

# SUSU KUDA SUMBAWA MENINGKATKAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS DAN SEKRESI REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATES (ROI) MAKROFAG MENCIT YANG DIPAPAR BAKTERI SALMONELLA TYPHIMURIUM

Reni Sofiyatin

**Abstract:** The component of milk has function as immunomodulator in humoral and cellular of immune response. Immune response has a role to protect the body from infection of pathogenic intracellular bacteria like *Salmonella* Typhimurium by increasing the activity of phagocytosis and the mechanism of macrophage microbiodidal. This study aims to determine the effects of Sumbawa Mares Milk in increasing the cellular immune response by increasing the phagocytosis activity index, secretion of *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) of Balb/c mice which treated with *S. Typhimurium*, This research uses experimental methods to the design of *posttest-only Control Group Design*, we performed a series *in vivo* experiments by using 24 Balb/c Mice on 8-12 weeks of age which divided on four groups. There are a control group and three treatments groups . On three treatment groups has exposed by Mares Milk for 14 days on different dosages such as 0.5 ml/day ; 1 ml/day; 1.5 ml/day respectively. The macrophages peritoneum had been isolated and treated with *S. Typhimurium* by *in vitro* experiment. Our result showed that there were a significant different on phagocytosis activity index ( $p= 0.000$ ), secretion of *Reactive Oxygen Intermediates* ( $p=0.000$ ) of Balb/c mice which treated a with *S. Typhimurium* among groups. The highest index of phagocytosis activity of macrophage was reached the on dosage 1.5 ml/day ( $51.23 \pm 9.72$ ). The highest presentation of macrophage which secreted of ROI was reached on dosage 1.5 ml/day ( $67.00 \pm 9.61$ ). In conclusions, Sumbawa Mares milk has ability to increased the index of phagocytosis activity, the presentation of secretion of *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) of Balb/c Mice which treated with *S. Typhimurium*.

**Kata Kunci:** Susu Kuda Sumbawa, Aktivitas Fagositosis: Sekresi ROI, *Salmonella* Typhimurium

## LATAR BELAKANG

Peningkatan daya tahan tubuh dapat dilakukan dengan pengaturan respon imun (imunomodulasi) (Roitt *et al.*, 2001). Salah satunya dengan peningkatan kemampuan fagositosis sel-sel fagosit terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh (Bellanti, 1993).

Salah satu sel fagosit adalah makrofag yang merupakan komponen seluler yang akan mengelimenasi patogen pada tahap imunitas inat dan memperantarai terjadinya imunitas adaptif melalui peranannya sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) (Bellanti, 1993; Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 2001).

Bakteri yang diketahui mampu survival dalam sel fagosit salah satunya adalah *Salmonella* Typhimurium. Bakteri ini merupakan bakteri intraseluler yang memiliki faktor-faktor yang mampu menggagalkan proses mikrobiasidal dari sel fagosit. *Salmonella* Typhimurium menghambat fusi fagosom dengan lisosom menyebabkan bakteri dapat bereplikasi di dalam fagolisosom. Bakteri *Salmonella* Typhimurium juga merupakan bakteri yang menyebabkan salmonellosis pada mencit yang analog dengan deman typhoid yang disebabkan oleh *S. Typhi* pada manusia yang masih banyak menimbulkan gangguan intestinal (Mittrucker H.S and Kaufmann Stefan H.E. 2000).

Untuk membunuh bakteri intraseluler salah satu caranya dengan meningkatkan aktivasi makrofag, stimulasi sel T, dan sitokin-sitokin yang dilepas oleh makrofag yang berkaitan dengan proses fagositosis dan *killing* mikroba. Makrofag apabila teraktivasi akan berusaha membunuh agen penginfeksi dengan cara meningkatkan aktivitas fagositosisnya dan mengembangkan mekanisme mikrobiosidal melalui sistem oksidatif maupun non oksidatif. Pada sistem oksidatif makrofag menghasilkan *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI), sedangkan pada sistem non oksidatif makrofag antara lain akan meningkatkan jumlah produksi enzim-enzim lisosomal (Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 2001).

Susu fermentasi banyak diklaim memberikan dampak menyehatkan seperti *koumiss* yang merupakan susu kuda fermentasi yang banyak digunakan di Negara Rusia untuk pengobatan penyakit tuberculosis, liver, typhoid (Hermawati *et al.*, 2004; Nurliyani *et al.*, 2005).

Susu yang dikonsumsi masyarakat atau produk susu yang dipasarkan biasanya berasal dari susu sapi. Namun akhir-akhir ini di masyarakat banyak beredar susu kuda dari Pulau Sumbawa yang dipromosikan sebagai obat yang dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit (Hermawati *et al.*, 2004; Sujaya *et al.*, 2008; Yuniati, 2000).

Hasil beberapa penelitian *in vivo* susu kuda yang mengalami autofermentasi dapat meningkatkan imunitas terhadap vaksin hepatitis A pada mencit Balb/c (Sasmito *et al.*, 2006). Protein susu kuda pasteurisasi dan fermentasi berperan sebagai imunomodulator pada respon imun humoral dan

menstimulasi aktivitas fagositosis pada mencit Balb/c (Nurliyani *et al.*, 2005). Studi *in vitro* menunjukkan susu kuda Sumbawa mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii* (Formanto B, 2001; Hermawati *et al.*, 2004) *Vibrio cholera*, *Pseudomonas auruginosa*, *Salmonella* Typhimurium (Hermawati *et al.*, 2004) *Mycobacterium tuberculosis* baik isolat standar maupun isolat klinis (Rijatmoko, 2003; Pana, 2004)

Mengingat susu kuda mempunyai potensi yang khas, perlu dilakukan penelitian yang mendasar untuk dapat menggali lebih dalam potensi susu kuda khususnya dari Sumbawa sebagai pangan kesehatan dan obat terutama dalam meningkatkan daya tahan tubuh.

Berdasarkan uraian di atas, ingin dibuktikan apakah susu kuda Sumbawa mampu meningkatkan respon imun seluler makrofag Mencit Balb/c yang dipapar bakteri *S. Typhimurium* melalui peningkatan aktivitas fagositosis, sekresi *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI).

## METODE

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit spesies *mus musculus* galur B albino clone (Balb/c) jantan usia 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 28 gram sebanyak 24 ekor dan susu kuda Sumbawa yang berasal dari Kabupaten Bima, NTB. Mencit dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol aquades, kelompok susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr, kelompok susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr dan kelompok susu kuda sumbawa 1.5 ml/hr yang diberikan selama 14 hr secara oral. Kemudian mencit diambil cairan peritonium untuk diisolasi

makrofag peritonium dan dipapar dengan bakteri *Salmonella Typhimurium* secara *in vitro*. *Salmonella Typhimurium* yang digunakan adalah koleksi dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya.

Isolasi makrofag peritonium mencit merujuk penelitian Lewia J.G, 1995. Mencit dimatikan dengan klorofom, kemudian bagian abdomen disemprotkan dengan alkohol 70%, bagian abdomen dibedah bagian kulit luar, dan disterilisasi dengan alkohol 70%, kemudian sejumlah 10 ml medium RPMI dingin diinjeksikan dengan menggunakan jarum 19G kelapisan peritoneum. Abdomen ditepuk-tepuk selama 10 detik lalu diambil cairan peritoneum dengan menggunakan jarum 25G, Konsentrasi makrofag yang digunakan sekitar  $10^6$  sel/ml masukkan dalam tiap mikroplate 24 well yang berisi cover slip ditambahkan medium komplek 200µl, diinkubasi CO<sub>2</sub> 5% selama 2 jam suhu 37°C, sel yang tidak melekat dibuang, sedangkan sel yang melekat dicuci dengan Medium RPMI sebanyak 1x, ditambahkan medium komplet ke dalam tiap mikroplate 24 well sebanyak 500 µl dan inkubasi CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam, suhu 37°C. Setelah 24 jam kultur makrofag siap digunakan untuk uji aktivitas fagositosis makrofag dan kemampuan makrofag mengsekresi ROIs terhadap *S. Typhimurium*.

Uji aktivitas fagositosis makrofag merujuk penelitian Wang Yinang, *et al.*, 2009. Makrofag yang dikultur sehari sebelumnya dalam kultur 24 well yang telah diberi coverslip bulat dengan konsentrasi  $10^6$  sel/ml kemudian dipapar bakteri *S. Typhimurium*  $10^7$  sel/ml diinkubasi 37°C di shaker water bath dengan waktu inkubasi 60 menit<sup>18</sup> Pellet dicuci dengan PBS 1 x ,untuk menghilangkan bakteri yang

tidak difagosit, keringkan pada suhu ruang, fiksasi dengan metanol absolut 30 detik, setelah kering, coverslip dipulas dengan giemsa 20% selama 30 menit lalu cuci dengan aquades, angkat dari sumuran kultur dan keringkan pada suhu kamar, setelah kering *dimounting* pada *object glass* dan diamati dibawa mikroskop cahaya pembesaran 1000x. Uji fagositosis makrofag secara kuantitatif dihitung dalam 200 sel makrofag jumlah rata-rata bakteri yang terfagosit per sel makrofa dibagi jumlah makrofag aktif.

Aktivitas sekresi ROIs oleh makrofag di Uji dengan metode *Nitroblue tetrazolium* (NBT) *reduction assay*. Pada uji ini PMA (*phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) akan mestimulasi makrofag mengsekresi ROIs dengan adanya ROIs maka NBT akan tereduksi membentuk presipitat formazan yang tidak terlarut dan dapat dilihat dengan mikroskop cahaya. Adapun *Nitroblue tetrazolium* (NBT) *reduction assay* dilakukan dengan cara sebagai berikut: Makrofag dalam kultur 24 well dengan konsentrasi  $10^6$  sel/ml dipapar dengan bakteri *S. Typhimurium*  $10^7$  sel/ml untuk tiap perlakuan, diinkubasi 60 menit<sup>18</sup> pellet diambil dan dicuci menggunakan PBS sebanyak 1x, pellet kemudian ditambahkan 500 µl larutan NBT (1 mg/ml) yang mengandung 1250 ng/ml PMA untuk tiap sumuran dan diinkubasi pada incubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit. Pellet dicuci dengan PBS 3x. Setelah kering dicat dengan 2 % *Neutral Red Solution* selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades. Cover slip yang sudah kering pada suhu kamar diangkat dari sumuran microplate 24 well, untuk dilihat dibawa mikroskop cahaya pembesaran 1000x. Adapun gambaran makrofag yang mengsekresi ROIs

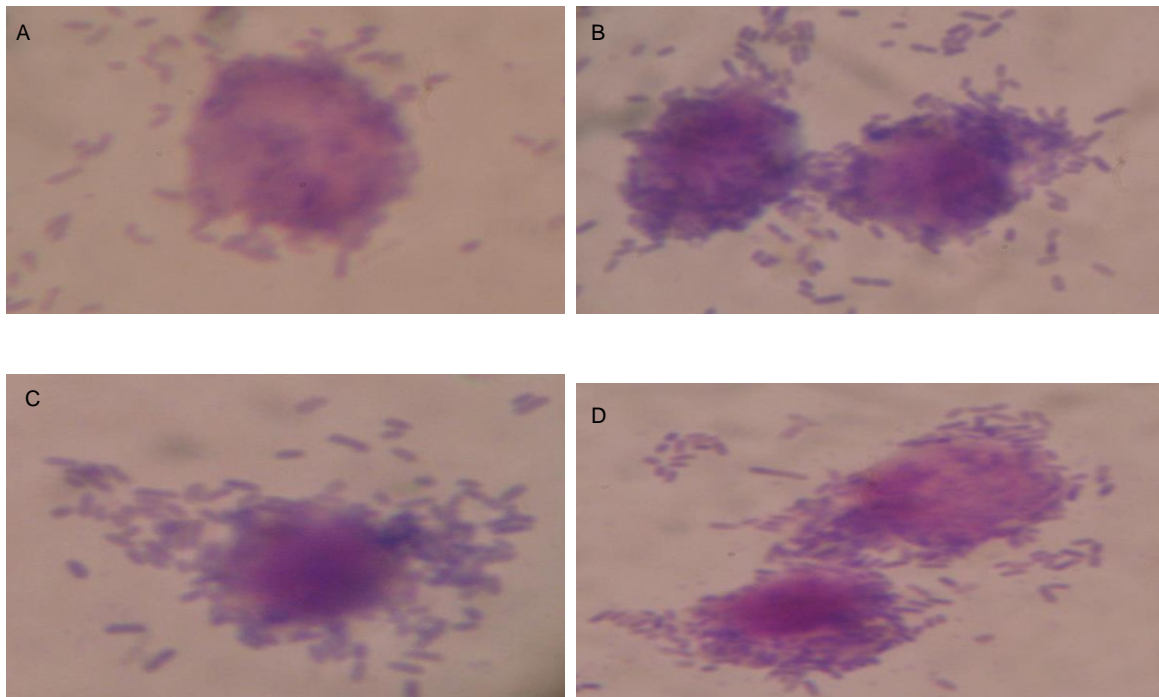
adalah persentase makrofag yang membentuk formazan dari 200 sel makrofag yang terlihat di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x.

## HASIL

### 1. Pengaruh Susu Kuda Sumbawa pada Aktivitas Fagositosis Makrofag

Aktivitas fagositosis makrofag terhadap bakteri *S.Typhimurium* ditentukan dengan

menghitung rata-rata jumlah bakteri *S.Typhimurium* yang terfagosit per sel makrofag yang dihitung dari 200 sel makrofag dinyatakan dengan indeks fagositosis. Adapun gambaran makrofag yang mengfagositosis bakteri *S.Typhimurium* dari tiap-tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 1.1

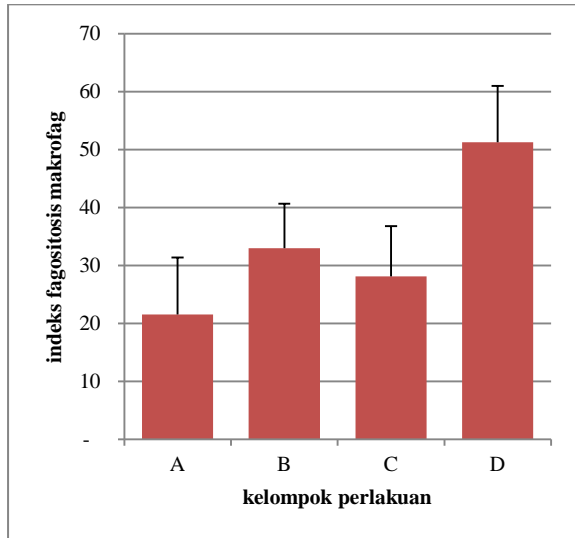


**Gambar 1.1.** Gambar makrofag peritoneum mencit Balb/c yang mengfagositosis bakteri *S.Typhimurium* pada tiap kelompok perlakuan. A= Kontrol aquades, B= susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr, C= susu kuda Sumbawa Dosis 1 ml/hr dan D= susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr. pengecatan Giamsa, pembesaran 1000x

Pada gambar 1.1. di atas tampak bakteri *S.Typhimurium* yang difagositosis oleh makrofag. Bakteri yang paling banyak difagositosis tampak pada perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr

diikuti dengan perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr dan pada kelompok kontrol terlihat yang paling sedikit diikuti oleh kelompok susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr. Adapun rata-rata dan

standar deviasi indeks fagositosis makrofag untuk tiap kelompok perlakuan dapat dilihat gambar 1.2 di bawah ini



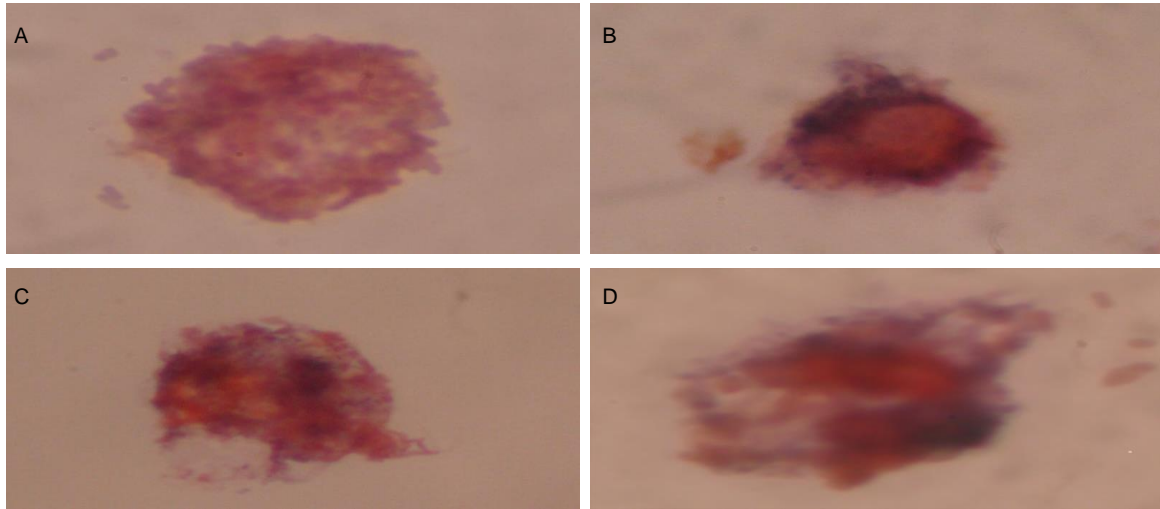
**Gambar 1.2. Grafik rata-rata jumlah Bakteri *S.Typhimurium* yang terfagosit yang dinyatakan dalam indeks fagositosis Makrofag untuk tiap kelompok perlakuan: A= Kontrol Aquades, B= susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr, C= susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr dan D= susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr**

Gambar 1.2 menunjukkan indeks fagositosis makrofag yang paling tinggi pada kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr ( $51.23 \pm 9.72$ ) kemudian kelompok susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr ( $33.00 \pm 7.64$ ) dan kelompok susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr ( $28.13 \pm 8.67$ ) sedangkan yang terendah terdapat pada kelompok kontrol ( $21.53 \pm 9.86$ ). Pada perlakuan

susu kuda sumbawa dosis 1 ml/hr mengalami penurunan indeks fagositosis dibandingkan pada dosis susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr tetapi lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kontrol. Hasil analisis statistik dengan *One-way Anova* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan indeks fagositosis makrofag antara kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0.000$  ( $p < 0.05$ ) dan pada hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr secara signifikan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol, susu kuda Sumbawa dosis 0,5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr. Sehingga dalam penelitian ini pemberian susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr mampu meningkatkan indeks fagositosis makrofag mencit Balb/c yang dipapar bakteri *S.Typhimurium*.

## 2. Pengaruh Susu Kuda Sumbawa pada Kemampuan Makrofag Mengsekresi ROI

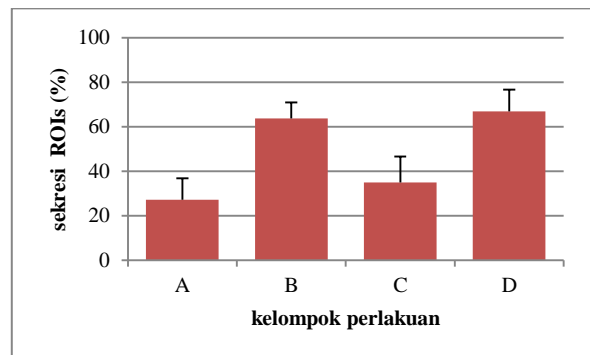
Kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROIs dinyatakan sebagai persentase jumlah makrofag yang memproduksi ROIs pada setiap 200 sel makrofag Kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROIs diukur dengan metode *Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay*. Adapun gambar hasil dari makrofag yang mengsekresikan ROIs dapat dilihat pada gambar 2.1.



**Gambar 2.1.** Makrofag peritoneum mencit Balb/c yang mengsekresikan ROIs pada tiap kelompok perlakuan. A= kontrol aquades, B= susu kuda sumbawa dosis 0.5 ml/hr, C= susu kuda sumbawa Dosis 1 m/hrl dan D= susu kuda sumbawa dosis 1.5 ml/hr. Pengecatan *neutral red*, pembesaran 1000x

Pada gambar 2.1 sekresi ROI yang digambarkan dengan pembentukan biru formazan yang menunjukkan adanya lonjakan respirasi diikuti dengan pembentukan superoksida yang akan mereduksi NBT menjadi produk reaksi formazan yang tidak terlarut paling tinggi pada perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr dan yang paling rendah pada perlakuan kontrol.

Adapun rata-rata dan standar deviasi persentase makrofag yang mengsekresikan ROIs untuk tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 2.1



**Gambar 2.1** Grafik Porsentase makrofag yang mengsekresikan ROIs untuk tiap kelompok perlakuan. A= kontrol aquades, B= susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr, C= susu kuda sumbawa dosis 1 ml/hr dan D= susu kuda sumbawa dosis 1.5 ml/hr

Gambar 2.1. menunjukkan rata-rata persentase makrofag yang mengsekresi ROIs yang paling tinggi pada kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa 1.5 ml/hr (67.00±9.61%) diikuti kelompok susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr (63.83±7.30%) dan kelompok susu kuda

Sumbawa dosis 1 ml/hr ( $35.17 \pm 11.65\%$ ). Sedangkan yang paling rendah pada kelompok kontrol ( $27.50 \pm 9.64\%$ ). Hasil analisis statistik dengan *One-way Anova* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan persentase makrofag yang mengsekresikan ROIs antara kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0.000$  ( $p < 0.05$ ) dan pada hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr secara signifikan berbeda bermakna dengan kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr dan kelompok kontrol. Sehingga pemberian susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr mampu meningkatkan persentase sekresi ROIs yang ditunjukkan oleh sekresi positif NBT pada makrofag peritoneum mencit Balb/ yang dipapar bakteri *S.Typhimurium*.

## PEMBAHASAN

### 1. Pengaruh Susu Kuda Sumbawa pada Aktivitas Fagositosis Makrofag

Variabel respon imun seluler yang diukur adalah aktivitas fagositosis makrofag sebagai fagosit profesional. Dalam penelitian ini mengukur kemampuan makrofag peritoneum mencit Balb/c untuk mengfagosit bakteri *S. Typhimurium* secara *in vitro* setelah secara *in vivo* mencit mendapatkan susu kuda Sumbawa secara oral dalam berbagai dosis (0.5 ml/hr, 1 ml/hr dan 0.5 ml/hr) selama 14 hari. Aktivitas fagositosis makrofag terhadap bakteri *S.Typhimurium* ditentukan dengan menghitung rata-rata jumlah bakteri *S.Typhimurium* yang terfagosit per sel makrofag yang dihitung dari 200 sel makrofag dinyatakan dengan indeks fagositosis.

Hasil penelitian ini (Gambar 1.1 dan 1.2 ) menunjukkan perlakuan susu kuda Sumbawa mampu mengaktivasi makrofag yang ditandai dengan meningkatnya kemampuan fagositosis makrofag dibandingkan pada kontrol aquades. Kemampuan fagositosis makrofag yang dinyatakan dalam indeks fagositosis secara signifikan berbeda bermakna antar kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa dengan nilai ( $p = 0.000$ ;  $p < 0.05$ ) dan yang paling tinggi pada perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr. Secara normal makrofag dalam keadaan nonaktif, dan dapat diaktifkan oleh berbagai stimulan dari luar tubuh . Pada mencit yang telah mendapat susu kuda Sumbawa secara *in vivo* dan secara *invitro* makrofag peritoneum dipapar bakteri *S.Typhimurium* mengalami peningkatan kemampuan dalam mengfagositosis bakteri *S.Typhimurium* dengan adanya peningkatan rata-rata jumlah bakteri *S.Typhimurium* yang terfagosit bila dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa komponen dalam susu kuda Sumbawa mampu meningkatkan kapasitas reseptor yang dimiliki oleh makrofag dan juga meningkatkan produksi sitokin-sitokin yang mengaktivasi makrofag. Menurut Perdigon *et al* pemberian susu fermentasi yang mengandung salah satu bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobasillus casei rharmonus*, atau keduanya secara *in vitro* dan *in vivo* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit. Peningkatan indeks fagositosis makrofag dalam penelitian ini dipengaruhi oleh kandungan bakteri asam laktat yang terkandung dalam susu kuda Sumbawa dalam menginduksi produksi sitokin yang berperan dalam aktivasi makrofag. Hal ini didukung oleh beberapa penelitian

yang menunjukkan BAL yang berperan sebagai probiotik memiliki kemampuan sebagai aktivator yang kuat untuk sistem imun alami karena mempunyai molekul yang spesifik pada dinding selnya. Dinding sel BAL tersusun atas *peptidoglycan* (30-70% dari total dinding sel), *polysaccharide*, dan *lipoteichoic acid*. Adanya spesifik reseptor pada *peptidoglycan* mempengaruhi limfosit atau makrofag. *Peptidoglycan* terutama dikenali oleh reseptor makrofag yang dalam hal ini adalah *Toll Like Receptor* (TLR) (Dziarski R,1992). *Toll Like Receptor* (TLRs) menjembatani sistem imunitas alami ke sistem adaptif dengan menginduksi berbagai molekul efektor dan ko-stimulator. Dalam perannya membantu menjembatani sistem imunitas alami ke sistem adaptif, TLR mampu menginduksi respons imun baik ke arah Th1 maupun Tregulasi. Sinyal dari TLR dapat mengaktifkan respon imun non spesifik, dengan cara merangsang produksi berbagai protein penting yang terdapat pada makrofag (Abbas Ak, et al., 2000). *Toll Like Receptor* (TLR) terutama mengenali sejumlah besar patogen yang berhubungan dengan PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Salah satu PAMPs yang ditemukan pada bakteri gram positif dan sebagai contohnya adalah Bakteri Asam Laktat (BAL) adalah *lipoteichoic acid* (LTA) . Molekul Biologis LTA pada BAL akan dikenali PRRs (*Pattern Recognition Receptor*) dalam hal ini TLR2 dan TLR4. TLR-2 dan TLR-4 diketahui mempunyai peran penting dalam polarisasi respons imun oleh paparan mikroba.

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa komponen BAL *lipoteichoic acid* dapat menginduksi produksi sitokin diduga melalui dua

jalur yaitu sitokin yang disekresikan terjadi apabila reseptor permukaan sel berikatan dengan antigen yang dipresentasikan ke T limfosit dan melalui interaksi langsung BAL dengan sel imunokompeten (Bhakdi S et al., 1991; Heumann D et al 1994). Hasil penelitian menunjukkan bahwa komponen BAL *lipoteichoic acid* dapat menginduksi produksi sitokin Interleukin-1 (IL-1), IL-6, dan *Tumor Necrosis factor-alfa* ( *TNF- $\alpha$* ) pada sel monosit manusia menginduksi produksi sitokin IL-12, IL-18 dan Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) pada sel-sel mononuclear darah perifer manusia (Matsuzaki T et al, 2000) dan sitokin IL-12, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  pada sel-sel limpa tikus (Mettinen M et al.,1998). Hasil beberapa penelitian menunjukkan susu kuda Sumbawa mengandung BAL *Lactobacillus* sp, *Weissella* sp, atau *Leuconostoc* sp yang merupakan kelompok *Lactobacili homofermentatif* dan *heterofermentatif* dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhimurium*, dan *Staphylococcus aureu* pada studi *in vitro* selain itu *Lactobacillus* spp yang terkandung dalam susu kuda Sumbawa berpotensi sebagai galur probiotik (Sujaya et al.,2008). Selain kandungan BAL, susu kuda Sumbawa mengandung laktoferin yang mampu menginduksi terbentuknya antibodi. Antibodi dapat meningkatkan fagositosis salah satunya Immunoglobulin G (IgG) yang dikenal oleh Fc $\gamma$ R pada permukaan fagosit diikat mikroba. Fc $\gamma$ R adalah reseptor untuk fraksi IgG yang diekspresikan pada sel efektor sistem imun terutama makrofag, monosit dan sel dendrit. Fc $\gamma$ R sangat penting sebagai jembatan untuk aktivasi respon imun melalui mekanisme efektor seluler yaitu proses fagositosis (Abbas AK et al.,2000) Sinyal dari Fc $\gamma$ -R akan



meningkatkan aktivitas makrofag untuk mengfagositosis mikroba yang diopsonisasi (Roitt I *et al.*, 2001). Hasil penelitian Nurliyani *et al.*, 2005, menunjukkan bahwa pemberian laktoferin susu kuda baik secara oral maupun intraperitonium berperan dalam menginduksi terbentuknya respon spesifik IgA, IgG, subkelas IgG1 dan IgG2b dalam serum mencit Balb/C

## 2. Pengaruh Susu Kuda Sumbawa pada Kemampuan Makrofag Mengsekresi ROI

Pada mencit kontrol aquades maupun yang diberikan susu kuda Sumbawa berbagai dosis secara *in vivo* dan secara *in vitro* makrofag peritoneum mencit dipapar bakteri *S.Typhimurium* mampu mengsekresikan ROI. Persentase makrofag yang mengsekresikan ROI yang ditunjukkan pembentukan biru formazan pada kelompok susu kuda Sumbawa dengan berbagai dosis menunjukkan peningkatan dibandingkan kontrol aquades. Kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROI secara signifikan berbeda bermakna antar kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa dengan nilai ( $p=0.000$ ;  $p<0.05$ ) dan yang paling tinggi pada perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr.

Pada penelitian ini (Gambar 2.1 dan 2.2) menunjukkan pada perlakuan susu kuda Sumbawa mampu mengaktivasi makrofag yang ditandai dengan meningkatnya kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROI dibandingkan pada kontrol aquades. Dalam penelitian ini diukur reduksi NBT yang memerlukan anion superoksida ( $O_2^*$ ) menjadi presipitan formazan yang tidak terlarut menggunakan metode *Nitroblue tetrazolium* (NBT) *reduction assay* dengan pengamatan di bawah mikroskop cahaya.

Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa pemberian susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr secara *in vivo* berpengaruh meningkatkan aktivitas fungsional makrofag untuk mengsekresikan ROI setelah diinfeksi bakteri *S.Typhimurium*. Pada perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr menunjukkan peningkatan jumlah bakteri yang terfagosit oleh sel makrofag yang juga disertai peningkatan sel makrofag dalam mengsekresikan ROI. Interaksi antara bakteri *S.Typhimurium* dengan membran makrofag tidak hanya menyebabkan *ingesti* yang ditunjukkan oleh meningkatnya jumlah rata-rata bakteri yang terfagosit oleh makrofag tetapi juga menyebabkan suatu *respiratory burst* yang ditandai dengan peningkatan konsumsi oksigen ( $O_2$ ) dan produksi anion superoksida ( $O_2^*$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang memiliki aktivitas mikrobiosidal. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang terfagosit akan mempengaruhi reseptor fagosit yang mengikat bakteri mengirimkan sinyal yang mengaktifkan beberapa enzim dalam fagolisosom. Salah satu enzim adalah oksidase fagosit. Pengaktifan enzim NADPH (*Nikotinamide Adenine Dinukleotide Phosphate*) oksidase yang berfungsi mengkatalisa pembentukan superoksida yang diperkirakan terjadi di sebelah luar membran plasma, mencetuskan *respiratory burst* disertai pembentukan radikal superoksida ( $O_2^*$ ). Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga superoksida dibebaskan ke dalam vakuola. Selanjutnya secara spontan atau enzimatik (dikatalisis oleh superoksida dismutase) menghasilkan radikal bebas lain seperti hidrogen peroksida. Selanjutnya hidrogen peroksida dapat

diubah oleh myeloperoksidase menjadi asam hipoklorit sehingga lisis bakteri (Roit I *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini, kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROI pada kelompok perlakuan susu kuda Sumbawa dosis 1 ml/hr mengalami penurunan. Hal ini diduga komponen yang dikandung oleh susu kuda mampu menghambat proses *respiratory burst*. Dalam komponen susu kuda Sumbawa terdapat komponen galaktoferin/laktoferin (Hermawati, 2005) dimana laktoferin juga merupakan protein pengikat metal (*metal-binding protein*) yang berfungsi sebagai *metal-chelator* (Nagasako *et al.*, 1993). Kemampuan komponen susu dalam menghambat *respiratory burst* juga ditunjukkan oleh hasil penelitian Sabina (Sabina *et al.*, 2002), kemampuan fagositosis sel neutrofil dari sukarelawan sehat yang diberi perlakuan konsumsi susu kuda 250 ml/hr selama 3 minggu, menunjukkan penurunan proses *respiratory burst* namun kemampuan kemotaksis sel netrofil meningkat sehingga dalam penelitiannya diduga komponen yang ada dalam susu kuda berfungsi sebagai imunostimulator dalam proses fagositosis. Sehingga kemampuan makrofag dalam mengsekresikan ROIs dalam perlakuan susu kuda dosis 1 ml/hr mengalami penurunan dapat dipengaruhi oleh beberapa komponen dalam susu kuda namun hal ini memerlukan pembuktian lebih lanjut dengan melakukan pengukuran secara spesifik enzim SOD ataupun radikal bebas lain yang terbentuk maupun jenis sitokin yang dihasilkan sebagai pengaruh pemberian susu kuda Sumbawa.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Penelitian ini dapat membuktikan bahwa susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr secara signifikan meningkatkan indeks fagositosis makrofag peritoneum mencit Balb/c yang dipapar bakteri *S.Typhimurium*. Susu kuda Sumbawa dosis 0.5 ml/hr dan susu kuda Sumbawa dosis 1.5 ml/hr secara signifikan meningkatkan persentase sekresi *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) yang ditunjukkan oleh sekresi positif *Nitroblue tetrazolium* (NBT) pada makrofag peritoneum mencit Balb/c yang dipapar bakteri *S.Typhimurium*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa susu kuda Sumbawa mampu meningkatkan respon imun seluler makrofag melalui peningkatan indeks fagositosis dan sekresi ROI makrofag mencit yang dipapar bakteri *S.Typhimurium*.

### Saran

Penelitian ini perlu ditindak lanjuti dengan penelitian tentang kandungan Bakteri Asam Laktat (BAL) dan komponen bioaktif dalam susu kuda Sumbawa tiap dosis perlakuan, pemberian komponen BAL atau komponen bioaktif yang terkandung dalam susu kuda Sumbawa pada hewan coba yang diinfeksi bakteri *S. Typhimurium* secara *in vitro* dan *in vivo*, pengaruh komponen susu kuda Sumbawa terhadap sekresi sitokin yang berperan dalam respon imun, pengaruh komponen susu kuda Sumbawa terhadap pembentukan radikal bebas seperti Hidrogen peroksida, Nitrit Oxide, serta penelitian dengan topik yang sama dengan menggunakan metode flowcytometry.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abbas AK, Lichtmann AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000.
- Bellanti J A. Immunologi III ( Wahab SA. Penerjemah). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 1993: 280-293.
- Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of Monokine Production by Lipoteichoic Acid. *Infect. Immun.* 1991, 59: 4614-4620.
- Dziarski R. Demonstration of Peptidoglycan-Binding Sites on Lymphocytes and Macrophages by Photoaffinity Cross-Linking. *J.Biol.Chem.* 1991, 266: 4713-4718
- Formanto Bobby. Aktivitas Antimikroba Susu Kuda terhadap Bakteri Pathogen. Skripsi. Bogor: Institusi Pertanian Bogor Fakultas Peternakan, 2001.
- Hermawati. Kajian Aktivitas dan Karakterisasi Senyawa Antimikroba dari Susu Kuda Sumbawa. Disertasi. Bogor: Institusi Pertanian Bogor, 2005.
- Hermawati,D. Sudarwanto, M., Soekarto, S.T., Zakaria, F.R., Sudrajat,S. dan Tjatur, R.F.S. Aktivitas Antimikroba pada Susu Kuda Sumbawa, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 2004, XV (1): 47-53.
- Heumann D., Barras C., Severin A., Glauser M. P, Tomasz A. Gram-positive Cell Walls Stimulate Synthesis Of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin- 6 by Human Monocytes. *Infect.Immun.* 1994, 62: 2715-2721.
- Lewia J.G. Isolation of Alveolar Macrophages, Peritoneal Macrophages and Kuffer Cells. In Burleson G.R, *et al (Eds), Methods in immunotoxicology*, Volume 2, John Willey & Sons Inc. Publ,USA, 1995, 19-20.
- Matsuzaki,T and J.Chain. Modulation Immune Responses with Probiotik Bacteri. *Immunology and cell.* 2000, 78:67-73
- Mettienen M, Matikainem S, Vuopio Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Jurkunen I. *Lactobacilli and streptococci* Induce Interleukin-12,IL-18 and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell. *Infect Immune.* 1998, 66: 52-60.
- Mittrucker H.S and Kaufmann Stefan H.E. Immune Response to Infection with *Salmonella* Typhimurium in Mice. *Journal of Leukocyte Biology.* 2000, 67: 457-463.
- Nagasako , Y ., H . Saito , Y . Tamura, S. Shimamura and M . Tomita.. Iron-Binding Properties of Bovine Lactoferrin in Iron-Rich Solution. *J . Dairy Sci.* 1993, 76(7): 1876-1881.
- Nurliyani, Artama T.W. dan Zuheid N. Respon Antibody Dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit Yang Diberi Protein Susu Kuda Pasteurisasi dan Fermentasi. *Media Kedokteran Hewan*, 2008, 21 (2): 51-57.
- Nurliyani, M. Adnan. Artama T.W. dan Zuheid N. Peran Laktoferin susu kuda sebagai imunomodulator dalam respon imun humoral. *Agritech*, 2005, 25(2): 85-89.
- Pana. Perbandingan Pengaruh Susu Kambing dan Susu Kuda Sumbawa terhadap Pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara In vitro. Tesis. Program Pascasarjana Institusi Pertanian Bogor, 2004.
- Perdigon G, Macias M.E.N. Alvarez s. Oliver G. De Holgado R.A.P. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*.*Immunology*,1988, 63: 17-23.
- Rijatmoko Dijan. Pengaruh susu kuda sumbawa terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara in vitro. Tesis.Program Pascasarjana Institusi Pertanian Bogor, 2004.
- Roitt I,J. Brostoff and Male D. *Immunology.* 6<sup>th</sup> ed, London; Harcourt Publisher Ltd., 2001.
- Sabina E, Linscheid Karl Peter Jahnecke Stefan, Goerlich Roland, Enbergs Heinrich. The Effect of Mare's Milk Consumption on Functional Elements of Phagocytosis of Human Neutrophil Granulocytes from Healthy Volunteers. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, ISSN 0954-0105: 191-

- 200.
- Sasmito ediati, Rumiyan, Rahayu,S.W, Andriyani E. dan Rochmy I. Pengaruh Pemberian Susu Kuda Terfermentasi terhadap Imunitas Vaksin Hepatitis A pada Mencit Balb/c. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2006, 17 (1): 13-18.
- Sujaya I.N, Dwipayanti Utami N.M, Suriani P.N.L,Widarini, N.P, Nocianitri A.K dan Nursini N.W. Isolasi dan Karakterisasi bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner*, 2008, 9 (2): 52-59.
- Warren, J., Mastroeni P., Dougan, G, Noursadeghi, M., Cohen, J,Walport, M. J., and Botto, M. Increased Susceptibility of C1q-Deficient Mice to *Salmonella Enteric Serovar Typhimurium* Infection. *Infect Immun*. 2002, 70: 551-557.
- Winarsi Sr. Respon Imun Seluler dan Protektivitas in vivo protein adhO36 *Salmonella typhi* (upaya memperoleh kandidat vaksin demam tifoid) Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Barawijaya Malang, 2005.
- Yinang Wang, Xueling Cui, Guixiang Tai, Jingyan Ge, Nan Li, Fangfang Chen, Fang Yu, and Zhonghui Liu. A critical Role of Activin A in Maturation of Mouse Peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Celular & Immunology*, 2009, 6 (5): 387-392.
- Yuniati.H. Komponen Bioaktif Protein dalam Susu Kuda Liar.  
[URL:http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?top=/Member/lisa\\_ira@litbang.depkes.id/jkpkbppk-gdl-res-2000-heru-992-susu](http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?top=/Member/lisa_ira@litbang.depkes.id/jkpkbppk-gdl-res-2000-heru-992-susu)