

LAPORAN AKHIR

HIBAH DOKTOR TAHUN 2013



**POTENSI KERANG DARAH (*Anadara granosa*) TERHADAP
SISTEM IMUN SELULER DAN HUMORAL
TIKUS BETINA (*Rattus norvegicus*) KURANG GIZI**

OLEH

**Dra. NETTY INO ISCHAK, M.Kes
NIDN : 0023026803**

UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO

NOVEMBER 2013

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DISERTASI DOKTOR

Judul Kegiatan : Potensi Kerang Darah (Anadara granosa.L) Terhadap Sistem Imun Seluler dan Humoral Tikus Betina (Rattus Norvegicus) Kurang Gizi.

Kode/Nama Rumpun Ilmu : ILMU KESEHATAN

Ketua Peneliti

A. Nama Lengkap	: Dra. NETTY INO ISCHAK M.Si
B. NIDN	: 0023026803
C. Jabatan Fungsional	: Lektor Kepala
D. Program Studi	: Pendidikan Kimia
E. Nomor HP	: 081340516545
F. Surel (e-mail)	:
G. NIM	: 091070836
H. Semester ke	: 6

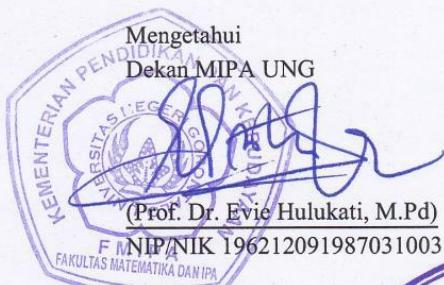
PT Penyelenggara : UNIVERSITAS AIRLANGGA

Program Doktor : Ilmu Kesehatan

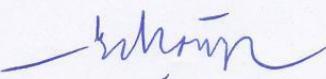
Nama Promotor : R BAMBANG WIRJATMADI

NIDN Promotor : 0020034903

Biaya yang Diusulkan : Rp 35.000.000,00



Gorontalo, 13 -11 - 2013,
Ketua Peneliti,


(Dra. NETTY INO ISCHAK M.Si)
NIP/NIK



RINGKASAN

Prevalensi kurang gizi saat ini masih menjadi masalah nasional. Masalah kurang gizi yang dihadapi anak usia balita adalah defisiensi zat gizi makro yang juga disertai defisiensi zat gizi mikro. Asupan nutrisi seperti protein yang tidak seimbang akan mengakibatkan sistem kekebalan tubuh terganggu dan berdampak terhadap menurunnya sistem pertahanan seluler dan produksi zat anti bodi dalam tubuh. Penurunan sistem pertahanan tubuh . Hal ini berakibat mudahnya penyakit masuk ke dalam tubuh dan mengganggu pertahanan seluler dan humoral terutama produksi antibodi. Kerang darah (*Anadara granosa*) merupakan salah satu jenis kerang yang mampu memenuhi kebutuhan protein hewani dan harganya murah serta aman dikonsumsi manusia. Kandungan protein dan zinc yang cukup tinggi dari kerang darah, memiliki potensi terapi suplementasi bagi anak-anak kurang gizi. Konjugasi antara protein dan zinc ini merupakan komponen senyawa yang berperan dalam regulasi metabolisme sel dalam tubuh. Protein akan membantu proses absorpsi zinc dan selanjutnya mempengaruhi proses terbentuknya sistem imun.

Selama ini pemenuhan kebutuhan protein masih terbatas pada konsumsi daging dan susu yang relatif mahal, maka pada penelitian disertasi ini dikaji secara ilmiah potensi kerang darah sebagai bahan pangan sumber protein dan mineral terhadap sistem imun.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis potensi suplementasi kerang darah dalam meningkatkan jumlah limfosit T(CD4⁺), kadar γ -globulin dan sIgA mukosa usus (jejunum dan ileum) serta perbaikan timus tikus (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague Dawley* kurang gizi.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik dengan disain penelitian *The Randomized Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan 30 ekor tikus betina (*R. norvegicus*) sebagai subyek penelitian. Sampel dipilih dengan cara *simple random sampling*, dibagi dalam lima kelompok perlakuan: (1) kelompok kontrol normal (KN), (2) dan (3) adalah kelompok kurang gizi yang masing-masing mendapat perlakuan ransum non protein sebagai kontrol positif K.kg (+), dan sumber protein kasein 20% sebagai kontrol negatif K.kg (-) serta (4), (5) adalah kelompok kurang gizi yang mendapat perlakuan sumber protein kasein (10%) yang dikombinasi tepung kerang darah (10%) P.kg1, dan P.kg2 yang diberi sumber protein tepung kerang darah 20%. Perlakuan dilakukan selama 35 hari. Kondisi tikus kurang gizi dengan kadar albumin 2,7 g/dL, diperoleh dengan pemberian ransum yang tidak mengandung bahan protein (non protein). Air minum diberikan *ad libitum* selama 14 hari. Ketika akhir penelitian, tikus dikorbankan untuk pengambilan darah dan jaringan. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan jumlah limfosit T(CD4⁺), kadar γ -globulin, albumin, zinc serum, imunoglobulin A sekretori (sIgA) di mukosa usus, serta histologi jaringan timus dan mukosa usus halus (jejunum dan ileum).

Pengukuran variabel yang diamati dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis melihat pola makan dan berat badan. Evaluasi mikroskopis melalui analisis laboratorium meliputi: pengukuran albumin dan γ -globulin yang dianalisis dengan metode elektroforesis protein dengan perangkat lunak SEBIA, jumlah limfosit T(CD4⁺) dengan *flowcytometry FACSCalibur*, kadar zinc serum dengan AAS, pengamatan histologi timus dan jaringan usus halus dengan mikroskop cahaya menggunakan *Hematoxilin Eosin* (HE) dan sIgA mukosa usus (jejunum-ileum) tikus percobaan melalui metode imunohistokimia (IHK). Metoda IHK menggunakan antibodi Primer **Policlonal goat anti rat sekretori IgA**.

Analisis data dilakukan dengan *Analysis Of Variance* (ANOVA) dan uji lanjut *Duncan* untuk untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda satu sama lain menggunakan *SPSS 18.0*. Analisis hubungan antar variabel digunakan *Partial Least Square* (PLS).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerang darah berpotensi meningkatkan jumlah limfosit T(CD4⁺), γ -globulin, albumin, zinc serum dan sIgA mukosa usus serta mampu memperbaiki struktur korteks dan medula timus, kerusakan vili, dan ketebalan mukosa usus di jejunum maupun di ileum tikus percobaan yang mengalami kurang gizi dengan signifikan ($p<0,05$).

Kesimpulan penelitian ini adalah kerang darah sebagai bahan pangan yang mengandung nutrisi terutama protein (asam amino) dan zinc terbukti meningkatkan respon imun seluler dan humorai tikus kurang gizi.

Temuan baru dalam penelitian ini adalah merupakan penelitian pertama yang membahas tentang potensi kerang darah terhadap sistem imunitas yang belum pernah dilakukan penelitian sebelumnya. Hasil penelitian ini dapat menjelaskan mekanisme imunopatobiologis kerang darah dalam meningkatkan sistem imun seluler dan humorai yang diakibatkan oleh kondisi kurang gizi .

Hasil penelitian ini mengungkapkan bahwa terjadinya peningkatan jumlah limfosit T (CD4⁺) dan peningkatan γ -globulin tetap meningkatkan produksi γ -globulin jauh lebih tinggi. Fakta ini lebih menguatkan bahwa pada kondisi kurang gizi setelah diberi kasein maupun kerang darah γ -globulin lebih responsif dibandingkan limfosit T (CD4⁺). kerang darah lebih baik jika dibandingkan dari perlakuan lainnya. Tetapi dalam hal produksi γ -globulin pemberian kasein saja sudah cukup meningkatkan γ -globulin meskipun pada pemberian kerang darah dan kombinasinya dengan kasein mampu

Kebaharuan penelitian ini adalah 1) Kerang darah berpotensi sebagai bahan pangan fungsional. 2) Kerang darah berpotensi dijadikan sebagai terapi alternatif dalam upaya pelaksanaan program pencegahan dan penanggulangan masalah gizi, menjadi lebih baik, terutama bagi balita dan anak-anak kurang gizi.

Kata Kunci : Kerang Darah (*Anadara granosa*), sistem imun seluler, humorai, kurang gizi

PRAKATA

Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat, kasih sayang dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan akhir penelitian dan penulisan disertasi ini. Salawat dan taslim semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW dan semoga akan sampai pada seluruh umatnya.

Laporan Akhir penelitian hibah doktor ini ditulis untuk memenuhi persyaratan monitoring dan evaluasi (MONEV) yang diselenggarakan oleh lembaga penelitian (LEMLIT) Universitas Negeri Gorontalo.

Terima kasih khusus penulis haturkan dengan rasa hormat, penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga kepada yang terhormat Bapak **Prof. Bambang Wirjatmadi, dr., M.S., MCN., Ph.D., Sp.GK.,** selaku **Promotor** dan Bapak **Prof. Dr. H. Yoes Prijatna D., dr., M.Sc., Sp.Par.K.,** selaku **Ko-Promotor** yang di tengah-tengah kesibukan beliau masih bersedia memberi petunjuk dan pengarahan sejak dari pembuatan rencana penelitian sampai pada penelaahan hasil demi tersusunnya disertasi ini

Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus kepada yang terhormat:

1. Direktorat Pendidikan Tinggi (DIKTI) melalui dana Desentralisasi (BOPTN) yang telah membiayai dana penelitian hibah doktor ini sampai pada penyusunan disertasi.
2. Dr. Syamsu Qamar Badu, M.Pd., dan Prof. Dr. Ir. Nelson Pomalingo, M.Pd., sebagai rektor dan mantan Rektor Universitas Negeri Gorontalo yang telah memberi izin kepada penulis untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor pada Program Studi Ilmu Kesehatan di Universitas Airlangga Surabaya.
3. Prof. Dr. Evi Hulukati, M.Pd., selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Negeri Gorontalo yang telah merekomendasikan penulis untuk studi Program Doktor pada Program Studi Ilmu Kesehatan di Universitas Airlangga Surabaya.. .
4. Kepala Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo beserta staf (dr. Diyah, Bu Indri) terima kasih telah membantu penulis dalam analisis sampel untuk pengujian limfosit T(CD4), γ -globulin dan albumin.
5. Kepala Laboratorium Pusat Studi Primata Bogor IPB beserta staf (Bu Lis, dr. Vivi dan asistennya) yang telah menyediakan fasilitas laboratorium dan membantu penulis dalam pemrosesan jaringan sampai mendapatkan hasil.
6. Kepala Laboratorium Seafast IPB beserta staf, Dr. Endang, Bu Sri, Pak Adi yang telah banyak membantu dari penyediaan fasilitas kandang hewan coba selama proses penelitian berlangsung.
7. Kepala Laboratorium Puslitbang Gizi Bogor beserta staf analis (Bu Nelly dan mbak Ari) yang membantu penulis dalam menganalisis Zinc.

Terima kasih penulis ucapkan kepada semua pihak yang tidak sempat di sebutkan satu persatu yang telah membantu penelitian ini . Kiranya hanya Allah SWT membalas segala kebaikan, kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT, kekurangan adalah milik mahluk-Nya. Semoga Allah Arrahman dan Arrahim senantiasa melimpahkan rahmat, keberkatan serta ridho-Nya kepada kita semua, Amin. Semoga bermanfaat.

Gorontalo, Agustus 2013
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Permasalahan	3
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Distribusi dan Frekuensi Masalah Gizi	5
2.2 Kerang Darah (<i>Anadara granosa</i>)	6
2.3 Kebutuhan Protein dalam Tubuh.....	7
2.4 Komponen Sistem Imun	9
2.5 Peran Protein dan zink dalam sistem imun.....	12
2.6 Histologi Timus	14
2.7 Mukosa Usus Pencernaan.....	16
 BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1 Tujuan Penelitian.....	19
3.2 Manfaat Penelitian.....	19
 BAB 4 METODE PENELITIAN	 21
4.1 Jenis dan Rancang Bangun Penelitian.....	21
4.2 Lokasi Penelitian	21
4.3 Bahan Penelitian.....	21
4.4 Tahapan Penelitian	22
 BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	 26
5.1 Hasil Penelitian.....	26
5.1.1 Hasil Analisis Jumlah Limfosit T (CD4+) Tikus Percobaan.....	27
5.1.2 Hasil Analisis Kadar γ -Globulin Tikus Percobaan	29
5.1.3 Hasil Pengamatan Histologi Timus	31
5.1.4 Hasil Pengamatan Mikroskopis sekretori IgA (sIgA) Mukosa Usus di Jejunum Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) dengan Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)	36
5.2. Pembahasan	39
5.2.1 Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Jumlah Limfosit T CD4+ Tikus Kurang Gizi	39
5.2.1.1 Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Kadar γ -Globulin Tikus Kurang Gizi	40
5.2.3 Potensi Kerang Darah dalam Memperbaiki Jaringan Timus pada	

Tikus Kurang Gizi	43
5.2.4 Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Kandungan sIgA Mukosa Usus Tikus Kurang Gizi dengan Metode Imunohistokimia.....	45
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
6.1 Kesimpulan.....	49
6.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 5.1 Rerata dan Standar Deviasi Limfosit T (CD4+), gama Globulin,Tikus Percobaan Setelah Perlakuan	20
Tabel 5.2 Rerata dan Standar Deviasi Ukuran Ketebalan Korteks dan Diameter medulla Timus Tikus Percobaan.....	21
Tabel 5.3 Deskripsi Kandungan sekretori Imunoglobulin A (sIgA) pada Mukosa Usus di Jejunum Tikus Percobaan.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Kerang Darah (<i>Anadara granosa</i>).....	4
Gambar 2.2 Organ Timus Normal	11
Gambar 2.3 Histologi Usus Halus yang menunjukan Vili dan Mukosa Usus.....	12
Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian	16
Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian	17
Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Mikroskopik Sediaan Histologi Timus	22
Gambar 5.3 Hasil Pengukuran Ketebalan Korteks Timus pada Kelompok Perlkuan Tikus Percobaan.....	32
Gambar 5.4 Hasil Pengukuran Diameter Medula Timus pada Kelompok Perlkuan Tikus Percobaan.....	33
Gambar 5.5 Hasil Pengamatan Mikroskopis Histologi Timus pada Kelompok Perlkuan Tikus Percobaan dengan Pewarnaan HE, skala 100 μ m	35
Gambar 5.6 Fotomikrograf Jaringan Usus Halus Bagian Mukosa jejunum dengan pewarnaan Imunohistokimia (IHK) terhadap Kandungan sIgA	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Pemeriksaan <i>Protein elektroforesis SEBIA</i> (Hidragel K-20 Protein) untuk Pemeriksaan Albumin dan γ -Globulin	57
Lampiran 2. Prosedur Analisis <i>Flowcytometri</i> (Jumlah Limfosit T CD4+).....	59
Lampiran 3. Biodata Personalia Peneliti.....	60
Lampiran 4. Artikel Jurnal	63
Lampiran 5. Hasil Subbmited dan reviw Jurnal.....	77

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Paradigma masalah kurang gizi yang dihadapi anak usia balita adalah defisiensi zat gizi makro, juga disertai defisiensi zat gizi mikro. Asupan energi dan zat gizi makro seperti protein yang tidak seimbang akan mengakibatkan sistem kekebalan tubuh terganggu dan berdampak terhadap menurunnya produksi zat anti bodi dalam tubuh. Penurunan zat anti bodi ini mengakibatkan mudahnya bibit penyakit masuk kedalam dinding usus dan mengganggu produksi beberapa enzim pencernaan makanan dan selanjutnya penyerapan zat-zat gizi yang penting menjadi terganggu. Penyakit infeksi dan kurang energi protein (KEP) adalah dua hal yang berhubungan sinergis. Menurut Kusharisupeni (2005) bahwa KEP berat akan menurunkan sistem imun humorai. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Schroeder (2001) bahwa sebagian besar penyebab imunodefisiensi terjadi disebabkan adanya malnutrisi protein energi (MPE) atau KEP. Jika keadaan berlanjut anak tidak mendapatkan makanan yang cukup untuk memenuhi kebutuhan dan memulihkan kesehatan serta status gizinya, maka dampaknya akan terjadi penurunan jaringan otot dan lemak. Anak akan kehilangan berat badan, kurus dan pertumbuhannya akan terhenti.

Propinsi Gorontalo merupakan salah satu daerah dari 6 propinsi di Indonesia yang masuk dalam katergori prevalensi gizi buruk dan gizi kurang diatas prevalensi nasional. Angka prevalensi gizi buruk pada anak balita masih cukup tinggi yakni pada tahun 2007 mencapai 4,71% dan pada tahun 2010 turun menjadi 4,49% dan prevalensi gizi kurang mencapai 17,05 %. Masalah gizi utama yang dihadapi adalah masalah gizi akut dengan prevalensi balita gizi kurus ditambah sangat kurus berada di atas batas yang dianggap serius (di atas 10%), dan masalah gizi kronis dengan prevalensi balita pendek dan sangat pendek yang tinggi yakni 41,15% (Depkes, 2010). Hasil survei ditemukan bahwa masalah gizi kronis yang tersebar di 6 kabupaten/kota ditemukan 3 diantaranya berada diatas 40% tertinggi 45,13%

berada di Kabupaten Gorontalo Utara. Tingginya kasus ini di Gorontalo dan beberapa propinsi lainnya di Indonesia diduga ada hubungannya dengan pola konsumsi pangan anak, status infeksi dan sanitasi lingkungan (Data Susenas, 2010).

Asupan zat gizi berupa protein dan *zinc* merupakan faktor penting yang mempengaruhi sistem imun tubuh, karena sistem imun tubuh berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel, terutama sel yang menghasilkan sel limfosit. Kekebalan tubuh seseorang dapat diukur dari kadar limfositnya baik sel T maupun sel B. Batasan kadar limfosit normal adalah sebesar 20-40% (Almatsier, 2005). Kadar limfosit menggambarkan besarnya pertahanan tubuh manusia dalam melawan segala macam benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Turunnya kadar limfosit akan mengakibatkan tubuh mudah terkena berbagai macam penyakit infeksi dan aktivitas sel dalam sistem kekebalan terhambat. Menurut Baratawidjaja (2004), restriksi energi akan menurunkan sitokin dan meningkatkan respon proliferasi sel T, sedangkan defisiensi protein akan menurunkan imunoglobulin yang ada disirkulasi. Di sisi lain defisiensi *zinc* berpengaruh pada kerusakan epitel saluran cerna dan aktivasi limfosit terutama penurunan jumlah dan fungsi limfosit, penurunan rasio limfosit T CD4⁺ dan penurunan respon antibodi limfosit B (Shakar dan Prasad, 1998; Melanie, 2009).

Sistem imun adaptif terdiri atas sistem imun humoral dan sistem imun seluler yang masing-masing diperankan oleh sel limfosit B dan sel limfosit T. Sistem imun humoral di dalam sistem pertahanan mukosa diperankan oleh imunoglobulin A tipe sekretorik (sIgA) dan bekerja lebih awal saat antigen masih berada di luar sel. Bila antigen berhasil masuk ke dalam sel, maka komponen imunitas seluler dalam hal ini sel limfosit T dengan dua subpopulasi sel yang dimiliki yaitu sel T(CD4⁺) dan sel T(CD8⁺) mulai bekerja. Fungsi sIgA ini tidak mengaktifkan sistem komplemen tetapi hanya melapisi antigen (bakteri, virus, dan parasit) dengan cara mencegah perlekatan pada lapisan epitel mukosa usus. Selain itu sIgA

mempunyai dua fungsi pertahanan yang lain yakni sebagai *intracellular neutralization*, dan *virus excretion* (Woof dan Kerr, 2007).

Kerang merupakan komoditi perairan yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Volume produksi kerang-kerangan di Indonesia pada tahun 2008 mencapai 8321 ton (KKP 2010). Kerang sebagai salah satu makanan produk hasil laut (*seafood*) yang banyak dikonsumsi manusia karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan nilai proteinnya dikategorikan *complete protein* karena kadar asam amino yang tinggi, berprofil lengkap, dan sekitar 85-95% mudah dicerna tubuh (Widowati, 2008). Oleh sebab itu kerang mempunyai prospek yang baik bagi penambahan konsumsi protein hewani di Indonesia. Kelompok kerang memiliki kandungan protein sebesar 7,06-16,78%, lemak sebesar 0,40-2,47%, karbohidrat sebesar 2,36-4,95%, dan memberikan energi sebesar 69-88 kkal/100 gram daging (Sudrajat, 2008). Aras seng tertinggi ditemukan dalam kerang-kerangan yang dapat mengandung 400 bpj (deMAN, 1997). Kerang disebut sebagai sumber *zinc* yang baik karena mengandung *zinc* lebih tinggi dibanding kandungan *zinc* pada putih telur 0,02 mg per 100 g dan pada daging ayam 1 mg per 100 gram (Widowati, 2008).

Kandungan protein dan zink yang cukup tinggi dari kerang darah, sehingga memiliki potensi terapi suplementasi bagi anak-anak kurang gizi. Konyugasi antara protein dan zink ini merupakan komponen senyawa yang berperan dalam regulasi metabolisme sel dalam tubuh. Protein akan membantu proses absorpsi zink dan selanjutnya mempengaruhi proses terbentuknya sistem imun.

1.2 Permasalahan Penelitian

Kerang darah merupakan salah satu biota laut yang sampai saat ini keberadaannya belum termanfaatkan secara optimal. Belum pernah ada dilaporkan publikasi ilmiah tentang potensi kerang darah terhadap sistem imun baik selular maupun humoral.

Selama ini pemenuhan kebutuhan protein masih terbatas pada konsumsi daging dan susu yang relatif mahal. Maka pada penelitian disertasi ini perlu dilakukan pengkajian secara ilmiah pemanfaatan kerang darah sebagai bahan pangan sumber protein dan mineral.

Oleh karena itu perlu adanya penelitian ini untuk mengkaji secara ilmiah potensi kerang darah (*Anadara granosa*) dijadikan sebagai suplemen bahan pangan terhadap peningkatan status gizi dan sistem imun.

Kebaharuan penelitian ini adalah kerang darah diharapkan dapat membuka peluang potensi bahan pangan fungsional dijadikan sebagai terapi alternatif dalam upaya pelaksanaan program pencegahan dan penanggulangan masalah gizi menjadi lebih baik, terutama bagi balita dan anak-anak yang kurang gizi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Distribusi dan Frekuensi Masalah Gizi

Masalah gizi dapat terjadi pada seluruh kelompok umur, bahkan masalah gizi pada suatu kelompok umur tertentu akan mempengaruhi pada status gizi dan periode siklus kehidupan berikutnya (*intergenerational impact*). Masa balita merupakan masa dimana terjadi pertumbuhan badan yang cukup pesat sehingga memerlukan zat-zat gizi yang tinggi di setiap kilo gram berat badannya. Dalam keadaan seperti ini anak balita justru paling sering mengalami kekurangan gizi sehingga anak balita merupakan kelompok umur yang rentan menderita kekurangan gizi (Depkes, 2010)

Prevalensi nasional Gizi Buruk pada Balita tahun 2010 yang diukur berdasarkan BB/U adalah 5,4%, dan Gizi Kurang pada Balita adalah 13,0%. Prevalensi nasional untuk gizi buruk dan kurang adalah 18,4%. Bila dibandingkan dengan target pencapaian program perbaikan gizi pada Rencana Pembangunan Jangka Menengah (RPJM) tahun 2015 sebesar 20% dan target MDGs untuk Indonesia sebesar 18,5%, maka secara nasional target-target tersebut sudah terlampaui. Namun pencapaian tersebut belum merata di 33 provinsi. Sebanyak 19 provinsi mempunyai prevalensi Gizi Buruk dan Gizi Kurang diatas prevalensi nasional, yaitu Nanggroe Aceh Darussalam (26,5%), Sumatera Utara (22,7%), Sumatera Barat (20,2%), Riau (21,4%), Jambi (18,9%), Nusa Tenggara Barat (24,8%), Nusa Tenggara Timur (33,6), Kalimantan Timur (19,2%), Kalimantan Barat (22,5%), Kalimantan Tengah (24,2%), Kalimantan Selatan (26,6%), Sulawesi Tengah (27,6%), Sulawesi Tenggara (22,7%), **Gorontalo (25,4%)**, Sulawesi Barat (16,4%), Maluku (27,8%), Maluku Utara (22,8%), Papua Barat (23,2%) dan Papua (21,2%), (Data Susenas 2010).

2.2 Kerang Darah (*Anadara granosa* L)

Kerang merupakan komoditi perairan yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Volume produksi kerang-kerangan di Indonesia pada tahun 2010 mencapai 10321 ton (KKP 2011). Kerang sebagai salah satu makanan produk hasil laut (*seafood*) yang banyak dikonsumsi manusia karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan nilai proteinnya dikategorikan *complete protein* karena kadar asam amino yang tinggi, berprofil lengkap dan sekitar 85-95% mudah dicerna tubuh. Oleh sebab itu kerang mempunyai prospek yang baik bagi penambahan konsumsi protein hewani di Indonesia.



Gambar 2.1 Kerang Darah (*Anadara granosa* L)

Hasil penelitian Nurjana, dkk (2005) dilaporkan nilai proksimat daging kerang segar adalah sebagai berikut: protein 19,48 %, air 74,37 %, abu 2,24 %, dan lemak 2,48 %. Nilai proksimat daging kerang rebus adalah: protein 23,23 %, abu 2,57 %, air 65,69 %, dan lemak 7,01 %. Sedangkan kandungan mineral seperti Zn, Cu, Fe dan Ca memiliki kadar yang bervariasi berdasarkan perlakuan pengolahan. Kerang darah mentah memiliki kandungan Zn (13,91 ppm); Cu (3,51 ppm); Fe (93,63 ppm); Ca (698,49 ppm). Perlakuan perebusan kerang dapat menurunkan kadar mineral dari daging kerang disebabkan melarutnya mineral ini dalam air rebusan.

2.3. Kebutuhan Protein dalam Tubuh

Protein merupakan senyawa makromelokul utama yang sangat dibutuhkan oleh orang dewasa maupun anak-anak. Fungsi protein adalah sebagai senyawa pembangun (struktural) dan memiliki fungsi aktivitas biologi dan kimia pada proses metabolisme dalam tubuh. Kebutuhan protein diperlukan sebagai sumber nitrogen untuk tubuh dalam pembentukan zat-zat yang mengandung N (*nitrogenous*) dan sebagai sumber asam amino esensial.

Kebutuhan akan protein dari makanan berdasarkan pada kebutuhan asam amino yang tidak dapat disintesis oleh tubuh. Berdasarkan akan hal ini kebutuhan akan asam amino dibagi menjadi asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino esensial adalah asam amino yang sangat diperlukan oleh tubuh, dan hanya dapat diperoleh makanan. Asam amino ini adalah valin, leusine, isoleusin, lysin, triptofan, metionin, treonin, histidin dan phenilalanin. Sedangkan asam amino non esensial adalah asam amino yang keberadaanya dalam sel dan disintesis oleh tubuh berdasarkan kebutuhan. Asam amino ini adalah arginin, sistein, asam glutamat, asparagin, alanin, asam aspartat, glutamin, tirosin, glisin, prolin dan serin (Linder, 2010). Sumber asam amino esensial ini berasal dari daging, ikan, telur, susu dan serealia. Jumlah relatif asam amino esensial dalam protein serupa dengan yang didapatkan dalam telur dan air susu sapi.

Selain proporsi asam amino esensial, kualitas protein juga ditentukan oleh kecernaanannya dan umumnya oleh kapasitasnya mendukung pertumbuhan. Umumnya makanan hewani mengandung protein yang kecernaanannya lebih tinggi tetapi rata-rata kurang dari 100%, yakni berkisar antara 85-100% (Reed, P.B, 1980 dalam Linder (2010).

Kebutuhan protein orang dewasa sudah ditetapkan sebanyak 0,8 g/KgBB oleh FAO/WHO. Bila berdasarkan berat badan rata-rata, maka kebutuhan per kg berat badan,

lebih besar untuk bayi dan anak-anak dan wanita hamil. Untuk balita (anak dibawah 5 tahun) kebutuhan protein adalah 2,0 g/kg/hari (Linder, 2010).

Sepertiga bagian protein darah terdapat dalam plasma dan dua pertiganya lagi merupakan protein sel darah merah yaitu haemoglobin. Protein plasma total kira-kira 5–8 gr/dl. Protein plasma merupakan bagian utama zat plasma campuran yang sangat kompleks, tidak hanya terdiri dari protein sederhana (polipeptida) tetapi juga untuk protein campuran, yang mengandung zat-zat tambahan seperti hem, karbohidrat, lipid atau asam nukleat seperti glikoprotein dan berbagai jenis lipoprotein. Sebagian besar protein tubuh berbentuk globular atau elips dan dinamakan protein globular. Umumnya larut dalam air atau larutan garam. Berbagai protein globular di klasifikasikan berdasarkan sifat kimianya sebagai berikut:

1. **Albumin** merupakan protein utama dan sederhana, mudah larut dalam air serta terdapat jumlah sedikit di dalam sel.
2. **Globulin** juga merupakan protein sederhana yang larut dalam cairan fisiologis tetapi sukar larut dalam air, sehingga terdapat jumlah besar dalam plasma dan sel.

Albumin merupakan protein yang paling banyak terdapat dalam serum, dengan kadar paling tinggi 3,5 – 5,5 g/dL atau 0,54 – 0,84 mmol/L. Albumin mempunyai berat molekul paling kecil dibandingkan molekul-molekul protein lain (BM. 69.000). Disintesis dalam hati dan merupakan suatu rantai tunggal yang terdiri dari 610 asam amino. Disamping berperan dalam tekanan osmotik koloid, albumin juga bekerja sebagai molekul pengangkut untuk bilirubin, asam lemak dan banyak obat-obatan. Penentuan status protein dalam tubuh dapat menggunakan indikator albumin Gibson (2005). Albumin merupakan indikator laboratorium yang dapat dijadikan untuk uji sensitivitas status gizi individu dan spesifik untuk intake nutrisi. Albumin memiliki *half life* yang cukup panjang yaitu 14-20 hari dan benar-benar mampu untuk menjadi marker status nutrisi kronik.

Globulin serum adalah campuran heterogen molekul- molekul protein, α , β , dan γ -globulin semuanya berdasarkan mobilitas elektroforesis. Klasifikasi didasarkan pada struktur atau fungsinya yakni mukoprotein, lipoprotein, protein pengikat logam dan Gamma (γ) Globulin. Fraksi γ - globulin serum adalah tempat utama antibodi yang beredar, yang dinamakan Imunoglobulin. Secara elekroforesis imunoglobulin (Ig) dibagi dalam 5 golongan. Diantaranya IgG yang juga dikenal sebagai γ - globulin adalah fraksi terpenting yang mengandung antibodi, terdiri kira-kira 80% dari γ - globulin.

2.4. Komponen Sistem Imun

2.4.1 Limfosit T

Limfosit adalah sel darah putih atau leukosit yang berbentuk bulat berdiameter 7-15 μm . Sel limfosit selain terdapat di dalam darah perifer, terdapat juga pada organ limfoid seperti limfa, kelenjar limfe dan thymus. Limfosit manusia berjumlah sekitar 30% dari persentasi normal sel darah putih. Sel limfosit memiliki fungsi yang kompleks dengan fungsi utama adalah memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor khusus dalam menanggapi antigen yang terikat oleh makrofag, sel limfosit mampu menghasilkan respon imun spesifik terhadap berbagai jenis antigen yang berbeda. Sel limfosit merupakan sel kunci dalam proses respon imun spesifik, Sel limfosit dapat mengenali antigen melalui reseptor antigen dan mampu membedakannya dari komponen tubuhnya sendiri. (Roitt & Delves 2001).

Limfosit T merupakan 65-80% dari total limfosit tang beredar disirkulasi darah. Limfosit T berasal dari sum-sum tulang. Tidak seperti limfosit B yang matang dalam sum-sum tulang, limfosit T bermigrasi ke kelenjar timus untuk menjadi matang. Selama proses pematangan di timus, limfosit T mengekspresikan molekul untuk mengikat antigen (*antigen binding molecule*) pada membrannya, disebut reseptor sel T (T-cell receptor). Receptor

limfosit T ini hanya dapat mengenali antigen yang terikat pada protein membran sel yang disebut molekul MHC (Major histocompatibility complex)..

Fungsi utama limfosit T adalah limfosit Th dan limfosit Tc. Limfosit T aktif mensekresi IL-2 (*T cell growth factor*), yang merangsang produksi reseptor IL-2 dan proliferasi limfosit T. Limfosit Th juga mensekresi IL-4, IL-5 dan IL-6 (*B cell growth factor*) yang meningkatkan proliferasi dan maturasi limfosit B. Limfosit Tc dapat membunuh sel host yang mengekspresikan antigen endogen dipermukaan seperti virus dan tumor. Limfosit T mempunyai rentang aktivitas yang luas antara lain: (1) mengontrol pertumbuhan limfosit B dan produksi antibodi, (2) berinteraksi dengan fagosit, membantu memusnakan patogen, dan (3) mengenal sel yang terinfeksi virus dan memusnakannya (Baratawidjaja, 2002).

Dua kelas besar limfosit T dibedakan satu dengan lain berdasarkan ekspresi petanda permukaan CD4 dan CD8. Limfosit *helper* adalah limfosit T CD4⁺, limfosit T sitotoksik adalah limfosit T CD8. CD4 dan CD8 adalah glikoprotein permukaan yang berfungsi sebagai molekul adesi dan sebagai *co-receptors* limfosit T untuk antigen. Limfosit Th (CD4⁺) mengenal antigen yang dipresentasikan pada permukaan makrofag dalam bentuk peptida-antigenik yang berbentuk kompleks dengan molekul MHC kelas II. Sel Tc (CD8⁺) mengenali antigen yang dipresentasikan dipermukaan dalam bentuk peptida-antigenik yang membentuk kompleks dengan molekul MHC kelas I (Baratawidjaja, 2002).

Limfosit Th CD4⁺ dibagi atas dua subset berdasar atas profil sitokin dan fungsi predominan (Mellors, 1999):

1. Limfosit T *helper* tipe I (Th1) memproduksi TNF- α , IFN- γ , TNF- γ , IL-2, dan mengatur reaksi hipersensitifitas lambat (tipe IV) terutama disekitar aktivasi makrofag dan imunitas yang diperantarai limfosit T (*T cell-mediated immunity*)

2. Limfosit T *helper* tipe 2 (Th2) memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10, yang ikut terlibat dalam reaksi hipersensitivitas (tipe I) dan imunitas yang diperantarai oleh antibodi sel B (*B cell antibody-mediated immunity*)

Terbentuknya limfosit Th1 dan Th2 adalah bentuk polarisasi dari respon imun spesifik yang terjadi akibat kombinasi aksi antara faktor genetik dan lingkungan, dengan menghasilkan produksi sitokin yang selektif.

Perbedaan sitokin yang dihasilkan ini menyebabkan perbedaan peran dalam hal proteksi, dan respon terhadap reaksi imunopatologi. Limfosit subset Th1 berperan terhadap mikroorganisme intraseluler sedangkan limfosit subset Th2 berperan terhadap mikroorganisme ekstraseluler. Satu fungsi yang penting dari limfosit subset Th2 adalah dapat menekan produksi limfosit subset Th1, jadi akan mengurangi kerusakan jaringan yang menyertai respon limfosit subset Th1.

2.4.2 Imunoglobulin (γ -globulin)

Imunoglobulin atau antibodi merupakan glikoprotein yang disekresi oleh sel plasma sebagai respon terhadap paparan imunogen. Antibodi ini mempunyai kemampuan untuk mengikat epitop yang merangsang pembentukan antibodi tersebut. Antibodi ini terutama berada dalam fraksi γ -globulin serum.

Antibodi adalah bahan larut jenis glikoprotein disebut globulin, dibangun dari dua rantai polipeptida berat dan dua rantai polipeptida ringan, dikenal sebagai imunoglobulin. Dibentuk oleh sel plasma dari proliferasi sel limfosit B akibat adanya kontak dengan antigen. Imunoglobulin dibagi dlm 5 kelas IgG, IgM, IgA, IgD dan IgE.

Imunoglobulin sekretori (*secretory immunoglobulin*) merupakan glikoprotein yang menyerupai musin pada bagian engsel (*hing region*) antara sub unit Fc (*constant fragment*) dan Fab (*antigen binding fragment*). Bagian ini menempati interfase antara musin dan cairan diatasnya. Bagian yang menyerupai musin berada dalam lapisan musin dan bagian molekul

imunoglobulin yang lain berada dalam lapisan cairan. Dengan demikian maka imunoglobulin sekretorik dapat membentuk lapisan selapis (*monolayer*) pada permukaan mukin sehingga merupakan mekanisme pertahanan terhadap imunogen atau patogen (Sanderson, 1999). Pembentukan immunoglobulin (Ig) ditandai dengan meningkatnya titer γ -globulin.

2.5 Peran Protein dan Zink dalam Sistem Imun

Zink mempengaruhi fungsi imun spesifik dan non spesifik pada berbagai level. Dampak defisiensi zink terhadap fungsi imun diperantarai melalui pelepasan glukokortikoid, penurunan aktivitas thymulin, dan antioksidan. Dalam bentuk imunitas nonspesifik, defisiensi zink mempengaruhi integritas hambatan epitel, fungsi neutrophil, sel pembunuh alami, monosit dan macrophag. Pada imunitas spesifik, defisiensi zink mengakibatkan terjadinya *lymphopenia* dan penurunan fungsi lymphocyte sehingga mengganggu keseimbangan *T helper cell* (Th1 dan Th2) dan produksi *cytokine*.

Meskipun telah banyak diketahui efek zink terhadap fungsi imunitas melalui percobaan hewan, beberapa studi juga telah menunjukkan bahwa status zink dapat mempengaruhi kompetensi imunitas pada orang dewasa. Sebagai contoh lansia di negara berpendapatan tinggi yang menerima zink suplemen menunjukkan perbaikan dalam gangguan *hipersensitif cutaneous*, jumlah T sel, dan serum antibodi IgG yang merespon tetanus toksoid. Studi lain adanya defisiensi zink ringan pada orang dewasa mengakibatkan penurunan serum timulin, aktivitas IL-2 dan penurunan limfosit tertentu saat deplesi zink. Keadaan ini kembali normal pada saat dilakukan replesi (penggantian) zink (WHO, 1996).

Timulin adalah hormon spesifik timus yang memerlukan zink untuk mengekspresikan aktifitas biologiknya. Timulin akan berikatan dengan afinitas kuat pada reseptor sel T, menginduksi beberapa pertanda sel T, dan meningkatkan fungsi sel T, termasuk sitotoksitas allogenik, serta meningkatkan fungsi dan produksi dari IL-12. Defisiensi zink ringan dapat

menurunkan aktivitas timulin serum dan terkoreksi dengan suplementasi zink secara *in vivo* maupun *in vitro*. Aktivitas sel NK juga sensitif terhadap restriksi zink, hal tersebut menunjukkan bahwa zink sangat berperan penting terhadap fungsi dari sel T pada manusia. Keadaan defisiensi zink menyebabkan sitokin Th-1 menurun, tetapi tidak mempengaruhi sitokin Th-2, dan terjadi pergeseran fungsi Th-1 ke Th-2. Penurunan zink mempengaruhi ekspresi gen dan generasi sitokin TNF- α , IL-1 β , dan IL-8.

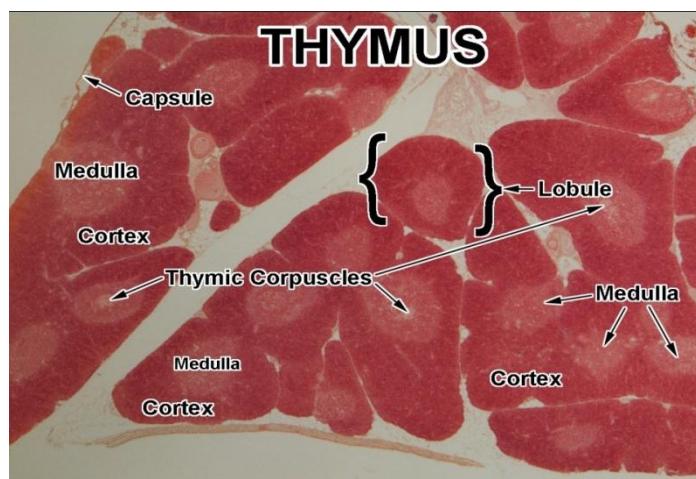
Pada keadaan infeksi dan proses peradangan akan terjadi peningkatan drastis kadar C-reaktif protein (CRP) yang merupakan protein fase akut, selain itu juga akan terjadi peningkatan leukosit atau sel darah putih yang berfungsi sebagai pertahanan pertama pada proses peradangan (Roitt, 2007). Peningkatan kadar CRP dalam plasma juga akan mengikat virus atau kuman yang mengandung fosfatidilkolin dalam membrannya, sehingga terjadilah kompleks CRP membran fosfatidilkolin yang akan mengaktifkan sistem komplemen. Sehingga terjadilah deposit C3b dipermukaan melalui konvertasa dengan C5, C5a-C5b, C6,7,8,9 akibatnya permeabilitas membran vaskuler meningkat, hal tersebut akan mengaktifkan magrofag dan mengakibatkan virus atau kuman menjadi lisis atau tercerna oleh magrofag. Jadi peningkatan CRP dapat juga mencerminkan terbentuknya *innate immunity* (imunitas alamiah) Mekanisme peran zink dan protein terlihat pada *zn-finger* yang mekanismenya reversibel pada kadar zink yang cukup, peningkatan pool zink dapat memicu sintesis metalotionin sel usus yang dapat mengikat kelebihan zink intraseluler. Setelah masuk ke dalam eritrosit, zink diikat oleh protein intestinal kaya sistein (*cystein rich intestinal protein-CRIP*) yang memindahkan zink ke metalotionin atau melintasi sisi serosa enterosit untuk berikatan dengan protein plasma (albumin) masuk kesirkulasi portal dan terkonsentrasi di hati. Komponen plasma lain yang mengandung zink yaitu alfa-2 makroglobulin, transferin, dan asam amino khususnya sistein dan histidin (Prasad, 2007).

2.6 Histologi Timus

Kelenjar timus adalah salah satu dari organ dalam tubuh, di kedokteran dikenal sebagai organ limfoid. Organ ini bertugas memproduksi sel-sel yang sering ditemukan dalam darah, namun juga membuat sel yang sering ditemukan di jaringan-jaringan dalam tubuh. Kelenjar timus terletak di belakang tulang dada, di depan jantung, berupa organ pipih berbentuk segitiga dengan alasnya menghadap ke leher. Kelenjar timus merupakan sumber sel limfosit yang dikenal sebagai sel limfosit T (limfosit yang berasal dari kelenjar timus). Sel limfosit T ini sangat sensitif terhadap antigen yang masuk (baik berasal dari virus, bakteri atau zat-zat lainnya). Salah satu reaksi dari sel-sel limfosit di kelenjar timus bila tubuh kemasukan antigen, adalah berproliferasi atau memperbanyak diri dengan melakukan pembelahan. Limfosit T ini merupakan komando dan pengendali aparat ketahanan tubuh. Pertumbuhan kelenjar timus sangat dipengaruhi oleh usia, hormon dan penyakit.

Besar timus sangat bervariasi, ukuran relatif yang paling besar pada hewan yang baru lahir sedangkan ukuran absolutnya terbesar pada waktu pubertas. Setelah dewasa timus mengalami atrofi dari parenkhima dan korteks diganti oleh jaringan lemak. Timus yang mengalami atrofi cepat merupakan reaksi terhadap stres, sehingga hewan yang mati sesudah menderita sakit yang lama mungkin mempunyai timus yang sangat kecil (Tizard 1987). Timus dikelilingi oleh jaringan ikat yang berupa kapsula yang berhubungan dengan septa tipis yang membaginya secara tidak sempurna menjadi lobulus. Bagian tengah tiap lobulus disebut medulla sedangkan bagian tepinya disebut korteks. Korteks timus paling utama terdiri dari retikulum epitel dan limfosit. Sel epitel stelata memiliki inti lonjong, besar dan pucat dengan penjuluran bercabang panjang yang mengandung banyak filament mikro, dan saling berhubungan kuat melalui desmosom, organel tidak jelas. Sel-sel epitel membentuk balutan berkesinambungan pada tepi lobulus dan sekitar ruang perivaskular. Ini merupakan bagian penting dari barier antara darah dan timus (Dellman 1989). Pada bagian medulla ada beberapa sel-sel epitel retikuler yang memiliki struktur yang sama dengan korteks, meskipun yang lain jauh lebih besar dan keadaan

epitel lebih jelas. Medulla lebih banyak mengandung mitokondria, RER (*Reticulum Endoplasmic rough*) yang lebih ekstensif, apparatus golgi dan butir-butirnya memberikan aktivitas sekresi. Sel-sel epitel medulla khas membentuk benda-benda timus atau benda *Nissl*, terdiri dari satu atau beberapa sel-sel yang mengalami degenerasi atau berkapur, dikelilingi oleh sel-sel pipih bertanduk dengan susunan konsentris yang mengandung banyak desmosom dan berkas filament mikro. Sel-sel jalinan retikuler adalah limfosit kecil dengan sedikit makrofag (Dellman 1989).



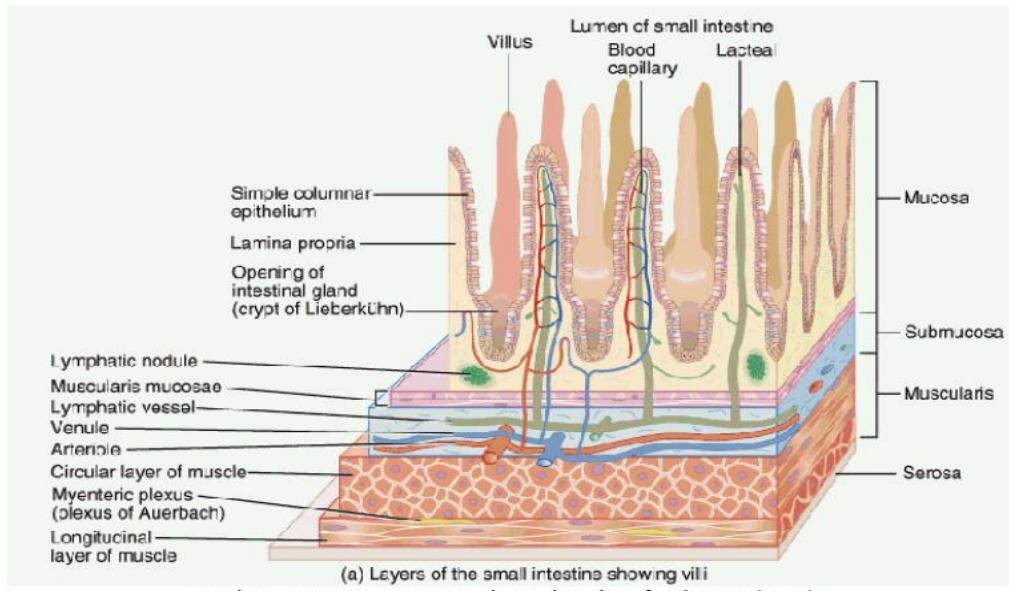
Gambar 2.2 Organ Timus Normal (Anonimus 2008h)

Pada hewan umur muda, timus bersifat sangat aktif yang secara normal mengalami involusi menjelang pubertas dengan bertambahnya umur. Proses involusi ditandai dengan berkurangnya secara bertahap limfosit terutama di daerah korteks, pembesaran dari sel-sel epitel retikuler dan parenkim diganti oleh sel-sel lemak. Pada hewan dewasa, timus terdiri dari jalur-jalur tipis parenkim di mana banyak sel-sel retikuler epitel membesar yang dikelilingi jaringan lemak (Dellman 1989). Timus juga menjamin lingkungan dimana sel bibit (*stem cells*) yang bermigrasi dari sumsum tulang pascanatal berproliferasi serta berdiferensiasi menjadi limfosit T. Proses ini didorong oleh beberapa bahan kimia berupa polipeptida yang dihasilkan oleh sel-sel epitel retikuler, keadaan sebenarnya dari proses ini

tidaklah jelas. Limfosit T menjadi bagian darah dengan migrasi melalui endotel venula pasca kapiler yang selanjutnya menetap dalam daerah timus dependen dalam organ limfatik. Sel ini adalah limfosit umur panjang yang memiliki antigen permukaan (Dellman 1989).

2.7 Mukosa Usus Pencernaan

Usus halus merupakan bagian dari saluran pencernaan manusia yang terletak di antara lambung dan usus besar. Dinding usus halus kaya akan pembuluh darah yang mengangkut zat-zat nutrisi menuju hati melalui vena porta. Fungsi usus antara lain untuk proses pencernaan makanan, penyerapan zat gizi, dan pertahanan terhadap serangan dari luar. Komponen pertahanan usus terdiri dari atas tiga jenis yaitu mikrobiota, pertahanan mukosa, dan sistem imun internal (Bourlioux *et al.* 2002). Usus halus terdiri dari duodenum, jejunum, dan ileum. Duodenum pada manusia memiliki panjang sekitar 25 cm terikat erat pada dinding dorsal abdomen dan sebagian besar terlatak retroperitoneal. Jalannya berbentuk seperti huruf C yang mengitari pankreas dan ujung distalnya menyatu dengan jejunum yang terikat pada dinding dorsal rongga melalui mesenterium. Jejunum dapat bergerak bebas pada mesenteriumnya dan merupakan dua-perlima bagian proksimal usus halus. Sedangkan ileum merupakan sisa tiga-perlimanya. Ileum adalah bagian akhir dari usus halus, bentuk vilinya seperti ibu jari dengan jumlah kelenjar Liberkun yang sedikit. Ileum memiliki lebih sedikit sel goblet namun dilengkapi dengan jaringan limfatik yang besar yaitu daun Peyer (Jonqueira & Carneiro 2005; Samuelson 2007). Dinding usus halus terdiri atas empat lapis konsentris yaitu mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa (Leeson *et al.* 1996)



Sumber : DOTE Anatomy Topics, University of Debrecen (2008).

Gambar 2.3 Histologi Usus Halus yang menunjukan Vili dan Lapisan Mukosa

Lapisan mukosa terdiri dari lamina epitel, lamina propria, dan muskularis mukosa. Bentuk mukosa tersusun dari tonjolan berbentuk jari yang disebut vili. Vili usus halus manusia memiliki tinggi 0.5-1.5 mm, terbentuk di permukaan mukosa yang digunakan untuk memperluas permukaan. Vili tersusun atas kumpulan sel epitel silindris sebaris yang berjejer dan jaringan ikat longgar lamina propria. Sel epitel manusia memiliki mikrovili di permukaannya dengan panjang 1 μm dan diameter 0.1 μm . Mikrovili berfungsi untuk menyerap nutrisi (Jonqueira & Carneiro 2005). Kerusakan mikrovili dan atropi vili usus halus dapat mengganggu penyerapan nutrisi (*malabsorption syndrome*). Di bagian bawah vili, baik pada manusia maupun hewan (mamalia dan unggas) terdapat kripta dan kelenjar Liberkun yang terdiri atas stem sel, sel goblet, sel Panet, dan enteroendokrin sel (Jonqueira & Carneiro 2005; Samuelson 2007). Permukaan mukosa dilindungi oleh banyak mekanisme pertahanan yang memastikan perlindungan yang efektif dengan memproduksi imunoglobulin A (IgA), mukus, dan kriptoprotektif peptida. Mikroorganisme dapat mempengaruhi struktur mukosa, fungsi, dan perkembangan sistem imun (Herich dan Levkut 2002).

sIgA adalah imunoglobulin utama yang ditemukan di saliva dan sekresi seromukous lainnya seperti di saluran pencernaan. Terdapat dua subkelas IgA1 dan IgA2 yang distribusikan berlainan di dalam cairan tubuh. IgA1 predominan dalam serum, sedangkan IgA2 ditemukan dalam kadar tinggi di dalam sekresi eksternal termasuk disaliva hingga mencapai 50% (Sufiawati,2007). IgA1 lebih banyak diarahkan untuk mengatasi antigen protein sementara IgA2 untuk mengenali polisakarida (Cole & Lydyard, 2006).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan khusus penelitian ini adalah menjelaskan dan menganalisis potensi suplementasi kerang darah (*Anadara granosa*) dalam meningkatkan sistem imun seluler dan humorai tikus betina (*Rattus norvegicus*) strain Spraque dawley kurang gizi, yang dijabarkan sebagai berikut:

1. Menganalisis potensi kerang darah terhadap peningkatan sistem imun seluler dengan pengukuran jumlah limfosit T(CD4⁺) tikus kurang gizi.
2. Menganalisis potensi kerang darah terhadap peningkatan sistem imun humorai dengan pengukuran kadar γ -globulin tikus kurang gizi.
3. Menganalisis potensi kerang darah dalam memperbaiki struktur korteks dan medula timus tikus kurang gizi.
4. Menganalisis potensi kerang darah dalam memperbaiki kerusakan vili dan ketebalan mukosa usus tikus *R. Norvegicus* kurang gizi.
5. Menganalisis potensi kerang darah dalam meningkatkan sIgA mukosa usus (jejunum dan ileum) tikus kurang gizi dengan metode imunohistokimia.

3.2 MANFAAT PENELITIAN

1. Secara ilmiah penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dengan penjelasan ilmiah tentang pemanfaatan kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai salah satu bahan pangan yang dapat meningkatkan sistem imun seluler dan humorai tubuh.
2. Secara praktis sebagai bahan pertimbangan dalam tatalaksana gizi untuk balita yang mengalami gizi kurang dan gangguan pertumbuhan.

3. Di sisi lain akan dapat membuka peluang usaha bagi masyarakat lokal untuk mengembangkan budidaya kerang darah dan pengembangan pengolahan hasil bahan pangan ini, sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan pendapatan masyarakat.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Dan Rancang Bangun Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian Ekperimental laboratorik dengan disain penelitian *Randomized Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian

4.2. Lokasi Penelitian

1. Uji kode etik (*Ethical clearance*) dilakukan di Fakultas Kesehatan Masyarakat (FKM) Universitas Airlangga
2. Pemeliharaan tikus percobaan di Laboratorium kandang Seafast IPB Bogor
3. Pemeriksaan kadar albumin, limfosit T, γ -Globulin, dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FK UI Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo
4. Pemeriksaan histologi organ timus dan imunohistokimia sIgA mukosa usus tikus percobaan (jejunum-ileum) dilakukan di Laboratorium Patologi dan Anatomi Pusat Studi Primata Bogor

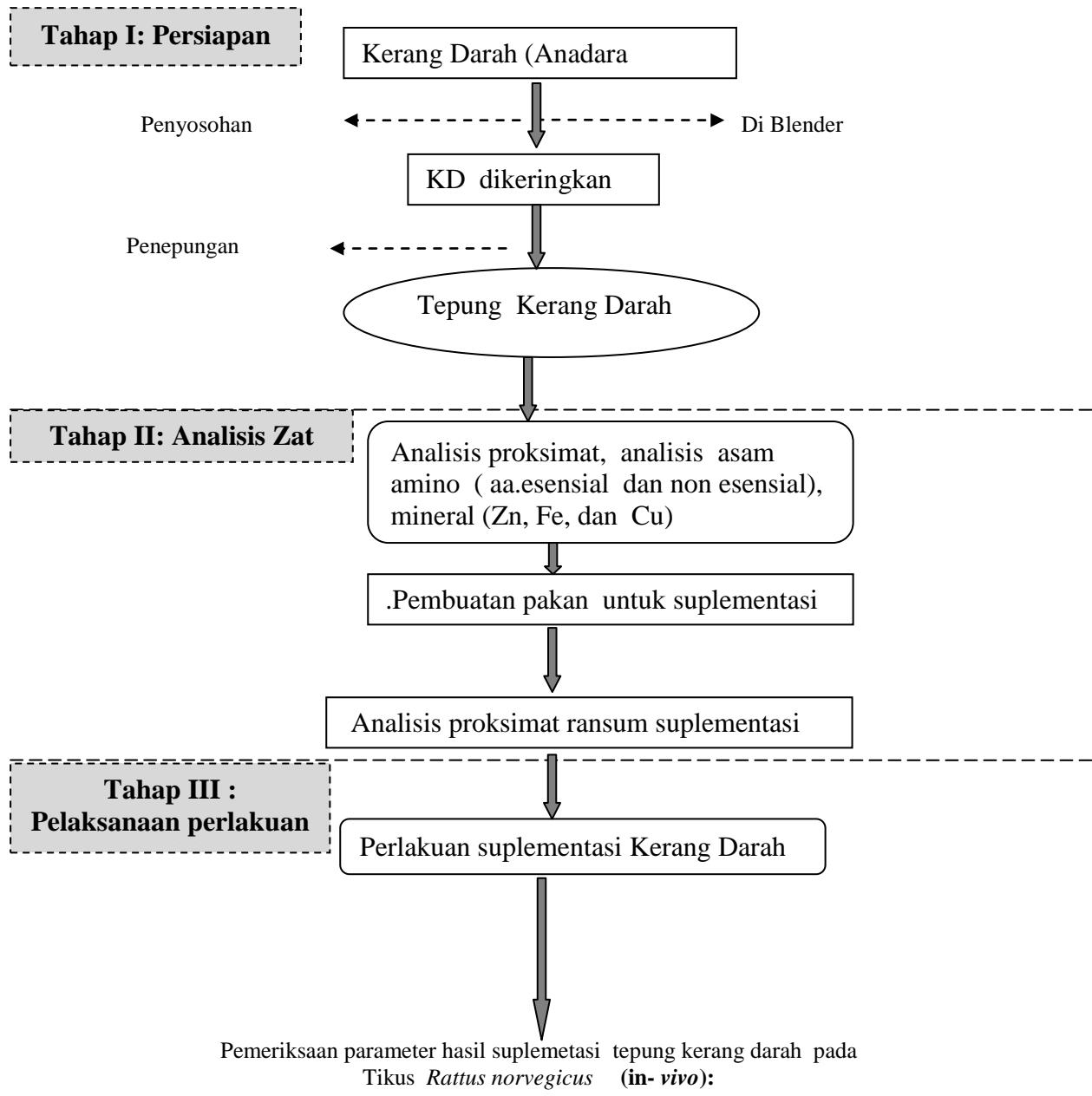
4.3. Bahan

- a. Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian adalah kerang darah species *Anadara granosa Linn* yang diperoleh dari pesisir pantai utara teluk Tomini Propinsi Gorontalo.
- b. Tikus putih (*Rattus novergicus*) strain *Sprague Dawley* betina umur 3-4 minggu berat badan 75-105 gram sebanyak 40 ekor. Pakan standar/normal (kontrol positif) produksi BDH Chem. LTD, London. Pakan diet non protein (kontrol negatif).
- c. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisis berasal dari *E-Merk, Sigma Aldrich, Gibco BRL*.

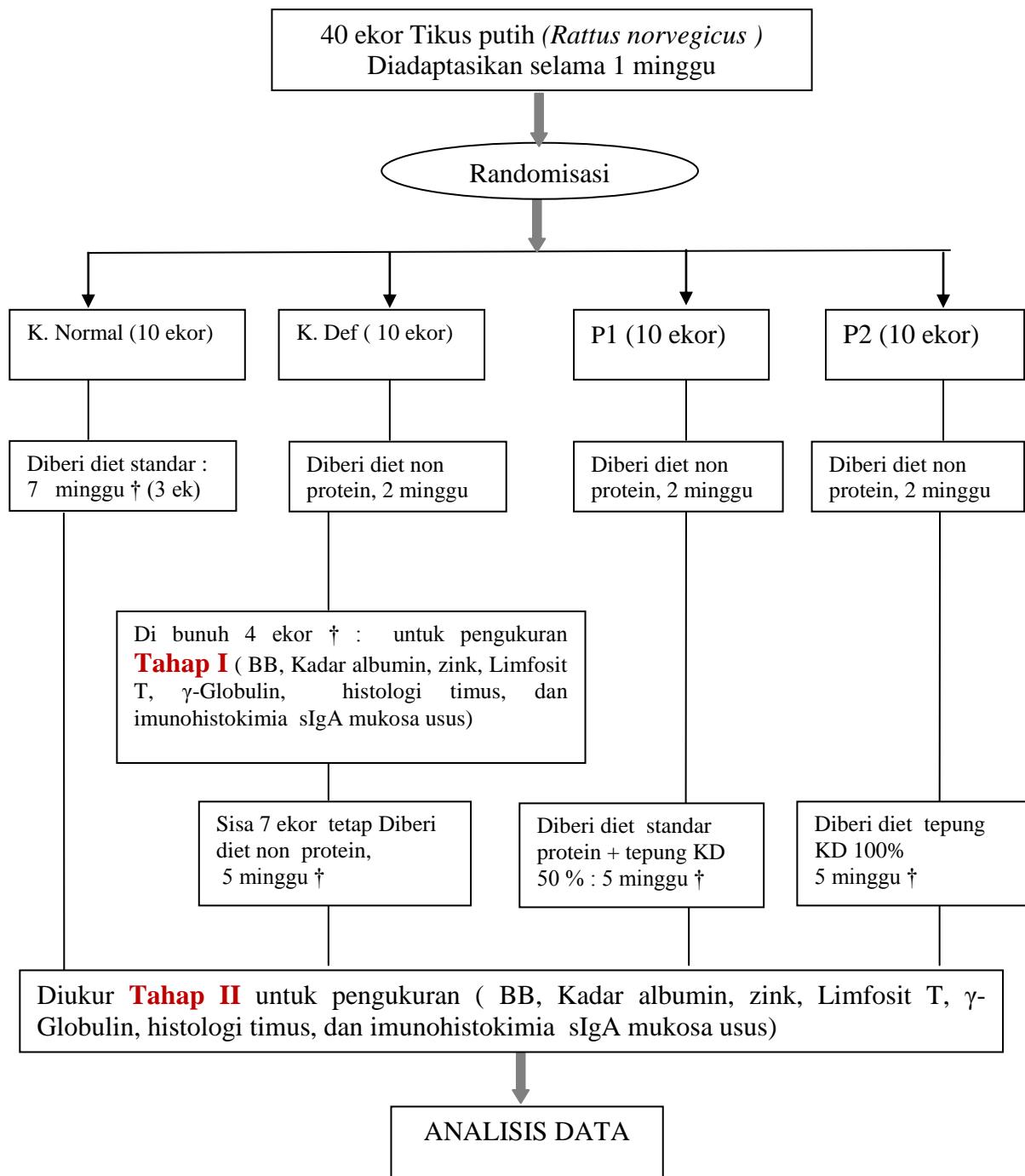
4.4. Tahapan Penelitian

Penelitian dibagi menjadi 3 (tiga) bagian penelitian yaitu 1) Persiapan sampel dan analisis komposisi kimia yang meliputi kadar proksimat, asam amino, asam lemak dan kandungan mineral daging kerang darah, 2) Penyusunan ransum dan analisis proksimat ransum percobaan dan pembuatan tikus percobaan kurang gizi 3) Mengevaluasi potensi tepung kerang darah secara *in vivo* pada tikus percobaan yang dibuat dalam kodisi kurang gizi. Penelitian tahap ketiga menjadi tujuan diajukannya penelitian hibah doktor ini.

Secara lengkap gambaran penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian



Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian

Kerang darah yang memiliki kandungan protein dan zink yang tinggi diharapkan mampu meningkatkan sistem imun seluler dan humoral tikus betina (*Rattus norvegicus*) kurang gizi. Parameter pengukuran secara makroskopis dan mikroskopis tikus percobaan. Secara makroskopis melihat pola makan, berat badan dan histologi organ timus. Evaluasi mikroskopis meliputi Pengukuran Albumin , γ -Globulin, dan limfosit T dengan metode **fluorocytometry** instrument **Cobas Mira Plus**. Profil histologi Timus dengan **pewarnaan HE** dan **sIgA mukosa usus** (jejunum-ileum) tikus pecobaan melalui metode imunohistokimia (IHK). Metoda IHK menggunakan antibodi Primer **Policlonal goat anti rat sekretori IgA**.

BAB 5 **HASIL DAN PEMBAHASAN**

5.1 HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian disertasi tahap pertama telah menghasilkan tepung kerang darah dengan komposisi kimia daging kerang darah terdiri dari kadar air 9,47% (bk), abu 10,62% (bk), lemak total 2,54% (bk), serat 2,10% (bk), karbohidrat 48,01% (bk) dan protein total 27,26% (bk). Kandungan mineral terdiri dari Ca 318,67 ppm , Cu 4,26 ppm , Fe 1.720,46 ppm , Zn 81,16 ppm. Daging komplet kerang darah mengandung 14 asam amino yang terdiri atas 9 asam amino esensial dan 5 asam amino non esensial. Kandungan asam amino yang paling tinggi pada kerang darah adalah asam amino glutamat dengan nilai 3,79% . Asam amino esensial seperti Arginin 2,02%, metionin 0,35%, leusin 1,72%, isoleusin 0,95%, valin 1,07%, dan histidin 0,22%. Asam lemak yang tertinggi adalah asam palmitat dengan nilai 45,310%. Asam lemak esensial seperti asam lemak oleat 31,941%, dan asam lemak (omega 3) dengan nilai 3,642%. Pembuatan tikus percobaan malnutrisi (kurang gizi) dengan kondisi kadar albumin < 3 µg/dL.

Untuk menguji potensi kerang darah terhadap sistem imun seluler dan humoral secara in-vivo tikus percobaan pada kondisi kurang gizi yang diberi ransum non gizi sebagai **tahapan penelitian ketiga yakni** menganalisis jumlah limfosit T CD4+, kadar γ -globulin dan prosedur IHK untuk mendeteksi antibodi sIgA di mukosa usus (bagian jejunum dan ileum) serta gambaran perbaikan timus dan krusuran vili di mukosa usus.

Hasil akhir penelitian ini berupa data yang menggambarkan jumlah sel limfosit T(CD4 $^{+}$), kadar γ -globulin, albumin dan zinc serum. Pengamatan histologi timus melalui pengukuran ketebalan korteks dan diameter medula. Sedangkan untuk pengamatan histologi usus halus yang terdiri dari jejunum dan ileum pengukurannya meliputi persentase (%) kerusakan vili usus dan ketebalan mukosa usus. Data yang didapat dari hasil semua pengukuran variabel disusun sebagai rancangan acak lengkap yang dianalisis dengan

ANOVA. Apabila perlakuan memberikan pengaruh yang signifikan pada tingkat kemaknaan ($p<0,05$), maka dilanjutkan dengan uji beda lanjut *Duncan* untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda satu sama lain. Untuk mendeteksi kandungan sIgA di mukosa usus di jejunum dan ileum dilakukan dengan metode imunohistokimia. Hasil pewarnaan imunohistokimia dalam bentuk fotomikrograf di amati secara kualitatif dan dilakukan analisis secara deskriptif.

Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk narasi yang disertai dengan grafik dan gambar yang disusun sesuai dengan tujuan penelitian yaitu:

1. Menganalisis potensi kerang darah terhadap peningkatan sistem imun seluler dengan pengukuran jumlah limfosit T($CD4^+$) tikus kurang gizi.
2. Menganalisis potensi kerang darah terhadap peningkatan sistem imun humorai dengan pengukuran kadar γ -globulin tikus kurang gizi.
3. Menganalisis potensi kerang darah dalam memperbaiki profil histologi timus tikus kurang gizi.
4. Menganalisis potensi kerang darah dalam meningkatkan sekretori imunoglobulin A (sIgA) mukosa usus (jejunum dan ileum) tikus kurang gizi dengan metode imunohistokimia.

5.1.1 Hasil Analisis Jumlah Limfosit T ($CD4^+$) Tikus Percobaan

Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung kerang darah terhadap jumlah limfosit T ($CD4^+$) dan kadar γ -globulin, pada masing-masing perlakuan tikus percobaan disajikan pada tabel 5.1. Hasil penelitian ini berdasarkan uji statistik dengan data berdistribusi normal dan homogen.

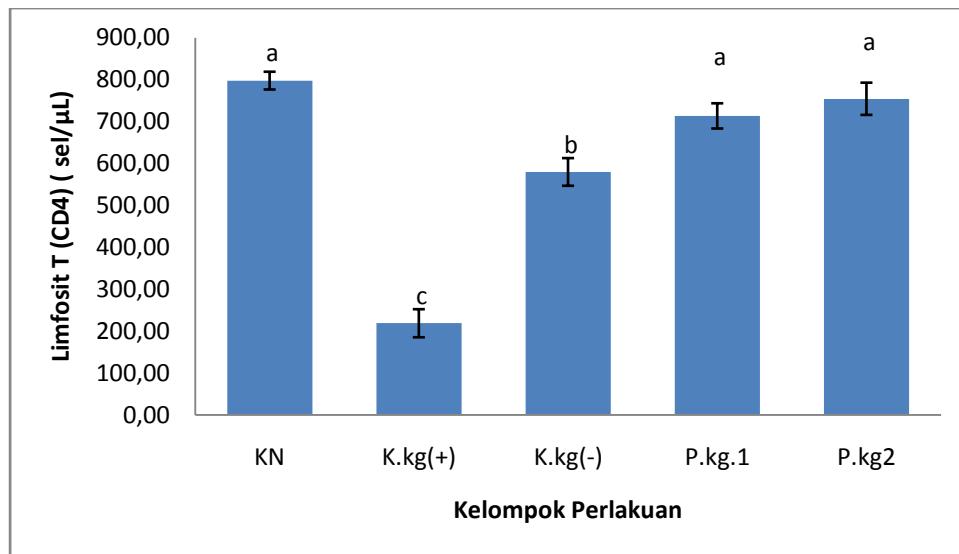
Tabel 5.1. Rerata dan Standar Deviasi Limfosit T (CD4⁺), γ - Globulin, Tikus Percobaan Setelah Perlakuan

Perlakuan	Rata-rata dan Standar Deviasi			
	Limfosit T (CD4 +) (sel/ μ L)*	P signifikansi	γ -Globulin (g/dL)*	P signifikansi
KN	797,667±21,172	0,0001	1,308±0,066	0,0001
K.kg (+)	219,000±23,461		0,377±0,059	
K.kg (-)	579,833±22,982		1,027±0,134	
P.kg 1	713,500±110,059		1,143±0,128	
P.kg 2	754,333±108,428		1,210±0,097	

*) Nilai Signifikan Jumlah Limfosit T(CD4⁺) p= 0,0001; γ -Globulin p=0,0001; (α = 0,05).

Analisis awal penelitian untuk kelompok kurang gizi memiliki rata-rata jumlah limfosit T (CD4⁺) sebesar 400 sel/ μ L, sedangkan pada kelompok tikus percobaan (normal/sehat) mempunyai kadar limfosit T (CD4⁺) sebesar 746 sel/ μ L. Jumlah limfosit T (CD4⁺) normal dalam darah manusia adalah 410-1590 sel/ μ L. Analisis jumlah limfosit T (CD4⁺) tikus percobaan disajikan pada gambar 5.3. Gambar 5.3 menunjukkan bahwa rata-rata limfosit tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol normal (KN) sebesar 797,67 sel/ μ L, diikuti perlakuan pemberian tepung kerang darah (P.kg2) sebesar 754,33 sel/ μ L. Kelompok perlakuan pemberian kasein dan tepung kerang darah P.kg1 sebesar 713,5 sel/ μ L, kelompok perlakuan pemberian kasein K.kg(-) sebesar 579,83 sel/ μ L dan terendah pada kelompok perlakuan pemberian ransum non protein K.kg(+) sebagai kontrol positif sebesar 219 sel/ μ L.

Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, maka pemberian ransum P.kg1 dan E) mampu menaikkan jumlah limfosit T (CD4⁺). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap kenaikan jumlah limfosit T (CD4⁺) tikus kurang gizi. Gambar perubahan kenaikan jumlah limfosit T (CD4⁺) pada masing-masing perlakuan disajikan pada gambar 5.3.



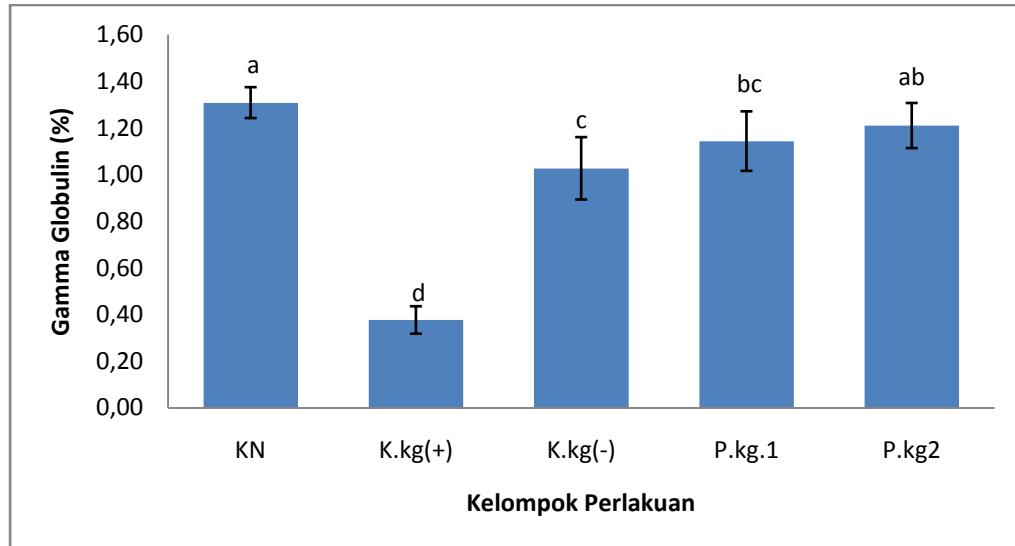
Gambar 5.1 Jumlah Limfosit T (CD4⁺) pada Kelompok Perlakuan Tikus Percobaan

Huruf di atas diagram pada gambar 5.1 menunjukkan beda bermakna jika huruf berbeda berdasar uji *Duncan* pada $\alpha = 0,05$. Hasil uji lanjut *Duncan* menunjukkan bahwa perlakuan KN tidak memberikan perbedaan yang nyata dengan perlakuan P.kg1 dan P.kg2. Sedangkan bila dibandingkan dengan kontrol positif K.kg (+) memberikan perbedaan yang nyata dengan perlakuan K.kg (-). Hal ini menunjukkan bahwa meningkatnya jumlah limfosit T (CD4⁺) disebabkan oleh pemberian tepung kerang darah maupun kombinasinya dengan kasein.

5.1.2 Hasil Analisis Kadar γ - Globulin Tikus Percobaan

Analisis awal penelitian untuk kelompok kurang gizi memiliki rata-rata kadar γ - globulin 0,45 g/dL, sedangkan pada kelompok tikus percobaan (normal/sehat) mempunyai kadar γ - globulin sebesar 1,2 g/dL. Kadar γ - globulin normal dalam darah manusia adalah 0,7–1,7 g/dL atau 11– 18 % (Sheehan, 1990). Analisis kadar γ - globulin tikus percobaan disajikan pada gambar 5.2. Gambar 5.2 menunjukkan bahwa rata-rata kadar γ - globulin tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol normal (KN) sebesar 1,31 g/dL, diikuti perlakuan pemberian tepung kerang darah (P.kg2) sebesar 1,21 g/dL, kelompok perlakuan yang diberi kasein

dan tepung kerang darah P.kg1 sebesar 1,14 g/dL, kelompok perlakuan yang diberi kasein K.kg(-) sebesar 1,03 g/dL dan terendah pada kelompok perlakuan pemberian ransum non protein K.kg(+) sebagai kontrol positif sebesar 0,38 g/dL.



Gambar 5.2 Kadar γ - Globulin pada Kelompok Perlakuan Tikus Percobaan

Huruf di atas diagram menunjukkan beda bermakna jika huruf berbeda berdasar uji *Duncan* pada $\alpha = 0,05$. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, maka pemberian ransum (P.kg1 dan P.kg2) mampu menaikkan kadar γ - globulin. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap kenaikan kadar γ - globulin tikus kurang gizi. Gambar perubahan kenaikan kadar γ - globulin pada masing-masing perlakuan disajikan pada gambar 5.2.

Hasil uji lanjut *Duncan* menunjukkan bahwa perlakuan KN tidak memberikan perbedaan yang nyata dengan perlakuan P.kg2. Pemberian tepung kerang darah (P.kg2) tidak memberikan perbedaan yang nyata dengan kelompok kurang gizi yang di beri kombinasi kasein dan tepung kerang darah P.kg1. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh kelompok perlakuan K.kg(-) yang tidak memberikan perbedaan yang nyata dengan P.kg1. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh perlakuan K.kg(+)

yang menunjukkan perbedaan yang nyata dengan perlakuan K.kg(-). Dapat disimpulkan bahwa meningkatnya kadar γ -globulin tikus percobaan dalam kondisi kurang gizi, dapat disebabkan oleh adanya pemberian tepung kerang darah maupun kombinasinya dengan kasein.

5.1.3 Hasil Pengamatan Histologis Timus

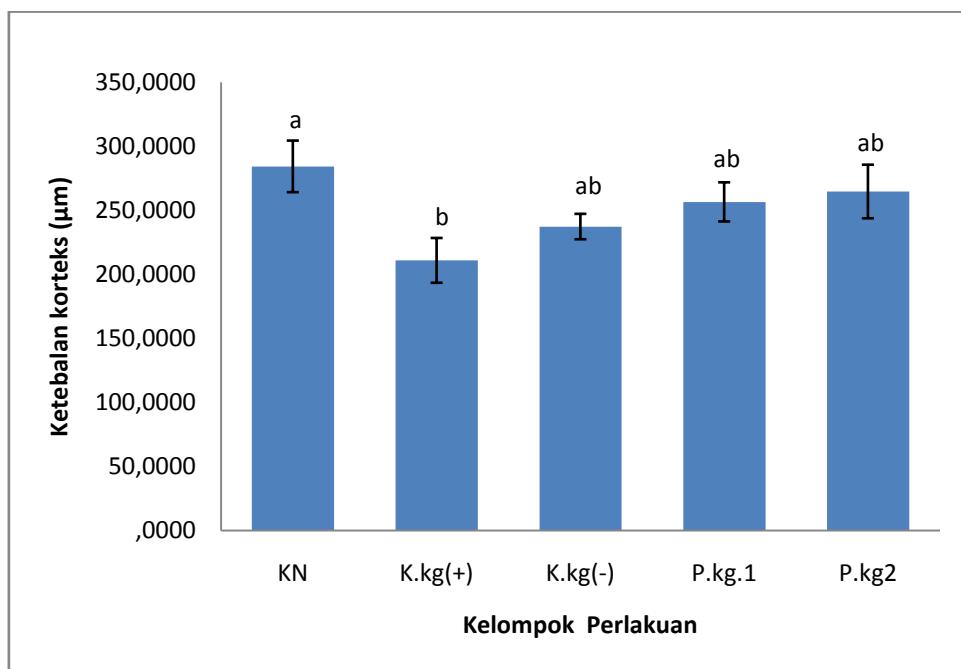
Pengamatan organ timus merupakan salah satu variabel yang diamati dalam bentuk gambaran mikroskopik sediaan histologi dengan pengecatan Hematoksilin-Eosin. Pengamatan sediaan histologi timus meliputi pengukuran ketebalan korteks dan diameter medula timus pada tiap-tiap perlakuan tikus percobaan. Tabel 5.2. menjelaskan bahwa ukuran ketebalan korteks timus pada masing-masing perlakuan menujukkan nilai tertinggi pada kelompok perlakuan kontrol normal (KN) yakni $284,30\mu\text{m}$, dan terendah pada kelompok perlakuan K.kg(+) yakni $217,88\mu\text{m}$. Perlakuan P.kg1 adalah $232,57\mu\text{m}$ sedikit lebih rendah dari perlakuan P.kg2 yakni $264,67\mu\text{m}$, dan kelompok perlakuan K.kg(-) adalah $237,31\mu\text{m}$, sedikit lebih tinggi dari perlakuan P.kg1.

Tabel 5.2. Rerata dan Standar Deviasi Ukuran Ketebalan Korteks dan Diameter

Medula Timus Tikus Percobaan

Perlakuan	Rata-Rata dan Standar Deviasi Ketebalan Korteks Timus (μm)	P signifikansi	Rata-Rata Diameter Medulla Timus (μm)	P signifikansi
KN	$284,30 \pm 20,149$	0,042	$290,049 \pm 40,538$	0,004
K.kg (+)	$217,88 \pm 17,492$		$503,322 \pm 26,609$	
K.kg (-)	$237,31 \pm 9,928$		$381,504 \pm 37,828$	
P.kg 1	$232,57 \pm 15,278$		$333,646 \pm 24,363$	
P.kg 2	$264,67 \pm 20,933$		$354,508 \pm 25,715$	

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap ketebalan korteks timus tikus kurang gizi. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa perlakuan KN dan P.kg2 memberikan perbedaan yang nyata dengan perlakuan pemberian ransum non protein K.kg(+). Begitu juga perlakuan kontrol normal (KN) tidak memberikan perbedaan yang nyata pada kelompok kurang gizi yang diberi ransum kasein K.kg(-) dan kelompok kurang gizi yang diberi kombinasi kasein dan tepung kerang darah P.kg1. Hal yang sama juga ditunjukkan kelompok perlakuan K.kg(+) tidak memberikan perbedaan yang nyata dengan kelompok K.kg(-), meskipun nilainya sedikit lebih rendah. Disimpulkan bahwa pemberian tepung kerang darah maupun kombinasinya dengan kasein ke dalam ransum tikus percobaan dapat mengembalikan ukuran ketebalan korteks timus tikus percobaan kurang gizi seperti yang digambarkan oleh tikus kelompok kontrol normal.

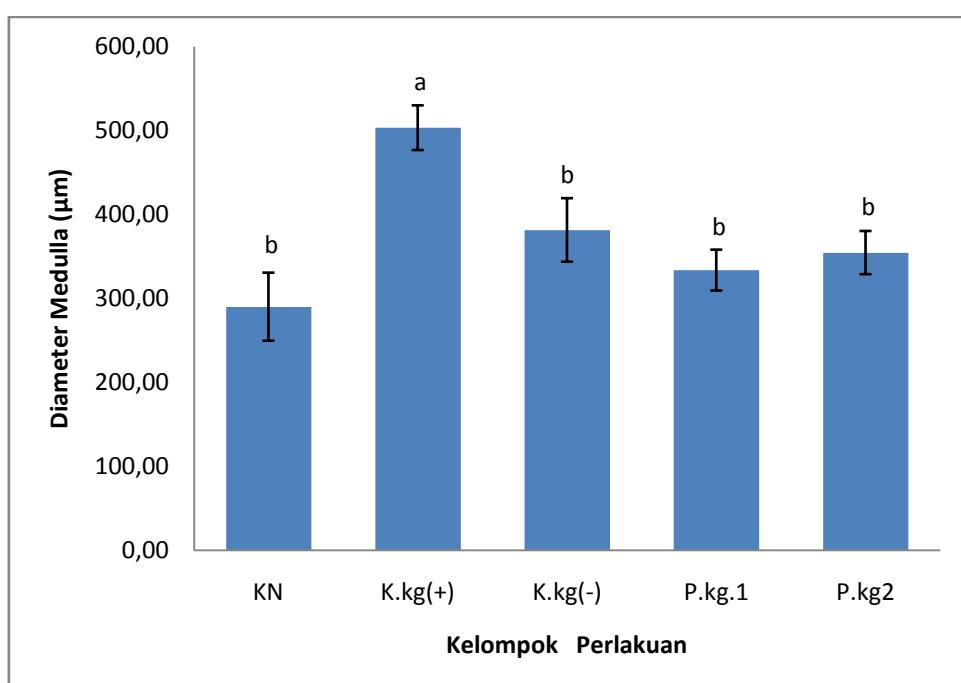


Gambar 5.3 Hasil Pengukuran Ketebalan Korteks Timus pada Kelompok Perlakuan Tikus Percobaan.

Huruf di atas diagram menunjukkan beda bermakna jika huruf berbeda berdasar uji *Duncan* pada $\alpha=0,05$. Selanjutnya untuk mengetahui rata-rata pengaruh pemberian tepung

kerang darah terhadap perubahan diameter medula timus tikus percobaan pada masing-masing perlakuan di sajikan pada tabel 5.2. Tabel 5.2 menunjukkan bahwa ukuran diameter medula timus pada masing-masing perlakuan menunjukkan nilai tertinggi pada kelompok perlakuan K.kg(+) yakni $503,23\mu\text{m}$, dan terendah pada kelompok perlakuan KN yakni $290,05\mu\text{m}$. Perlakuan P.kg1 adalah $333,65\mu\text{m}$ sedikit lebih rendah dari perlakuan P.kg2 yakni $354,51\mu\text{m}$, dan kelompok perlakuan K.kg(-) yakni $381,50\mu\text{m}$, sedikit lebih tinggi dari kelempok perlakuan P.kg2.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap ukuran diameter medula tikus kurang gizi.

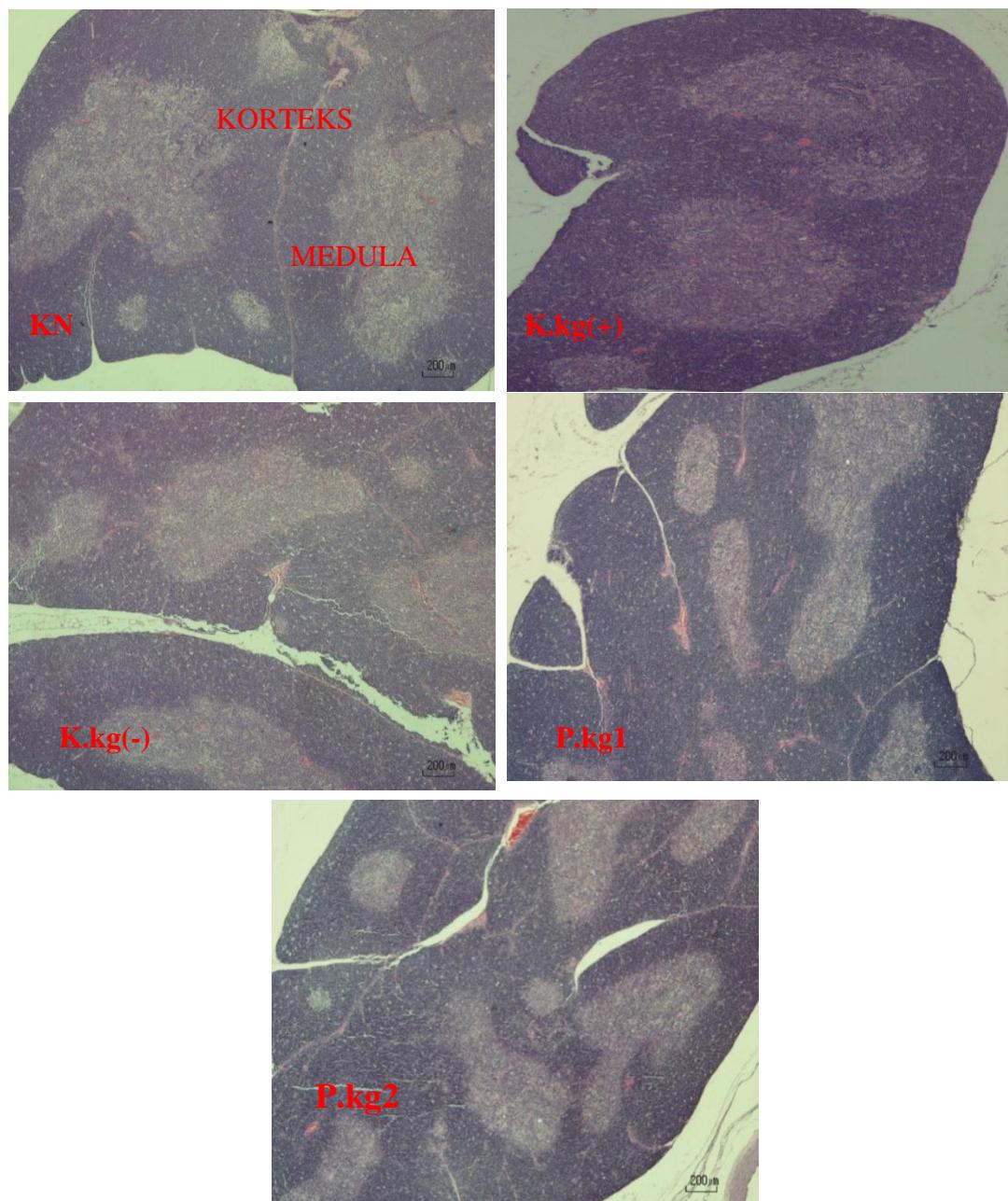


Gambar 5.4 Hasil Pengukuran Diameter Medula Timus pada Kelompok Perlakuan Tikus Percobaan.

Huruf di atas diagram pada gambar 5.4 menunjukkan adanya beda bermakna jika huruf berbeda berdasar uji *Duncan* pada $\alpha = 0,05$. Hasil yang diperoleh dari uji lanjut *Duncan* menunjukkan bahwa perlakuan B memberikan perbedaan yang nyata dengan perlakuan pemberian ransum tepung kerang darah (P.kg2) dan kelompok kontrol normal (KN). Begitu juga perlakuan kontrol normal (KN) tidak memberikan perbedaan yang nyata pada kelompok kurang gizi yang diberi ransum kasein K.kg(-). Hal ini berlaku pula pada kelompok kurang gizi yang diberi kombinasi kasein dan tepung kerang darah P.kg1 dimana tidak ditemukan perbedaan yang nyata.

Dengan demikian hasil yang dapat disimpulkan dari penelitian ini adalah bahwa ukuran diameter medula timus tikus percobaan dalam kondisi kurang gizi dapat dipengaruhi oleh adanya pemberian tepung kerang darah maupun kombinasinya dengan kasein. Hasil fotomikrograf pada sediaan histologi timus dengan pewarnaan HE disajikan pada gambar 5.5.

Hasil fotomikrograf pada sediaan histologi timus dengan pewarnaan HE disajikan pada gambar 5.5.



Gambar 5.5 Hasil Pengamatan Mikroskopis Sediaan Histologi Timus Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Pengecatan HE, skala:100 μ m pada:
(KN)Tikus Kontrol Normal, K.kg(+)Tikus Kontrol Kurang Gizi yang Diberi Ransum Non Protein, K.kg(-) Tikus Kontrol Kurang Gizi yang Diberi Ransum Kasein Standar, P.kg1 Tikus Kurang Gizi yang Diberi Ransum Kasein dan Tepung Kerang Darah 10% Dan (P.kg2)Tikus Kurang Gizi yang Diberi Tepung Kerang Darah 20%

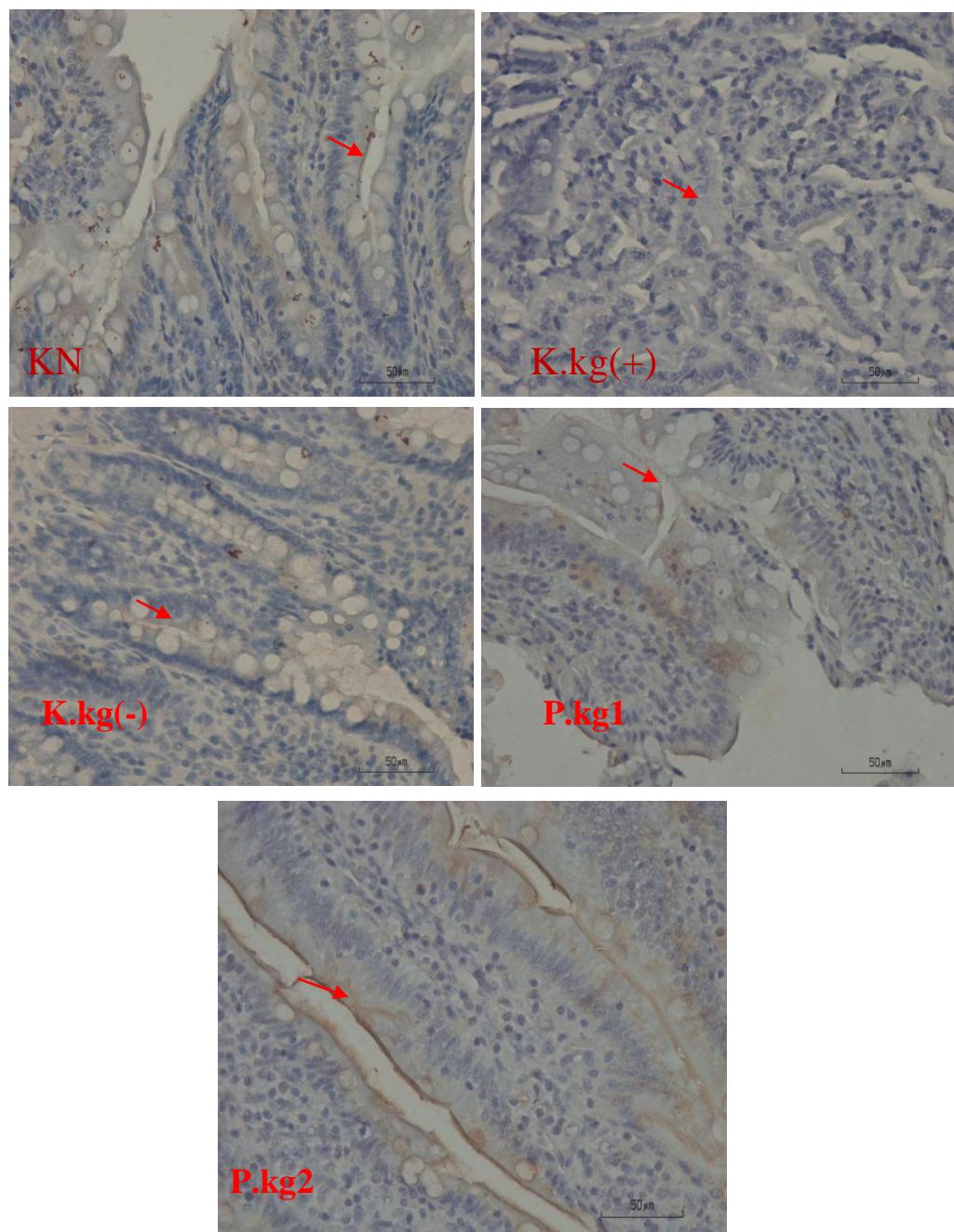
5.1.4 Hasil Pengamatan Mikroskopis Sekretori IgA (sIgA) Mukosa Usus di Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)

Analisis kandungan imunoglobulin A sekretori (sIgA) pada mukosa usus halus baik di jejunum maupun di ileum tikus percobaan dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Pemberian perlakuan dengan tepung kerang darah pada tikus percobaan kurang gizi dapat memberikan efek imunomodulator. Pengamatan ini dilakukan oleh dua penilai pada setiap prefarat kemudian hasilnya dirata-rata. Hasil ini dapat dilihat dari kandungan imunoglobulin A sekretori (sIgA) pada mukosa usus jejunum dan ileum tikus percobaan yang ditunjukkan tabel 5.3. Pada tabel 5.3 menunjukkan hasil penilaian secara deskriptif pada tiap-tiap perlakuan tikus percobaan di mukosa usus pada jejunum.

Tabel 5.3 Deskripsi Kandungan Sekretori Imunoglobulin A (sIgA) pada Mukosa Usus di Jejunum Tikus Percobaan

Perlakuan	Kandungan sIgA	Deskripsi
KN	+++	Warna coklat tua pada seluruh bagian atau sebagian besar lapisan epitel dan <i>crypt</i> mukosa usus.
K.kg (+)	+	Warna biru menunjukkan bagian tersebut tidak mengandung sIgA atau warna coklat muda hanya pada bagian <i>crypt</i> mukosa usus.
K.kg (-)	++	Warna coklat muda hanya pada lapisan epitel dan <i>crypt</i> atau sebagian besar atau seluruh mukosa usus.
P.kg 1	+++	Warna coklat tua pada seluruh bagian atau sebagian besar lapisan epitel dan <i>crypt</i> mukosa usus.
P.kg 2	++++	Warna coklat sangat tua pada seluruh bagian atau sebagian besar lapisan epitel dan <i>crypt</i> mukosa usus.

Hasil pengamatan secara kualitatif terhadap kandungan sIgA pada mukosa usus di jejunum menunjukkan adanya penurunan pada kelompok perlakuan kontrol positif K.kg(+) atau hanya sedikit ditemukan kandungan sIgA baik pada lapisan epitel atau *crypt* mukosa usus tikus percobaan yang ditandai dengan warna coklat muda pada fotomikrograf. Sedangkan pada perlakuan tikus kurang gizi yang diberi tepung kerang darah (P.kg2) maupun kombinasinya (kelompok P.kg1) menunjukkan kandungan sIgA lebih tinggi dari kontrol positif. Peningkatan tersebut terlihat dari semakin banyaknya sel yang memberikan reaksi positif dengan warna coklat pada sebagian besar lapisan epitel dan *crypt* mukosa usus seperti ditunjukkan pada gambar 5.6.



Gambar 5.6 Fotomikrograf Jaringan Usus Halus pada Bagian Mukosa Jejunum Tikus Percobaan yang Diwarnai Secara Imunohistokimia terhadap Kandungan sIgA, Ditandai dengan Warna Coklat pada Bagian Epitel dan Crypt Mukosa Usus. Skala: 50 μ m, pada;

(KN)Tikus Kontrol Normal, K.kg(+)Tikus Kontrol Kurang Gizi yang Diberi Ransum Non Protein, K.kg(-) Tikus Kontrol Kurang Gizi yang Diberi Ransum Kasein Standar, P.kg1 Tikus Kurang Gizi yang Diberi Ransum Kasein dan Tepung Kerang Darah 10% dan (P.kg2)Tikus Kurang Gizi yang Diberi Tepung Kerang Darah 20%. Tanda panah menunjukkan Warna coklat di lumen usus bagian mukosa.

5.2 PEMBAHASAN

5.2.1 Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Jumlah Limfosit T (CD4⁺) Tikus Kurang Gizi

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik dapat disimpulkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap kenaikan jumlah limfosit T (CD4⁺) tikus kurang gizi. Terjadinya peningkatan jumlah limfosit T (CD4⁺) pada kelompok tikus kurang gizi setelah diberi kerang darah maupun kombinasinya dengan kasein menggambarkan bahwa peran nutrisi dalam hal ini kerang darah memiliki kandungan protein yang adekuat mampu meningkatkan jumlah limfosit T di dalam tubuh.

Organ limfoid yang berhubungan dengan produksi limfosit T adalah timus. Seperti diketahui bahwa tempat maturasi sel limfosit T adalah di timus. Timosit terdapat pada kelenjar timus. Peran sel timosit dan hubungannya dengan kandungan leptin yang ada dalam timus telah dilakukan oleh Yablonski, *et al.*, (2008). Penurunan kadar leptin terjadi pada keadaan malnutrisi, yang akan menstimulasi *axis adrenal*, pituitri dan hipotalamus. Hal ini dapat berakibat terjadinya peningkatan hormon glukokorticoid dan pada akhirnya terjadi peningkatan apoptosis *tymosit*. Apoptosis *tymosit* dapat dicegah dan dapat dipulihkan kembali dengan pemberian protein adekuat dengan syarat leptin masih ada (pada kadar yang memadai). Jika kadar leptin turun maka timus akan mengalami atrofi, dan selanjutnya produksi limfosit T turun. Mekanisme peran leptin pada organ limfoid adalah membangun keseimbangan energi pada organisme melalui rangsangan di hipotalamus dan memacu produksi limfosit dan memacu hormon pertumbuhan pada timus (hormon timulin) dengan adanya leptin.

Penelitian lain dilakukan oleh Nasser, *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa anak-anak dengan KEP diketahui terjadi penurunan jumlah sel limfosit T. Hal ini disebabkan pada kondisi KEP terjadi penurunan sintesis hormon timus, yang bertanggung jawab terhadap

pengembangan respon imun yang diperantarai sel. Jaringan limfoid terutama timus yang ditemukan berhenti berkembang dan efeknya produksi limfosit T menjadi sedikit.

Penurunan kadar limfosit T ($CD4^+$) pada kelompok tikus kurang gizi yang mendapatkan ransum non protein dapat disebabkan pula oleh penyerapan nutrisi dari usus halus menurun akibat gerak laju digesti yang semakin menurun. Diduga pada kondisi malnutrisi, infeksi dapat saja terjadi. Jika hal tersebut terjadi, maka akan semakin meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS). Semakin meningkatnya ROS akan semakin meningkatkan nekrosis epitel, yang menyebabkan semakin meningkatnya Hsp70 (Nasronudin, 2005). Penelitian lain menyebutkan bahwa semakin meningkat ROS akan semakin meningkatkan apoptosis sel T($CD4^+$) dan APC yang berdampak pada semakin menurunnya sel T($CD4^+$) dan ekspresi IgA (Prasetyo, 2010).

Peran nutrisi pada kerang darah dan aktivitas timulin (hormon kelenjar timus) diduga dapat memperbaiki dan melindungi sel-sel timus (korteks dan medula) dari serangan antigen, sehingga keutuhan sel akan terjaga. Proses maturasi, diferensiasi dan aktivasi sel-sel meningkat. Sinergisme protein dan zinc yang terdapat pada tepung kerang darah juga dapat memacu sel-sel timus berfungsi dengan baik. Produksi limfosit T pada akhirnya akan semakin meningkat.

5.2.2. Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Kadar γ - Globulin Tikus Kurang Gizi

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan ($p<0,05$) terhadap kenaikan kadar γ - globulin tikus kurang gizi. Terjadinya peningkatan kadar γ -globulin serum tikus percobaan menggambarkan bahwa tubuh hewan percobaan mampu membentuk imunoglobulin atau daya tahan tubuh dengan baik. Berdasarkan hal tersebut, maka pemberian tepung kerang darah mempunyai peran pada peningkatan kadar γ -globulin. Respon imunologis humoral

merupakan pembentukan antibodi yang ada dalam cairan tubuh didasarkan oleh daya kerja serum γ -globulin yang disebut antibodi. Imunoglobulin terutama γ -globulin yang disintesis di jaringan limforetikuler, bersifat spesifik terhadap mitogen yang menginduksinya.

Salah satu komponen asam amino yang terkandung pada kerang darah adalah arginin. Arginin adalah asam amino yang dibentuk di hati dan beberapa diantaranya terdapat dalam ginjal. Arginin bermanfaat untuk meningkatkan daya tahan tubuh atau produksi limfosit serta meningkatkan pengeluaran hormon pertumbuhan (Linder, 2010). Komponen asam amino lain seperti isoleusin, lisin, sistein, dan metionin merupakan asam amino yang terkenal karena kemampuannya meningkatkan ketahanan tubuh (Peng Li, *et al.*, 2007). Lisin berfungsi sebagai bahan dasar antibodi darah, memperkuat sistem sirkulasi, mempertahankan pertumbuhan sel-sel normal bersama prolin. Vitamin C akan membentuk jaringan kolagen.

Metionin juga berfungsi menghasilkan asam amino lain, yaitu sistein. Kebutuhan tubuh akan metionin menurut FAO/WHO (1985) diacu dalam Santoso, *et al* (1996) adalah 0,42%. Daging dan jeroan kerang darah dapat menyumbang metionin sebesar 0,25%. Peran metionin dalam tubuh dapat mengantikan sistein yang lebih banyak aktivitasnya sebagai reseptor membran sel. Ketika dalam kondisi defisiensi protein seperti pada kasus malnutrisi atau kurang gizi, ketersediaan asam amino dalam sintesis protein kurang atau tidak tersedia di dalam tubuh. Hal ini menyebabkan produksi antibodi dalam cairan tubuh juga berkurang. Hasil penelitian Irawan (2011), mengungkapkan bahwa glutamin (salah satu asam amino non esensial) dapat berperan dalam menaikkan kadar albumin dan protein plasma dalam tikus malnutrisi.

Kerang darah juga mengandung senyawa glikoprotein yang berperan sebagai zat imunomodulator dengan aktivitas yang tinggi (Klein, 2004). Fungsi glikoprotein dalam sel sangat beragam. Fungsi glikoprotein antara lain sebagai molekul struktural, pelindung membran, molekul pengangkut (vitamin, lipid, mineral), hormon, enzim dan tempat

pengenalan atau pengikatan sel-sel. Air rebusan daging kerang *patinopectan yanoensis* mengandung senyawa glikoprotein yang berperan sebagai zat imunomodulator atau sebagai anti tumor (Sasuki, *et al.*, 1987 dalam Zulhelmi, 2007). Kondisi defisiensi protein seperti dalam penelitian ini merupakan kasus penyakit sebagai akibat dari terjadinya penyimpangan atau gangguan metabolisme dalam sistem reseptor pada membran sel. Glikoprotein sebagai salah satu komponen membran sel memegang peranan penting dalam mempertahankan kondisi metabolisme normal di dalam membran sel. Kerusakan sistem membran sel dapat terjadi akibat fraksi protein atau karbohidrat mengalami mutasi atau kerusakan oleh infeksi sehingga menyebabkan sinyal-sinyal reaksi untuk proses metabolisme tidak dapat berjalan dengan normal atau terjadi gangguan.

Hasil penelitian lain seperti yang dilaporkan Merryana (2009), menyatakan bahwa pemberian suplementasi *zinc* dapat meningkatkan kadar γ -globulin. Melalui mekanisme pengikatan *zinc* dan protein. *Zinc* penting dalam memelihara struktur protein sehingga dapat berfungsi dengan baik, misalnya dalam sintesis dan degradasi RNA (*ribonucleic acid*), DNA (*deoksiribonucleic acid*) serta ribosome.

Selanjutnya dijelaskan bahwa menurunnya sintesis protein yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perbaikan sel, juga dapat mempengaruhi fungsi metabolismik dan penurunan respon imun tubuh, lama fase inflamasi, penurunan fibroblas dan sintesis proteoglikan (Klein, 2004; Peng dan Lie, 2007). Kontribusi pemberian kerang darah dan ransum normal seperti kasein dapat mempengaruhi secara langsung maupun tidak langsung jaringan target, khususnya mempengaruhi produksi sitokin dan komplemen limfokin lainnya serta mempengaruhi ekspresi protein dan faktor pertumbuhan yang diperlukan pada proses pemulihan. Asam amino yang lebih berperan pada proses pertumbuhan dan imunitas adalah tirosin. Hasil penelitian pendahuluan bahwa kerang darah memiliki kandungan asam amino tirosin. Tirosin ini berperan sebagai reseptor protein kinase yang dikenal sebagai tirosin

kinase. Tirosin kinase berfungsi mengontrol sintesis dan pelepasan berbagai mediator contohnya reseptor sitokin. Sitokin merupakan protein kecil sebagai mediator dan pengatur imunitas. Sitokin dihasilkan sebagai reseptor terhadap stimulus sistem imun dengan mengikat reseptor membran spesifik yang kemudian membawa sinyal ke sel melalui *second messenger* yakni tirosin kinase untuk mengubah aktivitasnya. Contohnya adalah sitokin IL-2 yang dihasilkan oleh sel limfosit Th1 berfungsi sebagai *growth factor*, proliferasi, dan aktivasi dengan cara pengaktifan sel limfosit T dan sel limfosit B penghasil imunoglobulin.

Bukti penelitian ini terungkap bahwa dengan pemberian kasein pada kelompok K.kg(-), terjadi peningkatan kadar γ -globulin yang hasilnya tidak berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan yang diberi kombinasi kasein dan kerang darah (P.kg1) maupun perlakuan P.kg2 yang diberikan kerang darah. Hal ini menegaskan bahwa pemberian kasein saja sudah dapat meningkatkan γ -globulin tikus percobaan yang mengalami kurang gizi jika dibandingkan dengan peningkatan limfosit T ($CD4^+$) pada penelitian ini. Fakta ini menjelaskan bahwa γ -globulin lebih responsif dibandingkan limfosit T($CD4^+$) pada kondisi tikus kurang gizi.

5.2.3 Potensi Kerang Darah dalam Memperbaiki Jaringan Timus pada Tikus Kurang Gizi

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian tepung kerang darah ke dalam ransum tikus percobaan berpengaruh signifikan $p=0,042$ terhadap ketebalan korteks, dan $p=0,004$ terhadap diameter medula tikus kurang gizi, pada tingkat kepercayaan ($p<0,05$). Timus penting perannya dalam sistem imun spesifik seluler karena di dalam timus terjadi diferensiasi dan proliferasi dari sel T atau limfosit T. Jika terjadi involusi (gangguan perkembangan) dari kelenjar timus akan menyebabkan penurunan dari sel T, diantaranya adalah sel T $CD4^+$ [sel T helper 1 (Th1) dan sel T helper 2 (Th2)] (Baratawidjaja, 2002).

Atrofi adalah penyusutan atau mengecilnya suatu organ atau jaringan tubuh, menjadi lebih kecil dari bentuk normalnya. Teori lain menjelaskan bahwa atrofi pada timus dicirikan

dengan hilangnya populasi limfosit dan hilangnya batas perbedaan antara medula dan korteks (Stacey, 2007). Atrofi dapat juga disebabkan oleh kurangnya asupan nutrisi dalam fungsinya sebagai zat pertumbuhan dan perkembangan sel timus. Kurangnya asupan nutrisi yang lengkap dapat menyebabkan organ tersebut mengalami perubahan degeneratif. Adapun perubahan yang terjadi pada timus adalah atrofi pada korteks dan medulla.

Berdasarkan tabel 5.3 terlihat bahwa ukuran korteks semakin kecil pada perlakuan tikus kurang gizi yang diberi ransum non protein. Demikian pula pada tabel 5.4 terlihat bahwa ukuran medula lebih besar dari ukuran korteks. Hal ini menunjukkan bahwa timus mengalami atrofi akibat dari menurunnya konsumsi nutrisi yang menyebabkan semua komponen sel dalam tubuh mengalami hambatan pertumbuhan.

Hal yang sama juga terjadi pada organ timus tikus sebagai salah satu organ limfoid yang menghasilkan sel-sel imun. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa dalam keadaan infeksi seperti diare akan menimbulkan efek imunosupresif sebagai akibat langsung dari infeksi sitolitik pada limfosit. Efek Imunosupresif berhubungan dengan adanya limfoblas yang mengalami transformasi yang mengakibatkan gagalnya pembentukan limfosit B dan limfosit T sehubungan dengan adanya infeksi sitolitik. Jika keadaan ini berlanjut akan mengakibatkan atrofi pada timus.

Besar timus sangat bervariasi. Ukuran yang paling besar terdapat pada hewan baru lahir. Ukuran absolut terbesar pada waktu pubertas. Setelah dewasa timus mengalami atrofi dari parenkima dan korteks diganti oleh jaringan lemak. Timus yang mengalami atrofi cepat merupakan reaksi terhadap stres. Hasil penelitian menunjukkan tikus percobaan mengalami stres yang menyebabkan hewan tersebut mengalami gangguan fisiologis sebagai akibat kurangnya nafsu makan. Efeknya yang terjadi adalah adanya hambatan pertumbuhan dan perkembangan sel atau jaringan dalam tubuh. Tizard (1987) dalam Febriana (2004), menjelaskan bahwa timus akan mengalami atrofi cepat akibat stres. Hewan yang mati setelah

menderita sakit yang lama mempunyai timus yang sangat kecil. Korteks timus komponen utamanya terdiri dari retikulum epitel dan limfosit. Oleh karena itu dengan semakin kecil ukuran korteks akan semakin sedikit limfosit yang diproduksi pada jaringan ini. Proses involusi ditandai dengan berkurangnya limfosit secara bertahap terutama di daerah korteks. Pembesaran dari sel-sel epitel retikuler dan parenkim diganti oleh sel-sel lemak. Timus juga menjamin lingkungan dimana sel bibit (*stem cells*) yang bermigrasi dari sumsum tulang pascanatal berproliferasi serta berdiferensiasi menjadi limfosit T (Stacey, 2007). Proses ini didorong oleh beberapa bahan kimia berupa polipeptida yang dihasilkan oleh sel-sel epitel retikuler (Nakamura, 1986)

Salah satu fungsi *zinc* sebagai antioksidan kuat dan mampu mencegah kerusakan sel, menstabilkan struktur dinding sel, serta meningkatkan daya tahan tubuh. *Zinc* dapat berfungsi mencegah terjadinya radikal bebas sehingga proses apoptosis atau kematian sel secara terencana dapat ditekan (Fukamachi, *et al.*, 1998). Menurut Pond, *et al.*, (2005) *zinc* juga memiliki pengaruh terhadap imunitas dan dapat meningkatkan aktivitas sel limfoid termasuk organ timus.

Timulin merupakan hormon yang disekresikan oleh kelenjar timus. Hormon tersebut berfungsi sebagai pengendali sistem imun secara umum seperti maturasi limfosit T. Peningkatan aktivitas timulin membuktikan bahwa gangguan sistem imun pada kasus kurang gizi sebagai akibat atrofinya kelenjar timus dapat diperbaiki dengan asupan makanan yang berprotein lengkap seperti kerang darah.

5.2.4 Potensi Kerang Darah dalam Meningkatkan Kandungan sIgA Mukosa Usus Tikus Kurang Gizi dengan Metode Imunohistokimia

Produksi imunoglobulin sekretori A (sIgA) merupakan komponen efektor terbaik yang dihasilkan oleh mukosa usus. Dalam kerjasamanya dengan faktor imun *innate* (bawaan), seperti *mucus*, sIgA dalam lumen usus akan mencapai “imun eksklusi” untuk melindungi permukaan mukosa (Blum dan Schiffelin, 2003). Sistem imun humorai di dalam

sistem pertahanan mukosa diperani oleh imunoglobulin A tipe sekretori (sIgA) dan bekerja lebih awal saat antigen masih berada di luar sel.

Pengaruh pemberian kerang darah pada ekspresi imunoglobulin A sekretori (sIgA) di jejunum dan ileum usus yang rusak sebagai akibat kurang gizi menunjukkan adanya perbaikan yang dibuktikan dengan pemeriksaan imunohistokimia. Gambaran ekspresi sIgA di bagian usus jejunum dan ileum pada kelompok kontrol normal (KN) dan kelompok perlakuan yang diberi ransum tepung kerang darah (P.kg2) di dapatkan kandungan sIgA secara deskriptif terbanyak disusul kelompok kombinasi kasein dan tepung kerang darah maupun hanya diberi kasein saja. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yakni kelompok defisiensi non protein seperti yang ditunjukkan pada tabel 10 dan tabel 11, hasil ini memberikan gambaran secara kualitatif bahwa kandungan sIgA di mukosa ileum sedikit lebih banyak dibandingkan yang ada di jejunum.

Pemeriksaan fotomikroskopik kandungan sIgA di bagian usus jejunum dan ileum pada kelompok defisiensi non protein didapat jumlah kandungan sIgA paling sedikit. Fakta ini membuktikan bahwa kerang darah dapat meningkatkan kadar sIgA di mukosa usus bagian jejunum maupun ileum. Imunoglobulin A (IgA) adalah antibodi yang berbentuk dimer tersimpan di dalam sel basal dan diubah menjadi sIgA melalui penambahan komponen sekretori yang kemudian disekresi ke dalam lumen usus atau ke bagian apeks dari epitel mukosa usus. Imunoglobulin A sekretori memiliki sifat resisten terhadap enzim pencernaan sehingga dapat mengikat agen infeksi maupun toksin yang menginviasi lumen maupun mukosa usus.

Antibodi sIgA yang dihasilkan oleh sel limfosit merupakan antibodi utama yang berperan di dalam sistem imun lokal di jaringan usus halus. Memiliki kemampuan mengaglutinasi agen infeksi dan memfasilitasi proses klirens mikroba tersebut melalui gerakan peristaltik dan gerakan mukosilier usus halus (Mestecky et al., 1999). Selain itu sIgA

juga melekat secara selektif pada sel M dan ikut terangkut bersama antigen yang dibawa oleh sel M dan selanjutnya masuk ke dalam sel dendritik (Corthesy, 2007). Sel M adalah sel epitel yang memiliki bentuk berbeda yang melapisi bagian permukaan dari kelenjar *Peyer's patches* (PP). Sel M berfungsi membawa antigen yang ada di lumen usus ataupun yang melekat pada sel M, terangkut pula sIgA bersamanya yang kemudian mengalami internalisasi ke dalam sel dendritik (DC) yang dimediasi oleh *IgA moiety*. Imunoglobulin A sekretori yang terbawa bersama sel M maupun sel DC akan memudahkan pengambilan antigen berikutnya oleh sel M, dan memicu migrasi sel DC ke dalam PP yang kaya akan sel limfosit T.

Peningkatan ROS dapat terjadi pada kondisi kurang gizi yang akan mengakibatkan apoptosis pada *antigen presenting cell* (APC), yang akan menurunkan ekspresi antigen. Apoptosis yang terjadi pada sel T-CD4⁺ dan APC akan menyebabkan penurunan ekspresi IgA. Hal ini menunjukkan bahwa produksi dan fungsi sIgA yang diskspresikan oleh sel plasma sangat dipengaruhi oleh keberadaan limfosit T(CD4⁺) di mukosa usus. fakta dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada tikus kurang gizi terjadi penurunan yang bermakna dari kandungan sIgA dibagian lapisan epitel dan *script* mukosa dan akan diikuti oleh penurunan bermakna dari kandungan IgA di lamina propria. Mekanisme yang dapat menjelaskan hal ini adalah apabila timbul respon sel B penghasil IgA mukosa terhadap sel T dependen antigen, maka sel B akan diaktifkan oleh sel T helper di dalam *Peyer's patches*, melalui switch IgA, diferensiasi, dan *clonal expansion*. *Class switching* dan maturasi ke dalam sel plasma penghasil IgA diduga terjadi secara lokal di usus. Sel B terutama akan bermigrasi keluar dari *Peyer's patches* melalui pembuluh limfe ke kelenjar limfe mesenterika, mengalami proses maturasi menjadi sel plasma dan pada akhirnya kembali ke lamina propria melalui darah. Hal ini mengindikasikan bahwa berkurangnya ekspresi sel plasma IgA di mukosa usus dapat disebabkan oleh berkurangnya akaktivasi sel T di *Peyer's patches* dan menurunnya kandungan ekspresi sel T-CD4⁺ di *Peyer's patches*. Hal ini

menjelaskan berkurangnya kepadatan sel plasma IgA di lamina propria ileum. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi kurang gizi terhadap sistem imun mukosa pada sel T helper dan produksi antibodi sIgA intestinal sangat penting bagi pertahanan di dalam usus tikus percobaan kurang gizi. Sebaliknya, meningkatnya sel plasma IgA di lamina propria akan mengaktifasi dan mengekspresi sIgA ke permukaan mukosa usus lebih banyak dan akan melindungi permukaan sel terhadap invasi antigen.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian kerang darah dapat mempengaruhi sistem imun seluler melalui peningkatan jumlah limfosit T ($CD4^+$) pada tikus (*R.norvegicus*) kurang gizi.
2. Pemberian kerang darah dapat mempengaruhi sistem imun humorai melalui peningkatan kadar γ -globulin pada tikus (*R.norvegicus*) kurang gizi.
3. Pemberian kerang darah dapat memperbaiki struktur timus melalui peningkatan ukuran ketebalan korteks dan diameter medula pada tikus (*R.norvegicus*) kurang gizi.
4. Melalui pemeriksaan imunohistokimia pemberian tepung kerang darah dapat meningkatkan kandungan sIgA dalam mukosa usus tikus (*R.norvegicus*) kurang gizi.

Temuan baru yang dihasilkan dari disertasi ini adalah kerang darah dapat meningkatkan sistem imun seluler dan humorai tikus (*R.norvegicus*) kurang gizi dengan penjelasan ilmiah sebagai berikut:

- 1) Hasil penelitian ini dapat menjelaskan mekanisme imunopatobiologis kerang darah dalam meningkatkan sistem imun seluler dan humorai yang diakibatkan oleh kondisi kurang gizi melalui pengamatan kadar limfosit T ($CD4^+$), γ -globulin, histologi timus dan vili usus di jejunum dan ileum serta kandungan sekretori imunoglobulin A (sIgA) mukosa usus.
- 2) Penelitian ini mengungkapkan bahwa terjadinya peningkatan jumlah limfosit T ($CD4^+$) dan peningkatan γ -globulin tetap kerang darah lebih baik jika dibandingkan dari perlakuan lainnya. Tetapi dalam hal produksi γ -globulin pemberian kasein saja sudah cukup meningkatkan γ -globulin meskipun pada pemberian kerang darah dan kombinasinya dengan kasein mampu meningkatkan produksi γ -globulin jauh lebih tinggi. Fakta ini lebih menguatkan bahwa pada kondisi kurang gizi setelah diberi kasein maupun kerang darah γ -globulin lebih responsif dibandingkan limfosit T ($CD4^+$).
- 3) Dengan suplementasi kerang darah keutuhan struktur epitel dan vili usus mengalami perbaikan (restorasi) sehingga lintas invasi sIgA dengan poli-IgA (reseptor) sampai ke lumen usus dapat berlangsung dengan baik. Selanjutnya sIgA dapat berfungsi menjaga sistem pertahanan mukosa intestinal.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini disarankan.

1. Perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis protein spesifik yang terdapat pada kerang darah (*Anadara granosa*) dalam perannya sebagai biomelokul dalam meningkatkan respon imun selular maupun humorai agar dapat mengungkap peran protein (asam amino) dan kandungan antibodi sIgA di saluran pencernaan.
2. Berdasarkan hasil analisis jumlah limfosit T(CD4⁺) dan limfosit B(γ -globulin) perlu diteliti lebih lanjut menentukan rasio T(CD4⁺) cell/B cell karena perlakuan kasein.

DAFTAR PUSTAKA

- ACC-SCN, 2000. *Fourth Report on the World Nutrition Situation: Nutrition Throughout the Lifecycle*. Geneva: ACC-SCN in Collaboration with IFPRI.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H, 2010. *Cellular And Molecular Immunology*, International Ed 6, Philadelphia: Saunder.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H, 2011. *Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune system*, Saunder, Elsevier Philadelphia, Pa.
- Adriani,M., 2009. Pengaruh Pemberian Seng Pada Suplementasi Vitamin A Dosis Tinggi Terhadap Status Infeksi Dan Pertumbuhan Linear Balita, *Disertasi*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K, Watson, J. 1994. *Molecular Biology of The Cell*, New York: Garland Pub.
- American Institute of Nutrition, 1993. Report AIN Ad Hoc Committee on Standart for Nutrition Studies. *J Nutr*, 107, pp. 1340-1348.
- Aosasa, S., Mochizuku, H., Yamamoto, T., 1999. A Clinical Study of the Effectiveness of Oral Glutamin Supplementation during total Parenteral Nutrition: influence on mesenteric mononuclear cells. *J Parent Ent Nutr*, 23(Suppl), pp. S41-44.
- Azwar, A., 2004. *Aspek Kesehatan dan Gizi dalam Ketahanan Pangan, dalam LIPI, 2000*. Prosiding Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi VII, Jakarta, hal. 101-109.
- Almatsier, Sunita. 2004. *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Aritonang, I. 2002. *Krisis Ekonomi: Akar Masalah Gizi*. Surakarta: Sebelas Maret University Press.
- Baratawidjaja, K.G., 2004. *Imunnologi Dasar*. Ed 5, Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bakri, A., 2003. *Peranan mikronutrien seng dalam pencegahan dan penanggulangan Diare. Dalam: Kumpulan makalah kongres nasional II badan koordinasi Gastroenterologi anak Indonesia*, hal. 132-5.
- Baron, R.B, 2005. Nutrition. In: *Current Medical Diagnosis and Treatment*. Ed 44, New York: McGraw-Hill, pp. 1214-1242.
- Benjamini, E., Geoffrey, S., 1996. Immunology A Short Course Third edition A. New York: John Wiley & Sons Inc, pp. 4-25
- Blum, Schiffrin, 2003. Intestinal Microflora And Homeostasis Of The Mucosal Immune Response Imflication For Probiotic Bacteria. *Curr. Issues Intestin Microbiol*, 4(2), pp. 53-60

Boediwarsono, 2006. *Terapi Nutrisi Pada Penderita Kanker*. Naskah Lengkap Surabaya
Hematology Oncology Update IV, Medical Care of the Cancer Patient, pp. 134-141.

Bristian, B., 2004. *Nutritional Assessment*. In: Cecil Textbook of Medicine, ed 22, Philadelphia: Saunders, pp. 1312 – 1315.

Brown, K.H., Sara, E.W., 2000. *Zinc And Human Health Result of Resent Trials and Implication for Program Intervention and Research*. Otattawa: International Development Research Center.

Brown, K.H., Peerson, J.M, Rivera, J., Allen, L.H., 2002. Effect of Suplementation Zinc on the Growth and Serum Zinc Concentration of Pre Pubertal Children: A Meta Analysis Of Randomized Contolled Trials. *Am J Clin Nutr*, 75, pp. 1062-71.

Casey, C.E., Walravens, P.A., 1998. *Trace Elements. Nutrition During Infancy*. Philadelphia: Hanley & Belfus, pp. 191-215.

Cole, M.F., Lydyard, P.M., 2006. *Oral Microbiology And The Immune Response*. Oral Microbiology and Immunology, Washington DC: ASM press, pp. 201-229.

Coppen, D.E., Davies, N.T., 1987. Studies on the Effects of Dietary Zinc Dose on Zn Absorption In Vivo and on the Effects of Zn Status on Zn Absorption and Body Loss in Young Rats. *Br J Nutr*. 57, pp. 35-44.

Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., et al, 2006. Rotavirus Anti-VP6 Secretory Immunoglbuline A Contributes to Protection via Intraceller Neutralization but Not via Immune Exclusion, *J Virol* 06, 80(21), pp. 10692-10699.

David, J., Dabbs. 2010. Diagnostic Immunohistochemistry, *Theranostic And Genomic Applications*. Ed 3, Saunders Elsevier.

Delves, P., Seamus, M., Dennis, B., Roitt. 2006. *Roitt s Essential Immunology*, Ed 11, Willey- Blackwel.

Dellman, H.D, J.A. Eurell., 1998. *Textbook of Veterinary Histology*. Ed 5. New York: Lippincott Williams & Wilkins.

Dewi, P.Z., 2009. Kadar sIgA dan Laktoferin ASI. *Jurnal Gizi Indonesia*, 32(1), hal. 1-9.

Duggan, C., Gannon, J., Walker, W.A., 2002. Protective Nutrients And Functional Foods For the Gastrointestinal Tract. *Am J Clin Nutr*, 75, pp. 789-808.

Droomers, M., Gross, R., Schultink, W., Sastroamidjojo, 1995. High Socioeconomic Class Preschool Children from Jakarta, Indonesia are taller and heavier than NCHS reference population. *Eur J Clin Nutr* 1995, 49, pp. 740-4.

Eckmann, L., 2006. *Animal Models Of Inflamantory Bowel Disease, lesson from enteric infections*. New York: Acad Science, 1072, pp. 28-38

Edison, T., 2009. *Amino Acid Esensial for our Bodies*. <http://livewellnaturally.com>.
[Situs tanggal 02 Maret 2011]

Ersoy, B., Ozeren, A., 2009. The Effect Of Cooking Methods On Mineral and Vitamin Contents Of African Catfish. *J. Food Chemistry*, pp. 115419-422.

- Fisheries and Aquaculture Organization. 2009. *Anadara granosa* (Linnaeus 1758). <http://www.fao.org/fishery/species/3503/en> [Situs tanggal 12 Desember 2011].
- Forbes, J.M., 2007. *Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals*. Ed 2, Leeds: Biddles Ltd.
- Fukamachi, Y., Karasak, Y., Sugiura, T., Itoh, H., Abe, T. 1998. Zinc Suppreses Apoptosis of U937 Cells Induc By Hydrogen Peroxide Trough An Increase Of Bcl-2/Bax Ratio. *Biochem Biophys Res Commun*, 19, pp. 364-369.
- Geoffrey, B., Simon, W., Peter, R., Peter, A., 2010. Clinical Biochemistry, Ed 8, Wiley-Blackwell
- Gibson, R.S., 2005. *Principle of Nutritional Assessment*. Ed 2, Oxford University Press. New York.
- Goldsby, R.A., Kuby, 2000. *Immunology*. Ed 4. Freeman and Company.
- Holmgren, J., Cerkinsky, C., 2005. Mucosal Immunity and Vaccines. *Nat Med Supply*, 11, pp. S45-S 51.
- Horas, P., Hutagalung, Sutomo. 1999. *Kandungan Cu Dan Zn Dalam Kerang Hijau (Mytilus viridis) Linn) dan Kerang Darah (Anadara Granosa Linn) Dari Perairan Teluk Banten*, Jakarta: Prosiding Oceanologi dan Lingkungan laut.
- Heru, P., 2010. Perubahan ekspresi CD4, IgA, PGE2 dan Hsp70 Mukosa Usus Mus musculus BALB/c Kurang Energi Protein yang Diinfeksi Cryptosporidium. *Disertasi*, Pascasarjana Unair, Surabaya.
- Irawan, R., 2011. Efek Pemberian Glutamin terhadap Aktivitas Sucrase, Maltase, Laktase dan ekspresi Spectrin, Clathrin dalam Perbaikan Mikrovilli Usus, *Disertasi*, Pascasarjana Unair, Surabaya.
- John, M., De M.A.N., 1997. Kimia Makanan edisi ke dua (Principle of food Chemistry) Terjemahan Kosasi Padmawinata, ITB, Bandung
- Johnston, L.B., Clark, A.J.L, Savage, O.M., 2002. Genetics Factors Contributing To Birth Weight. *Arch Dis Child*, 86, pp.108-12.
- Jungueira, C., Carlos, L., Carniaro., 1997. *Histologi Dasar*. Ed 9, Alih, Jakarta: EGC, hal.256,301-3
- Kaslow, J.E., 2010. *Analysis of Serum Protein*. Santa Ana: 720 North Tustin Avenue Suite 104.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2010. Statistik Kelautan dan Perikanan 2008. Jakarta: Kementrian Kelautan dan Perikanan
- Kementrian Kesehatan Propinsi Gorontalo, 2010. *Pemantauan Status Gizi Balita, Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI*, Propinsi Gorontalo
- Kementrian Kesehatan RI, 2010. *Riskesdas 2007*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan.
- Kementrian Kesehatan RI, 2011. *Kebijakan dan Program Kementrian Kesehatan Dalam Pelaksanaa PKH terkait INPRES I Dan INPRES III Tahun 2010*. Dirjen Bina Gizi dan Kesehatan Ibu dan Anak.
- Kiernan, J.A., 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory & Practice*. Oxford: Pergamon press.
- Klein, S., 2004. *Protein – Energy Malnutrition*. In: *Cecil Textbook of Medicine*. Ed 22, Philadelphia: Saunders, pp. 1315–1318.
- Kuby, J., 2007. *Immunology*, New York: W. H Freeman and Company.
- Kusharisupeni. 2005. *Peran Status Kehamilan Terhadap Stunting pada Bayi: Sebuah Studi Prospektif Departemen Gizi Kesehatan Masyarakat*. Jakarta: FKM Universitas Indonesia.

- Kuntoro. 2010. *Metode Sampling dan Penentuan Besar Sampel*. Penerbit: Pustaka Melati.
- Linder, M.C., 2010. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian Secara Klinis*, Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Leeson, C.R., Leeson, T.S., Paparo, A.A. ,1998. *Texbook of Histologi*, Sanders: Philadelphia, p. 303
- Levine-LeMoal ,V., Servin, A.L., 2006. The Front Line Of Enteric Host Defense Against Unwelcome Intousion Of Harmful Microorganisme: Mucins, Antimicrobial Peptides And Microbiota. *Clin Microbiol*, 19, pp.315-337
- Kaetzel, C.S, 1991. Fungsi IgA pada Sistem Imun, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88, hal. 8796-8800
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Chintalacharuna K.R., et al, 1991, The Polymeric Immunoglobulin Receptor (Secretory Component) Mediates Transport of Immunoe Complexcs Across Epithelial Cells: A Local Defense Function for IgA. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88, pp.8796–8800.
- Michael, S., Mozs, E., Shearer, G.M., 1972. Thymus-Independence of Slowly Metabolized Immunogens. Departemen of Chemycal Immunology, *Proc.Nat.Acad*, 69(9), pp. 2696-2700.
- Mayer, G., 2007. *Immunoglobulin-Structure and Function*. In: *Microbiology Immunology on line*. University of South Carolina. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/IgStruct2000.htm>. [Situs tanggal 22 Maret 2011]
- Malole, Pranomo, 1989. *Penggunaan Hewan Percobaan di Laboratorium*, Jakarta: Penerbit Pustaka.
- Mestecky, J., Russel M.W., Elson, C.O., 1999. Intestinal IgA ; *Novel Views On Its Intestinal in the Defence Of the Largest Mucosal Surface*. Gut,44, pp. 2–5.
- Mellova, A.M., 2003. Effects of Protein Energy Malnutrition on the Immune System, *Makara Sains*, 7(2).
- M.F Nassar, N.T Younis, A.G Tohamy, D.M, El-Badawy. M.A., 2007. T-Lymphocyte subsets and Thymic size in Malnourished Infants in Egypt: a hospital-based studi; Eastern mediteraniean *Health Journal* vol.17. no.5. 2007
- Melanie J. T., Fazel, N.. 2009. *Zinc Deficiency*. Department of Dermatology, University of California, 25, pp. 136-143
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., 2007. *Biokimia*, Ed 26, Jakarta: EGC.
- Nakamura, K., Imada, Y., Maeda, M., 1986. Lymphocyte Depletion of Bursa of Fabricius and Thymus in Chickens Inoculated with Escherichia coli. *Vet. Pathol.* 23, pp.712-717.
- Nasronudin, 2005. Efek Pernyataan Diagnosis Terinfeksi HIV/AIDS Terhadap Mekanisme Apoptosis Limfosit T-CD4 pada Penderita HIV/AIDS, *Disertasi*, Pascasarjana Unair, Surabaya.
- Niers, L., Stasse-Wolthuis, M., Rombouts, F.M., Rijkers, G.T., 2007. Nutritional Support for Infant's Immune System. *Nutrition Reviews*, 65,(8), pp. 347-360.

- Nurjanah, Zulhamsyah, Kustiyariyah. 2005. Kandungan Mineral Dan Proksimat Kerang Darah (Anadara granosa) Yang diambil Dari Kabupaten Boalemo Gorontalo. *Buletin jurnal Tehnologi Bahan Pangan IPB*, 8(2), p. 15-24.
- Ou, D., Li, D., Cao, Y., Li, X., Yin, J., Qiao, S., Wu, G., 2007. Dietary Supplementation With Zinc Oxide Decreases Axpression Of The Stem Cell Factor In The Small Intestine Of Weanling Pigs. *J. Nutr Biochem*, 18, pp. 820-6
- Peng, Li, Yu-Long, Yin, Sung W.K., et al, 2007. Amino Acids And Immune Function, *Review Article*.
- Piliang, W.G., 2006. *Fisiologi Nutrisi Volume II*. Bogor: IPB Press.
- Petrof, Eo, Ciaancio, M.J., Chang, B.B., 2007. Role and Regulation Of Intestinal Epithelial Heat Shock Proteins In Healts and Disease, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, pp.808-818.
- Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R., Schoknecht, P.A., 2005. *Basic Animal Nutrition and Feeding*, Ed 5. United States of America: Wiley.
- Prasad A.S., 2007. Zinc Mechanisms Of Host Defense. *Journal Nutrition*, 137, pp. 1345-9.
- Rahma, F., Elnovriza, Syafiani. 2007. Faktor Resiko Kejadian Gizi Buruk Balita Pada Di Wilayah Kerja Puskesmas Andalas Kecamatan Kota Padang Tahun 2007, *Jurnal Media Gizi & Keluarga*, Juli 2007, 31(1) 80-88.
- Ramos-Vara, J.A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry, *Review article*.
- Rey, J., Garin, N., Spertini, F., Corthesy, R., 2004. Targeting of Secretory IgA to Peyer's Patch Dendritic and T cells After Transport by Intestinal M Cells. *J. Immunology*, 172, 3026–3033.
- Roitt I, Male David, et al., 2007. Immunology International, Ed 7, Mosby Elsevier 2006/2007. P.74
- Rundles SC and Lin DH. 1998. Nutrition and the Immune System of the Gut, *Nutrition*, 14(7), pp. 573-579.
- Samsi,M., 2008. ImunitasTubuh.
<http://www.damandiri.or.id/file/muhamadsamsiipbbab2.pdf>. [Akses tanggal 8 Juli 2012].
- Sandstrom, B., Cederblad, A., 1980. Zinc Absorption From Composite Meals. II. Influence Of the Main Protein Source. *Am J Clin Nutr*, 33, pp. 1778-1783.
- Schroeder, D.G., 2001, *Malnutrition*, Edited Samba R.D., and Bluem M.W.L., Nutrition and Health Humania Press

Semba, R.D., de Pee S, Sun, K., Sari, M., Akhter, N., Bloem, M.W., 2010. *Effect Of Parental Formal Education on Risk of Child Stunting in Indonesia and Bangladesh: a cross-sectional study*. Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore.

Shankar, A.H, Prasad, A.S., 1998. Zinc And Immune Function: The Biological Basis Of Altered Resistance To Infections. *Am J Clin Nutr* 1998, 68(suppl) 447S-463S.

Soekirman, 2000. *Ilmu Gizi dan Aplikasinya untuk Keluarga dan Masyarakat*. Jakarta: Depdiknas.

Subowo, 2009. *Imunobiologi*. Ed 2, Jakarta: Sagung Seto.

Supariasa, N., 2002. *Penilaian Status Gizi*. Jakarta: ECG.

Sufiawati. 2008. *Kadar sIgA Saliva pada Pasien yg Terinfeksi HIV di RS Cipto Magunkusumo Jakarta*. FKG UNPAD, Bandung

Suwignyo, Sugiarti. 2005. *Avertebrata Air*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Staines, N., Jonathan, B., Keith, J., 1994. *Introducing Immunology*. Ed 2, London: Mosby.

Stacey, E.M., 2007. *Histology for Pathologists*. Ed 3, Lippincott: Williams & Wilkins.

Steel, L., Cousins, R.J., 1985. Kinetics Of Zinc Absorption By Luminally And Vascularly Perfused Rat Intestine. *Am J Physiol*, 248, pp. G46-G53.

Sudradjat, A. 2008. *Budidaya 23 Komunitas Laut Yang Menguntungkan*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Susanna, C.R, Aeri, M., David, F., Mc Neeley. 2008. Malnutrition and Host Defense. With permission frm Duggan C.et al. *Nutrition in Pediatric*, Hamilton, Ontario: BC Decker Inc.

Susanto, H., Siti, I.M, Hernowati, T.E, Johannis W.D.T., 2011. Efek Nutrisional Tepung Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Varietas NTT Terhadap kadar Albumin Tikus Wistar Kurang Energi Protein. (Studi In Vivo Kelor sebagai Kandidat Terapi Suplementasi pada Kasus Gizi Buruk). Publikasi Ilmiah SemNas MIPA.

Thaha, A.R., Hardiansyah, Ala, A. 1999. *Pembangunan Gizi dan Pangan dari Perspektif Kemandirian Lokal*. Bogor: DPP Pergizi Pangan Indonesia.

Winarno, F.G., 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Bogor: M-Brioo Press.

WHO dan FAO., 2004. Vitamin And Mineral Requirements in Human Nutrition, second edition: Report of join FAO/WHO expert, Bangkok.

Widowati, W., et al, 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Yogyakarta: Penerbit Andi.

Wolfgang, S., Barry, J.P., Paul, D.B., 2003. Studies of Albumin binding to rat liver plasma membrans: Implication for the albumin receptor hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 756(1), pp. 20-27.

LAMPIRAN 1.

Prosedur Pemeriksaan Protein Elektrophoresis SEBIA (Hydragel K20 Protein)

Preparasi Reagen pada *the hydragel* protein (E) K20. Kits

1. Agarose gels
Siap pakai
Simpan pada posisi gel horizontal
Bisa disimpan pada suhu ruang atau refrigerator (2-8C)
2. *Tris-barbital buffer*
Setiap vial stok buffer solution diencerkan sampai 1 liter dengan agubidest
Contoh: 50 ml stock diencerkan sampai 500 ml dengan aguabidest
Vial yang sdh diencerkan tahan selama 1 tahun pada suhu ruang
Setelah pemakaian (dicamber) disimpan pada tempat lain utk menghindari kerusakan elektrode pada chamber.
Ganti buffer pada chamber setelah 1 minggu pemakaian atau 1 kali migrasi (1 full gel agarose)
3. *Amidoblack stain*
Setiap vial stok amidoblack stain (botol coklat) ditambahkan dengan staining solution diluent (60ml) lalu encerkan sampai 300 ml dengan aguabidest
Stabil selama 1 bulan
Ganti amidoblack setiap buka kit baru.
4. *Destaining solution*
Setiap vial stok destaining solution diencerkan sampai 100 liter dengan aguabidet
Contoh 1 ml stock solution diencerkan sampai 1 liter dgn aquabidest
Working reagen stabil sampai 1 minggu bila disimpan pada suhu ruang dan disimpan botol tertutup.
Ganti setiap selesai destaining utk 1 kali migrasi (Chamber 1)
5. *Applicators*
Siap pakai
Simpan pd tempat yg kering pada suhu ruang
6. *Filters papers-thin*
Siap pakai

Material yang harus disediakan (tidak tersedia dalam kit)

a. *Fixative solution*

Etanol 180 ml, acetic acid 30 ml, aquabidest 90 ml

Simpan pada suhu ruang, ganti dengan 3 bulan atau setelah pemakaian 4-6 gel untuk setiap 300 ml.

b. *Fluidil*

Siap pakai (SEBIA,PN 4587,1 vial 5 ml)

Penanganan sampel:

Dianjurkan sampel serum yang baru. Bisa disimpan pada suhu 2-8 C segera setelah sampling dan sampai 1 minggu

Prosedur:

1. Hydragel K20 applicator carrier ditempatkan pada permukaan yang datar
2. Sebanyak 120 μ l aquabidest ditambahkan pada applicators carrier
3. Buka pack hydragel agarose gel plate
4. Serap buffer pada agarose gel dengan filter paper secukupnya (harus rata), jangan terlalu kering
5. Agarose gel ditempatkan pada hydragel K20 applicator dengan posisi kutub (+) berada di atas
6. Applicator ditempatkan pada permukaan yang datar

7. Sebanyak 10 μ l serum ditambahkan pada masing-masing sumuran applicator, patahkan ujung applicator
8. Applicator ditempatkan pada applicator carries di posisi 6
9. Applicator diturunkan sampai menyentuh permukaan gel agarose dengan memutar switch perlahan-lahan
10. Setelah 40 detik, angkat perlahan-lahan applicator
11. Pindahkan agarose gel ke chamber dengan posisi kutub (+) ke arah kutub (+) pada chamber. Gel agarose harus terendam 1 cm pada masing-masing ujungnya ke dalam Tris buffer.
12. Nyalakan power supply dengan setting sebagai berikut:

Volume buffer percompartemen	150 ml
Total volume buffer	300 ml
Waktu migrasi	22 menit
Voltage	90 volt
Arus ampere	12 \pm 3 mA (set di alat 60 mA)
13. Setelah migrasi, pindahkan gel untuk di fixasi
14. Fixasi gel ke larutan fixasi selama 15 menit
15. Keringkan gel kedalam incubator IS 80 pada suhu 80 C selama 10 menit (sampai kering), setelah itu biarkan dingin sekitar \pm 1 menit.
16. Pewarnaan pada larutan staining selama 4 menit
17. *Destaining* pada larutan destaining sampai benar-benar bersih
18. Keringkan pada incubator IS 80
19. Pembacaan hasil pada scanner dengan posisi gel menghadap ke scanner (ke bawah).

LAMPIRAN 2.

Analisa *Flowcytometri* (Jumlah Limfosit T CD4)

Analisa ini dilakukan untuk mengetahui peningkatan atau penurunan sub-populasi limfosit di dalam darah.

1. Sel sel limfosit di isolasi dari darah hewan percobaan menggunakan *Ficoll- paque plus* (*Amersham Biosciences*) sesuai protokol dari perusahaan.
2. Lapisan plasma *buffe coat* dicuci 2 kali dengan FACS buffer (Dulbecco's phosphate-buffered saline [Thermo Scientific] mengandung 5% *heat inactivated foetal calf serum* (FCS; Bovogen Biologicals) dan 0.05% *sodium azide* [Sigma-Aldrich]).
3. Sel limfosit kemudian dilarutkan ke dalam FACS buffer dengan konsentrasi 1 x 10^7 cell/ml, dan direaksikan dengan antibodi: 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *mouse anti-bovine CD4 MAb* (*Serotec*), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *mouse anti-bovine CD8 Mab* (*Serotec*) atau 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *mouse anti-bovine CD21 MAb* (*Santa Cruz*).

Semua sampel di analisa dengan alat *BD Cell Quest Pro V5.2* (*BD Biosciences*) dengan perangkat lunak FACSCalibur.

Pengolahan data dilakukan dengan *Flow Jo V7.2.5* (*Treestar Inc., USA*) *flow cytometry analysis software*.

LAMPIRAN 3.

BIODATA PENELITI

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap	Dra. Netty Ino Ischak, M.Kes
2	Jenis Kelamin	P
3	Jabatan Fungsional	Lektor Kepala
4	NIP/NIK	196802231993032001
5	NIDN	0023026803
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Telaga, 23 Pebruari 1968
7	E-mail	nettyischak@yahoo.com
8	Nomor Telpon/HP	081340516545
9	Alamat Kantor	Jl.Jend.Sudirman No.6 Kota Gorontalo
10	Nomor Telpon/Faks	0435-821125
11	Lulusan yang telah dihasilkan	S-1= 45 orang, S2= -, org, S3= -, org
12.	Mata Kuliah yg Diampuh	<ol style="list-style-type: none">1. Biokimia2. Kimia Bahan Makanan

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2	S-3
Nama Perguruan Tinggi	UNSRAT-FKIP Gorontalo	UNPAD-Bandung	UNAIR-Surabaya
Bidang Ilmu	Pend. Kimia	Biokimia Kesehatan	Ilmu Kesehatan
Tahun Masuk-Lulus	1987-1992	1998 - 2001	2010 – 2013
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Analisis Kadar Asam Laktat Pada Beberapa Jenis Susu yg Beredar Di Pasaran Gorontalo	Aktivitas Imunosupresi Ekstrak Temu Putih (<i>Curcuma zedoaria</i>) Melalui Uji Fagositosis Sel Netrofil Secara In-Vitro	Potensi Kerang Darah (<i>Anadara granosa</i>) Terhadap Limfosit T, γ -Globulin, Histologi Timus dan sIgA Mukosa Usus Tikus Betina (<i>Rattus norvegicus,L</i>)Kurang Gizi
Nama Pembimbing/Promotor	Prof. Dr.Ishak Isa M.Si	Dr. Koeswadji, M.Sc	Prof.R.Bambang Wirjatmadi, dr.,MCN

C. Pengalaman Penelitian

Tahun	Judul Penelitian	Sumber Dana
2006	Meningkatkan Aktivitas dan Hasil Belajar Mahasiswa Pada Pembelajaran Biokimia Melalui Pencapaian Konsep dan Jigsaw Secara Variatif.	DIKTI, PPKP
2007	Optimalisasi Pemahaman Mahasiswa Pada Pembelajaran Kimia Dasar Melalui Pencapaian Konsep-Jigsaw Secara Variatif	DIKTI, PPKP
2008	Analisis Kandungan Kimia Ikan Nike Asal Pantai Leato Selatan Gorontalo	UNG
2008-2009	Studi Kandungan Kimia Dan Aktivitas Biologi Daun Jarak Asal Gorontalo,	DIKTI,Hibah Bersaing
2009-2010	Evaluasi Aktivitas Imunomodulator Dan Anti Kanker Ekstrak Glukan Dari Serealia Lokan Non Beras	DIKTI, Hibah bersaing
2010	Evaluasi Mutu Ikan Cakalang Asap dengan Metode Ensiling	UNG

D.Buku/Bab/Jurnal

Tahun	Judul	Penerbit/Jurnal
2005	Immunosupresi Ekstrak Metanol Rimpang <i>curcuma zedoaria</i> Berg Roscoe, Melalui Uji Fagositosis Sel Netrofil Darah Manusia Secara In Vitro	FMIPA/ MATSAINS
2007	Meningkatkan Aktivitas dan Hasil Belajar Mahasiswa Pada Pembelajaran Biokimia Melalui Pencapaian Konsep dan Jigsaw Secara Variatif	LEMLIT UNG/ Penelitian Pendidikan dan Sains
2008	Studi Kandungan Kimia Dan Aktivitas Biologi Daun Jarak Asal Gorontalo,	UNG/ SAINTEK
2007	Penerapan teknologi Fermentasi Minyak Kelapa Pada Ibu Rumah tangga Di Desa Luhu Kec Telaga.	LPM UNG/SIBERMAS
2008	Gangguan metabolisme <i>Triasil Gliserol</i> pada Sirosis Hati yang di sertai Diabetes Melitus	UNG/SAINTEK
2011	Eavaluasi Mutu Ikan Cakalang Asap dengan Metode Ensiling	ENTROPI/ Pend.Kimia

E.Makalah/Poster

Tahun	Judul	Penyelenggara
2005	Immunosupresi Ekstrak Metanol Rimpang <i>curcuma zedoaria</i> Berg Roscoe, Melalui Uji Fagositosis Sel Netrofil Darah Manusia Secara In Vitro (Makalah)	UNG/Seminar Nasional Kimia

2006	Isolasi Flavonoid Ekstrak Etanol Temu Putih(Curcuma Zedoaria) Asal Gorontalo (Makalah)	UNIMA/ Seminar Nasional Kimia
2008	Efek Penggunaan Jamu Tradisional Bagi Kesehatan (Makalah)	KAHMI
2009	Evaluasi Aktivitas Imunomodulator Dan Anti Kanker Ekstrak Glukan Dari Serealia Lokal Non Beras	Hibah Bersaing
2013	Profil Asam Amino dan Asam Lemak Kerang Darah (Anadara granosa) Asal Pantai Pohuwato Gorontalo	Seminar Nasional UNTAD-Palu

F. Pengabdian Pada Masyarakat

Tahun	Judul	Penyelenggara
2006 - Sekarang	Tim Auditor LP POM MUI Propinsi Gorontalo	Badan LP POM Propinsi Gorontalo
2008	Pelatihan tentang Efek Penggunaan Jamu Tradisional Bagi Kesehatan Pada Masyrakat Desa Iluta Kec. Batudaa.	LPM,
2011	Penerapan Tekhnologi Pengawetan Ikan Asap Secara Ensilling dengan memanfaatkan limbah sayur kubis pada masyarakat di desa Tilote Kec. Tilango Ka. Gorontalo	LPM, Sibermas

Gorontalo, Agustus 2013

**Dra. Netty Ischak, M.Kes
NIP. 19680223199303 2 001**

LAMPIRAN 4.

ANALYSIS of T LYMPHOCYTES (CD4⁺), ZINC SERUM AND THYMUS HISTOLOGY of MALNOURISHED RATS SUPPLEMENTED by THE BLOOD COCKLE (*Anadara granosa*)

Netty Ino Ischak¹, Bambang Wirjatmadi², Yoes Priyatna Dachlan³

¹Department of Chemistry, Universitas Negeri Gorontalo

²Department of Nutritional Sciences, Faculty of Public Health, Universitas Airlangga, Surabaya

³Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

The Blood cockle (*Anadara granosa*) is an invertebrate animal that has quite high protein and zinc. Malnourished condition characterized by decreasing the number of T lymphocytes (CD4⁺) and zinc serum levels with the presence of organ dysfunction such as atrophy of thymus. This study aims to analyze the blood cockle supplementation in increasing the number of T lymphocytes (CD4⁺), zinc serum levels and improved thymus of malnutrition rat (*Rattus norvegicus*). The experimental study of the Randomized Post Test Only Control Group Design on 30 female rats of *Sprague Dawley*. The sample was selected by simple random sampling, divided by five treatment groups: (1) normal controls (KN), (2) and (3) malnourished group who were given non protein rations as a positive control K.kg (+), and 20% casein as negative control K.kg (-), and (4), (5) malnourished group was given 10% casein combined with 10% blood cockle flour (P.kg1), and (P.kg2) 20 %blood cockle flour. Treatment was for 35 days. Malnutritionmarked (albumin level <3.0 g/dL). At the end of study rats were sacrificed for blood and tissue collection, further examination for the number of T lymphocytes (CD4⁺) and zinc serum. Histological examination of the thymus with Hematoxilin-Eosin staining (HE). Data were analyzed by ANOVA and further test of Duncan. The results showed that blood cockles supplementation increasing the amount of T lymphocytes (CD4⁺) and serum zinc levels to normal, and able to improve the malnutrition rat cortex structure and thymus medulla with significant level (p <0,05).

Keywords: Blood Cockle (*Anadara granosa*), T lymphocytes (CD4⁺), zinc serum, thymus, malnutrition

INTRODUCTION

Cockle is a commodity that has a high economic value. Production volume of cockles in Indonesia in 2010 reached 8321 tons (KKP 2010). Cockles as one marine food products (seafood) that consumed by many human because it has a high nutritional and protein value that categorized as protein complete because of amino acid levels are high, a full profile and about 85-95% easily digestible by our body (Widowati, 2008). Cockles as a source of zinc as its containing higher value than york 0.02 mg/100 g, and chicken meat 1 mg/100 grams (Widowati, 2008).

The high content of protein and zinc in blood cockle, so it has a potential as a therapeutic supplementation for malnourished children. The conjugation both protein and zinc as compound component that plays a role in the cell metabolism regulation in the body. Protein will help the process of zinc absorption and subsequently affect the process of the formation of the immune system.

The role mechanisms of *zinc* and protein shown in the reversible mechanism of *zn-finger* at sufficient *zinc* levels, an increase in *zinc* pool can trigger the methalotionin synthesis of intestinal cells that can bind intracellular zinc excess. Upon entry into erythrocytes, zinc bound by cysteinerich intestinal protein (CRIP) which move zinc into methalotionin or across the serous side of enterocytes to bind the plasma proteins (albumin) entry circulation portal and concentrated in the liver. Other plasma components containing zinc which is alpha-2 macroglobulin, transferin, and amino acids, particularly cysteine and histidine (Prasad, 2007). The thymus gland is a source of lymphocytes known as T lymphocytes (lymphocytes derived from the thymus gland). T lymphocytes ($CD4^+$) is very sensitive to the incoming antigens (both derived from viruses, bacteria or other substances). For instance the reactions of lymphocyte cells in thymus gland when the body inserted by antigens, were proliferated or multiply by division. The T lymphocytes commands and controlsthe body immunity. The growth of thymus gland is influenced by age, hormones and disease. Thymic that has a quick atrophy is a reaction to stress, so the animals were dead after a long illness that may have a very small thymus (Tizard, 1987) this can be found in malnutrition.

This study aims to analyze the number of T lymphocytes ($CD4^+$), zinc serum levels and thymus improvement through measurement of the cortex thickness and medulla diameter with stained of hematoxylin-eosin (HE) at the thymus tissue of malnutrition rat supplemented with blood cockleflour. The results of this research can be used as a scientific basis in order to improve the immune system, especially in the nutrition managerial can utilize the blood cockles that have complex nutrition, especially protein and zinc to overcome the problem of malnutrition.

RESEARCH METHODOLOGY

Research Location and Schedule

The care of 30 female rats (*Rattus norvegicus*) of Spraque Dawley strain in *Seafast* laboratory cages of Food and Nutrition Department, Institut Pertanian Bogor. Analysis of the number of T lymphocytes ($CD4^+$) and zinc serum conducted at the Laboratory of Clinical Pathology of

RSCM. Processing of Thymus histology carried out in the Laboratory of Primate Center, Institut Pertanian Bogor.

RESEARCH DESIGN

This study is an laboratoric experimental research with research design of Randomized Post Test Only Control Group Design using rats as test subjects as *ad libitum*.

Making of Blood Cockle Flour

Materials used were blood cockle *Anadara granosa* species taken the flesh intact after being separated from the shell. Blood cockles obtained from the Coast of Tomini Gulf of Gorontalo. Making of blood cockle flour include: washing, steaming, and the separation of intact meat with shell, draining, drying and milling. Drying used sunlight to reduce the water content level. The grinding used *disc mill* with 40 mesh, and the resulting blood cocklesflour.

Analysis of Blood Cockle Flour

Analyzes performed on blood cockle flour included:

- Proximate analysis (moisture, ash, fat, protein and carbohydrates) (AOAC, 1995)
- Analysis of the mineral content of zinc (Zn) with AAS method.

Creating a malnourished rats

The creation was based on the concept (Susanto, 2011) of a non-protein food feeding (see the list in table.1) in 14 days. Rats are identified malnutrition if their albumin reaches 3,0 g/dL or at least around 2,7 g/ dL.

Food formula, test-animal treatment, and sampling

Table 1. the composition of rat experiment food (AIN, 1993)

Component	Normal Control (KN)	Malnutrition Negative Control K.kg (-)	Malnutrition Positive Control K.kg (+)	Treatment (P.kg1)	Treatment (P.kg2)
Protein (%)	20,039	0,212	20,039	20,114	20,036
Fat (%)	6,999	6,844	6,999	6,167	6,996
Carbohydrate (%)	53,508	74,529	53,508	58,100	47,877
Mineral mixture (%)	2,627	2,627	2,627	2,627	2,627
Vitamin (%)	1	1	1	1	1
CMC (%)	5	5	5	3,58	2,160
Water (%)	8,992	10	8,992	3,052	3,052
Total	100 (98,165)	100	100	100	100

	(100,212)	(98,165)	(94,64)	(83,974)
Energy (Kcal)	367,93	369,305	367,93	376,54

Note: KN : Normal Control (food's standard casein 20%)
 K.kg(+) : Malnutrition (non protein)
 K.kg(-) : Malnutrition (food's standard casein 20%)
 P.kg 1 : Malnutrition (casein 10% + Blood Cockle Flour10%)
 P.kg 2 : Malnutrition (Blood Cockle Flour 20%)

Analysis of Total T-lymphocytes (CD4⁺)

Mouse blood samples were taken from all treatment groups and put in micro tainer tubes and stored in a cooler box. Further, samples were prepared and analyzed at the Laboratory of Clinical Pathology RSCM Jakarta. Inspection and reading of the results follow laboratory procedures using a FACSCalibur tool.

Analysis of Serum Zinc Levels

The Blood was then centrifuged to obtain serum, and then continued with the analysis of serum zinc levels by the method of *Atomic Absorption Spectrofotometer* (AAS).

Processing and staining Thymus Network (Hematoxylin-eosin)

After the sampling, the thymus tissue of the five groups of rats were fixed in a paraformaldehyde for 24 hours, then followed by dehydration process with alcohol prior to embedding in paraffin. Pieces of tissue ($\pm 5\mu\text{m}$) were further processed with common staining of hematoxylin eosin (HE). HE staining (Kiernan, 1992) was conducted to determine the general morphology of thymus tissue that covers the size of cortical thickness and diameter of the thymus medulla using a light microscope at 100 times of magnification.

Observation and Data Analysis

Analysis results of the number of T lymphocytes (CD4⁺), serum zinc levels and cortical thickness measurement and thymic medulla in five treatments arranged as a completely randomized design – they were analyzed by ANOVA. If the treatment gives a significant effect ($p < 0.05$), then it will be followed by Duncan's significant difference test to determine the difference of each treatment (Steel and Torrie, 1986).

RESULTS

Chemical analysis of the Blood Cockle Flour

Chemical analysis on the Blood Cockle Flour and casein during the study are presented in Table 2. Analysis results of samples used in the study

Nutrition Component	Content (%)			
	Casein (Alacid acid casein)	Acid	Blood Cockle Flour	

Protein	86, 46	27,26
Fat	0,66	2,54
Water levels	4,36	9,47
Abu levels	3,78	10,62
Carbohydrate	4,74	48,01
Zinc (mg/L)	-	81,16

Analysis of T lymphocyte (CD4⁺)

Analysis results of the number of T lymphocytes (CD4⁺) and serum zinc levels in all treatment groups are presented in Table 3.

Table 3. The mean of T lymphocytes (CD4⁺) Serum Zinc Levels of Rat Experiment

Treatment	Tlymphocytes (CD4 ⁺) (sel/ μ L) \pm SD	P significant	ZinkSerum (mg/L) \pm SD	P significant
KN	797,667 \pm 21,172	0,0001	0,990 \pm 0,075	0,0001
K.kg (+)	219,000 \pm 23,461		0,458 \pm 0,052	
K.kg (-)	579,833 \pm 22,982		0,902 \pm 0,064	
P.kg 1	713,500 \pm 110,059		1,012 \pm 0,090	
P.kg 2	754,333 \pm 108,428		1,093 \pm 0,072	

Baseline analysis on undernourished group showed that this group had an average number of T lymphocytes (CD4⁺) of 400 cells / mL, whereas in the group of rats (normal / healthy) had levels of T lymphocytes (CD4⁺) of 746 cells / mL. Number of T lymphocytes (CD4⁺) in normal human blood is 410-1590 cells / μ L. Analysis of the number of T lymphocytes (CD4⁺) on rats experiment is presented in Figure 5.3. The figure shows that the highest average of lymphocytes present in the group amounted to 797.67 KN cells / mL, followed by 754.33 P.kg2 cells / mL, group P.kg1 of 713.5 cells / mL, group K.kg (-) amounted to 579.83 cells / mL and the lowest one in the group K.kg (+) as a positive control was 219 cells / μ L.

Statistical analysis showed that administration of blood into the flour shells ration rats gives significant effect ($p <0.05$) on increasing the number of T lymphocytes (CD4⁺) on undernourished rats. Picture changes increase the number of T lymphocytes (CD4⁺) in each treatment are presented in Figure 1.

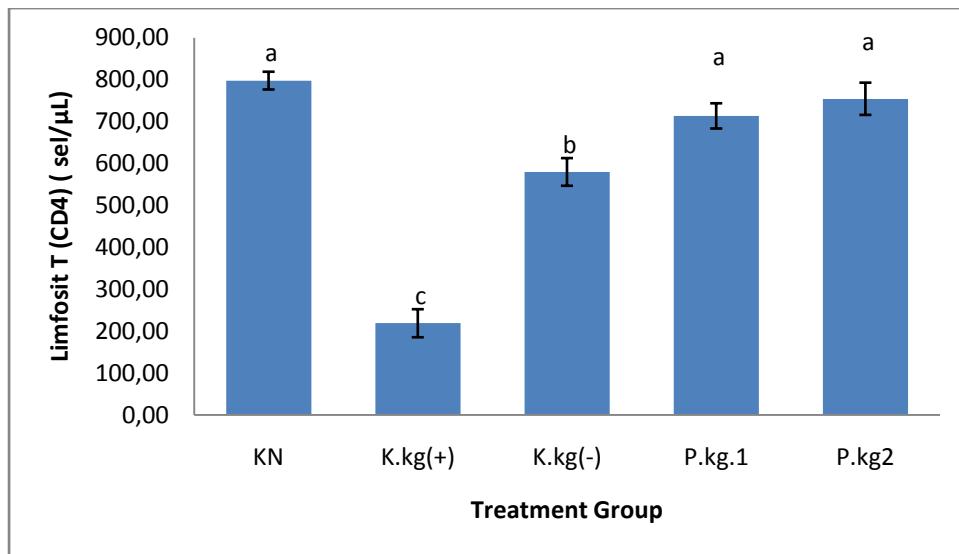


Figure 1. Number of T lymphocytes (CD4 +) on Treatment Group of Rat Experiment. Letters above diagram shows the different letters differ significantly if Duncan test based on $\alpha = 0.05$.

Further test results show that the group KN Duncan does not give a real difference to the group and P.kg2 P.kg1. When compared with the positive control K.kg (+), it gives a real difference to the group K.kg (-) which has increased the number of T lymphocytes (CD4⁺) was slightly lower than the group KN, P.kg1 and P.kg2. This suggests that increasing the number of T lymphocytes (CD4⁺) caused by the administration of blood or flour shells combination with casein.

Analysis of Serum Zinc Levels

Baseline analysis for the undernourished rats experiment group had an average serum zinc levels of 0.473 mg / L, whereas in the group of rats (normal / healthy) had serum zinc levels of 0.866 mg / L. Plasma and serum contain approximately 10-20% zinc circulation. Normal plasma zinc levels in the 80-110 mg / dL, blood contains 20 times as much as the enzyme carbonic anhydrase in erythrocytes, hair containing 125-250 ug / g muskulus 50 ug / g (Bakri, 2003).

Analysis of mice zinc levels are presented in Table 3 which shows that the average highest serum zinc levels found in Blood Cockle Flour treatment giving (P.kg2) was 1.09 mg / L, followed by 1.01 mg of P.kg1 group , KN treatment was 0.99 mg / dL, a group K.kg (-) was 0.90 mg / L and the lowest one in the group K.kg (+) as a positive control of 0.46 mg / L.

When compared with the positive control group, the Rationing (P.Kg1 and P.Kg2) could increase serum levels of zinc rats. Statistical analysis showed that blood shells flour giving

into rats ration significantly ($p < 0.05$) increase the serum zinc levels of malnourished mice as presented in Figure 2.

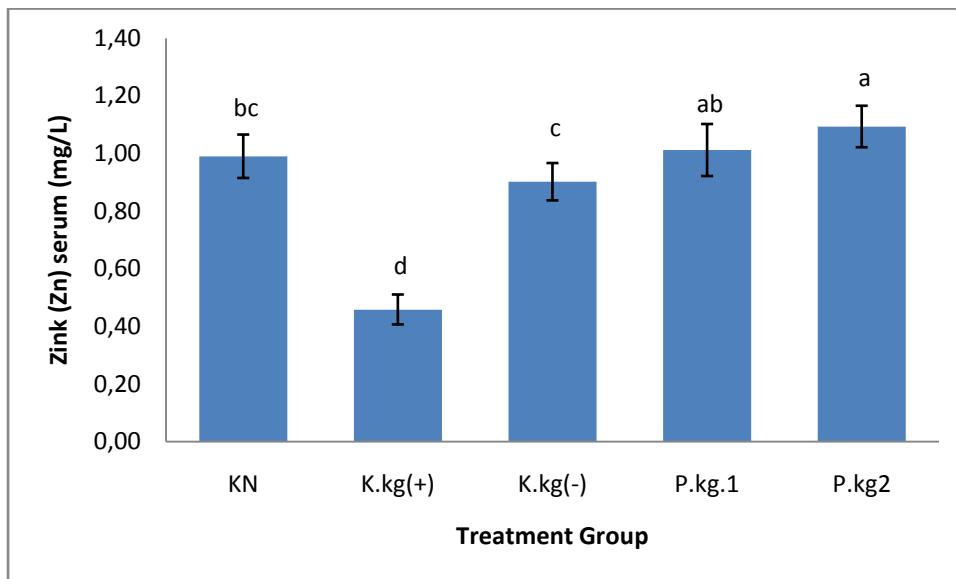


Figure 2 Serum Zinc Levels in treatment group of Rats Treatment. Letters above diagram shows the different letters differ significantly if Duncan test based on $\alpha = 0.05$.

Further test results show that the group P.Kg1 Duncan did not give a real difference on P.kg2 and KN groups. Similarly KN group did not provide a noticeable difference in the group K.kg (-) and group P.kg1. In contrast to the positive control group K.Kg (+) effect of blood cockles flour gave a very significant effect. This suggests that giving blood cockles into the flour ration can increase serum zinc levels in malnourished rats condition.

Thymus Histological Observations

Statistical analysis showed that Blood Cockle Flourgiving into rats ration has a significant effect on the thickness of $p = 0.042$ and $p = 0.004$ cortex to the medulla diameter of malnourished rats, it reached the level of confidence ($p < 0.05$).

In Table 4 the average size of the thymus cortical thickness in each treatment showed the highest values in the normal control treatment group (KN) i.e. 284.30 lm, and the lowest one in group K.Kg (+) i.e. 217.88 lm. 232.57 lm P.Kg1 group is slightly lower than the 264.67 lm P.Kg2 group, and the group K.kg (-) is 237.31 lm, slightly higher than the P.Kg1.

Table 4. The mean size cortex thickness and diameter of medulla of Thymus Rat Experiment

Treatment	Mean Thymus cortex thickness(μm) ±SD	P significant	Thymus diameter(μm) ±SD	medulla P significant
KN	284,30±20,15	0,042	290,049±40,54	0,004
K.kg (+)	217,88±17,49		503,322±26,61	
K.kg (-)	237,31±9,93		381,504±37,82	
P.kg 1	232,57±15,28		333,646±24,36	
P.kg 2	264,67±20,93		354,508±25,71	

Duncan's test results further indicated that the group KN and P.Kg2 provided a real difference to the treatment of non-protein Rationing K.kg (+). KN group did not provide a noticeable difference in the malnourished group that were given a ration of casein K.kg (-) and the malnourished group who were given a combination of casein and starch P.kg1 blood cockles. The same group demonstrated that K.kg (+) did not provide a clear difference with K.kg group (-), although slightly lower values. To sum up, Blood Cockle Flour giving in combination with casein in rats ration can improve rat thymus cortical thickness or malnourished rats as depicted by KN group.

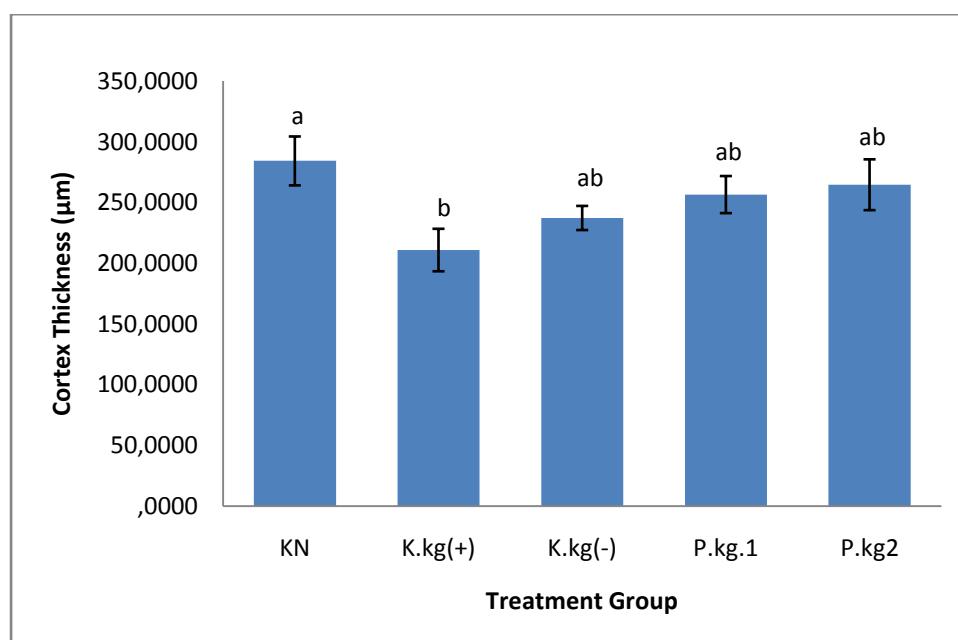


Figure 3. Thymus cortex thickness measurement results on Treatment Group of rats experiment. Letters above the diagram shows the different letters differ significantly if Duncan test based on $\alpha = 0.05$.

Table 4 shows that the average diameter size of the thymic medulla in each treatment group showed the highest value at K.kg (+) i.e. 503.23 lm, and the lowest one on 290.05 lm KN group. 333.65 lm P.kg1 group is slightly lower than the 354.51 lm P.kg2 group, and the group K.kg (-) 381.50 lm that is slightly higher than P.kg2 group.

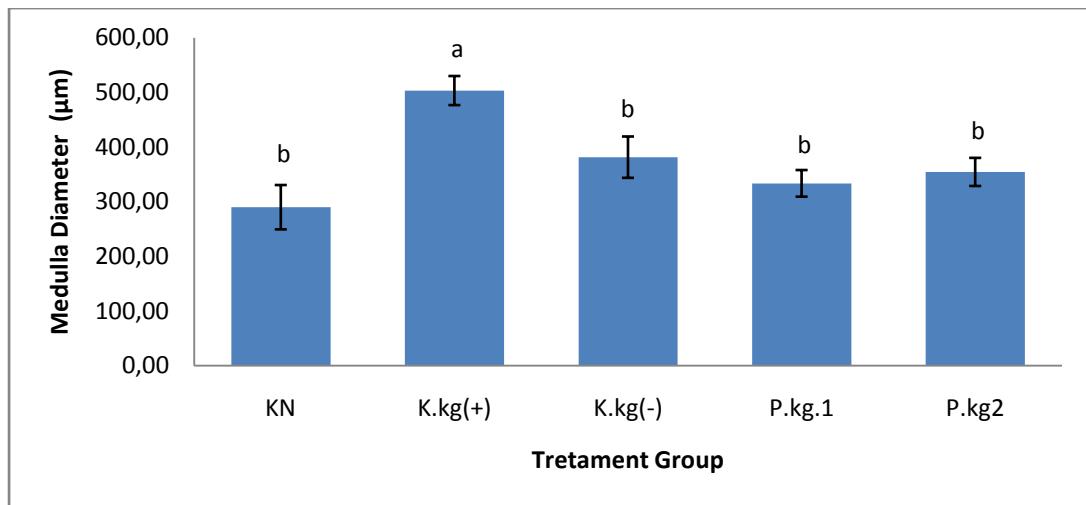


Figure 4. Thymus medulla Diameter Measurement results on Treatment Group of rats experiment. Letters above the diagram shows the different letters differ significantly if Duncan test based on $\alpha = 0.05$.

Duncan's test results further indicate that the group K.kg (+) gives a real difference with P.kg2 group and normal control group (KN). KN group did not provide a noticeable difference in the malnourished group that were given a ration of casein K.kg (-) and the malnourished group who were given a combination of casein and starch P.kg1 blood cockles. Results of histology photomicrograph on thymus preparations with HE staining presented in figure 5

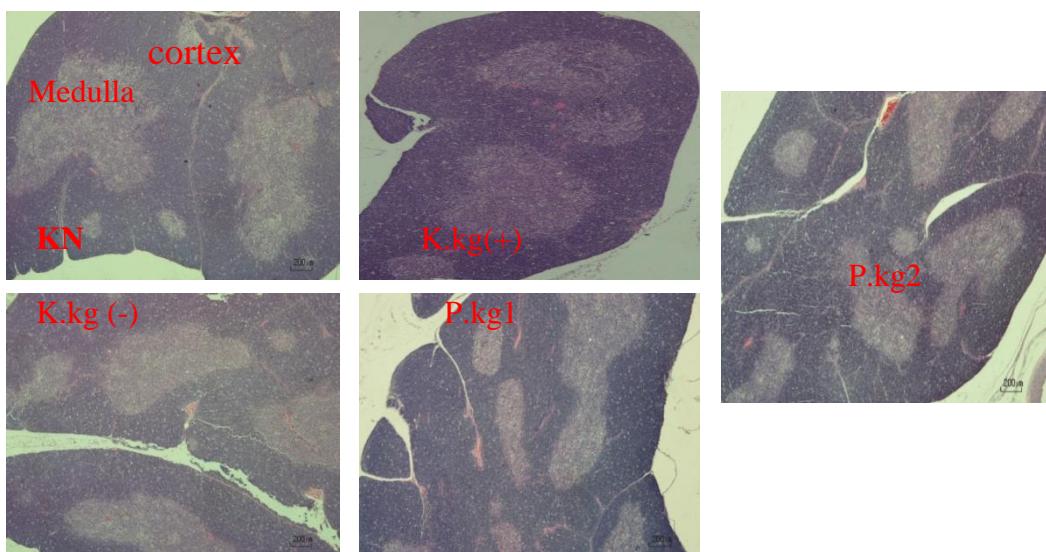


Figure 5. Observations Rat Thymus Histology Microscopic preparations (*Rattus norvegicus*) with HE Painting, scale: 100 μm at: (KN) Normal Control Rats, K.kg (+) control mice were given rations Malnourished Non Protein, K.kg (-) Mice malnutrition is given control ration Standard Casein, P.kg1 malnourished Rats were given rations Casein and Wheat Shells and Blood 10% (P.kg2) malnourished Rats were given a 20% Blood Meal Shells

DISCUSSION

Number of T lymphocytes (CD4⁺)

Based on the results of this study and the statistical analysis showed that administration of blood into the flour shells ration rats significantly ($p < 0.05$) towards increased levels of T lymphocytes (CD4⁺) rats undernourished.

An increase in the number of T lymphocytes (CD4⁺) in the group of rats malnourished after being given blood cockle and its combination with casein illustrates that the role of nutrition in the blood shellfish contain adequate protein can increase the number of T lymphocytes in the body.

A lymphoid organ associated with the production of T lymphocytes is thymus. As it is known that the maturation of T lymphocytes in the thymus is. In the thymus gland are timosit. Role timosit cells and its relationship with the existing content of leptin in the thymus have been done by Yablonski, et al., (2008). Explained that the state of malnutrition decreased leptin levels, which would stimulate adrenal axis, pituitri and the hypothalamus, which is resulting in an increase in the hormone glukokorticoid and ultimately an increase in apoptosis tymosit. Furthermore tymosit also explained that apoptosis can be prevented and can be reversed by administration of leptin provided that adequate protein is still there (at adequate levels). When leptin levels fall then would thymus atrophy, and further down the production of T lymphocytes. Mechanism of the role of leptin in lymphoid organs is to build on the energy balance of the organism through the stimulation of the hypothalamus and stimulate lymphocyte production and spur growth hormone on thymus (timulin hormone) in the presence of leptin.

Another study conducted by Nasser, et al., (2007) on children with PEM note a decline in the number of T lymphocytes this was due to a decline in the condition of PEM thymus hormone synthesis, which is responsible for the development of cell-mediated immune response. Also explained that the lymphoid tissue found primarily atrophied thymus and T lymphocyte production effects become slightly.

Decreased levels of T lymphocytes (CD4⁺) in the malnourished mice receiving non-protein ration can be caused by the absorption of nutrients from the small intestine digestion rate decreased due to the motion of diminishing. Suspected infection in malnutrition conditions may occur, and if this is the case will further increase reactive oxygen species (ROS), increasing ROS will further increase epithelial necrosis, which caused an increasing Hsp70 (Nasronudin, 2005).

Rat Serum Zinc Levels of Malnutrition

Albumin proteins can bind to zinc in serum and together play a role in protein synthesis in the body. The results showed an increase in serum zinc levels after being given a blood or flour shells in combination together with casein. This is evidenced significant p value = 0.0001 which means that the treatment effect on serum zinc levels at p <0.05.

If examined from the results of Duncan's test was not significant difference in the two treatments (P.kg1 and P.kg2), despite having reviewed the results of the analysis are known ration treatment combination of 10% casein and 10% flour blood cockles (P.kg1) has lower zinc levels ie 19.65 mg / L, compared ration P.kg2 group was 34.19 mg / L. This result can be explained that the zinc status is affected by zinc intake from food. Components of blood shellfish such as iron (Fe), protein, dietary fiber and phytic also affect zinc absorption. On the other hand zinc absorption varies greatly depending on the content of zinc in the diet and bioavailability, zinc from animal products is easily absorbed zinc. Coppen and Davies (1987) and Sandstrom and Cederblad (1980) reported that higher intake of zinc will reduce the amount of zinc absorbed. Decreased zinc absorption as a result of zinc doses higher, due to saturation of the transport mechanism. Steel and Cousins (1985) stated that zinc absorption is affected by the component carrier (carrier) and diffusion processes. Amount of zinc absorbed increases linearly up to higher levels, but after reaching the diffusion process, the amount of zinc absorbed will be consistent.

As metaloenzyme, zinc is needed in almost all aspects of cellular metabolism. Study some of the results of animal studies indicate that zinc is essential for DNA synthesis by mammalian cells. Thymidine kinase, RNA polymerase, DNA polymerase, ribonuclease and reverse transcriptase is zinc dependent enzymes that are catalysts important in replication and transcription of DNA during cell division (Prasad, 1998). Is a zinc finger protein that binds nucleic acids in the form of zinc ion that binds cations cysteine and histidine in the form of a bond between the hydrophobic alpha with two anti-parallel beta strand of a self-folding structure, the structure of DNA binding protein is essential. Zinc finger bonding can describe the pattern of amino acids around the zinc binding was observed on certain transcription factors that result in the formation of the loop (node) or a finger on the protein and allows the parts that are bound to bind DNA (Deoxyribo nucleic acid) in the gene promoter. Therefore, without the zinc transcription factors can not bind to DNA and stimulates transcription of the gene. Zinc-finger form requires four amino acid residues as the two cysteine ligands and two molecules each histidyl zinc (Prasad, 2007). Another thing could be explained that the biological role of zinc is always in the form of bivalent cations, did not undergo reduction

and oxidation under physiological conditions, so that zinc is a stable component of the protein complex (Prasad, 2007 and Sankar & Prasad, 1998). The reason can be explained that the shells of blood that contains high protein and zinc may play a role in improving the immune system, in addition to its function as an enzyme cofactor in cell metabolism. According to Pond, et al., (2005) zinc has effects on immunity and can increase the activity of lymphoid cells.

Thymus Tissue Repair

Thymus important role in specific cellular immune system, as occurs in the thymus differentiation and proliferation of T cells or T lymphocytes In the event of involution (developmental disorder) of the thymus gland would lead to a decrease of T cells, such as CD4⁺ T cells [T helper 1 cells (Th1) and T helper 2 cells (Th2)] (Baratawidjaja, 2002).

Shrinkage or atrophy is a shrinking of an organ or tissue, becomes smaller than its normal shape. Another theory explains that the atrophy of the thymus is characterized by loss of lymphocyte populations and limit the loss of distinction between medulla and cortex (Stacey, 2007). Atrophy can also be caused by lack of nutrition in its function as the growing essence and thymus cell growth. The lack of complete nutrition will affect degenerative changing on the organ. Further, the changing on thymus is atrophy and medulla. Table 4 shows that the size of cortex is getting smaller toward lack nutritious mouse which is given non protein food. This also can be seen on medulla size which bigger than cortex. This indicates that thymus is atrophy because they consume less nutrition which cause all cell components on their body grow improperly.

The size of thymus is varied, the biggest size can be found on newborn animal and absolute biggest size would be on puberty phase. In mature phase, thymus atrophy of parenchyma and cortex is replaced by fatty tissue. Thymus gets fast atrophy as a reaction on its stress of lack of nutrition. This research predicts the experimental mouse get stressed which cause this animal experience physiological disorder as a result of low appetite on food and it has effect on its growth and cell development or body tissues. Tizard (1987), in Febriana (2004), explains thymus will experience fast atrophy because of stress, therefore death animal after getting sick for along time, has a very tiny thymus. It is explained that the main component of cortex thymus consisted of reticulum epistle and lymphocyte. As the consequence, the smaller cortex size, the fewer lymphocytes produced on this tissue. Involution process is signed by frequent decrease of lymphocyte especially in cortex area, the enlargement of epistle reticular cells and parenchyma are replaced by fatty cells. Thymus also

guarantees habitat where stem cell migrate from spinal chord postnatal proliferate and differentiation to be lymphocyte T (Stacey, 2007). This process is pushed by some chemical materials such as polypeptide from reticular epistle cells (Nakamura, 1986)

One of functions of zinc as a strong antioxidant which is able to prevent cells damage, stabilize structure of cells and to increase body stamina. Zinc is able to prevent free-radicals, therefore apoptosis process or a planned death cell can be pressed (Fukamachi, et al., 1998). Based on Pond, et al., (2005) zinc is influential on immunity and can increase activity of lymphoid cell including thymus organ.

Timulin is a hormone which is secreted by thymus gland. The hormon functions as immune system control in general such as maturation lymphocyte T. The increasing timulin activity shows that immune system disturbance such as lack nutrition case as the result of thymus gland atrophy can be fixed by food with complete protein such as *Anadara granosa*. Nutrition roles on *Anadara granosa* and timulyn activity (thymus gland hormonal) is predicted can fix and protect thymus cells (cortex and medulla) from antigen attack. Therefore, cell completeness would be fit; maturation process, differentiation and cell activities will increase. Protein and zink in *Anadara granosa* can increase thymus cells work properly and in the end lymphocyte T production will increase.

CONCLUSION

Supplementing of *Anadara granosa* for 10% on lack nutritious mouse is (a) influential on the increasing number of lymphocyte T ($CD4^+$), (b) influential on the increasing level of zinc serum, (c) influential on thymus histology by fixing structure density of cortex and medulla diameter on thymus tissue which experience atrophy. Suplementing 20% *Anadara granosa* flour will have a better effect compared to 10%.

BIBLIOGRAPHIES

- Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH. 2002. Effect of Supplementation Zinc on the Growth and Serum Zinc Concentration of Pre Pubertal Children : A Meta Analysis Of Randomized Contolled Trials. *Am J Clin Nutr* 2002;75:1062-71.
- Casey CE, Walravens PA. 1998. Trace Elements. In: Tsang TC, Nichols BL, editors. *Nutrition During Infancy*. Philadelphia: Hanley & Belfus; 191-215.
- Coppen DE, Davies NT. 1987. Studies on the Effects of Dietary Zinc Dose on Zn Absorption *In Vivo* and on the Effects of Zn Status on Zn Absorption and Body Loss in Young Rats. *Br J Nutr* 57:35-44.
- Fukamachi. Y, Karasak Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T. 1998. Zinc Suppreses Apoptosis of U937 Cells Induc By Hydrogen Peroxide Trough An Increase Of Bcl-2/Bax Ratio. *Biochem Biophys Res Commun* 19 : 364-369.

- Kiernan, JA. 1992. Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice. 2nd Ed. New York. Pergamon Press.
- Linder,MariaC. 2010. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian Secara Klinis, Penerjemah Aminudin Prakkasi.UI Press:Jakarta
- M.F Nassar, N.T Younis, A.G Tohamy, D.M dalam and M.A El-Badawy. 2007. T-Lymphocyte subsets and Thymic size in Malnourished Infants in Egypt: a hospital-based studi; Eastern mediteraniean *Health Journal* vol.17. no.5.
- Melanie J. Tuerk and Nasim Fazel. 2009. Zinc Deficiency. Department of Dermatology, University of California, in Gastroenterology, 25:136-143.
- Nakamura K, Imada Y, Maeda M.1986. Lymphocyte Depletion of Bursa of Fabricius and Thymus in Chickens Inoculated with Escherichia coli. *Vet.Pathol.* 23 : 712-717.
- Nurjanah, Zulhamsyah dan Kustiyariyah. 2005. Kandungan Mineral Dan Proksimat Kerang Darah (*Anadara granosa*) Yang diambil Dari Kabupaten Boalemo Gorontalo. *Buletin Jurnal Tehnologi Bahan Pangan IPB*, Vol VIII Nomor 2.p. 15-24.
- Ou D, Li D, Cao Y, Li X, Yin J, Qiao S, Wu G. 2007. Dietary Supplementation With Zinc Oxide Decreases Expression Of The Stem Cell Factor In The Small Intestine Of Weanling Pigs. *J. Nutr Biochem*, 2007;18:820-6
- Prasad ASankar. 2007.Zinc Mechanisms Of Host Defense. *Journal Nutrition*,vol.137:1345-9.
- Sandstrom B, Cederblad A. 1980. Zinc Absorption From Composite Meals. II. Influence Of the Main Protein Source. *Am J Clin Nutr* 33:1778-1783 (Abstrak).
- Shankar AH, Prasad AS. 1998. Zinc And Immune Function: The Biological Basis OfAltered Resistance To Infections. *Am J Clin Nutr* 1998 ; 68(suppl) 447S-463S.
- Steel RGD, Torrie JH. 1986. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. Singapore. McGraw-Hill Book Co.
- Wilson Savino, Mireille Dardenne, Licio A, Velloso and Suse Dayse, Silva-Bardosa. 2007. The Thymus is a common Target in Malnutrition and Infection, Britis *Journal of Nutriae*. 98. Sup. 1- S11-S16.
- Yablonski, Galia., Philip, Moshe. 2008. Leptin and Regulation of Linear Growth; Gut; Current Opinion In Clinical Nutrition& Metabolic Care Vol.11; p-303-308.

LAMPIRAN 5.

Ms Number: SJMMS-13-033 **Ischak et al.**

Author(s): Netty Ino Ischak, Bambang Wirjatmadi, Yoes Priyatna Dachlan

Title: ANALYSIS of T LYMPHOCYTES (CD4⁺), ZINC SERUM AND THYMUS HISTOLOGY of MALNOURISHED RATS SUPPLEMENTED by THE BLOOD COCKLE (*Anadara granosa*)

Dear Dr. Netty Ino Ischak

Your manuscript has been received by the Editorial Office of the **Sky Journal of Medicine and Medical Sciences**. The decision letter and evaluations of the review will be sent to you as soon as we receive them.

Corresponding authors are charged a \$400 handling fee. Please do apply early for a partial waiver if you cannot afford to pay the full handling fee (send request to contactskyjournalsaccount@gmail.com; only a limited number is offered per month).

Please note that we only accept payment after manuscripts have been reviewed and accepted for publication.

Kindly fill the attached consent form and send back to me as soon as possible.

Thank you for sending your manuscript to the **Sky Journal of Medicine and Medical Sciences (SJMMS)**.

Best regards,

Johnson Samuel

Editorial Assistant

Sky Journal of Journal of Medicine and Medical Sciences (SJMMS)

E-mail: submit.sjmms@gmail.com or submit.sjmms@skyjournals.org

<http://www.skyjournals.org>

Please always quote the MS number in all correspondence.

Personal Information

Title	ANALYSIS of T LYMPHOCYTES (CD4⁺), ZINC SERUM AND THYMUS HISTOLOGY of MALNOURISHED RATS SUPPLEMENTED by THE BLOOD COCKLE (<i>Anadara granosa</i>)
Name	Netty Ino Ischak, Bambang Wirjatmadi, Yoes Priyatna Dachlan
Manuscript Number	SJMMS-13-033 Ischak et al.
Address	Chemistry Department of State University of Gorontalo, Indonesia
Email	nettyischak@gmail.com

B. Consent to Payment of Handling Charges?

Kindly mark 'X' in the appropriate column of the box below

A	Agreed to pay the handling charges for manuscript	X
B	Cannot pay handling charges	

NOTE:

Kindly mark 'X' if in the appropriate column of the box below

- By choosing option 'A' above, you have agreed to pay the appropriate manuscript handling fee after the manuscript has been accepted for publication.
- By choosing 'B', your manuscript may not be processed for publication.

For further information, please contact:

Accounts Unit
Sky Journals
Email: contactskyjournalsaccount@gmail.com
Web: <http://www.skyjournals.org>