

Aktivitas imunostimulan susu kedelai terhadap imunoglobulin (IgG, IgA) dan proliferasi sel limfosit pada mencit Balb/c yang diinduksi hepatitis A

Immunostimulant activity of soybean milk against immunoglobulin (IgG, IgA) and lymphocyte cells proliferation of Balb/c mice induced hepatitis A

Ediati Sasmito¹⁾ Sri Mulyaningsih²⁾ Eka Kartika Untari²⁾ dan Ratna Widyaningrum²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta

²⁾ Jurusan Farmasi FMIPA UII Yogyakarta

Abstrak

Susu kedelai mengandung isoflavon aglikon yaitu genestein dan kaya dengan protein. Genestein diketahui mempunyai aktivitas antitumor/antikanker, antivirus, antialergi dan berperan dalam respon imun. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas imunostimulan susu kedelai terhadap kadar imunoglobulin (IgG dan IgA) dan proliferasi sel limfosit pada mencit Balb/c yang diinduksi hepatitis A. Uji dilakukan pada 3 kelompok mencit (@ 5 ekor), masing-masing diberikan peroral pada kelompok : perlakuan (kelompok I) diberi susu kedelai dosis 0,7mL/20g/BB, kontrol positif (kelompok II) diberi levamisol hidroklorida dosis 0,45mg/0,7mL/20g/BB, dan kontrol negatif (kelompok III) diberi air dosis 0,7mL/20g/BB, sekali per hari, selama masa penelitian. Pada hari ke 7, 28 dan 43, semua hewan uji diinduksi hepatitis A dosis 5,24 IU/ 20g/ BB secara intra peritoneal. Pengambilan serum dilakukan pada hari ke 14, 35, dan 46 dari *plexus retroorbitalis*, untuk penetapan kadar imunoglobulin (IgG dan IgA) dengan metode ELISA tak langsung. Setelah pengambilan serum pada hari ke 46, semua mencit dikorbankan untuk diisolasi limfosit dari limpanya. Proliferasi limfosit diukur dengan metode MTT-*reduction*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa susu kedelai dapat meningkatkan kadar IgG dan IgA dalam serum hari ke 46 secara signifikan ($p < 0,05$), tetapi tidak dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit secara signifikan ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Dapat disimpulkan bahwa susu kedelai mempunyai aktivitas imunostimulator pada respon imun humoral, tidak pada respon imun seluler

Kata kunci : susu kedelai, imunoglobulin, sel limfosit, hepatitis A, levamisol

Abstract

Soybean milk contains of isoflavon aglycon as genestein and rich of proteins. The genestein of soybean milk potentially has antitumor/anticancer, antivirus, antiallergic activities and immunity responses. The aim of this research was to evaluate the immunostimulant activity of soybean milk against immunoglobulin (IgG and IgA) and lymphocyte cells proliferation in Balb/c mice induced by hepatitis A. The test was done at 3 groups of 5 Balb/c mice. Each group was consumed orally with soybean milk (group I) dose of 0.7mL/20g/BW, levamisole (group II, as positif control) dose of 0,45 mg/0.7mL/20g/BW, and water (group III, as negative control) dose of 0.7mL/20g/BW, once a day, through out of the research. On the day of 7, 28 and boosted on the day of 43, all groups were induced intra

peritoneally by hepatitis A dose of 5.24 IU/20g/BW. The serum were collected from plexus retroorbitalis by heparinized capillary on the day of 14, 35 and 46, for IgG and IgA measured by ELISA method, and then the mice were sacrificed to isolate the lymphocytes of spleen. The lymphocyte cells proliferation measured by MTT-reduction method. The result shown that IgG and IgA increased significantly ($p < 0,05$) against levamisole and water at the day-46, but did not increase significantly ($p > 0,05$) against lymphocyte cells proliferation concerning with soybean milk consumed. It can be concluded that the immunostimulatory activity soybean milk was against humoral immunity, instead of seluler immunity.

Key words : soybean milk, immunoglobulin, lymphocyte cells, hepatitis A, levamisole

Pendahuluan

Susu kedelai dikenal sebagai minuman kesehatan berasal dari pengolahan biji kedelai yang merupakan salah satu sumber nabati yang potensial. Susu kedelai adalah cairan hasil ekstraksi protein biji kedelai dengan menggunakan air panas (Anonim, 2004c). Kandungan senyawa flavonoid dan isoflavonoid dalam susu kedelai berpotensi sebagai antitumor/antikanker, anti virus dan anti alergi. Penyakit tumor/kanker yang disebabkan virus, dapat terjadi karena defisiensi sistem imun, sedangkan alergi disebabkan autoimun (Baratawidjaja, 2000).

Senyawa aktif yang berperan adalah genestein yang merupakan isoflavon aglikon. Mekanisme aktivitas senyawa ini dapat dipandang sebagai fungsi alat komunikasi yang mempunyai pengaruh negatif (menghambat) maupun bersifat positif (menstimulasi). Genestein juga berperan dalam sistem imun (Anonim, 2004a).

Penelitian lain juga dilakukan untuk melihat peran genestein pada pasien kanker stadium akhir, dan ditemukan adanya peningkatan sel NK dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) pada pengamatan selama 6 bulan (See, *et al.*, 2002).

Respon imun humoral berperan dalam pertahanan terhadap mikroba ekstraseluler, yang diperantarai antibodi. Sedangkan pertahanan terhadap mikroba intraseluler, misal virus, memerlukan respon imun seluler.

Adanya senyawa genestein dalam susu kedelai yang berperan dalam sistem imun, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas imunostimulan susu kedelai terhadap kadar imunoglobulin (IgG dan IgA) dan proliferasi sel limfosit pada mencit Balb/c yang diinduksi hepatitis A. Dari data

yang diperoleh, diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas imunostimulan susu kedelai, sebagai imunostimulan respon imun humoral atau seluler, sehingga penggunaan susu kedelai lebih tepat untuk meningkatkan respon imun humoral atau seluler dari hospes yang memerlukannya.

Metodologi

Bahan

Mencit dewasa galur Balb/c umur 12 minggu, berat \pm 20 g, susu kedelai, levamisol hidroklorida, vaksin hepatitis A yang mengandung virus hepatitis A Strain 175 (Havrix), RPMI 1640 (Sigma), MTT [3-(4,5-dimetillthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma)

Alat

ELISA (mikroplat) reader (Bio Rad), Laminair Air Flow (Labquin), inkubator CO₂ 5%, 37°C (Heraeus), Inverted microscope (Olympus), sentrifus berpendingin (Sigma 3K12)

Jalannya penelitian

Desain eksperimen pada mencit

Dalam penelitian ini digunakan 15 ekor mencit dewasa, yang dibagi menjadi 3 kelompok (@ 5 ekor) perlakuan yaitu : kelompok susu kedelai dengan dosis 0,7mL/20g/BB; kelompok levamisol (kontrol positif) dengan dosis 0,45mg/0,7mL/20g/BB; kelompok air (kontrol negatif) dengan dosis 0,7mL/20g/BB, masing-masing perlakuan diberikan per oral sekali setiap harinya selama penelitian. Induksi dengan hepatitis A dilakukan pada hari ke-7 dan ke-28 secara intraperitoneal dengan dosis 5,24 IU/20g/BB. Booster dilakukan pada hari ke-43 dengan empat titik : (1) 1/10 dosis total antigen diinjeksi secara i.p, volume 0,25 mL dalam PBS tunggu 45 menit; (2) 1/10 dosis total dengan cara dan volume yang sama pada titik yang berbeda, tunggu 45 menit; (3) 2/10 dosis total dengan cara dan volume yang sama, tunggu 30 menit; (4) 6/10 dosis total secara i.v. Pengambilan darah dari *plexus retroorbitalis*, dilakukan pada hari ke-

14, ke-35, dan ke-46. Sampel darah didiamkan selama 1-2 jam pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, serum diisolasi dan digunakan untuk penetapan kadar IgG dan IgA dengan metode ELISA tak langsung. Kemudian mencit dikorbankan, sel limfosit diisolasi, digunakan untuk uji proliferasi.

Penetapan imunoglobulin (IgG dan IgA) dengan metode ELISA tak langsung (Burgess, 1995)

Mikroplat 96 dilapisi dengan hepatitis A sebagai antigen kadar 5 µg/mL dalam 100µl PBS per sumuran, diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Masing-masing sumuran, cuci 3x dengan 300 µL 0,05 % PBST20, kemudian diblok dengan 0,5% BSA dalam 100 µL PBS, lalu diinkubasi 1 jam pada suhu 37°C. Kemudian dicuci 3x dengan 300 µL 0,05% PBST20. Ditambahkan 100 µL serum yang telah diencerkan (1:100 dalam PBS). Sebagai blangko digunakan PBS. Diinkubasi 2 jam pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 300 µL 0,05% PBST20. Ditambahkan 100 µL masing-masing isotype spesifik IgG dan IgA, lalu diinkubasi 30 menit pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 300 µL 0,05% PBST20 dan tambahkan 100 µL konjugat peroksidase, diinkubasi 15 menit pada suhu kamar. Cuci 3x dengan 300 µL 0,05% PBST20. Dimasukkan 100 µL substrat OPD, lalu inkubasi 30 menit pada suhu kamar diruang gelap selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50 µl 2,5 M H₂SO₄. Hasil dibaca dengan mikroplat reader pada panjang gelombang 492 nm.

Isolasi sel limfosit dan Uji proliferasinya dengan MTT reduction (Anonim, 2004b)

Limpa mencit diangkat dari selubung peritoneumnya dan diletakkan dalam cawan petri diameter 50 mm yang berisi 5 mL RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalamnya sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifus 10 mL dan disentrifus selama 10 menit. Pelet yang didapat, disuspensikan ke dalam 2 mL *Tris Buffered Ammonium Chloride* untuk melisis eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 2 menit. Ditambahkan 1 mL FBS pada dasar tabung, campur, sentrifus pada 1200 rpm 4°C selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet dicuci 2 kali dengan RPMI dan dilakukan proses seperti awal hingga didapatkan beningan dan sel limfosit disuspensikan dengan medium komplit. Dilakukan penghitungan sel dengan hemositometer. Selanjutnya sel limfosit siap untuk diuji aktivitasnya dan dikultur dalam

inkubator CO₂ pada 37°C. Sebanyak 100 µL sel limfosit didistribusikan ke dalam sumuran-sumuran mikroplat 96-wells sesuai dengan masing-masing kelompok perlakuan dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 20µL MTT 5 mg/mL. Kemudian diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu larutan SDS 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 50µL pada tiap sumuran, selanjutnya diukur absorbansi dengan mikroplat reader dengan panjang gelombang 550 nm.

Analisis hasil

Data OD (*Optical Density*) yang menunjukkan jumlah imunoglobulin (IgG dan IgA) dalam serum dengan metode ELISA tak langsung, dan hasil proliferasi sel limfosit dengan metode MTT-reduction, dihitung purata dan simpangan bakunya, kemudian dianalisis secara statistik.

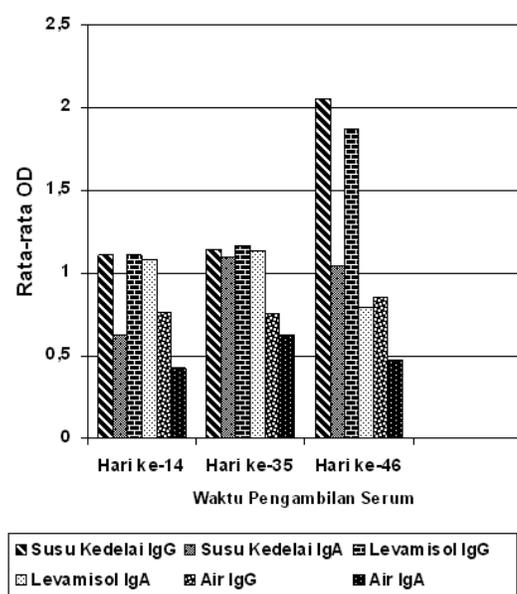
Hasil Dan Pembahasan

Penetapan imunoglobulin (IgG dan IgA) serum dengan metode ELISA tak langsung

Mencit diinduksi dengan vaksin hepatitis A yang berperan sebagai antigen. Imunoglobulin akan diproduksi, karena adanya paparan antigen. Induksi bertujuan untuk membangkitkan imunitas yang efektif sehingga terbentuk imunoglobulin dan sel-sel memori. Induksi dilakukan berulang sebanyak tiga kali agar sel-sel memori yang terbentuk semakin banyak (Subowo, 1993). Pada penelitian ini induksi dilakukan intraperitoneal, karena vaksin berupa campuran vaksin hepatitis A dengan minyak kelapa, dikhawatirkan jika disuntikkan intravena akan menyumbat pembuluh darah. Minyak kelapa (campuran 1 bagian minyak kelapa dan 3 bagian air) ini digunakan sebagai adjuvan yang berupa emulsi yang mampu memperkuat antigen dalam kemampuannya merangsang terbentuknya imunoglobulin. Pemberian antigen secara intraperitoneal, maka respon imun humoral berupa IgA diharapkan muncul, karena IgA berperan melindungi tubuh dari mikroorganisme berupa virus yang masuk melalui saluran pencernaan dan saluran pernafasan (Levinson dan Jawetz, 2003).

Serum diisolasi dari darah yang diambil pada hari ke 14, 35 dan 46, melalui *plexus*

retroorbitalis sebanyak $\pm 0,5$ ml. Pengumpulan serum dilakukan setelah *fase lag* yaitu sekitar 7-10 hari setelah antigen diinjeksikan. Pada induksi ketiga, serum diambil pada fase lag yang terjadi 3-5 hari setelah antigen diinjeksikan (Levinson dan Jawetz, 2003). Pengambilan darah yang berselang tersebut dimaksudkan agar hewan uji dapat memulihkan luka yang disebabkan pengambilan darah dari mata. Semakin banyak imunoglobulin yang terdapat dalam serum, maka semakin tinggi intensitas warna yang dihasilkan. Intensitas warna tersebut berbanding lurus dengan OD yang dibaca pada mikroplat *reader*. (Gambar 1).



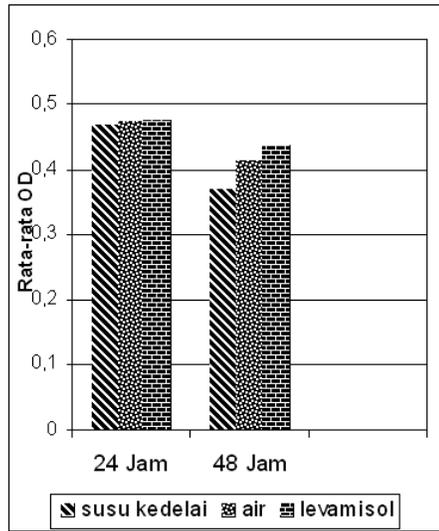
Gambar 1 Grafik rata-rata OD \pm SD hasil penetapan imunoglobulin serum hari ke 14, ke 35 dan ke 46 dengan ELISA tak langsung. Serum diambil dari mencit yang diberi perlakuan peroral masing-masing dengan susu kedelai, levamisol, dan air

Dari grafik dalam Gambar 1, dapat diketahui bahwa antara kelompok perlakuan susu kedelai dengan levamisol pada hari ke-14, tidak terdapat perbedaan signifikan ($p > 0,05$) terhadap produksi IgG dan IgA, dan kedua kelompok meningkat secara signifikan ($p < 0,05$) dibanding dengan kelompok air. Demikian pula, pada hari ke-35 pengambilan serum, kadar IgG maupun IgA meningkat secara signifikan

($p < 0,05$) terhadap kelompok air. Namun pada hari ke-46 terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap kadar IgG dan IgA yang dihasilkan antara kelompok perlakuan susu kedelai dengan levamisol, dan susu kedelai lebih dapat meningkatkan secara signifikan ($p < 0,05$) kadar IgG dan IgA, dibandingkan dengan levamisol. Hal ini membuktikan bahwa susu kedelai mempunyai kemampuan menstimulasi sistem imun humoral lebih baik dibanding dengan levamisol, karena mengandung senyawa genestein yang merupakan isoflavon aglikon yang mempunyai aktivitas meningkatkan respon imun (Anonim, 2004a). Air yang diberikan pada hewan uji tidak memiliki pengaruh imunostimulan terhadap peningkatan IgG dan IgA pada sistem imun. Jumlahnya yang agak tinggi bukan dikarenakan adanya pemberian air tetapi sistem imunitas hewan uji itu sendiri yang bekerja, karena diinduksi dengan antigen. Pada hari ke-35 dan ke-46 terjadi peningkatan respon imun, ini dikarenakan adanya sel-sel memori yang terbentuk pada saat induksi pertama, dan pada hari ke-35 dan ke-46 sel-sel memori tersebut meningkat sehingga jumlah imunoglobulin yang dihasilkan meningkat pula (Subowo, 1993).

Penetapan jumlah proliferasi sel limfosit

Isolasi sel limfosit dari limpa dilakukan pada hari ke-46 diharapkan setelah dilakukan induksi berulang-ulang akan terjadi peningkatan jumlah sel-sel respon imun. Untuk mendapatkan suspensi sel limfosit, dilakukan pemompaan media RPMI ke dalam limpa. Dengan cara ini jumlah sel yang rusak dapat diminimalkan. Kultur diinkubasi masing-masing selama 24 dan 48 jam, kemudian ditambahkan reagen MTT. Garam *Yellow tetrazolium* direduksi oleh sistem enzim dehidrogenase dalam mitokondria sel hidup menjadi bentuk kristal formazan ungu, apabila diinkubasi selama 2-4 jam. Dengan penambahan detergen yaitu SDS, maka sel akan lisis dan kristal larut, sehingga terjadi larutan yang berwarna. Hasil sebagai OD dibaca pada mikroplat *reader* pada panjang gelombang 550 nm. Terdapat hubungan yang linier antara jumlah sel dengan besarnya OD yang ditetapkan (Anonim, 2004b).

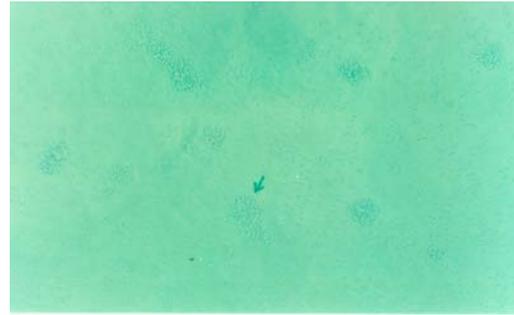


Gambar 2 Grafik hasil OD rata-rata ± SD proliferasi sel limfosit dengan metode MTT-reduction yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam

Dari grafik data OD pada Gambar 2, menunjukkan bahwa antara kelompok perlakuan susu kedelai saat inkubasi 24 jam tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) terhadap jumlah sel limfosit yang berproliferasi dibanding dengan kelompok levamisol dan air. Sedangkan pada inkubasi 48 jam menunjukkan antara kelompok perlakuan susu kedelai terjadi penurunan proliferasi yang signifikan ($p < 0,05$) dibanding dengan kelompok levamisol dan air. Hal ini bisa disimpulkan, bahwa susu kedelai yang mengandung genestein berperan dalam meningkatkan aktivitas sel NK dan sel T sitotoksik (Rorie, 2002), sehingga menurunkan jumlah sel limfosit dalam kultur pada inkubasi 48 jam.

Hasil proliferasi sel limfosit pada inkubasi 48 jam sebelum ditambahkan reagen MTT, dapat dilihat pada Gambar 3, 4, dan 5

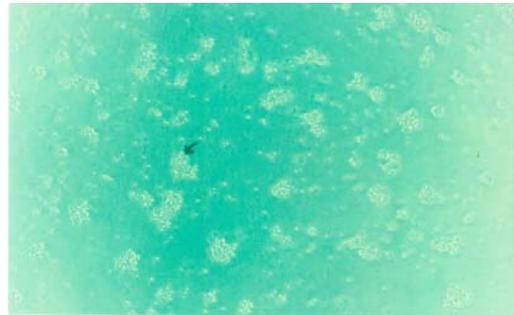
Dari kultur limfosit pada pemberian susu kedelai (Gambar 3), terlihat bahwa gerombolan sel limfosit lebih sedikit dibanding dengan pemberian levamisol (Gambar 4) dan air (Gambar 5). Hal ini sesuai dengan grafik hasil dari pengukuran dengan metode MTT reduction (Gambar 2) pada inkubasi 48 jam, yang menunjukkan bahwa levamisol dapat meningkatkan proliferasi limfosit secara signifikan



Gambar 3. Proliferasi sel limfosit pada pemberian susu kedelai (perbesaran 200x).



Gambar 4. Proliferasi sel limfosit pada pemberian levamisol (perbesaran 200x).



Gambar 5. Proliferasi sel limfosit pada pemberian air (perbesaran 200x)

Keterangan :

Anak panah : Sel limfosit yang bergerombol

($p < 0,05$) dibanding dengan pemberian air dan susu kedelai.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh, disimpulkan bahwa dengan pemberian susu kedelai dosis 0,7mL/20g/BB pada mencit yang diinduksi dengan hepatitis A dapat meningkatkan kadar imunoglobulin (IgG dan IgA) serum yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$),

namun proliferasi sel limfosit mencit pada inkubasi 24 jam, berbeda tidak signifikan ($p > 0,05$), dibanding dengan kelompok perlakuan levamisol dan air. Demikian pula pada inkubasi 48 jam, pemberian susu kedelai menurunkan proliferasi sel limfosit yang

berbeda nyata ($p < 0,05$) dibanding dengan pemberian levamisol dan air. Dengan demikian, susu kedelai mempunyai aktivitas imunostimulator pada respon imun humoral dibanding respon imun seluler.

Daftar Pustaka

- Anonim, 2004a, *Manfaat Isoflavon*, available at <http://www.google.com> (Oktober 2004).
- Anonim, 2004b, *MTT Assay*, available at <http://www.google.com>, (Oktober 2004).
- Anonim, 2004c, *Susu kedelai*, available at <http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/0504/cakrawala/penelitian01.htm>, Desember 2004.
- Baratawidjaja, K.G, 2000, *Imunologi Dasar*, Edisi IV, Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 3-246.
- Burgess, G.W., 1995, *Teknologi ELISA dalam Diagnosis dan Penelitian*, diterjemahkan oleh Wayan T. Artama, , Gadjah Mada University, Jogjakarta, 55-56 .
- Levinson W, dan Jawetz E, 2003, *Medical Microbiology and Immunology Examination and Board Review*, McGraw-Hill, Singapore.
- Rorie S, 2002, *The Road To Immune Health*, available at <http://www.vpico.com> (Juli, 2005).
- See D, Mason S, Roshan R, 2002, *Increased tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and Natural killer cell (NK) function using integrative approach in late stage cancers*, available at <http://www.yahoo.com> (Juli, 2005).
- Subowo, 1993, *Imunologi Klinik*, Penerbit Angkasa, Bandung.