuknya patogen ke dalam mukosa saluran pencernaan (Perdigon *et al.*, 2003). Bakteri yang terdapat pada jaringan usus perlakuan *splenectomy* dimungkinkan merupakan bakteri alami dan bakteri patogen lainnya yang jumlahnya meningkat akibat *splenectomy*. Hal ini dapat disebabkan oleh ketiadaan organ limpa yang meningkatkan kerentanan tubuh untuk mudah terinfeksi bakteri, sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui jenis dari bakteri tersebut.

Hasil analisis terhadap semua preparat jaringan usus halus tersebut, juga menunjukkan bahwa perlakuan *splenectomy* tidak berpengaruh terhadap kerusakan pada struktur jaringan usus halus mencit, khususnya pada bagian villi jaringan. Gambar 4.3. menunjukkan bagian epitel usus halus tidak tampak adanya kerusakan bila dibandingkan dengan perlakuan paparan *S. typhi* dan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Struktur villi usus halus tampak masih teratur hampir sama dengan struktur villi perlakuan kontrol. Kerusakan struktur jaringan usus halus terparah tampak pada mencit perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi*. Struktur jaringan usus halus pada perlakuan tersebut menunjukkan adanya bagian villi dan bagian epitel usus halus rusak dan tampak struktur yang tidak teratur. Sedangkan struktur jaringan usus halus mencit perlakuan paparan *S. typhi* menunjukkan struktur yang lebih teratur bila dibandingkan dengan perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi* meskipun tampak banyak bakteri yang melakukan penetrasi di dalam jaringan tersebut.

Bakteri *Salmonella* yang telah masuk ke dalam sistem pencernaan akan melakukan penetrasi ke bagian usus halus, sehingga di dalam jaringan usus akan ditemukan bakteri tersebut dalam jumlah yang banyak. Bakteri akan menyerang bagian mukosa usus halus dengan menembus pertahanan sel epitel, selanjutnya akan masuk ke bagian *M cell* dan selanjutnya dalam jumlah banyak akan melakukan penetrasi ke dalam *payer's patch*. Penetrasi bakteri dalam jaringan usus halus mengakibatkan perubahan karakteristik jaringan

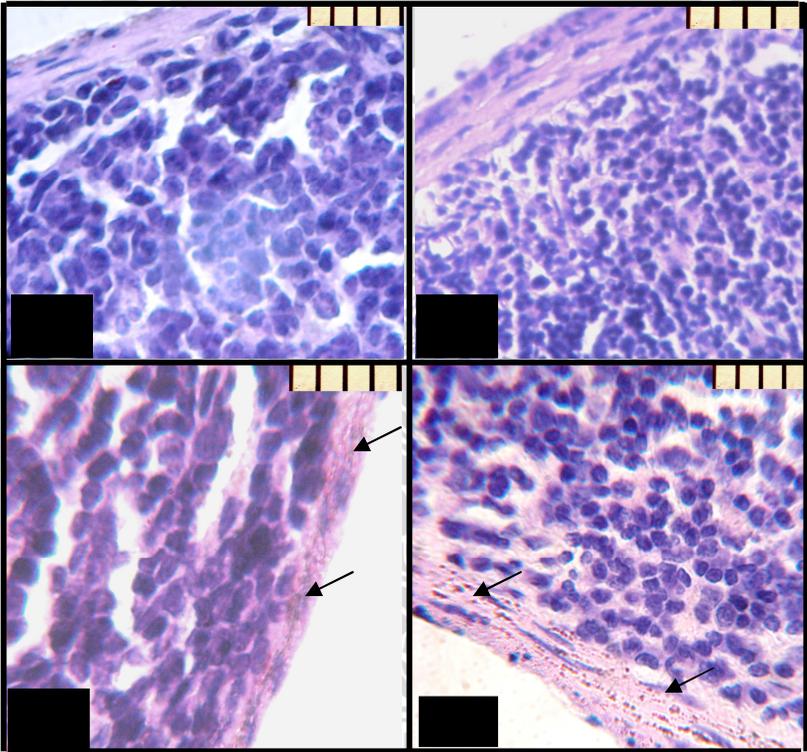
yang berkontribusi dalam kerusakan bagian mukosa usus halus (Monack *et al.*, 2000).



Gambar 4.4. Histopatologi usus halus bagian basal (1000X), (A) Kontrol, (B) *Splenectomy*, (C) Paparan *S. typhi*, (D) *Splenectomy*-paparan *S. typhi* (Warna merah kehitaman pada jaringan menunjukkan kemungkinan besar adanya koloni *S. typhi*) (1 skala = 1 μ m).

Bakteri yang melakukan penetrasi pada jaringan usus halus mencit dalam jumlah banyak pada perlakuan *splenectomy*-paparan *S. typhi* dapat dipengaruhi oleh hilangnya organ limpa sebagai salah satu organ penting dalam sistem imunitas tubuh dalam mengatasi antigen yang masuk ke dalam tubuh mencit. Walaupun demikian, penetrasi bakteri dalam jumlah banyak pada jaringan usus halus, dapat dikatakan kurang berpengaruh pada keadaan mencit khususnya

pada berat badan mencit. Hal ini dibuktikan dengan tidak adanya penurunan berat badan mencit secara signifikan melainkan tetap konstan hingga akhir perlakuan (Lampiran 20). Serta tidak adanya kematian mencit dari awal injeksi bakteri dan *booster* hingga akhir perlakuan.

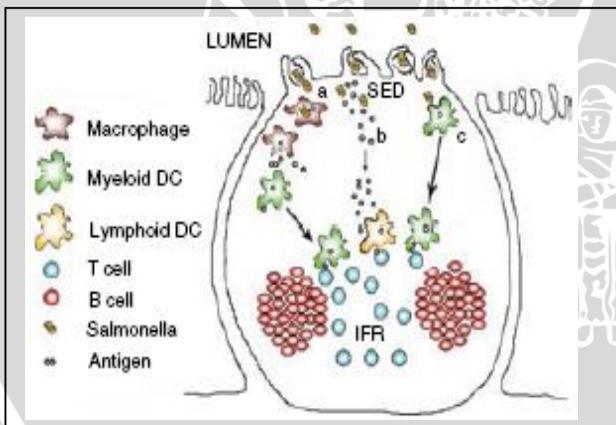


Gambar 4.5. Histopatologi usus halus bagian *Payer's patch* (1000X), (A) Kontrol, (B) *Splenectomy*, (C) Paparan *S. typhi*, (D) *Splenectomy*-paparan *S. typhi* (tanda panah pada jaringan menunjukkan adanya koloni *S. typhi*) (1 skkala = 1 μ m).

Hasil analisis berdasarkan penetrasi *S. typhi* pada mencit tersebut dapat dikatakan bahwa meskipun tidak adanya limpa, tubuh mencit dapat melakukan kompensasi terhadap hilangnya limpa dan adanya penetrasi bakteri pada bagian usus halus khususnya. Hal ini dapat terlihat pula dengan adanya peningkatan kadar IL-2 pada serum

mencit. Selain itu, pertahanan yang dilakukan oleh sel-sel epitel usus sebagai salah satu tempat produksi sitokin dan organ periferal lainnya masih mampu mengatasi penetrasi bakteri pada jaringan tersebut sehingga mencit masih tampak sehat.

Sistem pertahanan pada bagian usus terdapat pada bagian membran mukosa yang merupakan sistem pertahanan penting pada bagian tersebut. Sel-sel epitel mukosa merupakan bagian yang berperan penting sebagai lapisan pertahanan dan produksi sitokin sebagai respon imun (Gambar 4.6.). Selain hal tersebut, produksi antibodi (IgA) pada bagian lumen usus dapat mencegah infeksi enteropatogen, dapat menyerap protein alergi makanan dan bahan karsinogen (Perdigon *et al.*, 2003). Selain pertahanan dari sel-sel mukosa, sistem imun tubuh pada bagian saluran pencernaan juga diperkuat dengan bantuan dari mikroflora alami yang berada pada saluran pencernaan yang membantu dalam proses sekresi antibodi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Perdigon, *et al.* (1995) menyatakan bahwa terdapat peningkatan respon imun dengan keberadaan mikroflora dan bakteri asam laktat dalam saluran pencernaan. Bakteri asam laktat dalam sistem pencernaan mampu meningkatkan fungsi imun dengan merangsang peningkatan produksi sitokin pada makrofag.



Gambar 4.6. Respon Sistem imun pada bagian usus halus ketika terjadi infeksi bakteri *S. typhi* (DC = dendritic cell, SED = subepithelial dome, IFR = interfolicular region) (Ravindran dan Stephen, 2005)

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah

1. Paparan *S. typhi* pada mencit *splenectomy* maupun mencit tanpa *splenectomy* mampu meningkatkan kadar IL-2 pada serum mencit. Peningkatan kadar IL-2 tertinggi secara berturut-turut terjadi pada mencit perlakuan *splenectomy* (1,567 ng/ml), paparan *S. typhi* (1,352 ng/ml), *splenectomy*-paparan *S. typhi* (1,252 ng/ml), dan kontrol (0,494 ng/ml).
2. Paparan *S. typhi* pada mencit *splenectomy* maupun *nonsplenectomy* tidak mempengaruhi jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *mesenteric lymph node* mencit. Jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada semua *mesenteric lymph node* mencit perlakuan memiliki jumlah relatif sel hampir sama. Jumlah relatif sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada masing-masing perlakuan yaitu 32,65% dan 16,79% (kontrol), 28,24% dan 13,92% (*splenectomy*), 35,44% dan 14,65% (paparan *S. typhi*), serta 33,65% dan 14,85% (*splenectomy*-paparan *S. typhi*).
3. Paparan *S. typhi* mengakibatkan penetrasi bakteri *S. typhi* pada bagian epitel dan basal jaringan usus halus mencit perlakuan selain kontrol dengan tingkat penetrasi yang berbeda-beda. Mencit perlakuan *Splenectomy*-paparan *S. typhi* merupakan mencit dengan penetrasi *S. typhi* paling parah.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang :

1. Perhitungan jumlah absolut sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada organ-organ limfoid lainnya sehingga dapat diketahui jumlah sel T CD4⁺ dan CD8⁺ keseluruhan.
2. Analisis keberadaan bakteri di dalam jaringan usus dengan menggunakan pewarnaan khusus untuk bakteri *S. typhi*, sehingga dapat di ketahui secara pasti keberadaan *S. typhi* di dalam jaringan usus mencit perlakuan

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. 2005. Cellular and Molecular Immunology, Fifth Edition. Elsevier Saunders. Philadelphia. Hal : 17-24 dan 31-32.
- Albab, F. A. 2009. **Perubahan Komponen Sistem Imun Humoral pada Mencit (*Mus musculus* BALB/c) Splenectomy Pasca Paparan *Salmonella typhi***. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Al-Ramadi, B. K., M. J. F. Cabezedo, A. Ullah, H. E. Hasasna, and R. A. Flavell. 2006. CD154 Is Essential for Protective Immunity in Experimental Salmonella Infection: Evidence for a Dual Role in Innate and Adaptive Immune Responses. *J. of Immunology*. **176**: 496–506.
- Baratawidjaja, K. G. 2004. **Imunologi Dasar, Edisi Ke-enam**. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Biotech. 2008. Hybridoma Facility. <http://www.biotech.iastate.edu>. Tanggal akses 12 Oktober 2008.
- Cao, Z. X., X. P. Chen and Z. D. Wu. 2003. Changes of Immune Function in Patients with Liver Cirrhosis After Splenectomy Combined with Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. **2(1)**:562-565.
- Clark, A. M., K. A. Reed., J. Lodge, J. Stephen, B. H. Hirst and M. A. Jepson. 1996. Invasion of Murine Intestinal M Cells by *Salmonella typhimurium inv* Mutants Severely Deficient for Invasion of Cultured Cells. *American Society For Microbiology*. **64(10)**: 4363–4368.
- Corthay, A. 2006. A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand. J. Immunology*. **64**: 93–96.

Cruse, J. M. and Robert, E. L. 1999. Atlas Of Immunology. CRC Press. New York. 185- 423.

Cummings, L. A, S. L. R. Barrett, W. D. Wilkerson, I. Fellnerova and B. T. Cookson². 2005. FliC-Specific CD4₊ T Cell Responses Are Restricted by Bacterial Regulation of Antigen Expression¹. *The Journal of Immunology*. **174**:7929–7938.

Damayanti, F. O. 2006. **Pengaruh Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Ness) Terhadap Perbaikan Kondisi Insulinitis Tikus Diabetes mellitus Tipe-1 (IDDM) Melalui Konfirmasi Keberadaan Interleukin-2**. Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.

Debra, L.W., B. O'Neill. and D. M. Hone and E. S. Metcalf. 1998. Differential Early Interactions Between *Salmonella Enterica* Serovar Typhi and Two Other Pathogenic *Salmonella* Serovars with Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Infection and Immunity*. **66 (5)**: 2310-2318

Deodar, K. and N. Kakkar. 2004. An Audit Of Splenectomies In A Teaching Hospital In North India. Are Postsplenectomy Guidelines Being Complied With?. *J. Clinical Pathology*. **57(4)**: 407–410.

Diagnose-med. 2008. Consequences Of Splenectomy. <http://www.diagnose-med.com>. tanggal akses 14 November 2008.

Dutcher, J. 2003. High-Dose Interleukin-2 the Treatment of Choice for Metastatic Renal Cell Carcinoma?. *Kidney Cancer Journal*, **1**: 5-12.

Eckmann, L., and M. F. Kagnoff. 2001. Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes Infect*. **3**:1191–1200.

Everest, P., J. Ketley, S. Hardy, G. Douce, S. Khan, J. Shea, D. Holden, D. Maskell and G. Dougan. 1999. Evaluation of

Salmonella typhimurium Mutants in a Model. *American Society for Microbiology*. **67** (6): 2815–2821.

Gaffen, S.L and K.D. Liu. 2004. Overview of Interleukin-2 Function, Production and Clinical Applications. *NCBI*. **28**(3):109-23.

Higashijima, J., M. Shimada, M. Chikakiyo, T. Miyatani, K. Yoshikawa, M. Nishioka., T. Iwata and N. Kurita. 2009. Effect of Splenectomy on Antitumor Immune System in Mice. *Anticancer Research*. **29**: 385-394.

Hurst, S. D., C. J. Cooper, S. M. Sitterding, J. H. Choi, R. L. Jump, A. D. Levine, and T. A. Barrett. 1999. The Differentiated State of Intestinal Lamina Propria CD41 T Cells Results in Altered Cytokine Production, Activation Threshold, and Costimulatory Requirements. *The Journal of Immunology*. **163**: 5937–5945.

Hyde, R. M. 2000. **Immunology 4th Edition**. Lippincott William dan Wilkins. Philadelphia.

Ikuta, S., S. Ono, M. Kinoshita, S. Seki, H. Hiraide and H. Mochizuki. 2004. Enhanced Interferon- γ Production and Bacterial Clearance in the Liver of Splenectomized Mice in the Models of *Escherichia coli* Injection or Intestinal Obstruction. *SHOCK*. **21** (5): 452–457.

Junquera, L., Carneiro, C. J. and Kelley, R. O. 1995. Histologi dasar. Edisi Kedelapan. Alih Bahasa J. Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 270-27.

Kanwar, S. S. and L. Madan. 2000. Immunology And Medical Microbiology Principles And Applications Of Immuno-Diffusion, Immuno-Electrophoresis, Immuno-Fluorescence, Elisa, Western Blotting, Minimal Inhibitory Concentration (Mic), Kirby-Bauer Method And Widal Test. <http://nsdl.niscair.res.in/bitstream/123456789/606/1/Immunotechniques.pdf>. Tanggal akses 20 November 2008.

Kuehnl, M. J and N. C. Kesty. 2005. Bacterial Outer Membrane Vesicles and the Host-Pathogen Interaction. Review. Genes and Development. **19**:2645–2655

Kuranaga, N., M. Kinoshita, T. Kawabata, N. Shinomiya and S. Seki. 2005. A Defective Th1 Response of the Spleen in the Initial Phase May Explain Why Splenectomy Helps Prevent A *Listeria infectio*. Clinical and Experimental Immunology, **140(11)**: 11–21

Lelchuk, R. Rose, G. Playfair, J. H. L. 2006. Changes in the capacity of macrophages and T cells to produce interleukins during murine malaria infection. CABI abstract.

Manzano, M., A. C. A. Molina, E. G. Olivares, A. Gil and R. Rueda. 2002. Absolute Counts and Distribution of Lymphocyte Subsets in Small Intestine of BALB/c Mice Change during Weaning. *The journal of nutrition Nutritional Immunology*. **132**: 2757–2762.

Mayer. 2007. Immunology and Medical Microbiology. www.mayer@med.sc.edu. Tanggal akses 14 Agustus 2009.

Millievi, N. M., B. Luettig, C. Trautwein, T. Wiistefeld, M. Mahler, P. Jecker. K. Wonigeit, and J. Westermann. 2001. Splenectomy Of Rats Selectively Reduces Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 And Intercellular Adhesion Molecule 1 Expression On B-Cell Subsets In Blood And Lymph Nodes *J.of Immunology*. **98(10)**: 3035-3041.

Mittrucker, H.W., S.H. Kaufmann. 2000. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J Leukoc Biol*. **67**:457–63.

Monack, D. M., D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky and S. Falkow. 2000. Exploits Caspase-1 to Colonize Peyer's Patches in a Murine Typhoid Model. *J. Exp. Med*. **192**: 249–258.

- Mrusek, S., S. Vallbracht. S. Ehl. 2005. The Impact of Splenectomy on Antiviral T Cell Memory in Mice. *International Immunology*. **17(1):**27-33
- Newland. A. 2005. Preventing Severe Infection After Splenectomy. *BMJ. Med. Publ.* **331:** 417-418.
- Norris, T. G. and H. K. Crystal. 2002. Splenectomy. <http://www.healthline.com>. Tanggal akses 14 Nopember 2008.
- Odle, T. 2006. Splenectomy. <http://www.healthatoz.com>. Tanggal akses 5 Oktober 2008.
- Perdigón G, S. Alvarez, N. Gobbato, M. De Budeguer, P. D. R. Holgado. 1995. Comparative effect of the adjuvant capacity of *Lactobacillus casei* and LPS on the intestinal secretory antibody response and resistance to *Salmonella typhimurium* infection in mice. *J Agric Immunol* . **7:** 283-294.
- Perdigón, G., M. Locasciol, M. Medici1, A. P. D. Holgado and G. Oliver1. 2003. Interaction of Bifidobacteria with the Gut and Their Influence In the Immune Function. *Biocell*. **27(1):** 1-9.
- Prodia Laboratorium. 2006. Informasi Laboratorium *Salmonella typhi*. ISSN. **5** : 0854-7165.
- Raffatellu, M. D., Chessa, R. P. Wilson, C. A. Tu'kel, M. A. Elik and A. J. Ba'umler. 2006. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. Minireviews. *Infection and Immunity*. **74 (1)** : 19-27
- Ravindran, R. and S. J. McSorley. 2005. Tracking the dynamics of T-cell activation in response to *Salmonella* infection. Review Article. *Immunology*. **114:** 450-458.
- Rodri'guez-Sa'inz, M. C., S. Sanchez-Ramon, C. de Andres, M. Rodriguez-Mahou, and M. A. Munoz-Fernandez. 2002. Th1/Th2 cytokine balance and nitric oxide in cerebrospinal

fluid and serum from patients with multiple sclerosis. *Eur. Cytokine Netw.* **13**:110–114.

- Roitt, I. M. 1995. **Imunology. Essential Immunology, Edisi 8.** Alih Bahasa: Harahap, A. Liliana, K. Samsuridjal, D. Siti, B. K. Yoes, P. D. Widya Medika. Jakarta. Hal 105-106.
- Romagnani, S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunology.* **85**:9–21.
- School of medicine. 2006. Flow Cytometry and Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm. Tanggal akses 28 September 2009
- Sigbio. 2008. The Lymphatic System. <http://www.acm.uiuc.edu>. Tanggal akses 31 Oktober 2008.
- Srinivasan, A., J. Foley, R. Ravindran and S. J. McSorley. 2004. Low-Dose *Salmonella* Infection Evades Activation of Flagellin-Specific CD4 T Cells. *J. of Immunology.* **173**: 4091-4099.
- Stanford. 2009. The Immune System and Parasitic Evasion. www.stanford.edu/.../Background.html. Tanggal akses 28 Oktober 2009
- Todar, K. 2005. *Salmonella* and Salmonellosis. University of Wisconsin Madison Departement of Bacteriology. <http://www.bionewsonline.com>. Tanggal akses 9 Nopember 2008.
- Villegas, E. N., L. A. Lieberman, S. R. Carding, and C. A. Hunterl. 2002. Susceptibility of Interleukin-2-Deficient Mice to *Toxoplasma gondii* Is Associated with a Defect in the Production of Gamma Interferon. *Infection and immunity.* **70**. 9: 4757–4761

Wijayanti, M.,A. 2003. **Efek imunisasi terhadap peningkatan kadar Interleukin-2 dan Interferon-y pada mencit Swiss selama infeksi Plasmodium berghei.** Berkala Ilmu Kedokteran. **35 (1).**

Witztum, J. 2002. Splenic Immunity and Atherosclerosis: A Glimpse Into a Novel Paradigm?. *J. Clin. Invest.* **109**:721–724.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1. Kelaikan Etik Penelitian



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 18-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH INJEKSI *Salmonella Thypi* TERHADAP
KADAR INTERLEUKIN-2 (IL-2) PADA MENCIT (*Mus
Musculus BALB/C*) *SPLENECTOMY*

PENELITI : NURVALINA WAHYUNI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : JURUSAN BIOLOGI/FMIPA/UNIVERSITAS BRAWIJAYA

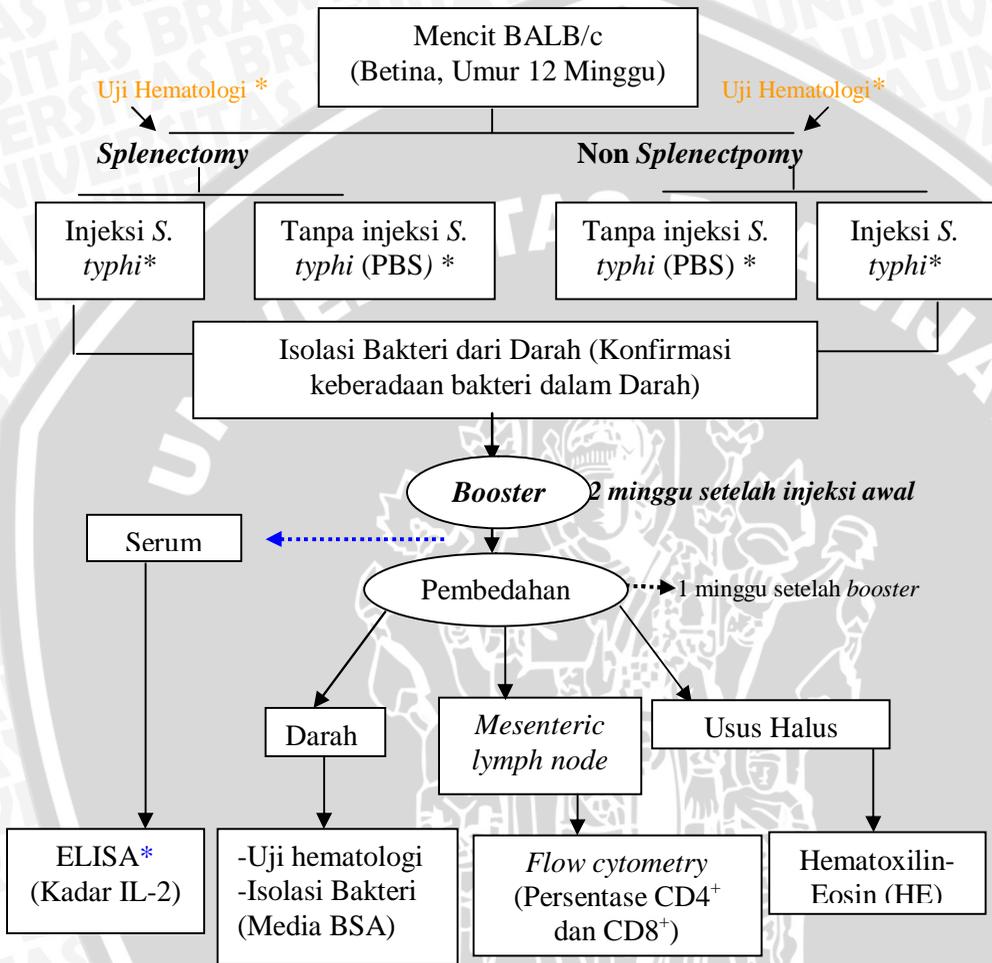
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Februari 2009
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 131 759 594

Gambar 1. Keterangan laik etik penelitian

Lampiran 2. Alur Kerja Penelitian

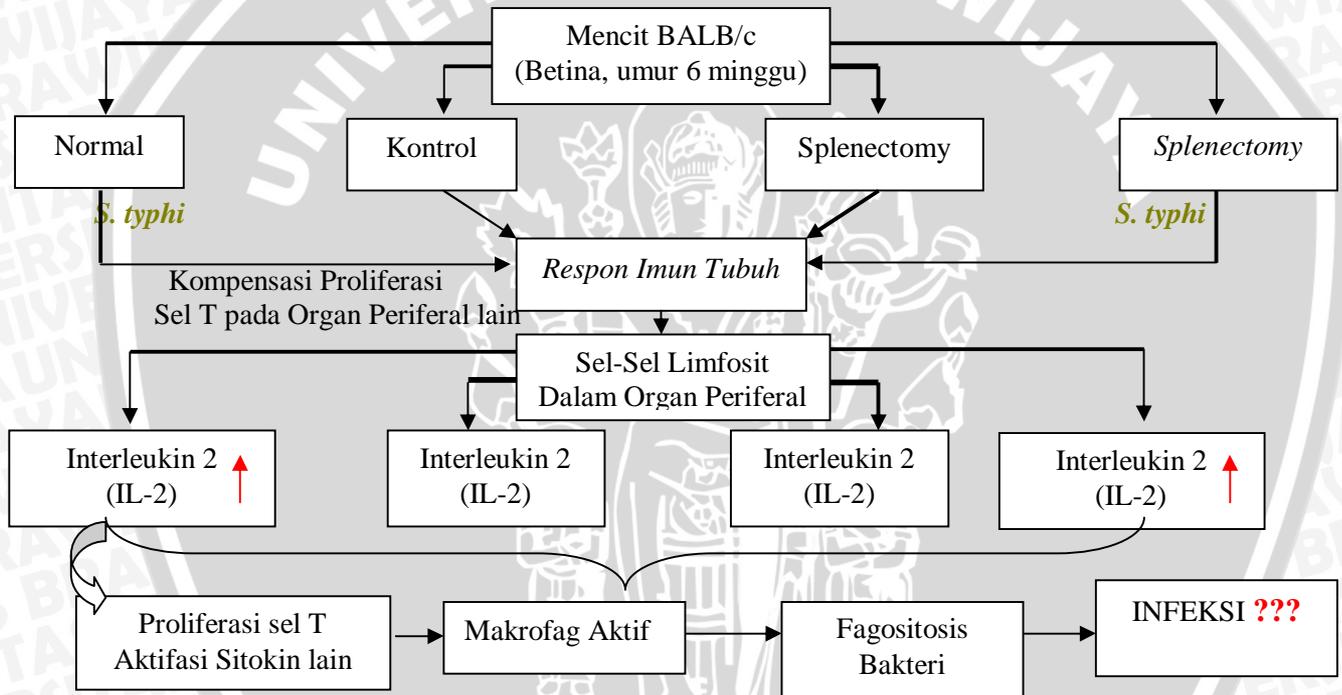


Keterangan :

- * dilakukan 1 minggu setelah splenectomy
- * dilakukan 2 minggu setelah splenectomy
- * dilakukan 3 hari setelah booster

Gambar 2. Alur Kerja Penelitian

Lampiran 3. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3. Kerangka konsep penelitian

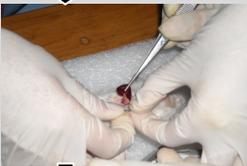
Lampiran 4. Skema Prosedur *Splenectomy* mencit (*Mus musculus* BALB/c)



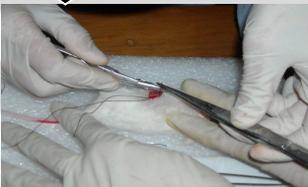
- ditimbang
- disinfeksi alkohol 70% pada bagian abdomen
- diinjeksi *Athrophin Sulfat* (0.04 mg/kg BB) (i.p)
- diinjeksi *Xylazin* (12 mg/kg BB) (i.p), 10 menit kemudian
- diinjeksi *Ketamin* (60 mg/kg BB) (i.p), 15 menit kemudian



- dicukur rambut bagian kiri tubuh



- dilakukan pembedahan (\pm 1-2 cm) secara perlahan
- pembuluh darah diikat dengan benang *cat gat*
- organ limpa diambil



- dilakukan penjahitan pada lapisan kulit bagian dalam dan luar mencit
- ditetaskan obat antiseptik pada bagian luka



- Mencit pasca *splenectomy* dipelihara dalam *pathogen free chamber* (27-30°C) selama perlakuan

Lampiran 5. Perhitungan Dosis Injeksi Anestesi

Diketahui :

Berat badan mencit	: 33,9 g = 0,0339 kg
Kadar stok Ketamin	: 100 mg/ml
Kadar stok Atrophin Sulfat	: 0,25 mg/ml
Kadar stok Xylazin	: 20 mg/ml
Dosis Ketamin	: 60 mg/kg BB
Dosis Atrophin Sulfat	: 0,04 mg/kg BB
Dosis Xylazin	: 12 mg/kg BB

Perhitungan dosis yang di injeksikan :

Atrophin sulfat :

$$\frac{0,0339 \text{ kg}}{1 \text{ kg}} \times 0,04 \text{ mg} : 0,001356 \text{ mg}$$

$$\frac{0,001356 \text{ mg}}{0,25 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} : 0,005424 \text{ ml} = 5,4 \mu\text{l}$$

Volume Atrophin sulfat yang diinjeksikan sebanyak 5,4 μl + 94,6 μl PBS

Xylazin :

$$\frac{0,0339 \text{ kg}}{1 \text{ kg}} \times 12 \text{ mg} : 0,4068 \text{ mg}$$

$$\frac{0,4068 \text{ mg}}{20 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} : 0,02034 \text{ ml} = 20,34 \mu\text{l}$$

Volume xylazin yang diinjeksikan sebanyak 20,34 μl + 79,5 μl PBS

Ketamin :

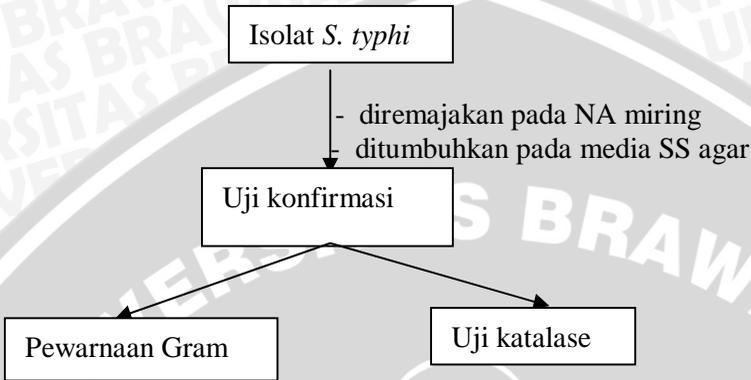
$$\frac{0,0339 \text{ kg}}{1 \text{ kg}} \times 60 \text{ mg} : 0,4068 \text{ mg}$$

$$\frac{0,4068 \text{ mg}}{100 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} : 0,02034 \text{ ml} = 20,34 \mu\text{l}$$

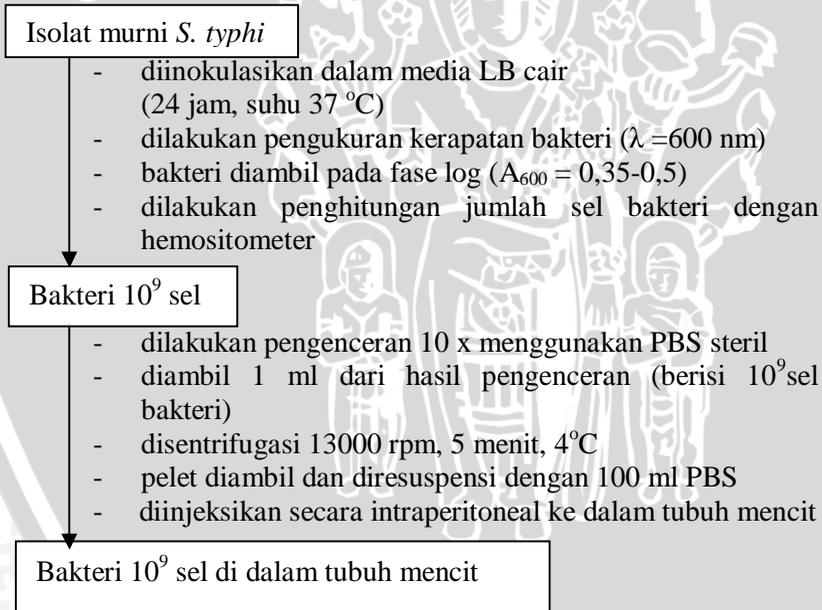
Volume ketamin yang diinjeksikan sebanyak 20,34 μl + 79,5 μl PBS

Lampiran 6. Skema Prosedur Persiapan dan Injeksi *S. typhi*

6.1 Uji konfirmasi

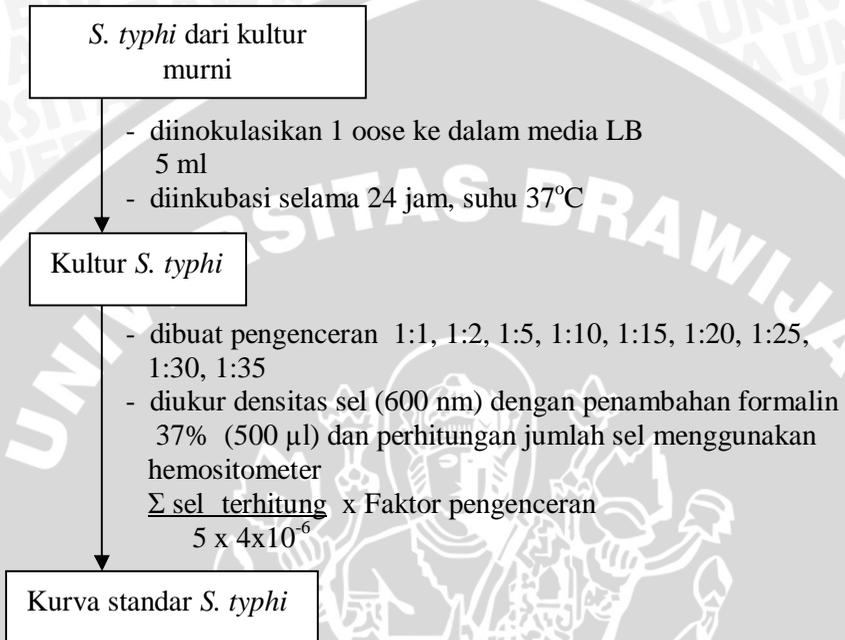


6.2 Persiapan injeksi *S. typhi* (Debra, *et al* (1998))



* keterangan = metode persiapan injeksi bakteri tersebut dilakukan kembali ketika akan dilakukan *booster* dua minggu setelah injeksi awal.

Lampiran 7. Skema Prosedur Pembuatan Pola Pertumbuhan Bakteri *S. typhi*



Lampiran 8. Skema Prosedur Isolasi bakteri *S. typhi* dari darah mencit

Darah dari ekor mencit

- diambil sebanyak 50 μ l dan ditambah 450 μ l NaCl fisiologis
- diinokulasikan 0,5 ml ke dalam medium *LB broth* 4.5 ml
- diinkubasi selama 24 jam (37°C) dengan agitasi 120 rpm

Suspensi *S. typhi*

- diambil sebanyak 0.1 ml
- diinokulasikan ke dalam cawan petri
- dituangkan medium *Salmonella-Shigella* (SS) pada cawan
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

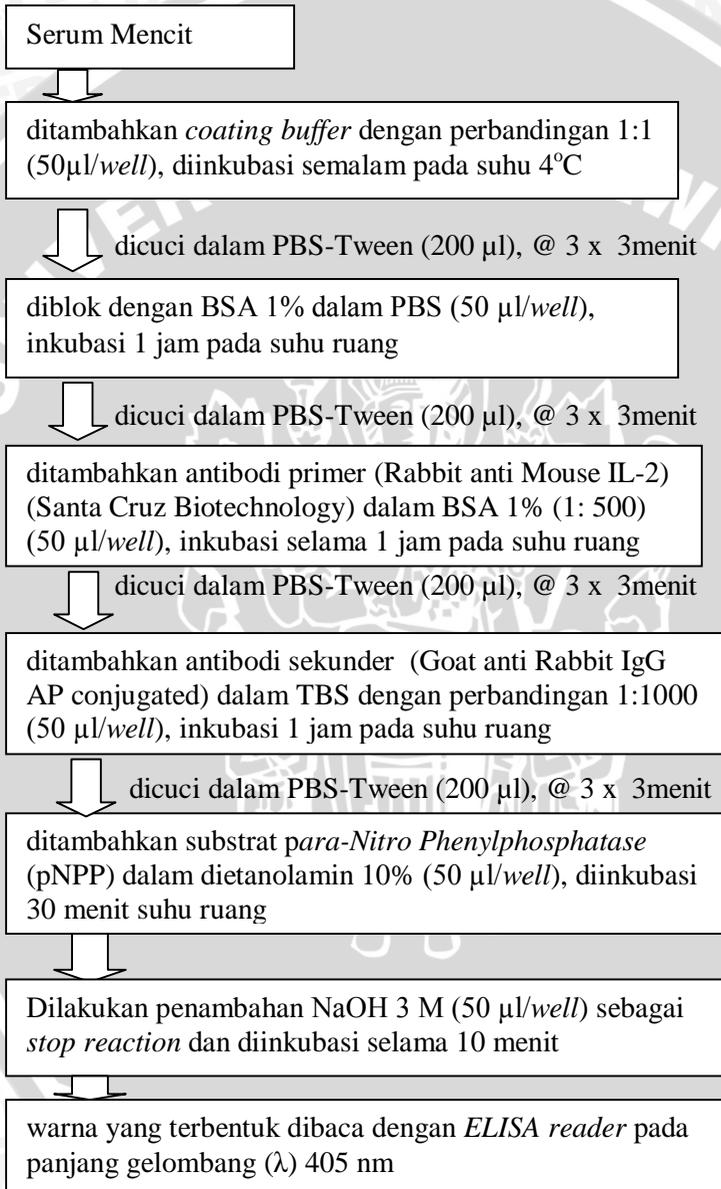
Koloni bakteri yang tumbuh

- dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh
- dilakukan uji konfirmasi (uji katalase dan ditumbuhkan pada medium *Bismuth Sulphite Agar* (BSA))
- koloni *Salmonella typhi* akan ditunjukkan dengan warna koloni bakteri hijau metalik.

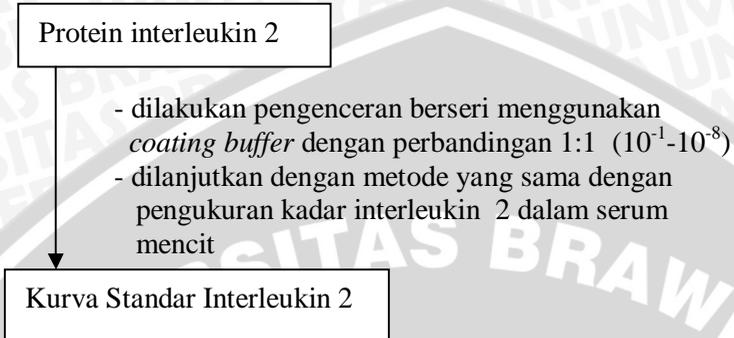
Bakteri *S. typhi*

Lampiran 9. Skema Prosedur Pengukuran kadar Interleukin 2 (IL-2) dengan ELISA

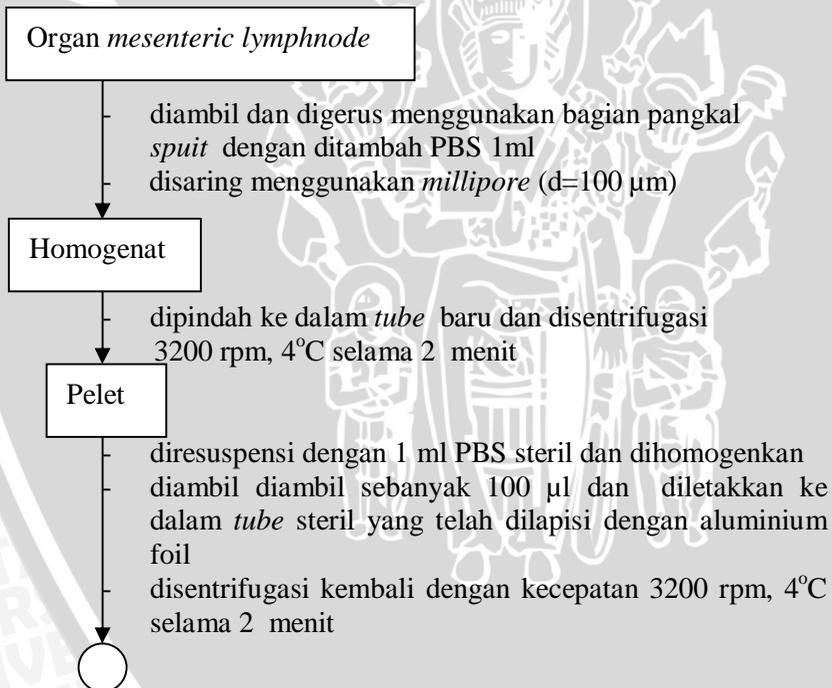
9.1 Pengukuran kadar IL- 2 dalam serum mencit

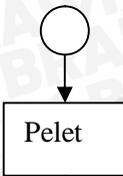


9.2 Pembuatan kurva standar IL- 2

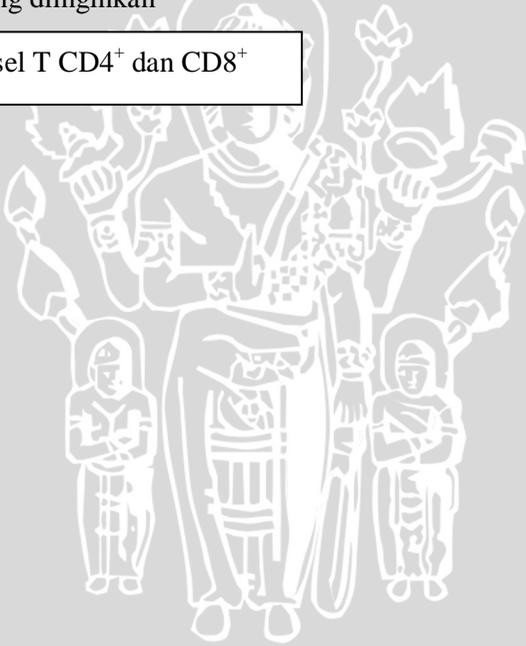


Lampiran 10. Skema Prosedur Analisis Jumlah Relatif Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ *Flow Cytometry*

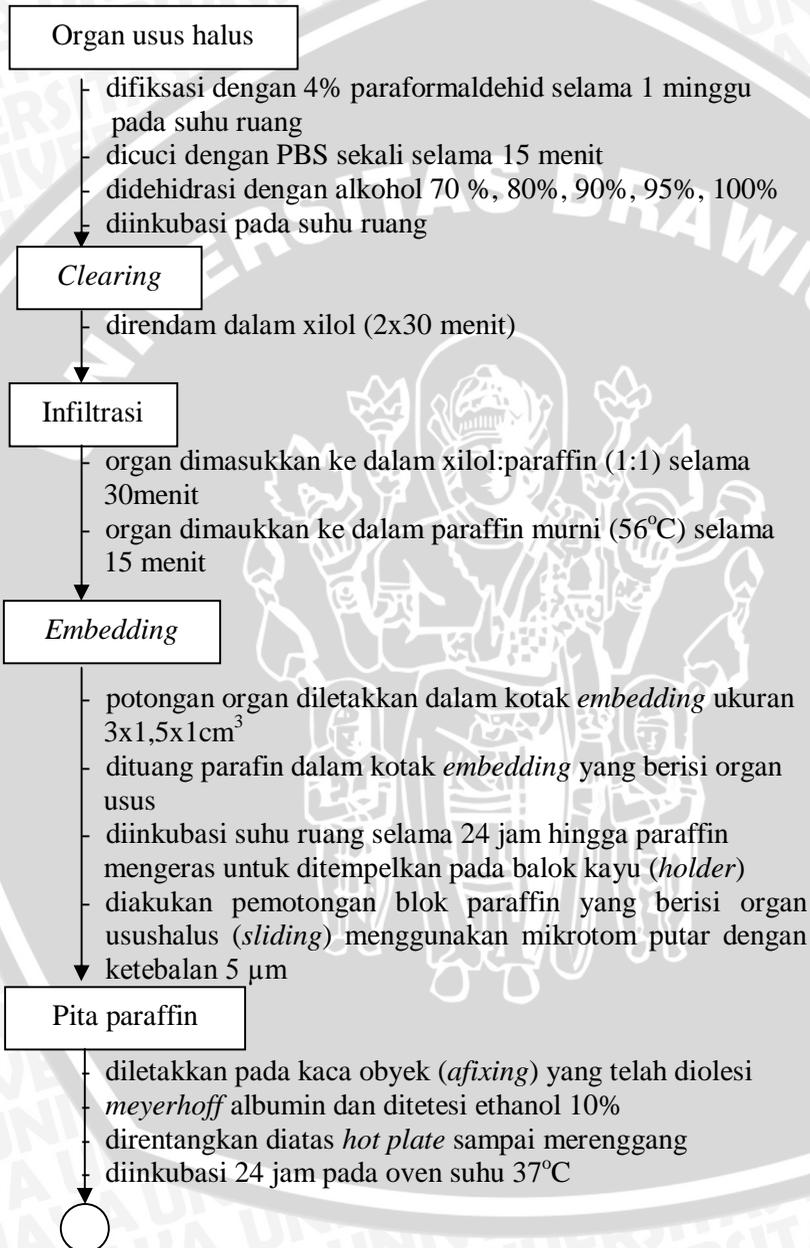




ditambahkan antibodi *anti mouse CD4⁺ FITC conjugated* dan *anti mouse CD8⁺ PE conjugated* (BD Bioscience, Pharmingen, USA), diinkubasi selama 15 menit
ditambahkan 1 ml PBS steril dan dimasukkan ke dalam tabung sampel mesin *flow cytometry* (flow cytometry BDX Calibur) yang telah diprogram untuk parameter yang diinginkan



Lampiran 11. Skema Prosedur Pengamatan Histopatologi Organ Usus Halus Mencit dengan Pewarnaan Hematoxilen-Eosin



- dideparafinasi dalam xilol dan rehidrasi dalam ethanol bertingkat
- dicuci dengan aquades selama 5 menit
- diwarnai dengan hematoxilen selama 5 menit
- dicuci dengan air mengalir selama masing-masing 5 menit
- didehidrasi dalam ethanol bertingkat (80%, 90%, 95% dan 100% selama 2 X @ 5 menit)
- dilanjutkan *clearing* dalam xilol 3 X @ 5 menit
- *mounting* dengan entelan dilakukan sebelum *slide* ditutup dengan *cover glass*
- dilakukan pengamatan pada preparat yang telah jadi

Preparat usus halus terwarnai hematoxilen-eosin



Lampiran 12. Komposisi Reagen dan Media yang Digunakan

Tabel 1. Komposisi *phosphate buffer saline* (PBS)

No.	Bahan	Jumlah
1	NaCl	8 g
2	KCl	0,2 g
3	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	2,1 g
4	KH ₂ PO ₄	0,2 g
5	Akuades	1000 ml
pH		7,2 – 7,4

Tabel 2. Komposisi NaCl 0,9 %

No.	Bahan	Jumlah
1	NaCl	9 g
2	Akuades	1000 ml

Tabel 3. Komposisi *Biuret*

No.	Bahan	Jumlah
1	CuSO ₄	0,3 g
2	NaKtartarat	0,9 g
3	NaOH	0,8 g
4	KI	0,5 g
5	dH ₂ O	100 ml

Tabel 4. Komposisi *paraformal dehyde* (PFA) 4 %

No.	Bahan	Jumlah
1	PFA	4 g
2	NaOH	
3	PBS	100 ml

Tabel 5. Komposisi PBS *Tween* 500 ml

No.	Bahan	Jumlah
1	PBS	500 ml (pH 7,3)
2	Tween	250 µl

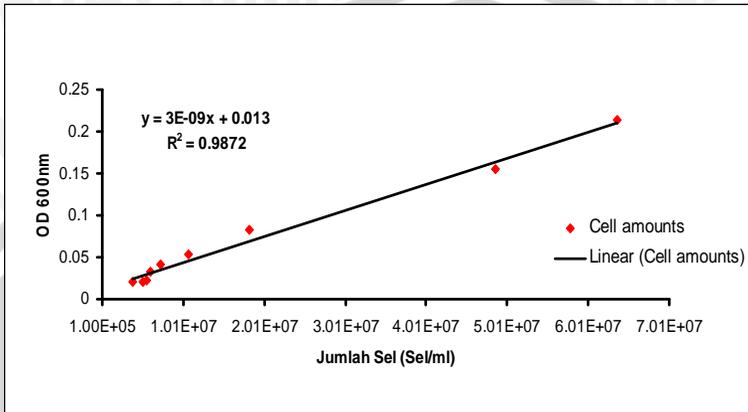
Tabel 6. Komposisi *coating buffer*

No.	Bahan	Jumlah
1	Na_2Ca_3	0,0795 g
2	NaHCO_3	0,1465 g
3	NaN_3	0,01 g
4	Akuades	500 ml
pH		9,6

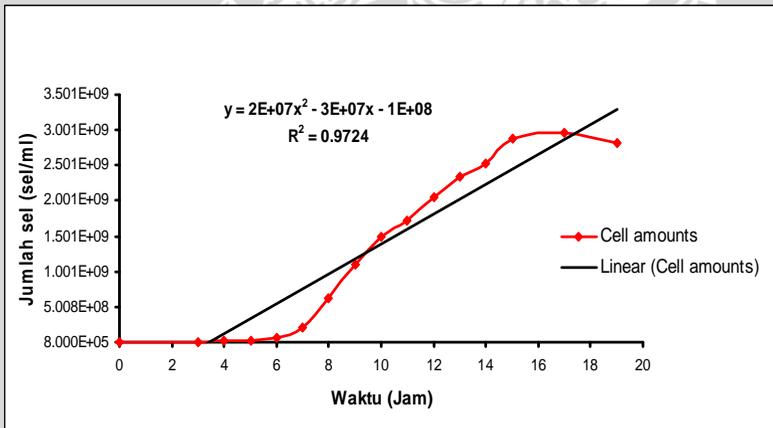
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 13. Kurva Standar dan Pertumbuhan Bakteri *S. typhi*

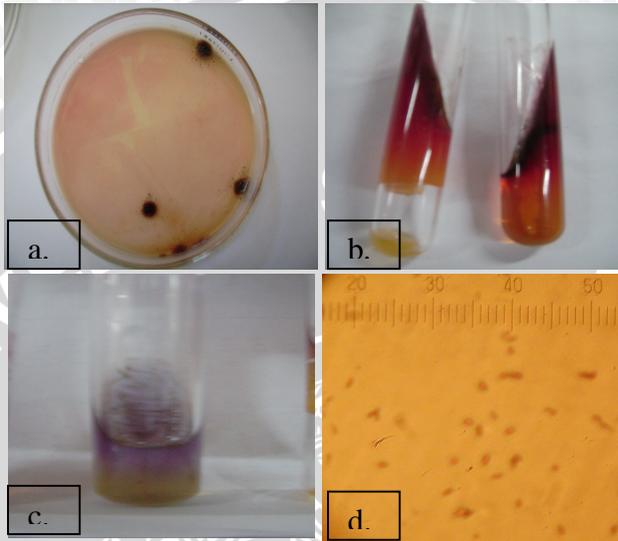


Gambar 4. Kurva Standar *S. typhi* dalam media *LB Broth*

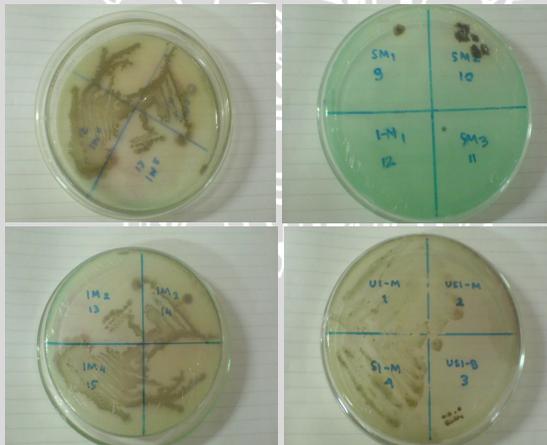


Gambar 5. Kurva pertumbuhan *S. typhi* dalam media *LB Broth*

Lampiran 14. Uji Konfirmasi *S. typhi* dalam Medium SS Agar, KIA & LIA dan BSA dari Darah Mencit



Gambar 6. Beberapa uji konfirmasi kemurnian isolat *S. typhi* sebelum proses injeksi ke dalam tubuh mencit. (a.) koloni hitam Salmonella dalam SS agar, (b.) uji pada KIA (+), (c.) Uji pada LIA (+), (d.) Sel bakteri *S. typhi*

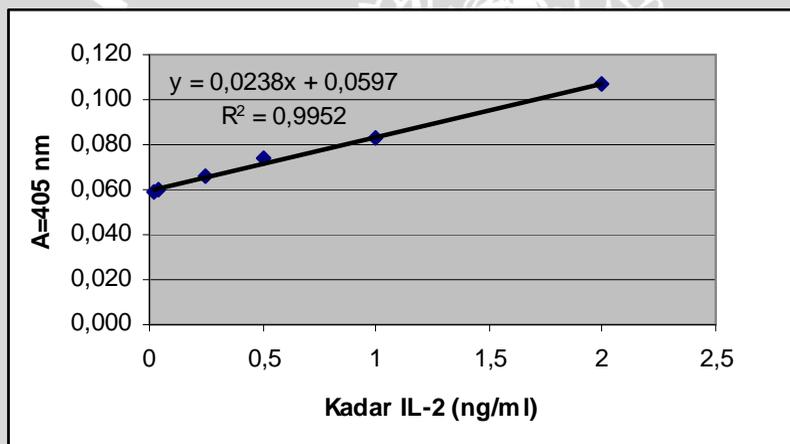


Gambar 7. Uji positif *S. typhi* dalam medium BSA dari darah mencit (Koloni hitam menunjukkan koloni *S. typhi*)

Lampiran 15. Kurva Standar IL-2

Tabel 7. Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Baku IL-2

Konsentrasi (ng/ml)	Absorbansi (405 nm)
0,01875	0,059
0,0375	0,060
0,25	0,066
0,5	0,074
1	0,083
2	0,107



Gambar 8. Kurva standar IL-2

Lampiran 16. Hasil Analisis Ragam (ANOVA) dan Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Peningkatan Kadar IL-2 pada Serum Mencit

Tabel 8. Hasil analisis ragam peningkatan kadar IL-2 pada serum mencit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.964	3	.655	27.128	.000
Within *	.193	8	.024		
Total	2.157	11			

Keterangan : * berbeda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 9. Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) peningkatan kadar IL-2 pada serum mencit

Perlakuan	Kadar IL-2
Kontrol	0,494 a
<i>Splenectomy</i>	1,567 b
Injeksi <i>S. typhi</i>	1,352 b
<i>Splenectomy</i> -injeksi <i>S. typhi</i>	1,252 b

Keterangan :

- huruf kecil yang sama di belakang nilai rata-rata pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji BNJ pada tingkat signifikansi 95%

Lampiran 17. Hasil Analisis Ragam (ANOVA) dan Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Jumlah Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ pada *Mesenteric lymph node* Mencit

Tabel 10. Hasil analisis ragam jumlah sel T CD₄ dan CD₈ pada *mesenteric lymph node* mencit

		Sum of Squares	df	Mean	F	Sig.
jumlah_sel_TCD8	Between Groups	14.184	3	4.72	0.45	0.724
	Within Groups	83.877	8	10.485	1	
	Total	98.061	11			
jumlah_sel_TCD4	Between Groups	84.449	3	28.150	0.90	0.481
	Within Groups	249.195	8	31.149	4	
	Total	333.644	11			

Keterangan : Tidaka ada beda nyata untuk jumlah sel T CD₄ dan CD₈ pada *Mesenteric lymph node* mencit sehingga tidak dilanjutkan untuk analisis lanjutan BNJ.

Lampiran 18. Hasil (*Output*) Analisis Ragam (ANOVA) dan Hasil uji BNJ (Beda Nyata Jujur) Peningkatan Kadar IL-2 pada Serum Mencit Melalui *Software Program SPSS for Windows Release Versi 13.0.*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.964	3	.655	27.128	.000
Within Groups	.193	8	.024		
Total	2.157	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: kadarinterleuki

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	splenectomy	-1.07300*	.12682	.000	-1.4791	-.6669
	injeksi	-.85833*	.12682	.001	-1.2645	-.4522
	splenectomy-injeksi	-.75800*	.12682	.001	-1.1641	-.3519
splenectomy	kontrol	1.07300*	.12682	.000	.6669	1.4791
	injeksi	.21467	.12682	.386	-.1915	.6208
	splenectomy-injeksi	.31500	.12682	.137	-.0911	.7211
injeksi	kontrol	.85833*	.12682	.001	.4522	1.2645
	splenectomy	-.21467	.12682	.386	-.6208	.1915
	splenectomy-injeksi	.10033	.12682	.857	-.3058	.5065
splenectomy-injeksi	kontrol	.75800*	.12682	.001	.3519	1.1641
	splenectomy	-.31500	.12682	.137	-.7211	.0911
	injeksi	-.10033	.12682	.857	-.5065	.3058

*. The mean difference is significant at the .05 level.

kadarinterleuki

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
kontrol	3	.4937	
splenectomy-injeksi	3		1.2517
injeksi	3		1.3520
splenectomy	3		1.5667
Sig.		1.000	.137

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 19. Rerata Berat Badan Mencit Seminggu Sebelum Perlakuan Hingga Akhir Perlakuan

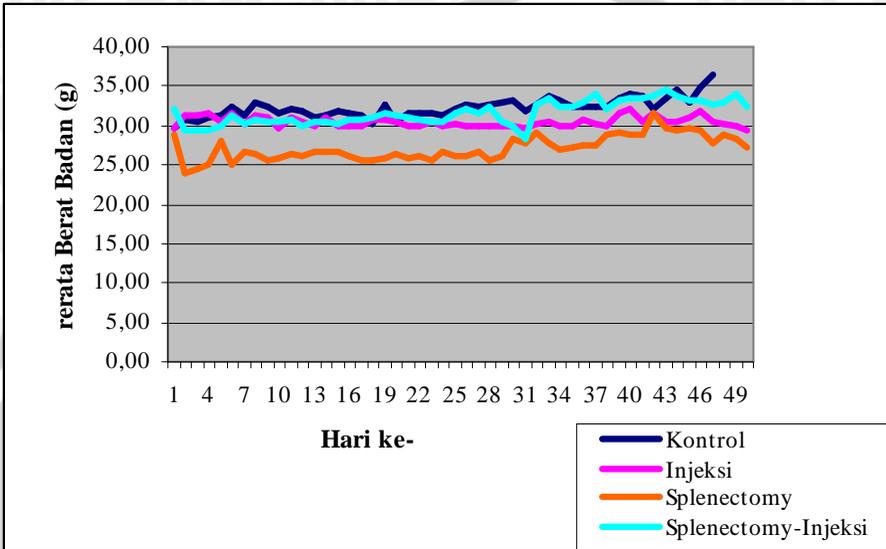
Tabel 11. Rerata berat badan mencit (g)

Tgl.	Kontrol	Injeksi <i>S. typhi</i>	<i>Splenectomy</i>	<i>Splenectomy</i> -Injeksi <i>S. typhi</i>
18 Mei	29,73	29,70	28,90	32,20
19 Mei	30,80	31,17	23,87	29,43
20 Mei	30,60	31,20	24,47	29,37
21 Mei	31,03	31,70	24,90	29,43
22 Mei	31,27	30,57	27,93	29,97
23 Mei	32,43	31,53	25,17	31,27
24 Mei	31,30	30,20	26,60	30,23
25 Mei	32,97	31,20	26,37	30,77
26 Mei	32,43	31,07	25,50	30,60
27 Mei	31,43	29,63	25,73	30,43
28 Mei	32,10	31,00	26,27	30,67
29 Mei	31,77	30,50	26,23	29,83
30 Mei	30,97	29,93	26,67	30,60
31 Mei	31,40	31,03	26,70	30,40
1 Juni	31,87	29,97	26,80	30,33
2 Juni	31,57	30,00	26,00	30,67
3 Juni	31,33	29,83	25,50	30,70
4 Juni	30,27	30,87	25,60	31,10
5 Juni	32,57	30,63	25,73	31,67
6 Juni	30,60	30,43	26,33	31,33
7 Juni	31,47	29,80	25,97	31,07
8 Juni	31,47	30,07	26,20	30,67
9 Juni	31,63	30,60	25,63	30,60
10 Juni	31,20	30,07	26,73	30,57
11 Juni	32,03	30,30	26,20	31,70
12 Juni	32,57	29,97	26,00	32,23
13 Juni	32,40	30,07	26,63	31,47
14 Juni	32,63	29,97	25,63	32,40
15 Juni	33,00	29,93	26,23	30,43
16 Juni	33,23	29,80	28,17	30,07
17 Juni	31,97	29,67	27,80	28,17

18 Juni	32,60	30,13	29,07	32,67
19 Juni	33,73	30,57	27,77	33,43
20 Juni	33,20	29,93	26,93	32,27
21 Juni	32,40	29,97	27,13	32,40
22 Juni	32,50	30,67	27,53	32,80
23 Juni	32,47	30,23	27,50	34,00
24 Juni	32,30	29,87	28,77	32,10
25 Juni	33,50	31,63	29,17	33,07
26 Juni	34,13	32,03	28,80	33,37
27 Juni	33,67	30,53	28,83	33,43
28 Juni	32,10	31,50	31,50	33,63
29 Juni	33,37	30,60	29,63	34,43
30 Juni	34,57	30,53	29,43	33,67
1 Juli	33,03	30,90	29,60	33,33
2 Juli	34,70	31,73	29,43	33,33
3 Juli	36,33	30,60	27,63	32,77
4 Juli		30,30	28,90	33,00
5 Juli		30,07	28,43	34,00
6 Juli		29,50	27,30	32,30

* Keterangan :

- : Perlakuan *splenectomy*
- : Perlakuan injeksi *S. typhi*



Gambar 9. Rerata berat badan mencit (g) awal hingga akhir perlakuan

Lampiran 20. Perbandingan Komponen Darah 1 Minggu Setelah Splenectomy dan 1 Minggu Setelah Injeksi *S. typhi*

Tabel 12. Hasil pengukuran komponen darah pada masing-masing mencit perlakuan 1 minggu setelah *splenectomy* dan 1 minggu setelah injeksi *S. typhi*

Pengambilan Sampel	Sampel	Hb (g/dl)	Eritrosit (10/mm ³)	Hemato-krit	Leukosit (sel/mm ³)	Trombosit (sel/mm ³)	Limfosit	Monosit
Satu minggu setelah <i>splenectomy</i>	Kontrol	10,17	7,03	34,67	10000	609333	88,67	8,33
	<i>Splenectomy</i>	4,90	2,98	18	13000	602000	76,67	11,67
Satu minggu setelah injeksi <i>S. typhi-splenectomy</i>	kontrol	6,13	2,97	8,87	2667	516667	84,33	11,33
	<i>Splenectomy</i>	4,97	2,72	7,5	2800	564667	79	17
	Injeksi <i>S. typhi</i>	5	2,45	4	3567	480667	71	18,67
	<i>Splenectomy</i> -injeksi <i>S. typhi</i>	5,4	2,58	7,2	2900	421667	83,33	13,33