

## RESPON IMUN MUKOSA DAN SELULER PADA TIKUS YANG DIBERI BUBUK SUSU KAMBING DENGAN INFEKSI *Salmonella Typhimurium*

[*Mucosal and Cellular Immune Response of Rat Given Goat Milk Powder and Infected with Salmonella Typhimurium*]

Nurliyani<sup>1)\*</sup>, Madarina Julia<sup>2)</sup>, Ani Harmayani<sup>3)</sup> dan Endang Baliarti<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2)</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3)</sup> Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Diterima 11 April 2012 / Disetujui 04 Desember 2012

### ABSTRACT

Goat milk contains bioactive proteins and oligosaccharides which can act as immunomodulators and prebiotics respectively. The objectives of this study were to determine the effect of giving goat milk powder on mucosal immune response (sIgA/secretory immunoglobulin A), cellular immune response (IFN- $\gamma$ /interferon- $\gamma$ ) and the total number of lactobacilli in caecal digesta of infected rat by *Salmonella Typhimurium*. Male Sprague Dawley rats 3 weeks old were divided into two groups: 1) goat milk powder treatment, and 2) control. After 14 days given goat milk powder, the rats were infected with *Salmonella Typhimurium* and after 21 days were killed. The results showed that the average concentration of sIgA in group of rats given with goat milk powder was not significantly different with the control rat (42.95 ng/ml). The concentration of IFN- $\gamma$  in rat given with goat milk powder was significantly different (63.33 pg/ml) from the control (45.00 pg/ml) ( $p < 0.05$ ). After infection, the concentration of IFN- $\gamma$  of the rat given goat milk powder decreased significantly to 36.33 pg/ml ( $P < 0.05$ ). The number of total lactobacilli in rats given with goat milk powder was 6.91 log<sub>10</sub> CFU/g before infection. After infection the number of total lactobacilli reduced significantly to 6.16 log<sub>10</sub> CFU/g ( $P < 0.05$ ). In conclusion, goat milk powder could not induce mucosal and cellular immune responses after infection. However, the cellular immune response was induced in uninfected rats. Therefore, the immune system can not eliminate the pathogen which cause a decrease in lactobacilli colonization in infected rat.

**Keywords:** Goat Milk Powder, IFN- $\gamma$ , Lactobacilli, *Salmonella Typhimurium*, sIgA

### ABSTRAK

Susu kambing mengandung protein bioaktif dan oligosakarida yang masing-masing dapat berperan sebagai imunomodulator dan prebiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian bubuk susu kambing terhadap respon imun mukosa (sIgA/secretory immunoglobulin A), respon imun seluler (IFN- $\gamma$ /interferon- $\gamma$ ), dan jumlah total *lactobacilli* dalam caecal digesta tikus yang diinfeksi *Salmonella Typhimurium*. Tikus jantan Sprague Dawley umur 3 minggu dibagi menjadi dua kelompok: 1) perlakuan bubuk susu kambing, dan 2) kontrol. Setelah pemberian bubuk susu kambing selama 14 hari tikus diinfeksi dengan *Salmonella Typhimurium*, dan setelah 21 hari kemudian tikus dibunuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata konsentrasi sIgA pada tikus yang diberi bubuk susu kambing tidak berbeda dengan kontrol (42.95 ng/ml). Konsentrasi IFN- $\gamma$  pada tikus yang diberi bubuk susu kambing menunjukkan perbedaan signifikan dengan kontrol (45.00 pg/ml) ( $P < 0.05$ ), namun setelah infeksi konsentrasi IFN- $\gamma$  menurun secara signifikan pada tikus yang diberi bubuk susu kambing menjadi 36.33 pg/ml ( $P < 0.05$ ). Jumlah total *lactobacilli* pada tikus yang diberi bubuk susu kambing adalah 6.91 log<sub>10</sub> CFU/g sebelum infeksi, sedangkan jumlah total *lactobacilli* setelah infeksi menurun secara signifikan menjadi 6.16 log<sub>10</sub> CFU/g ( $P < 0.05$ ). Kesimpulannya, bubuk susu kambing tidak dapat menginduksi respon imun mukosa dan seluler setelah infeksi, tetapi respon imun seluler dapat diinduksi pada tikus yang tidak diinfeksi. Akibatnya sistem imun tidak dapat mengeliminasi patogen yang menyebabkan penurunan kolonisasi *lactobacilli* pada tikus yang diinfeksi.

**Kata kunci:** IFN- $\gamma$ , *Lactobacilli*, *Salmonella Typhimurium*, sIgA, Susu Kambing Bubuk

### PENDAHULUAN

Penyakit diare karena infeksi masih tetap menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada anak-anak. Selama beberapa dekade terakhir, upaya global telah difokuskan pada pencegahan transmisi, dan promosi penggunaan terapi rehidrasi oral untuk mengurangi ancaman tersebut. Meskipun

upaya ini sudah dilakukan, penyakit diare pada anak-anak masih menjadi penyebab 1.5-2.5 juta kematian per tahun di seluruh dunia (Rhee *et al.* 2005).

Infeksi salmonella biasanya disebabkan oleh konsumsi pangan yang terkontaminasi dan biasanya menyebabkan beberapa penyakit pada manusia seperti demam tipoid dan salmonellosis (Tellez *et al.* 2011). Salah satu agen menular yang paling umum dari kasus gastroenteritis akut adalah *Salmonella Typhimurium*. Bakteri yang berhasil masuk ke dalam saluran pencernaan melalui makanan atau air yang ter-

\*Korespondensi Penulis :  
E-mail : nurliyani@yahoo.com; Telp.: 0274-513363

kontaminasi dapat melekat dan menyerang sel-sel epitel usus, terutama sel-sel M (*microfold*) yang melapisi *Peyer patch* (Rhee *et al.* 2005). Oleh karena itu perlu dikembangkan strategi preventif yang dapat memperbaiki bahaya infeksi salmonella. Salah satu cara untuk mengurangi bahaya infeksi salmonella dengan cara peningkatan sistem imun inang (Jain *et al.* 2008).

Komponen bioaktif dalam susu berperan penting untuk proteksi perkembangan intestinum pada anak yang baru lahir terhadap patogen, dan memodulasi respon imun setelah paparan antigen. Berbagai bukti menunjukkan bahwa peptida hasil hidrolisis protein susu dapat meregulasi fungsi imun pada anak yang baru lahir. Peptida dari protein susu dapat beraktivitas pada level sistem imun mukosa sampai fungsi sistem imun tersebut berkembang secara penuh (Baldi *et al.* 2005).

Bubuk susu kambing sangat praktis diaplikasikan untuk anak-anak di daerah rawan gizi. Bahkan susu kambing juga telah direkomendasikan sebagai alternatif yang sangat baik untuk rehabilitasi anak-anak gizi buruk di Madagaskar, karena absorpsi lemaknya lebih bagus dibanding susu sapi. Hal ini didasarkan pada studi di 30 rumah sakit di Madagaskar yang merawat anak-anak gizi buruk usia 1–5 tahun, dengan periode pemberian susu kambing 2 minggu (Haenlein, 2004). Manfaat bubuk susu kambing dalam mengurangi terjadinya kerusakan epitel usus halus telah diteliti oleh Prosser *et al.* (2004) pada tikus yang diinduksi stres panas. Demikian juga aktivitas *growth factor* susu kambing dalam kultur sel menunjukkan lebih tinggi dibanding susu sapi (Wu *et al.* 2006). Susu kambing kaya akan sumber prebiotik oligosakarida yang mirip oligosakarida ASI (air susu ibu) (Bode, 2006), dan berbeda dengan prebiotik lain seperti inulin atau frukto-oligosakarida rantai pendek (Villoslada *et al.* 2006). Perbedaan tersebut dikarenakan oligosakarida susu dapat menurunkan adesi patogen pada sel-sel epitel (*antiadhesive receptor analogs* untuk patogen), sehingga menghambat perlekatannya dengan sel-sel inang (Bode, 2006; Villoslada *et al.* 2006).

Imunoglobulin A sekretori (sIgA) banyak dijumpai pada saliva dan sekresi eksokrin yang lain seperti saluran pencernaan, pernafasan dan saluran urine (Seemann *et al.* 2004). Mekanisme utama proteksi terhadap antigen patogen oleh imunitas mukosa adalah diperantarai lewat sel-sel penghasil IgA dan IgA sekretori yang dapat menetralkan dan mencegah masuknya antigen berbahaya ke dalam inang. Stimulasi respon imun lokal efektif terhadap pencegahan penyakit oleh mikro-organisme yang masuk ke dalam tubuh inang melalui jalur oral (Baldi *et al.* 2005). Imunoglobulin A sekretori berfungsi pada sekresi mukosa sebagai pertahanan garis depan dengan cara membatasi invasi patogen. Proteksi *barier* epitelial mukosa oleh sIgA melalui berbagai mekanisme. Pertama, yaitu pembentukan kompleks dengan antigen lokal yang melapisi jaringan, diambil oleh sel fagosit, kemudian diabsorpsi ke dalam sistem vaskular atau ditransport melalui epitelium ke dalam lumen (Snoeck *et al.* 2006).

Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) merupakan sitokin esensial dalam reaksi imun (Aattouri *et al.* 2002), yang diproduksi oleh sel T teraktivasi maupun sel NK (*natural killer*). Peningkatan aktivasi imun akan menyebabkan produksi IFN- $\gamma$  dan peningkatan fungsi APC (*antigen-presenting cells*) oleh induksi molekul kelas II, yang berpotensi untuk mengaktivasi sel T lebih lanjut.

Disamping itu IFN- $\gamma$  juga mengaktifkan makrofag. Sitokin IFN- $\gamma$  dikenal mempunyai aktivitas sebagai imunoregulator, berperan dalam diferensiasi sel B dan sebagai antiviral (Roitt *et al.* 1993). Mikrobia yang mendiami saluran pencernaan inang mempunyai fungsi-fungsi metabolik, *trophic* dan protektif yang penting dan spesifik (Guarner dan Malagelada, 2003). Tikus yang diberi pakan susu formula, menunjukkan adanya beberapa jenis bakteri di dalam *caecum* antara lain *Lactobacillus*, *Enterobacteria* *ceae*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, dan *Streptococcus* (Nakayama *et al.* 2003).

Berdasarkan alasan-alasan tersebut di atas, perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian bubuk susu kambing terhadap respon imun mukosa (sIgA) dan respon imun seluler (IFN- $\gamma$ ) serta jumlah total *lactobacilli* digesta *caecum* pada tikus yang diinfeksi *Salmonella Typhimurium*, yang sejauh ini informasinya masih terbatas.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk susu kambing Peranakan Ettawah (PE) yang dibuat dengan cara *spray drying*, *Salmonella Typhimurium* yang diambil dari koleksi kultur Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM, Rat-sIgA ELISA Kit, Rat IFN- $\gamma$  ELISA Kit, dan medium Rogosa Agar.

### Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus jantan Sprague Dawley umur 3 minggu yang diperoleh dari LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) UGM. Semua prosedur terkait hewan coba telah dilakukan sesuai persyaratan etik dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (*Ethical Clearance Number*: KE/FK/374/EC).

### Rancangan penelitian

Tikus dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, yaitu kelompok yang diberi bubuk susu kambing dan kelompok yang tidak diberi bubuk susu kambing/kontrol (akuades). Masing-masing kelompok dibagi menjadi dua yaitu sebelum dan sesudah infeksi. Setiap kelompok perlakuan sebelum dan sesudah infeksi digunakan ulangan 6 ekor tikus. Percobaan dilakukan selama 21 hari, pada hari ke 15 tikus diinfeksi secara oral dengan *Salmonella Typhimurium* dengan konsentrasi  $10^5$  CFU/ml. Pengambilan sampel cairan intestinum, limpa dan digesta *caecum* tikus dilakukan pada hari ke 14 (sebelum infeksi) dan hari ke 21 (setelah infeksi). Selama percobaan tikus mendapat pakan standar AIN-93G (Reeves *et al.* 1993). Susu kambing diberikan sebanyak 0.36 g/ekor/hari secara *gavage* yang setara dengan konsumsi susu 200 ml untuk manusia.

### Koleksi cairan intestinum (Modifikasi Yun *et al.* 2000)

Pengambilan cairan intestinum tikus diambil secara *flushing* menggunakan 4 ml PBS (*phosphate-buffered saline*) dingin pH 7, yang mengandung 2 mM PMSF (*phenylmethyl sulfonyl fluoride*), 10  $\mu$ g TPCK (*tosylphenylalanine chloromethyl ketone*),

0.02%  $\text{NaN}_3$ , 5 mM EDTA (*ethylene diamine tetra acetic*). Cairan *flushing* ditampung dalam tabung *conical* steril 15 ml kemudian disentrifugasi pada 926 x g (Sorval, Biofuge primo R), supernatan diambil dan disimpan dalam suhu  $-20^\circ\text{C}$  sampai dianalisis.

#### Prosedur koleksi supernatan dari kultur limfosit limpa (modifikasi Jain et al. 2008)

Limpa diambil secara aseptis dan ditempatkan dalam 5 ml medium RPMI (Gibco) yang mengandung 10% FBS (*fetal bovine serum*) dan 2% penisilin-streptomisin. Limpa dicuci dengan PBS, kemudian ditempatkan pada medium RPMI yang mengandung FBS dan penisilin-streptomisin (Gibco). Limpa dirobek dengan spet dan disemprot menggunakan ujung spet 1 ml dengan bantuan pinset. Setelah limfosit terlepas, suspensi dibiarkan sebentar agar sisa-sisa jaringan limpa mengendap. Bagian supernatan diambil dengan pipet Pasteur dan dipindah dalam tabung *conical* steril lalu disentrifugasi 5 menit pada 148 x g. Supernatan dibuang kemudian, endapan disentrifugasi lagi dalam medium FBS. Endapan yang didapat ditepatkan konsentrasi selnya sebanyak  $5 \times 10^5/\text{ml}$ , kemudian ditumbuhkan dalam medium RPMI yang mengandung FBS dan penisilin-streptomisin, lalu dimasukkan ke dalam plate 96 *well*. Mitogen PHA (*phytohaemagglutinine*) ditambahkan ke setiap *well* dengan konsentrasi 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Plate dimasukkan dalam inkubator 5%  $\text{CO}_2$  (inco 2 Memmert) selama 72 jam, suhu  $37^\circ\text{C}$ . Kultur limfosit dikeluarkan dari inkubator, supernatan diambil sebanyak 50  $\mu\text{l}$  untuk analisis sitokin.

#### Analisis sIgA (sesuai instruksi dalam ELISA Kit, Uscn Life Science Inc., Wuhan)

Imunoglobulin A sekretori (sIgA) cairan intestinum dianalisis menurut instruksi pada Rat sIgA ELISA Kit (Uscn Life Science Inc., Wuhan) sebagai berikut: Larutan standar, sampel dan blanko sebanyak 100  $\mu\text{l}$  masing-masing dimasukkan ke dalam *well* yang ada pada *plate*, kemudian *plate* ditutup dengan *plate sealer* dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Larutan dibuang kemudian ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan *Detection Reagent A* (*biotin-conjugated polyclonal antibody specific for sIgA*) ke dalam setiap *well* dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Larutan pada *well* dibuang kemudian *plate* dicuci sampai tiga kali dengan *Wash Solution 1 X*. Selanjutnya ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  larutan *Detection Reagent B* (*Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase/HRP*) dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . *Plate* dicuci lima kali, kemudian ditambahkan 90  $\mu\text{l}$  *Substrate Solution* (*Tetramethyl benzidine*) ke dalam setiap *well* dan diinkubasikan selama 15-25 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$  pada ruang gelap (cairan akan berwarna biru). *Stop Solution* (*sulphuric acid*) sebanyak 50  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam setiap *well* (cairan akan berubah warna menjadi kuning), selanjutnya dibaca pada *microplate reader* (Model 680 XR, Bio-RAD) panjang gelombang 450 nm.

#### Analisis IFN- $\gamma$ (sesuai instruksi dalam ELISA Kit, Bender MedSystems, Austria)

Analisis IFN- $\gamma$  pada supernatan kultur limfosit limpa dilakukan menurut instruksi pada Rat IFN- $\gamma$  ELISA Kit (Bender Med Systems, Austria), yang garis besarnya sebagai berikut:

*Microplate* dicuci dua kali dengan *Wash Buffer*. Standar IFN- $\gamma$  direkonstitusi dengan 750  $\mu\text{l}$  aquabidest, kemudian dibuat 7 seri pengenceran dengan kisaran konsentrasi larutan standar tertinggi 4000 pg/ml dan terendah 31.3 pg/ml. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  larutan standar, sampel dan blanko masing-masing dimasukkan ke dalam setiap *well*. Larutan *Biotin Conjugate* ditambahkan ke dalam setiap *well* kemudian *plate* ditutup dengan film adesif dan diinkubasikan selama 2 jam pada suhu ruang. Film adesif dibuka dan *plate* dicuci tiga kali dengan *Wash Buffer*. Larutan Streptavidin-HRP sebanyak 100  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke dalam setiap *well* kemudian *plate* ditutup lagi dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu ruang. *Plate* dicuci tiga kali dan ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  substrat *tetramethyl-benzidine* (TMB) ke dalam setiap *well*. *Plate* diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit di tempat gelap. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 100  $\mu\text{l}$  *Stop Solution* ke dalam setiap *well*. Absorbansi larutan pada setiap *well* dibaca dengan *microplate reader* (Model 680 XR, Bio-RAD) pada panjang gelombang 450 nm.

#### Penghitungan total *lactobacilli* (modifikasi Nakayama et al. 2003)

Total *lactobacilli* dari digesta *caecum* dihitung menggunakan metode TPC (*total plate count*) pada media selektif Rogosa Agar (Merck). Sampel digesta ditimbang dan dibuat seri pengenceran menggunakan NaCl fisiologis, kemudian pada pengenceran tertentu diinokulasikan pada media agar. *Plate* agar yang telah diinokulasi, diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , kemudian koloni yang tumbuh dihitung, dan hasilnya dinyatakan dalam  $\log_{10}$  CFU/g berat basah digesta.

#### Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis dengan ANOVA dua arah (perlakuan bubuk susu kambing dan kontrol untuk tikus sebelum dan sesudah diinfeksi *Salmonella Typhimurium*) dengan  $p < 0.05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Imunoglobulin A sekretori (sIgA) cairan intestinum

Rerata sIgA cairan usus pada tikus yang diberi bubuk susu kambing ternyata tidak ada bedanya dengan kontrol (Tabel 1) baik sebelum maupun sesudah infeksi *Salmonella Typhimurium*. Hal ini berarti bubuk susu kambing yang diberikan sebanyak 0.36 g/ekor hari (setara dengan konsumsi pada manusia 20 g/hari atau 200 ml susu), belum mampu menginduksi respon imun mukosa di intestinum.

Tabel 1. Rerata sIgA (ng/ml) cairan usus pada tikus yang diberi bubuk susu kambing sebelum dan sesudah diinfeksi *Salmonella Typhimurium*

Perlakuan	Rerata sIgA (ng/ml) Cairan Usus pada Tikus		
	Sebelum Infeksi	Sesudah Infeksi	Rerata
Bubuk susu kambing	46.39	44.65	45.52
Kontrol	50.73	38.57	40.65
Rerata	48.56 $\pm$ 42.91	41.60 $\pm$ 18.17	45.08 $\pm$ 32.41 <sup>ns</sup>

Keterangan: ns=non significant

Menurut Debbabi *et al.* (1998), dosis dan jalur pemberian serta sifat protein antigen merupakan faktor penting untuk mendapatkan respon lokal dan periferal maupun besarnya modulasi respon imun. Konsumsi bubuk susu kambing dalam penelitian ini relatif sedikit untuk dapat menimbulkan respon antibodi, karena kandungan senyawa bioaktif yang terkandung juga relatif sedikit. Oleh karena itu dosis pemberian bubuk susu kambing perlu ditingkatkan atau dimodifikasi dengan penambahan komponen susu yang berpotensi besar sebagai imunostimulator.

Timbulnya respon sIgA di cairan intestinum dimungkinkan memerlukan dosis pemberian antigen yang lebih tinggi, apabila jalur pemberian antigen dilakukan secara oral. Hal ini dapat dimengerti karena sIgA di dalam cairan gastrointestinal terpapar dengan enzim proteolitik yang dapat mempengaruhi aktivitas biologisnya (Brown *et al.* 1970). Walaupun sIgA relatif resisten terhadap digesti tripsin (Brown *et al.* 1970), namun protease IgA1 yang merupakan endopeptidase dari beberapa spesies bakteri mampu memecah IgA1 pada daerah engsel, termasuk dalam bentuk sekretori (sIgA). Daerah atau sisi yang rentan terhadap protease IgA1 terletak pada ikatan peptida prolil-seril atau prolil-threonil, yaitu pada sekuen -Pro-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Pro-Ser di daerah engsel IgA1, tetapi tidak terdapat pada IgA2 (Kilian *et al.* 1988). Protease IgA1 tersebut diproduksi secara konstitutif oleh sejumlah patogen maupun beberapa flora residen (Reinholdt dan Kilian, 1997).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, yang menunjukkan bahwa mencit yang diberi susu kerbau selama 7 hari, setelah hari ke 5 pascainfeksi *Salmonella enteridis*, tidak terjadi peningkatan sIgA dalam cairan intestinum (Jain *et al.* 2008). Menurut hasil penelitian Markwick *et al.* (2005), mencit yang diberi susu bubuk dalam susunan ransum/pakannya juga tidak menunjukkan peningkatan respon antibodi spesifik terhadap ovalbumin dan toksin kolera dalam cairan intestinum. Namun demikian apabila pakan tikus dimodifikasi dalam bentuk MMP (*modified milk powder* yang mengandung bubuk *whey* dan konsentrat protein *whey* (*whey protein concentrates/WPC*) sekaligus merupakan ransum gizi seimbang untuk anak usia 1-3 tahun, maka terjadi peningkatan respon antibodi yang signifikan.

Berdasarkan hal tersebut dapat dimengerti bahwa untuk dapat menimbulkan respon antibodi dalam cairan intestinum, diperlukan ransum dengan gizi seimbang yang mengandung komponen imunostimulator. Komponen bahan makanan yang dikonsumsi berpotensi untuk mencapai dan berinteraksi dengan sel-sel imunokompeten di sepanjang saluran pencernaan, sehingga dapat menimbulkan respon imun. Interaksi komponen bahan makanan dengan sel-sel imunokompeten tersebut salah satunya ditentukan oleh faktor bentuk makanan seperti padat atau cairan (Sfeir *et al.* 2004).

*Whey* merupakan cairan hasil samping pembuatan keju yang mengandung protein penting baik dari aspek gizi maupun sifat-sifat biologisnya, terutama untuk meningkatkan kesehatan dan mencegah penyakit (Marshall, 2004; Madureira *et al.* 2007). Stimulasi sistem imun, antimikrobia dan sifat-sifat metabolik lain banyak terkait dengan protein *whey* seperti  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, laktoferrin, laktoperoksidase, dan *bovine serum albumin* (BSA) (Madureira *et al.* 2007). Dibanding sumber

protein yang lain, *whey* mengandung asam amino esensial dan asam amino bercabang dalam konsentrasi tinggi seperti leusin, isoleusin dan valin. Asam amino bercabang terutama leusin merupakan asam amino kunci dalam metabolisme protein selama inisiasi translasi pada sintesis protein (Marshall, 2004). Oleh karena itu apabila kekurangan asam amino tersebut dapat terjadi gangguan sintesis protein termasuk sintesis antibodi.

Penelitian lain juga memperkuat bahwa protein *whey* mempunyai peran penting dalam regulasi sistem imun. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Nuriyanti *et al.* (2010), bahwa pemberian *whey* susu kambing tidak menunjukkan adanya reaksi *delayed-type hypersensitivity* (DTH) pada tikus yang disensitisasi *dinitrochlorobenzene* (DNCB), sedangkan tikus yang diberi kasein susu kambing menunjukkan positif DTH. Protein *whey* kaya akan asam amino yang mengandung sulfur seperti sistein dan metionin, yang dapat meningkatkan fungsi imun melalui konversi intraseluler menjadi glutathion (Marshall, 2004). Sintesis glutathion memerlukan prekursor sejumlah asam amino glutamilsistein yang banyak dijumpai pada protein *whey*. Glutathion tersebut berperan penting dalam stabilitas lisosomal dan membran sel serta memproteksi sel dari pengaruh radikal bebas, sehingga sangat penting dalam menjaga kondisi fungsional atau aktivasi berbagai sel termasuk sel T dan B (Wong dan Watson, 1995).

Laktoferin yang terkandung dalam *whey* juga dapat menstimulasi sistem imun mukosa melalui aktivasi sel-sel imunokompeten (limfosit B atau T) (Debbabi *et al.* 1998). Kemampuan laktoferin berikatan dengan limfosit dan monosit/makrofag dapat dikaitkan dengan pengaruhnya terhadap berbagai aspek sistem imun termasuk respon imun humoral, pematangan sel T dan sel B serta proliferasi limfosit (Debbabi *et al.* 1998), aktivasi komplemen, regulasi pelepasan sitokin dan regulasi produksi antibodi (Naidu, 2002). Reseptor laktoferin ternyata diekspresikan dalam berbagai jaringan mamalia, termasuk usus, jantung, limpa, liver, monosit, limfosit, platelet dan kelenjar saliva. Reseptor laktoferin yang didapatkan pada *Peyer patch* epitel intestinum mempunyai kemampuan pengikatan spesifik yang paling tinggi dibanding dengan reseptor laktoferin pada sisi yang lain (Wolf *et al.* 2007).

Respon imun di mukosa juga dapat dipengaruhi oleh konsumsi prebiotik. Kandungan prebiotik yang berupa oligosakarida susu kambing pada penelitian ini terlalu sedikit untuk dapat menstimulasi respon sIgA, sehingga tidak dapat meningkatkan sIgA di cairan intestinum tikus. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan frukto-oligosakarida (FOS) yang diberikan pada mencit dapat meningkatkan total IgA dalam ekstrak jaringan usus halus dan *colon*. Peningkatan IgA tersebut dikarenakan FOS dapat meningkatkan ekspresi pIgR (polymeric immunoglobulin receptor), dan meningkatkan *isotype switching* dari IgM ke IgA dalam sel-sel *Peyer's patches* (PP).

#### IFN- $\gamma$ supernatan kultur limfosit

Tikus yang diberi bubuk susu kambing selama 14 hari (sebelum diinfeksi), ternyata mampu meningkatkan respon IFN- $\gamma$ . Namun setelah diinfeksi *Salmonella Typhimurium* pada hari ke 15, pemberian bubuk susu kambing sampai hari ke 21 tidak mampu meningkatkan respon IFN- $\gamma$  (Tabel 2).

Interferon- $\gamma$  merupakan sitokin yang penting dalam respon inang terhadap infeksi salmonella, dan juga mikrobia patogen mencit lainnya. Kemampuan sitokin tersebut adalah memodulasi aktivitas bakterisidal makrofag. Sitokin tersebut diproduksi pada fase awal infeksi *Salmonella Typhimurium* yang sangat penting untuk kelangsungan hidup inang (Tellez *et al.* 2011).

Tabel 2. Rerata IFN- $\gamma$  (pg/ml) supernatan kultur limfosit limpa pada tikus yang diberi bubuk susu kambing sebelum dan sesudah diinfeksi *Salmonella Typhimurium*

Perlakuan	Rerata Rerata IFN- $\gamma$ (pg/ml) Supernatan Kultur Limfosit Limpa pada Tikus		
	Sebelum Infeksi	Sesudah Infeksi	Rerata
Bubuk susu kambing	63.33 <sup>a</sup>	37.00 <sup>b</sup>	50.16
Kontrol	36.83 <sup>b</sup>	35.66 <sup>b</sup>	36.25
Rerata	50.08 $\pm$ 20.06	36.33 $\pm$ 4.65	43.20 $\pm$ 15.87

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p \leq 0.05$ )

Susu kambing mengandung protein laktoferin sebagai imunomodulator dan mempunyai reseptor di makrofag. Oleh karena itu laktoferin yang resisten terhadap degradasi proteolitik di saluran pencernaan dapat mencapai sel-sel imunokompeten dan menimbulkan respon imun. Konsumsi bubuk susu kambing sebanyak 0.36 g/hari selama 14 hari pada penelitian ini hanya dapat meningkatkan produksi sitokin pada tikus yang tidak diinfeksi, terbukti produksi IFN- $\gamma$  menurun secara signifikan setelah diinfeksi *Salmonella*. Hal ini berarti bubuk susu kambing tersebut belum mampu meningkatkan kemampuan bakterisidal makrofag terhadap salmonella atau tidak dapat meningkatkan fungsi makrofag sebagai APC. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, bahwa mencit yang diberi susu kerbau selama 7 hari tidak meningkatkan produksi sitokin IFN- $\gamma$  oleh limpa setelah 2; 5 dan 8 hari dari infeksi *Salmonella enteridis* (Jain *et al.* 2008).

Menurut Roitt *et al.* (1993), IFN- $\gamma$  dapat meningkatkan fungsi APC yang akan mengaktifkan sel T lebih lanjut, dan mengaktifkan makrofag. Proteksi terhadap bakteri intraseluler yang dimediasi sel tergantung pada perkembangan respon imun tipe 1 yang dicirikan oleh ekspansi sel T spesifik terhadap patogen yang mensekresikan sitokin IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . Sitokin tersebut dapat memerangi bakteri intraseluler dengan berbagai mekanisme, seperti menstimulasi makrofag untuk meningkatkan ekspresi *nitric oxide synthase-2* (NOS2), sehingga meningkatkan kapasitasnya dalam memproduksi antimikrobia NO2 (Parent *et al.* 2006).

### Total *Lactobacilli*

Bubuk susu kambing yang diberikan selama 14 hari pada tikus, tidak dapat meningkatkan jumlah *Lactobacilli* dalam digesta *caecum* atau sama dengan kontrol. Setelah tikus diinfeksi salmonella jumlah *Lactobacilli* menurun secara signifikan (Tabel 3). Hal ini dimungkinkan bubuk susu kambing yang diberikan sebanyak 0.36 g/hari pada penelitian ini kandungan oligosakaridanya terlalu sedikit untuk dapat berikatan dengan reseptor di sel-sel epitel usus halus. Dengan demikian patogen *Salmonella* menang dalam berkompetisi

dengan *Lactobacilli* untuk menempel pada sel-sel epitel tersebut. Beberapa spesies bakteri (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*) dapat ditangkap oleh sel-sel epitel, kemudian patogen akan masuk ke dalam jaringan inang melalui sel -M dan akan menggunakan reseptor integrin pada sel inang untuk berikatan (Herich dan Levkut, 2002). Menurut Villoslada *et al.* (2006), oligosakarida susu dapat beraktivitas sebagai *soluble homologues* terhadap reseptor permukaan sel-sel epitel yang merupakan target spesifik patogen. Jumlah total *Lactobacilli* dalam penelitian ini lebih rendah (6.91 log<sub>10</sub> CFU/g) dibanding hasil penelitian Nakayama *et al.* (2003) yang menunjukkan jumlah total *Lactobacilli* sebanyak 9.20 log<sub>10</sub> CFU/g pada *caecum* tikus yang diberi pakan susu formula. Hal ini dimungkinkan karena susu formula yang diberikan berbeda dalam jumlah pemberian maupun komposisinya dengan susu kambing. Walaupun demikian, level *Lactobacilli* dalam caecal tikus yang diberi susu formula juga tidak ada perbedaan dengan tikus yang menerima susu dari induknya, tetapi level *Enterobacteriaceae* yang yang terdeteksi pada usus halus tikus yang diberi susu formula lebih tinggi daripada tikus yang menerima susu dari induknya (Nakayama *et al.* 2003).

Penelitian sebelumnya juga menunjukkan tikus yang diberi pakan dengan kandungan oligosakarida dari susu kambing 20 g/kg pakan dan rerata konsumsi 20 g/hari, ternyata tidak meningkatkan jumlah *Lactobacilli* maupun bifidobacteria dalam *colon*, tetapi dapat menurunkan bacteroides, *entreobacteria* dan coliform. Oligosakarida tersebut dapat memproteksi tikus terhadap toksisitas *dextran sodium sulfate* (DSS) yang dapat diamati dari berkurangnya gejala klinis seperti diare dan *bloody stool* (Villoslada *et al.* 2006). Selanjutnya tikus yang diberi oligosakarida dari susu kambing 0.5 g/kg berat badan /hari dapat memproteksi dari inflamasi *colon* yang diinduksi oleh *trinitrobenzenesulfonic acid* (TNBS), sehingga oligosakarida tersebut sangat berguna sebagai alternatif terapi untuk penyakit radang usus (*inflammatory bowel disease/IBD*) (Daddaoua *et al.* 2006).

Tabel 3. Rerata *Lactobacilli* (log<sub>10</sub> CFU/g) digesta *caecum* pada tikus yang diberi bubuk susu kambing sebelum dan sesudah diinfeksi *Salmonella Typhimurium*

Perlakuan	Rerata <i>Lactobacilli</i> (log <sub>10</sub> CFU/g) Digesta <i>Caecum</i> pada Tikus		
	Sebelum Infeksi	Sesudah Infeksi	Rerata
Bubuk susu kambing	6.91 <sup>a</sup>	6.16 <sup>b</sup>	6.53
Kontrol	7.61 <sup>a</sup>	7.14 <sup>a</sup>	7.38
Rerata	7.26 $\pm$ 0.63	6.65 $\pm$ 0.84	6.95 $\pm$ 0.78

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom atau baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $p \leq 0.05$ )

Konsentrasi oligosakarida ASI (air susu ibu) sebanyak 5-8 g/l, sedangkan oligosakarida susu kambing lebih rendah dibanding ASI yaitu 0.25-0.30 g/l, namun lebih tinggi daripada susu sapi (0.03-0.06 g/l) (Daddaoua *et al.* 2006). Oligosakarida berpengaruh pada stimulasi pertumbuhan bifidobacteria dalam saluran pencernaan yang melindungi terhadap patogen *enteric*. Oligosakarida mirip prebiotik, yang berpotensi menstimulasi secara selektif pertumbuhan mikrobia menguntungkan dalam

saluran pencernaan. Oleh karena struktur oligosakarida ASI mirip dengan glikolipid dan glikoprotein dalam sel-sel intestinum (Daddaoua *et al.* 2006), dan oligosakarida susu kambing mirip oligosakarida ASI (Bode, 2006), maka dapat berfungsi sebagai reseptor untuk mikrobia yang merupakan mekanisme pertahanan tambahan (Daddaoua *et al.* 2006).

Hasil isolasi oligosakarida susu kambing dijumpai paling banyak berupa N-asetil-glukosil-laktosa, galaktosil-laktosa, N-asetilneuraminil-laktosa, 3-sialil-laktosa dan 6-sialil-laktosa yang merupakan 77% dari total oligosakarida (Villoslada *et al.* 2006). Glikan yang tersialisasi (*sialylated glycans*) adalah bagian dari oligosakarida ASI, sementara tempat perlekatan patogen pada epitelium inang juga merupakan seyawa glikan tersialisasi (Bode, 2006). Oligosakarida susu kambing mungkin sangat cocok digunakan untuk suplementasi susu formula, yang dapat diisolasi dari hasil samping dalam produksi keju (Bode, 2006). Dengan demikian susu kambing sangat potensial untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional, dan apabila diberikan pada dosis yang tepat dimungkinkan sangat bermanfaat untuk mengatur keseimbangan mikrobia usus, yang akan berimplikasi pada peningkatan sistem imun mukosa. Jumlah bakteri patogen tidak boleh lebih banyak daripada bakteri yang menguntungkan, namun keberadaan patogen tersebut sangat penting untuk menimbulkan respon imun di mukosa, karena respon imun yang ditimbulkan oleh bakteri komensal relatif kecil dibanding respon imun yang ditimbulkan oleh patogen (Brandtzaeg, 2002).

## KESIMPULAN

Bubuk susu kambing yang diberikan sebanyak 0.36 g/hari selama 21 hari belum mampu menginduksi respon imun mukosa maupun respon imun seluler pada tikus yang diinfeksi, namun respon imun seluler dapat diinduksi pada tikus yang sehat (tidak diinfeksi). Dengan demikian sistem imun tidak dapat mengeliminasi patogen, yang akan menyebabkan penurunan kolonisasi *Lactobacilli* pada tikus yang diinfeksi *Salmonella Typhimurium*. Hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran bagi penelitian selanjutnya akan pentingnya dosis pemberian senyawa bioaktif yang tepat dalam bubuk susu kambing pada hewan coba, sehingga senyawa bioaktif dapat mencapai dan berinteraksi dengan sel-sel imunokompeten atau menunjukkan aktivitas bioaktifnya. Disamping itu potensi susu kambing sebagai pangan fungsional masih perlu digali, melalui berbagai penelitian yang dapat dikonfirmasi dari komponen bioaktif atau modifikasi produk susu kambing untuk diujikan secara *in vitro* maupun *in vivo* pada individu sehat (normal) atau individu yang dibuat tidak sehat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM)-UGM atas bantuan dana penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Klaster Kesehatan 2009.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aattouri N, Bouras M, Tome D, Marcos A, Lemonnier D. 2002. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  production. *Brit J Nutr* 87: 367-373. DOI: [10.1079/BJN2001527](https://doi.org/10.1079/BJN2001527).
- Baldi A, Ioannis P, Chiara P, Eleonora F, Roubini C, Vittorio DO. 2005. Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *J Dairy Res* 72: 66-72. DOI: [10.1017/S00202990500110X](https://doi.org/10.1017/S00202990500110X).
- Bode L. 2006. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr* 136: 2127-2130.
- Brandtzaeg P. 2002. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann NY Acad Sci* 964: 13-45. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2002.tb04131.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04131.x).
- Brown WR, Newcomb RW, Ishizaka K. 1970. Proteolytic degradation exocrine and serum immunoglobulins. *J Clin Invest* 49: 1374-1380. DOI: [10.1172/JCI106354](https://doi.org/10.1172/JCI106354).
- Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martínez-Férez A, Guadix E, Sanches de MF, Zarzuelo A, Suarez DM, Boza JJ, Martínez-Augustín O. 2006. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 136: 672-676.
- Debbabi H, Dubbary M, Rautureau M, Tome D. 1998. Bovine lactoferrin induce both mucosal and systemic immune response in mice. *J Dairy Res* 65: 283-293.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519. DOI: [10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0).
- Haenlein GFW. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res* 51: 155-163. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2003.08.010](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010).
- Herich R, Levkut M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet Med-Czech* 47: 169-180.
- Jain S, Yadav H, Sinha PR, Naito Y, Marotta F. 2008. Dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* has a protective effect against *Salmonella enteridis* infection in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21: 1021-1029.
- Kilian M, Mestecky J, Russell MW. 1988. Defense mechanisms involving Fc-dependent functions of immunoglobulin A and their subversion by bacterial immunoglobulin A proteases. *Microbiol Rev* 52: 296-303.
- Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res Int* 40: 1197-1211. DOI: [10.1016/j.foodres.2007.07.005](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005).
- Markwick KJR, Johnson D, Cross ML, Gill HS. 2005. Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey protein concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. *Nutr Res* 25: 197-208. DOI: [10.1016/j.nutres.2004.12.004](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.12.004).

- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev* 9: 136-156.
- Naidu AS. 2002. Activated lactoferrin. A new approach to meat safety. *Food Technol* 56: 40-45.
- Nakayama M, Yajima M, Hatano S, Yajima T, Kuwata T. 2003. Intestinal adherent bacteria and bacterial translocation in breast-fed and formula-fed rats in relation to susceptibility to infection. *Pediatr Res* 54: 364-371. DOI: [10.1203/01.PDR.0000077482.28990.2D](https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000077482.28990.2D).
- Nurliyani, Harmayani E, Soesatyo MHNE. The Effect of Goat Milk Supplementation on Th1 and Th2 Responses of Peyer Patch Lymphocyte Culture in Dinitrochlorobenzene Sensitized Rat. Proceedings of International Conference on Agricultural, Food and Animal Science. Paris, July 28-30, 2010. World Academy of Science, Engineering and Technology. Academic Science Research. Issue 67, ISSN 2070-3724.
- Parent MA, Wilhelm LB, Kummer LW, Zaba FM, Mullarky IK, Smiley ST. 2006. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpa, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective fuctions during humoral defense againts lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect immun* 74: 3381-3386. DOI: [10.1128/IAI.00185-06](https://doi.org/10.1128/IAI.00185-06).
- Prosser C, Stelwagen K, Cummins R, Guerin P, Gill N, Milne C. 2004. Reduction in heat-induced gastrointestinal hypermeability in rats by bovine colostrum and goat milk powder. *J Appl Physiol* 96: 650-654. DOI: [10.1152/japplphysiol.00295.2003](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00295.2003).
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the formulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- Reinholdt J, Kilian M. 1997. Comparative analysis of immunoglobulin A1 protease activity among bacteria representing different genera, species, and strains. *Infect Immun* 65: 4452-4459.
- Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. 2005. Developmentally regulated intestinal expression of IFN- $\gamma$  and its target genes and the age-specific response to enteric *Salmonella* Infection. *J Immunol* 175: 1127-1136.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 1993. Immunology. P. 7.9. Mosby-Year Book Europe Ltd. London.
- Seemann R, Hägewald SJ, Sztankay V, Drews J, Bizhang M, Kage A. 2004. Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Invest* 8: 233-237. DOI: [10.1007/s00784-004-0280-5](https://doi.org/10.1007/s00784-004-0280-5).
- Sfeir RM, Dubarry M, Boyaka PN, Rautureau M, Tome D. 2004. The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. *J Nutr* 134: 403-409.
- Snoeck V, Peters IR, Cox Eric. 2006. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 37: 455-467. DOI: [10.1051/vetres:2006010](https://doi.org/10.1051/vetres:2006010).
- Tellez A, Corredig M, Turner PV, Morales R, Grffiths M. 2011. A peptidic fraction from milk fermented with *Lactobacillus helveticus* protects mice against *Salmonella* infection. *Int Dairy J* 21: 607-614. DOI: [10.1016/j.idairyj.2011.03.011](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.011).
- Villoslada FL, Debras E, Nieto A, Concha A, Galvez J, Huertas EL, Boza J, Obled C, Xaus J. 2006. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr* 25: 477-488. DOI: [10.1016/j.clnu.2005.11.004](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.11.004).
- Wolf JS, Li G, Varadhachary A, Petrak K, Schneyer M, Li D, Ongkasuwan J, Zhang X, Taylor RJ, Strome SE, O'Malley BW Jr. 2007. Oral lactoferrin results in T cell-dependent tumor inhibition of head and neck squamous cell carcinoma *in vivo*. *Clin Cancer Res* 13: 1601-1610. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-06-2008](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2008).
- Wong CW, Watson DL. 1995. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res* 62: 359-368. DOI: [10.1017/S0022029900031058](https://doi.org/10.1017/S0022029900031058).
- Wu FY, Tsao PH, Wang DC, Lin S, Wu J, Cheng YK. 2006. Factors affecting growth factor activity in goat milk. *J Dairy Sci* 89: 1951-1955. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72262-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72262-7).
- Yun CH, Lillehoj HS, Zhu J, Min W. 2000. Kinetics differences in intestinal and systemic interferon- and antigenic-specific antibodies in chickens experimentally infected with *Eimeria maxima*. *Avian Dis* 44: 305-312.