

Efek Probiotik pada Kadar IgA Mencit Model Sepsis

Diding Heri Prasetyo, Bambang Purwanto
Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta

Abstrak

Probiotik berfungsi sebagai imunomodulator dan imunonutrisi pada penderita penyakit kritis seperti sepsis, tetapi mekanismenya belum diketahui secara pasti. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek pemberian probiotik pada kadar IgA mencit model sepsis di Rumah Sakit dr. Moewardi/Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta periode Juli 2009–2010. Hewan uji berupa 18 ekor mencit Balb/C jantan yang dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok I tanpa diberi perlakuan (kontrol negatif), kelompok II adalah mencit model sepsis yang diinokulasi dengan lipopolisakarida (LPS)-*E.coli* (0,4 mg/mencit/i.p.), dan kelompok III adalah mencit model sepsis yang diinokulasi dengan LPS-*E.coli* serta diberi probiotik. Kadar IgA serum diperiksa dengan menggunakan ELISA. Data dianalisis secara statistik dengan *one way* ANOVA. Kadar IgA serum pada kelompok mencit normal $35,82 \pm 4,55$ ng/mL. Pemaparan LPS-*E.coli* menurunkan kadar IgA serum menjadi $6,20 \pm 5,80$ ng/mL. Pemberian probiotik pada mencit model sepsis, mampu meningkatkan kadar IgA serum menjadi $65,07 \pm 34,97$ ng/mL. Probiotik secara bermakna meningkatkan kadar IgA serum dibandingkan dengan kelompok mencit sepsis ($65,07 \pm 34,97$ ng/mL vs $6,20 \pm 5,80$ ng/mL, $p=0,000$). Simpulan, pemberian probiotik meningkatkan kadar IgA serum pada mencit model sepsis. [MKB. 2010;42(4):175–80].

Kata kunci: IgA, probiotik, sepsis

The Effect of Probiotic on IgA Level in Mice Model of Sepsis

Abstract

Probiotic is useful as immunomodulator and immunonutrition in patients with critical illness such as sepsis, but the mechanism is not entirely clear. This study was aimed to evaluate the effect of probiotic on serum IgA level in mice model of sepsis in dr. Moewardi Hospital/Faculty of Medicine, Universitas Sebelas Maret Surakarta period July 2009–2010. Eighteen males Balb/C mice were used and divided into three groups. Group I without treatment (negative control), group II which was mice model of sepsis inoculated with lipopolysaccharide (LPS)-*E.coli* (0.4 mg/mouse/ip), and group III was mice model of sepsis inoculated with *E. coli* LPS-and given probiotic. Serum IgA level was examined by ELISA. Data were analyzed statistically with one-way ANOVA. Serum IgA levels in normal mice group was 35.82 ± 4.55 ng/mL. Exposing LPS-*E. coli* reduced the levels of serum IgA to 6.20 ± 5.80 ng/mL. Administration of probiotics increased the serum IgA level to 65.07 ± 34.97 ng/mL in mouse models of sepsis. Probiotics significantly increased serum IgA levels compared to mice model of sepsis group (65.07 ± 34.97 ng / mL vs. 6.20 ± 5.80 ng / mL, $p = 0.000$). In conclusion, administration of probiotics can increase the levels of serum IgA in mice model of sepsis. [MKB. 2010;42(4):175–80].

Key words: IgA , probiotic, sepsis

Korespondensi: Diding Heri Prasetyo, dr., M.Si., Fakultas Kedokteran Sebelas Maret Surakarta, jalan sutami 36A Surakarta, telepon/Fax (0271) 664178, *mobile* 081931671212, *e-mail:* diding_hape@yahoo.com

Pendahuluan

Sepsis adalah infeksi sistemik yang dapat disebabkan mikroorganisme seperti bakteri gram negatif maupun positif, jamur, virus, dan parasit.¹ Patofisiologi sepsis sangat kompleks dengan karakteristik adanya ketidakseimbangan antara sitokin proinflamasi dan antiinflamasi.² Produksi sitokin inflamasi berlebihan akan mengaktifasi respons sistemik berupa *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), terutama pada paru-paru, hati, ginjal, usus, serta organ lainnya. Hal ini mempengaruhi permeabilitas pembuluh darah, fungsi jantung, dan juga menginduksi perubahan metabolik sehingga terjadi apoptosis maupun nekrosis jaringan, *multiple-organ failure* (MOF), syok septik, serta kematian.³ Kematian sel mukosa yang berlebihan akan menyebabkan atrofi saluran pencernaan, serta kerusakan dan gangguan fungsi pertahanan mukosa sehingga akan mengakibatkan ketidakmampuan dalam respons imun.⁴

Imunoglobulin A (IgA) adalah imunoglobulin utama yang ditemukan pada mukosa, sehingga disebut juga sebagai *secretory immunoglobulin A* (sIgA).⁵ Mukosa usus adalah tempat utama bagi pembentukan IgA.⁵ Masuknya antigen ini melalui mulut akan merangsang terbentuknya IgA. Zat anti ini dapat keluar dan masuk lumen usus atau masuk peredaran darah yang selanjutnya akan merangsang pembentukan IgG dan IgM.⁵

Probiotik merupakan imunonutrisi yang bermanfaat untuk kesehatan berfungsi sebagai imunomodulasi pada sistem imun⁵ dan sebagai imunonutrisi pada penderita penyakit kritis seperti sepsis.⁶ Penggunaan bentuk imunonutrisi dalam bidang medis secara formal belum sepenuhnya dipahami karena belum diketahui bahan aktif dan mekanisme kerjanya.⁷

Sekitar 80% dari total sel yang memproduksi imunoglobulin berada dalam lamina propia usus. Enterosit merupakan sel imunokompeten saluran pencernaan yang berperan pada berbagai reaksi lokal terhadap mikroorganisme patogen. Interaksi antara enterosit dan faktor di sekitarnya akan mengaktifasi ekspresi molekul adhesi, MHC kelas I dan II, presentasi antigen terhadap limfosit, produksi sitokin, transportasi sIg, dan kompleks sIgA.⁸ Mikroorganisme probiotik akan memicu aktivasi sel imunokompeten baik makrofag maupun sel dendrit sehingga jaringan limfoid (*gut-associated lymphoid tissues*/GALT) yang ada pada lamina propia akan memicu sel plasma

untuk memproduksi IgA yang berperan dalam sistem imun mukosa.^{8,9} Hasil penelitian awal, probiotik campuran (*B. longum*, *B. bifidum*, dan *L. acidophilus*) mampu menurunkan tingkat inflamasi mukosa intestinal pada hewan coba model alergi.¹⁰ Cara kerja probiotik tersebut tampaknya dapat dimanfaatkan untuk mengatasi kondisi imunokompromais pada sepsis melalui jalur apoptosis terutama epitel gastrointestinal. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efek pemberian probiotik terhadap kadar IgA serum pada mencit model sepsis.

Metode

Hewan uji berupa 18 ekor mencit Balb/C jantan, dengan bobot $\pm 18-22$ gram, dan berumur 4-6 minggu. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Setia Budi, Surakarta periode juli 2009-Februari 2010. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit BRI. Perlakuan hewan coba sesuai *ethical clearance* rumah sakit dr. Moewardi/Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Probiotik yang digunakan adalah probiotik campuran (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, dan *Bifidobacterium longum*) yang diproduksi oleh Merck Tbk, dengan dosis 0,46 mg tablet/mencit/hari yang setara dengan pemberian 1 tablet/hari pada manusia.

Hewan coba diadaptasikan selama seminggu, dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing kelompok 6 ekor. Kelompok I tanpa diberi perlakuan (sebagai kontrol negatif), kelompok II adalah mencit model sepsis yang diinokulasi dengan LPS-*E.coli* pada hari ke-0, dan kelompok III adalah mencit model sepsis yang diinokulasi dengan LPS-*E.coli* pada hari ke-0 serta diberi probiotik setiap harinya (LPS-*E.coli*+probiotik campuran). Pada hari ke-7 seluruh mencit dikorbankan untuk dikoleksi serumnya melalui pungsi jantung.

Model sepsis dibuat dengan menginokulasi 0,4 mg LPS (*E. coli*)/mencit/ intraperitoneal yang diperoleh dari Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany).¹¹

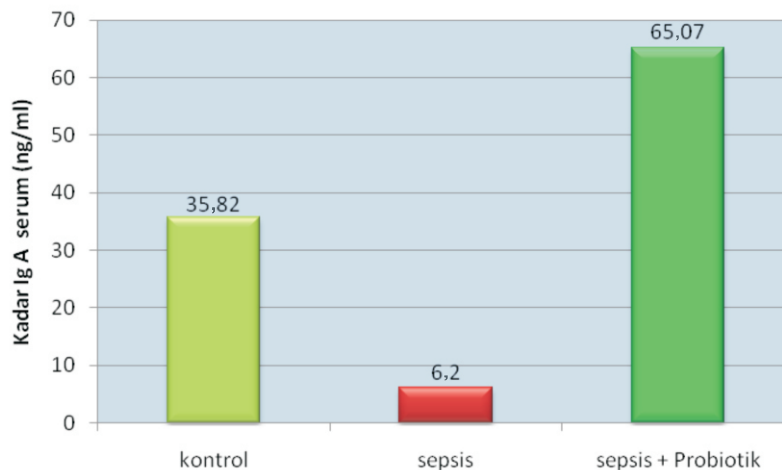
Penentuan kadar IgA serum dilakukan dengan cara ELISA (*GenWay Biotech, Inc.*) sesuai dengan petunjuk pabrik.

Data dianalisis secara statistik dengan *one way ANOVA* menggunakan program SPSS for

Tabel Ringkasan Hasil LSD Post Hoc Test antar Kelompok

Kelompok		p
Normal	Sepsis	0,002
Normal	Sepsis + Probiotik	0,078
Sepsis	Sepsis + Probiotik	<0,001

Keterangan: Perbedaan rerata bermakna pada $p < 0,05$



Gambar Rata-rata Kadar IgA Serum (ng/mL) Masing-masing Kelompok Hewan Coba

Windows Release 15.0 dan $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya.

Hasil

Penelitian ini memperlihatkan kadar IgA serum pada kelompok mencit normal, yaitu $35,82 \pm 4,55$ ng/mL. Pemaparan LPS-*E.coli* dengan dosis 0,4 mg/mencit/i.p., menurunkan kadar IgA serum menjadi $6,20 \pm 5,80$ ng/mL. Pemberian probiotik pada mencit model sepsis, mampu meningkatkan kadar IgA serum menjadi $65,07 \pm 34,97$ ng/mL. Kadar ini terlihat melebihi kadar IgA serum mencit normal. Rerata kadar IgA serum masing-masing kelompok hewan coba tercantum pada Gambar 1.

Data yang diperoleh dianalisis dengan *One-way ANOVA* menggunakan *software* program SPSS for windows release 15.0 diperoleh $p < 0,001$. Selanjutnya dilakukan *LSD post hoc test*, secara ringkas hasil uji statistiknya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan inokulasi LPS secara bermakna ($p=0.002$) menurunkan kadar IgA serum. Pemberian probiotik secara oral yang setara dengan satu tablet/hari pada manusia pada mencit model sepsis selama tujuh hari, mampu

meningkatkan kadar IgA serum secara bermakna ($p = 0,000$). Meskipun peningkatannya melebihi kadar IgA normal, tetapi tidak berbeda bermakna ($p = 0,078$) dibandingkan dengan kadar IgA serum mencit normal.

Pembahasan

Probiotik adalah "mikrob hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup memberi manfaat kesehatan pada pejamu", sehingga diperlukan evaluasi peran potensial probiotik dalam memodifikasi bioekologi lingkungan internal patologis pada penyakit kritis. Probiotik tersedia sebagai galur mikrob tunggal (misalnya, *Bacillus clausii*, *Lactobacillus*) atau sebagai campuran bermacam-macam jenis *Lactobacillus* (*acidophilus*, *sporogenes*, *lactis*, *reuteri* RC-14, GG, dan *L. Plantarum* 299v), *Bifidobacterium* (*bifidum*, *longum*, *infantis*), *Streptococcus* (*thermophilus*, *lactis*, *fecalis*), *Saccharomyces boulardii*, dll.^{12,13}

Permukaan epitel saluran pencernaan selalu berhubungan dengan imunogen yang berpotensi merusak, baik yang berasal dari makanan, bakteri usus, maupun mikroorganisme patogen. Untuk itu mukosa usus dilengkapi dengan ketahanan

mukosal baik yang alami maupun adaptif. Salah satu mekanisme pertahanan mukosa intestinal adalah melalui sekresi IgA, selain berbagai zat antimikrob dan antiviral, seperti lisosom dan interferon. Integrasi dan keterpaduan berbagai komponen sistem ketahanan mukosa tersebut sangat diperlukan untuk mempertahankan keutuhan fisiologis sistem saluran pencernaan makanan.¹⁴ Mikroflora yang bersifat melindungi, mencegah invasi dan kolonisasi mikroorganisme patogen melalui IgA dan kompetisi terhadap reseptor dan substrat metabolik.

Sel epitel saluran pencernaan bertindak sebagai sel efektor imunologis serta mampu mengatur molekul permukaan dan mensekresikan sitokin maupun kemokin untuk memfasilitasi presentasi antigen sel imun. Enterosit bertindak sebagai *antigen presenting cell* (APC) serta mampu mengatur respons limfosit di intestinal.¹⁵ Perubahan fungsi intestinal sebagai penyebab berkembangnya sepsis ke arah kritis, sehingga intestinal dikenal sebagai "motor" respons inflamasi sistemik.¹⁶ Pada keadaan penyakit kritis (termasuk sepsis) terjadi peningkatan perubahan *epithelial-commensal crosstalk*. Pada SIRS berat/sepsis, hiperpermeabilitas, *immune-suppression*, dan penggunaan antibiotik dapat mengubah keseimbangan mikroflora intestinal, dengan meninggalkan bakteri menguntungkan (seperti *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*) lebih sedikit dan bakteri "patogenik" (seperti *Staphylococcus* dan *Pseudomonas*) yang lebih tinggi.¹⁷ Terapi probiotik merupakan upaya untuk mengurangi atau menghapus potensi patogen dan toksin, untuk melepaskan nutrisi, antioksidan, faktor pertumbuhan dan faktor koagulasi, untuk merangsang motilitas usus serta memodulasi mekanisme pertahanan imunitas alami dan adaptif melalui normalisasi flora usus yang terganggu.

Mukosa usus adalah tempat utama bagi pembentukan IgA. Masuknya antigen per oral akan merangsang terbentuknya IgA. Zat anti ini dapat keluar dan masuk lumen usus atau peredaran darah. Menurut Kristine dkk.,² LPS sebagai kompleks endotoksin glikoprotein dari komponen utama membran terluar bakteri gram negatif dapat menginduksi terjadinya sepsis. Melalui mekanisme ikatan LPS-LBP yang akan menginduksi NF- κ -B sebagai sinyal pengatur transkripsi sitokin proinflamasi, kemokin, molekul *adhesion*, dan faktor koagulasi. Ekspresi NF- κ -B sangat mempengaruhi prognosis sepsis,

oleh karena ekspresi yang berlebihan akan mengakibatkan terjadinya peningkatan produksi sitokin proinflamatori yang akan menyebabkan peningkatan apoptosis epitel saluran pencernaan.⁴ Hal ini diperkuat pendapat Chang dkk.,¹⁸ bahwa proses patologik utama pada sepsis adalah apoptosis sel efektor imunologi, termasuk limfosit dan sel dendrit maupun apoptosis saluran pencernaan. Dengan peningkatan apoptosis sel efektor imunologi termasuk limfosit baik limfosit T maupun B, dan sel dendrit yang berperan sebagai APC akan menurunkan produksi imunoglobulin, khususnya IgA.⁵ Hal ini sejalan dengan hasil penelitian, bahwa kelompok mencit sepsis mengalami penurunan kadar IgA serum secara bermakna (Tabel 1). Terjadinya penurunan produksi IgA yang bermakna akan mengakibatkan terjadinya kerusakan sawar intestinal. Penurunan sistem imun baik alamiah maupun adaptif ini akan meningkatkan kematian hewan coba.⁶ Hal ini diperkuat dari hasil penelitian Diding dkk.,¹⁹ yang memperlihatkan jumlah mencit yang mampu bertahan hidup selama tujuh hari pada kelompok sepsis lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok mencit sepsis yang diberikan probiotik.

Peningkatan ketahanan hidup terjadi pada kelompok mencit sepsis yang diberikan probiotik, dimungkinkan pemberian probiotik akan merangsang perkembangbiakan sel epitel dan meningkatkan pengembangan sistem imun. Lomax dan Calder²⁰ berpendapat bahwa beberapa komponen respons imun, termasuk fagositosis, aktivitas sel NK, dan produksi IgA mukosa (terutama pada anak), dapat ditingkatkan oleh beberapa bakteri probiotik. Hasil penelitian ini memperlihatkan pemberian probiotik mampu meningkatkan sekresi IgA secara bermakna (Tabel 1) dibandingkan dengan kelompok sepsis yang tidak diberikan probiotik. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian *in vitro* yang menunjukkan bahwa *Bifidobacteria longum*, dan *Lactobacillus acidophilus* mampu menginduksi produksi antibodi (IgA oleh *Peyer patches*) secara signifikan.⁸ Selain itu sesuai dengan Fukushima dkk.,²¹ konsumsi formula yang mengandung probiotik (*Bifidobacteria*) meningkatkan kadar IgA lokal sehingga dapat memberikan kontribusi pada peningkatan mukosa dalam melawan infeksi gastrointestinal.

Peningkatan kadar IgA secara bermakna pada pemberian probiotik pada hewan coba model sepsis, disebabkan karena bakteri komensal

(*Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*) yang terkandung dalam probiotik diperlukan dalam perkembangan imunitas mukosa intestinal yang normal, dan akan mengendalikan inflamasi pada pejamunya. Sel dendrit akan mencapai lumen intestinal untuk bereaksi dengan antigen maupun bakteri yang ada di dalam lumen. Meskipun penetrasi sel dendrit ke lumen mukosa menembus sel epitel, integritas barrier intestinal masih tetap terjaga, sebab sel dendrit mengekspresikan *protein tight junction* dan tetap memelihara keutuhan dengan epitel di sekitarnya. Proses ini diatur oleh kemokin CX3CL1.¹⁵ Sel dendrit tersebut akan mencerna sekaligus membawa bakteri komensal yang ada di dalam lumen menuju nodus limfatikus mesenterikus, untuk selanjutnya akan menginduksi sekresi IgA, yang pada gilirannya akan melindungi intestinal dari penetrasi bakteri komensal lainnya.²²

Pemberian probiotik secara oral dapat meningkatkan sekresi IgA serum pada hewan coba model sepsis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini dalam program Penelitian Hibah Bersaing tahun anggaran 2009 melalui DIPA Universitas Sebelas Maret No. 0612.0/023-04.2/XIII/2009 dan A. Guntur Hermawan, selaku Guru besar Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, atas ide, saran, dan bimbingannya.

Daftar Pustaka

1. Guntur HA. SIRS, sepsis dan syok septik (imunologi, diagnosis dan penatalaksanaan). Surakarta: Sebelas Maret University Press; 2008.
2. Kristine MJ, Sarah BL, Anncatrine LP, Jesper EO, Thomas B. Common TNF- α , IL-1 β , PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis*. 2007;7:108.
3. Elena GR, Alejo C, Gema R, Mario D. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med*. 2006 March;203(3):563–71.
4. Alscher KT, Phang PT, Mc-Donald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281:G569–76.
5. Galdeano MC, Moreno LA, Vinderola G, Bibas BME, Perdigon G. Mechanism of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Am J Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:485-92
6. Calder PC. Increased mortality is associated with immunonutrition in sepsis. *BMJ* . 2003;327:117-8.
7. Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care*. 2004;7(2): 56–68.
8. Herich R, Levkut M. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet Med*. 2002;47(6):169-80.
9. Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in internal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277(52): 50959-65.
10. Diding HP, Guntur H. Effect of probiotic (Bion-3) on grading inflammation in intestinal mucosa. Dipresentasikan pada Simposium Nasional: the 2nd Indonesian Sepsis Forum. Surakarta 7–9 Maret 2008.
11. Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, Duong DN, Zheng YW, Coughlin SR. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*. 2006;107(10): 3912–21.
12. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 2009;27(3):202-9.
13. Singhi SC, Baranwal A. Probiotic use in the critically ill. *Indian J Pediatr*. 2008; 75(6):621-7.
14. Suhartono TP, Asnar E. Psikoneuroimunologi mukosa saluran pencernaan. Dalam: Pitono S, Subijanto MS, Suhartono TP, Judajana FM, penyunting. Gangguan sistem imun mukosa intestinal. Surabaya: GRAMIK FK-UNAIR; 2003. hlm:47-8.
15. Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:387-404.
16. Coopersmith CM, Stromberg PE, Davis CG, Dunne WM, Amiot DM, Karl IE, dkk. Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle arrest. *Crit Care Med*. 2003;31:1630–7.
17. Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, dkk. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS. *J Trauma*. 2006;60:126–33.
18. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, dkk. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrialmediated apoptosis. *FASEB J*. 2007;21:708–19.
19. Diding HP, Tatar S, Guntur H. Effect of probiotic on survival rate in Sepsis. KONAS PETRI ke-

- XIV. Samarinda. 7–8 Juni 2008.
20. Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Curr Pharm.* 2009;15(13):1428-518.
 21. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin. A production in healthy children. *Int J Food Microbiol.* 1998;42(1-2):39-44.
 22. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 2004;303:1662–5.