

Efektivitas Seng (Zn) sebagai Immunostimulan dalam Produksi *Reactive Oxygen Intermediate* pada Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*

(Effectiveness of Zinc as immunostimulatory Reactive Oxygen
Intermediate Production in Balb/c infected *Salmonella typhimurium*)

Ari Yuniastuti ^{1,2)}, Nugrahaningsih WH ¹⁾, Zunikhah ¹⁾

¹⁾Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang
Jalan Raya Sekaran Gunungpati Semarang 50229

²⁾ Penulis untuk korespondensi, e-mail : ari_yuniastuti@yahoo.co.id

Abstract

This study aims to prove the effectiveness of zinc as a micronutrient to increase immunostimulatory Reactive Oxygen Intermediate (ROI) production in balb/c mice infected by *Salmonella typhimurium*. Research was designed using randomized the Post Test Only Control Group Design. The sample of 24 male mice balb/c are grouped into four groups, i.e. one control group and three treatment groups (treatment dose of 78 ppm/day; 169 ppm/day and 260 ppm/day) intraperitoneally for 14 days with each group consisting of six rats. The independent variable is the provision of zinc with various doses, dependent variable is the ROI production of macrophages, which are checked by using Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay, and control variables are body weight, gender and age. All mice infected with *Salmonella typhimurium* 10⁵ intraperitoneally on day 8th. At the end of treatment mice were killed and was examined for levels of ROI. Inspection results were analyzed by *Kruskal Wallis* test. Result showed that doses of zinc of 78 ppm/day have immunostimulatory effective as the highest ROI production of mice Balb/c infected with *Salmonella typhimurium*.

Key words: immunostimulant, Reactive Oxygen Intermediate, zinc (Zn)

Pendahuluan

Penyakit demam tifoid yang biasa juga disebut tifus merupakan penyakit infeksi akut yang selalu terjadi (endemik) di Indonesia. Bila musim berganti, terutama di kota-kota besar, sering ditemukan penyakit tifus. Penyakit ini merupakan penyakit infeksi usus halus (Braunwald 2005).

Bakteri penyebab demam tifoid terutama dibawa oleh air dan makanan yang tercemar. *Salmonella typhimurium* merupakan agen yang bertanggung jawab terhadap

salmonellosis pada mencit, penyakit yang analog dengan demam tifoid yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* pada manusia (Gao *et al.* 1999). Beratnya infeksi pada demam tifoid sangat ditentukan oleh hubungan antara *host* dan mikroba. Tubuh mempunyai sistem imunitas baik alamiah maupun adaptif, dalam mengatasi antigen asing yang masuk, termasuk *S. typhimurium*. Peran fagosit dalam respon imunitas alamiah terhadap bakteri intraseluler kurang efektif, karena bakteri ini resisten terhadap enzim-enzim lisosom dan

mempunyai kemampuan untuk menghindari dari proses *killing* fagosit, seperti mencegah fusi antara fagosom dan lisosom (Abbas *et al.* 2003).

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

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

Beberapa penelitian yang telah dilakukan baik pada hewan maupun manusia, membuktikan bahwa seng mempunyai peran penting dalam sistem imun tubuh melalui peran

sebagai kofaktor dalam pembentukan DNA, RNA dan protein sehingga meningkatkan pembelahan selular. Keadaan defisiensi seng secara langsung menurunkan produksi limfosit T, respon limfosit T untuk stimulasi atau rangsangan dan produksi IL-1 (Fatimah 2006).

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

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

Penelitian yang dilakukan oleh *Zinc Investigators' Collaborative Group* berhasil menemukan bahwa dengan *intake* seng 10-30 mg/hari dapat menjadi terapi adjuvan yang

penting untuk mengobati terjadinya penyakit infeksi khususnya infeksi demam tifoid pada anak-anak di negara berkembang. Anak yang menderita defisiensi seng sangat rentan terhadap berbagai macam kuman patogen (Hadkinson *et al.* 2007)

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

Bahan dan Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design* menggunakan mencit Balb/c jantan berumur 8-10 minggu dan diadaptasikan selama 14 hari. Jumlah mencit yang dipergunakan sebanyak 24 ekor yang secara acak dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (P), yang masing-masing diberi sediaan seng yaitu P1 (78 ppm/ekor/hari), P2 (169 ppm/ekor/hari), P3 (260 ppm/ekor/hari) selama 14 hari peroral. Pada hari ke-8 semua mencit diinfeksi 10^5 CFU *S. typhimurium* intraperitoneal. Hari ke-15 mencit dibunuh

dan dilakukan pemeriksaan produksi ROI makrofag. Produksi ROI makrofag diperiksa dengan *Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction Assay*. Hasil pemeriksaan dianalisis dengan batas signifikansi (α) = 0.05

Hasil dan Pembahasan

Dengan adanya anion superoksid/ O_2 pada kultur makrofag yang diinduksi PMA, akan menyebabkan NBT tereduksi membentuk presipitat formazan. Hasilnya dibaca di bawah mikroskop cahaya, diukur persentase dan derajatnya per 50 makrofag kemudian dibuat rata-rata dan dinyatakan dalam derajat 1-4.

Rerata jumlah produksi ROI tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan P1, yaitu 3.53 sedangkan terendah pada kelompok kontrol yaitu 2.52 (Tabel 1). Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa produksi ROI untuk masing-masing kelompok reratanya berbeda. Rerata produksi ROI tertinggi ditunjukkan oleh perlakuan P1.

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

Tabel 1 Hasil pengamatan produksi ROI pada mencit setelah perlakuan

Kelompok	N	Jumlah produksi ROI
Kontrol	6	(2.52±0.108) ^a
P1	6	(3.53±0.164) ^b
P2	6	(3.04±0.136) ^c
P3	6	(2.72±0.213) ^d

Keterangan: superscrib yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata.

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

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

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

dosis seng 78 ppm/ekor/hari, 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari berpengaruh signifikan pada produksi ROI mencit Balb/c. Pada mencit Balb/c yang diberi dosis seng, mencit mengalami infeksi *S. typhimurium* yang masuk dalam tubuh ditunjukkan dengan adanya peningkatan produksi ROI. Makrofag yang teraktivasi akan memperlihatkan antara lain peningkatan produksi enzim lisosom, peningkatan aktivitas fagositosis dan adanya peningkatan produksi ROI dan NO. ROI dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan *S. typhimurium*

Tabel 2 Hasil Uji *Mann Whitney U* Produksi ROI*)

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

* Perhitungan selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 6

***Signifikan, berbeda nyata pada taraf uji 5%

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

P1 : berbeda nyata dengan P2, P3 dan kontrol

P2 : P2=P3

kelompok yang diberi dosis seng produksi ROI nya lebih tinggi dari kelompok kontrol. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan yang bermakna masing-masing kelompok, dilakukan uji *Mann Whitney U* yang menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ($p=0,004$) antara kelompok kontrol dibanding kelompok P1 dan P2; namun kelompok kontrol tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ($p=0,107$) karena $p > 0,05$. Kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3 ($p=0,016$). Pada kelompok kontrol (mencit Balb/c yang hanya diberi pakan standart dan diinfeksi *S. typhimurium*) produksi ROI tetap ada meski dalam jumlah yang relatif rendah (Tabel 2).

Dalam penelitian ini digunakan mencit Balb/c jantan, berumur 8-12 minggu dan pemilihannya dilakukan secara acak. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa pemberian

sebagai antimikrobia yang produksinya diinduksi bersama-sama oleh sitokin sitokin IFN- α dan TNF - α

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

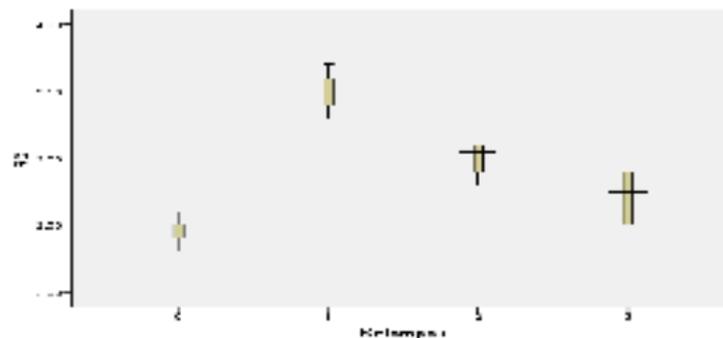
Hasil dari uji lanjut *Mann Whitney U* terlihat bahwa kelompok P1 berbeda nyata

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

Dari hasil uji *Mann Whitney U* terlihat

IFN- α serum dan pada saat kadar IFN- α turun maka aktivitas makrofag juga mengalami penurunan (Gandahusada 2000).

Aktivitas sekresi ROI dari makrofag pada kelompok P1 produksi ROInya lebih tinggi dibanding kelompok kontrol hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis seng dapat meningkatkan aktivitas makrofag untuk mensekresi ROI secara *in vitro*. Dosis seng meningkatkan ROI melalui sistem imun yang spesifik. Dalam Gandahusada (2000) dinyatakan bahwa pada infeksi *Salmonella typhimurium*, immunoglobulin M (IgM) mulai terbentuk beberapa hari setelah infeksi primer dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi, kemudian menurun



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

bahwa kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P3. Hal ini menunjukkan bahwa produksi ROI dari makrofag pada semua kelompok mencit setelah mengalami peningkatan sampai puncak tertentu, selanjutnya mengalami penurunan. Hasil ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Wahyu *et al.* (2008) yang menunjukkan bahwa produksi ROI makrofag pada mencit yang diinfeksi dengan *S. typhimurium* akan meningkat pada puncak tertentu, kemudian mengalami penurunan. Penelitian tersebut juga memperlihatkan bahwa gambaran aktivitas makrofag yang terjadi sejalan dengan gambaran kadar IFN- α serum, yaitu pada saat tercapainya puncak aktivitas makrofag ternyata juga terjadi puncak kenaikan kadar

dan meningkat dalam waktu 1-3 bulan. Immunoglobulin G (IgG) dapat dideteksi beberapa hari setelah munculnya IgM dan mencapai puncaknya ± 2 bulan setelah infeksi dan jumlah IgG yang tinggi ini dapat bertahan selama berbulan-bulan untuk kemudian mengalami penurunan dan dapat ditemukan seumur hidup dalam konsentrasi rendah. Berdasarkan pada respon imun yang dinyatakan oleh Gandahusada tersebut maka pemberian dosis seng yang merupakan komponen imunogenik dari *S. typhimurium* pada mencit kemungkinan juga akan menimbulkan respon imun yang serupa.

Interaksi antara opsonin mikroorganisme dan membran fagosit tidak hanya menghasilkan ingesti tetapi juga menyebabkan *metabolic*

burst, yang sangat karakteristik dengan peningkatan kebutuhan oksigen dan menghasilkan anion superoxide (H_2O_2), yang keduanya memiliki aktivitas mikrobisidal kuat (Leijh *et al* 1996). Pentingnya sistem untuk pemusnahan mikrobakterial dapat terlihat jelas pada pasien yang memiliki *defect* (kelainan) pada aktivitas mikrobisidal pada granulosit dan monosit seperti pada penderita *chronic granulomatous disease* (Guun-Moore *et al.* 2001).

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

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

Tingginya produksi ROI dihubungkan dengan usaha mencit dalam pemusnahan *S. typhimurium* yang masuk dalam tubuh, hal ini disebabkan oleh makrofag yang teraktivasi antara lain akan memperlihatkan peningkatan aktivitas fagositosis, secara fisik

terjadi perubahan bentuk atau ukuran dari makrofag, dan adanya peningkatan produksi ROI dan NO (Chan *et al.* 2001). ROI dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan *Salmonella typhimurium* sebagai antimikrobia yang produksinya diinduksi bersama-sama oleh sitokin IFN- α dan TNF- α . Dikatakan bahwa interaksi antara opsonin mikroorganisme dan membran fagosit tidak hanya menghasilkan ingesti tetapi juga menyebabkan *metabolic burst*, yang sangat karakteristik dengan peningkatan kebutuhan oksigen dan menghasilkan anion superoksida (H_2O_2), yang keduanya memiliki aktivitas mikrobisidal kuat (Leijh *et al.* 2006).

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

Berdasarkan pada gambaran hasil penelitian tersebut dengan mengingat bahwa infeksi *S. typhimurium* dapat merangsang produksi IFN- α maka sangat mungkin jika peningkatan dan penurunan produksi ROI makrofag pada penelitian ini dipengaruhi oleh peningkatan dan penurunan kadar IFN- α . Menurut Denker & Gazzinelli (2008), pada infeksi *Salmonella typhimurium* selain dihasilkan faktor-faktor yang mengaktivasi

respons imun (misalnya IL-12, TNF- α) juga dihasilkan faktor-faktor yang mengatur respons imun (misalnya IL-4, IL-10). Peningkatan dan penurunan kadar IFN- γ dapat dipengaruhi oleh 2 macam faktor tersebut.

Penutup

Berdasar hasil penelitian disimpulkan bahwa pemberian dosis seng 78 ppm/ekor/hari efektif sebagai imunostimulan, dengan indikator produksi ROI tertinggi dibandingkan produksi akibat pemberian seng pada dosis 169 ppm/ekor/hari dan 260 ppm/ekor/hari. Disarankan untuk dilakukan penelitian lanjut untuk membuktikan bahwa peningkatan aktifitas makrofag adalah akibat dari peningkatan sitokin IL-12 dan dengan IFN- γ

dari mencit Balb/c.

Daftar Pustaka

- Abbas AK & Lichtman AH. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Fifth edition Philadelphia : Saunders.
- Baratawidjaja KG. 2002. *Imunologi Dasar Edisi 5*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Beissel. 2002. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan (carrisyn). *Int. J Immunopharmacol* 40(10) : 967-974.
- Braunwald. 2005. *Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition*. New York: Penerbit Harrison's.
- Donabedian H. 2006. **Nutritional Therapy and Infectious Diseases: a Two-Edged Sword**. *Nutrition Journal*. 72(2) : 5-21.
- Fatimah. 2006. Respon Imunitas yang Rendah pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara Kedokteran*. 10(1) : 47-53.
- Gandahusada S. 2000. *Salmonellosis : Epidemiologi, Patogenesis dan Diagnostik*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gao XM, Tite JP & Lipscombe M. 1999. *Salmonella typhimurium* strains that invade nonphagocytic cells resistant to recognition by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Infect Immun*. 60(9): 3780-9.
- Guun-Moore DA, Jenkins PA & Lucke VM. 2001. Feline Tuberculosis : a literature review and discussion of 19 cases by unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec*. 138:276-80.
- Hodkinson C, Kelly M & Alexander H. 2007. Effect of Zinc Supplementation on the Immune Status of Healthy Older Individuals Aged 55-70 Years: The ZENITH Study. *The Journals of Gerontology: Series A : Biological sciences and medical sciences* 11(2) : 598-609.
- Kaufman HE. 1999. *Immune Response to Intracellular Bacteria*. In: Clinical Immunology Principle and Practice. St. Louis: Mosby.
- Leijh PCJ, Furh RV & Zwet TLV. 2001. *In vitro Determination of Phagocyte and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocyte*.in : Cellular Immunology. London : Blackwell Scientific Publication.
- Mittrucker HW, Kohler A & Kaufmann SHE. 2000. Characteriation of the Marine T-lymphocyte Response to Salmonella Enteritica Serovar Typhimurium infection. *Journal infect Immun*: 70 (1):199-203.
- Torres AV, Carson JJ & Mastroeni P. 2000. Antimicrobial Action of The NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis.I. Effects on Microbial Killing by ophage in Activated Peritoneal Macrophage in vitro. *J.Exp Med*. 192 (2) : 227-235.
- Wahyu W, Ashana S & Raymond J. 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Yogyakarta : Penerbit ANDI.

