

PERAN LAKTOFERIN SUSU KUDA SEBAGAI IMUNOMODULATOR DALAM RESPON IMUN HUMORAL
THE ROLE OF HORSE MILK LACTOFERRIN AS IMMUNOMODULATOR IN HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Nurliyani¹⁾, Mochamad Adnan²⁾, Wayan Tunas Artama³⁾, and Zuheid Noor³⁾

ABSTRACT

Lactoferrin is a multifunctional defense protein, eg. as immunomodulator, which is known as glycoprotein which has 80 kDa molecular weight. The aim of this research is to characterize of horse milk lactoferrin as immunomodulator in humoral immune response.

Lactoferrin in defatted horse milk, was isolated and purified on Ion Exchange (CM Sephadex C-50) and Gel Filtration (Sephadex G-75) column. Horse milk lactoferrin is administered orally into a group of 6-8 weeks old female Balb/c mice. The dose of lactoferrin were: 0 mg (control); 0,1 mg; 0,5 mg, and 1,0 mg/mice/day in assay period of 28 day. On the 7th, 14th, 21th, and 28th day, specific IgA and IgG serum of mice were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The results showed that IgG and IgA responses of mice that were administered with 0,5 mg or 1,0 mg horse milk lactoferrin, were higher than the control and 0,1 mg lactoferrin (P<0,05). Horse milk lactoferrin apparently induced subclass IgG1 and IgG2b responses. It can be concluded that horse milk lactoferrin which administered orally was an immunogenic protein, which has function as immunomodulator in humoral immune response.

Keywords : Horse Milk Lactoferrin, Immunomodulator, Immunoglobulin

PENDAHULUAN

Laktoferin termasuk glikoprotein yang mengikat besi (Fe) dengan berat molekul sekitar 80 kDa, merupakan protein *multifunctional defense* antara lain sebagai imunomodulator. Laktoferin terdapat dalam berbagai sekresi eksternal mamalia disamping susu, yaitu saliva, air mata, sekresi permukaan mukosal, genital dan granula sekunder neutrofil (Wei *et al.*, 2000). Konsentrasi laktoferin susu sangat bervariasi di antara spesies (Schanbacher *et al.*, 1993).

Sejak lama laktoferin dikenal sebagai imunopotensiator nonspesifik dan telah dipasarkan sebagai suplemen dalam susu formula bayi. Bahkan laktoferin tidak hanya penting untuk bayi, tetapi juga dapat diaplikasikan pada bidang farmasi dan bidang pangan (Kuwata *et al.*, 2000). Laktoferin telah dimanfaatkan secara komersial pada susu formula bayi, suplemen kesehatan, minuman fungsional, kosmetik, produk perawatan oral dan suplemen pakan (Steijns and Van Hooijdonk, 2000).

Masyarakat Indonesia belum biasa mengonsumsi susu kuda seperti halnya susu sapi, karena memang susu kuda belum banyak dikenal dan juga produksi susu per ekoranya relatif kecil. Populasi kuda di Indonesia sebenarnya cukup banyak yang sebagian besar digunakan sebagai kuda tarik. Oleh karena itu untuk meningkatkan daya guna ternak kuda sebagai penghasil protein hewani, perlu diusahakan pemanfaatan susunya. Se jauh ini potensi bioaktif susu kuda belum banyak diungkap termasuk potensi laktoferinnya yang mempunyai kisaran konsentrasi antara laktoferin ASI dan laktoferin susu sapi.

Sekuen asam amino dan tingkat glikosilasi dalam struktur laktoferin sangat berkaitan dengan fungsinya sebagai imunomodulator. Tingkat glikosilasi yang tinggi dan struktur glikan yang kompleks, akan dapat melindungi sekuen-sekuen tertentu laktoferin dari degradasi oleh enzim proteolitik. Perbedaan sekuen asam amino laktoferin yang terlibat dalam pengikatan reseptor akan menentukan interaksi dengan reseptornya (Schanbacher *et al.*, 1993), karena peran laktoferin susu sebagai imunomodulator dimediasi oleh adanya reseptor laktoferin pada sel epitelial usus halus, limfosit dan monosit/makrofag (Yuki *et al.*, 1998). Perbedaan konformasi laktoferin susu kuda dan ASI mungkin akan berpengaruh pada kestabilan terhadap degradasi enzim proteolitik. Oleh karena itu hal ini juga dimungkinkan akan berpengaruh pada peran laktoferin sebagai imunomodulator.

Telah dilaporkan sekuen asam amino laktoferin susu kuda oleh Sharma dan Singh (2002), ternyata ada perbedaan dengan laktoferin susu sapi, sedangkan tingkat glikosilasinya sejauh ini belum ada informasinya. Kuda termasuk ternak non-ruminansia, dimungkinkan sifat kimia maupun fungsi biologis komponen bioaktif susu kuda berbeda dengan susu sapi.

Tujuan penelitian ini untuk mengkarakterisasi laktoferin susu kuda sebagai imunomodulator dalam respon imun humoral. Laktoferin susu kuda ini diharapkan dapat disuplementasikan dalam bahan pangan sebagai bahan makanan fungsional atau *nutraceutical* yang dapat berperan sebagai imunomodulator atau berpengaruh positif bagi kesehatan. Oleh karena itu hasil penelitian ini diharapkan juga dapat membuka peluang bagi industri pangan yang akan memproduksi bahan makanan fungsional atau *nutraceutical* dengan komponen bioaktif laktoferin susu kuda.

¹⁾ Department of Animal Product Technology, Faculty of Animal Husbandry, Gadjah Mada University
²⁾ Laboratory of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agriculture Technology, Gadjah Mada University
³⁾ Laboratory of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University
⁴⁾ Laboratory of Food and Nutrition, Faculty of Agriculture Technology, Gadjah Mada University

MATERI DAN METODE

Isolasi dan purifikasi laktoferin susu kuda

Laktoferin diisolasi dari susu kuda lokal di Yogyakarta. Isolasi dan purifikasi laktoferin susu kuda dilakukan dengan kolom *cation exchange* (CM Sephadex C-50) dan gel filtrasi (Sephadex G-75) menurut Sharma *et al.* (1999).

Hewan coba dan pemberian laktoferin susu kuda

Mencit BALB/c betina umur 6-8 minggu yang digunakan dalam penelitian ini dikondisikan selama 7 hari dengan pakan standar AIN-93 (*American Institute of Nutrition-93*) (Reeves *et al.*, 1993), air minum diberikan secara bebas. Setelah dikondisikan dengan pakan standar selama 7 hari, mencit diberi laktoferin secara oral dengan cara *force feeding* selama 28 hari dan tetap menerima pakan standar. Laktoferin diberikan dengan dosis 0,1; 0,5 dan 1,0 mg/ekor/hari. Mencit pada kelompok kontrol diberi larutan Tris-Cl pH 8. Masing-masing kelompok mencit (perlakuan maupun kontrol) terdiri dari 7 ekor mencit.

Kelompok mencit yang diimunisasi secara intraperitoneal, disuntik laktoferin susu kuda dengan dosis 10 µg dalam bentuk emulsi dengan *Freund's complete adjuvant* pada hari ke 0, sedangkan pada hari ke 10 dan ke 20 diimunisasi emulsi laktoferin dengan *Freund's incomplete adjuvant*, dan pada hari ke 28 serum nya diambil. Kelompok kontrol diberi bufer Tris-Cl dan adjuvant yang sama seperti kelompok perlakuan.

Analisis IgA dan IgG Serum

Pelapisan (*coating*) plate dengan protein laktoferin 5µg dalam *buffer coating* 100 µl per well dalam waterbath suhu 37 °C semalam. Plate dicuci 3 X dengan *washing solution* 200 µl/well, *blocking nonspecific protein* dengan PBS yang mengandung 1% BSA (*bovine serum albumin*) selama 1 - 2 jam pada suhu 37 °C. Plate dicuci 3X dengan *washing solution* 200 µl/well. Serum ditambahkan sebanyak 100 ul/well pada masing-masing plate ELISA, diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37 °C. Plate dicuci 3X dengan *washing solution* 200µl/well. Konjugate anti-mouse : - IgG, -IgG1,- IgG2a,- IgG2b dan IgA alkalin fosfatase (1 : 3000) sebanyak 150 µl ditambahkan dalam plate dan diinkubasikan 1 jam. Setelah 3X pencucian, substrat paranitrofenil fosfat (1mg/ml) ditambahkan ke dalam plate sebanyak 150 µl/well. Plate diinkubasikan selama 15 - 30 menit pada suhu 37 °C. Hasil dapat divisualisasikan dengan timbulnya warna kuning, dan secara kuantitatif dapat dibaca pada *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm (Ausubel *et al.*, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon spesifik IgA serum mencit dengan perlakuan laktoferin susu kuda secara oral

Laktoferin yang diberikan sebanyak 1,0 atau 0,5 mg secara oral berpengaruh signifikan ($P < 0,05$) terhadap respon IgA serum, namun apabila diberikan hanya 0,1 mg memberikan respon IgA yang tidak signifikan atau sama dengan kontrol. Pemberiaan laktoferin dengan dosis 1,0 mg/hari memberikan respon IgA tertinggi pada hari ke 21, dan menurun pada hari ke 28. Respon IgA serum ini dapat dilihat pada Gambar 1.

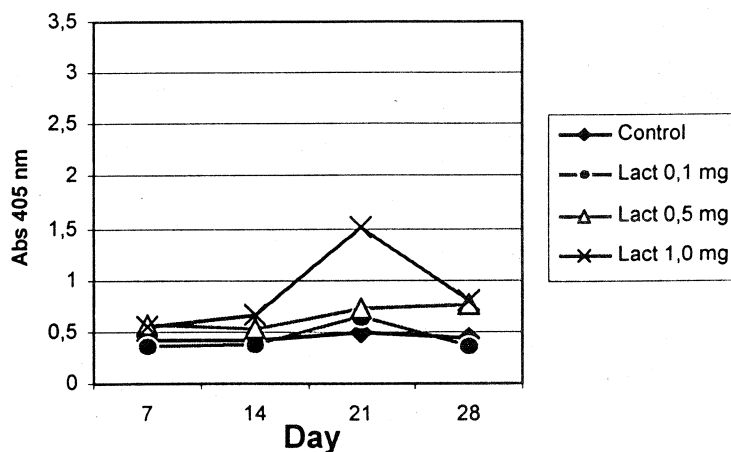


Figure 1. IgA respon in mice fed of horse milk lactoferrin orally

Respon spesifik IgG serum mencit dengan perlakuan laktoferin susu kuda secara oral

Mencit yang diberi laktoferin susu kuda selama 28 hari dengan konsentrasi 0,1; 0,5 dan 1,0 mg/ekor/hari, menunjukkan respon IgG serum seperti pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2, terlihat laktoferin yang diberikan sebanyak 0,1 mg/ekor/hari menunjukkan adanya respon IgG yang tidak signifikan pada serum atau sama dengan yang tidak diberi laktoferin (kontrol). Pemberian laktoferin 0,5 atau 1,0 mg memberikan respon IgG serum yang signifikan ($P < 0,05$).

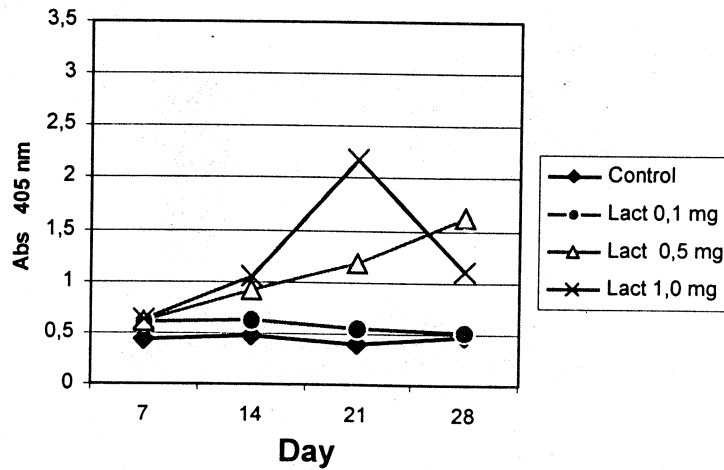


Figure 2. IgG respon in mice fed horse milk lactoferrin orally

Pemberian laktoferin 0,5 mg menunjukkan kecenderungan respon IgG serum yang meningkat dari perlakuan 7 hari sampai 28 hari ($P < 0,05$), sedangkan perlakuan 1,0 mg laktoferin menunjukkan respon paling tinggi pada hari ke 21 dan menurun pada hari ke 28.

Respon spesifik sub kelas IgG serum mencit perlakuan laktoferin susu kuda secara oral

Mencit yang diberi laktoferin susu kuda dengan dosis 0,5 mg/hari (Gambar 3) terlihat adanya respon yang tinggi pada subkelas IgG1 dan IgG2b ($P < 0,05$), sementara itu tidak menunjukkan adanya respon pada IgG2a. Respon IgG1 atau IgG2b pada hari ke 28 $>$ 21 $>$ 14 atau 7 ($P < 0,05$).

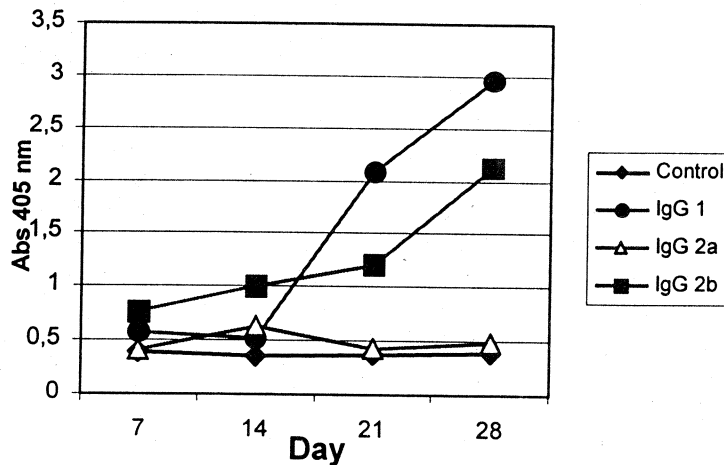


Figure 3. Subclass IgG respon in mice fed horse milk lactoferrin orally

Laktoferin susu kuda yang diberikan secara oral dapat menginduksi timbulnya respon spesifik subklas IgG1 dan IgG2b yang merupakan respon imun tipe Th2 (sel T helper 2) atau menginduksi respon imun humoral. Hasil ini sama dengan laktoferin ASI yang diberikan secara oral pada mencit, juga menginduksi respon subklas IgG1 dan IgG2b (Yuki *et al*, 1998). Peran IgG1 penting sebagai mediator dalam reaksi kaskade pada komplemen yang dapat menyebabkan perforasi membran sel *host* (Roitt and Male, 1993). Respon IgG1 menunjukkan bahwa laktoferin yang diberikan secara oral merupakan protein yang imunogenik.

Respon spesifik IgA dan IgG serum mencit perlakuan laktoferin susu kuda secara intraperitoneal

Laktoferin susu kuda yang sangat imunogenik apabila diberikan secara oral, didukung pula oleh hasil imunisasi secara intraperitoneal dengan adjuvant komplet dan tidak komplet, menunjukkan respon IgG serum yang tinggi dibanding kontrol. Respon IgG dan IgA serum hasil imunisasi secara intraperitoneal dapat dilihat pada Gambar 4.

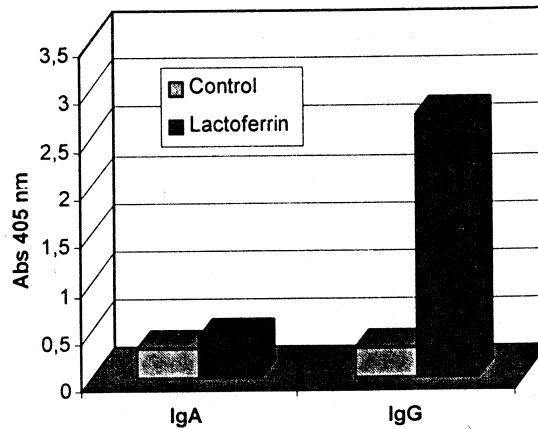


Figure 4. IgA and IgG responses in mice immunized horse milk lactoferrin intraperitoneally

Berdasarkan hasil penelitian, laktoferin susu kuda yang diberikan secara oral setiap hari dengan dosis 0,5 dan 1,0 mg dapat menyebabkan meningkatnya biosintesis IgA dan IgG spesifik dalam serum mencit. Penelitian terdahulu dilaporkan laktoferin susu sapi yang jenuh besi relatif resisten terhadap proteolisis *in vivo* (Spik *et al.*, 1982) dan *in vitro* (Brines and Brock, 1983) dalam Debbabi *et al.* (1998). Laktoferin susu kuda dalam bentuk apo-laktoferin ataupun jenuh besi, konformasi *lobe N* dan *lobe C* selalu tertutup (Sharma *et al.*, 1999), sehingga dimungkinkan mempunyai resistensi yang sama terhadap proteolisis. Disamping itu hasil degradasi laktoferin oleh pepsin menghasilkan peptida pendek (laktoferisin) yang stabil dan dapat berikatan dengan sel-sel epithelial usus halus (Wang *et al.*, 2000). Laktoferisin tersebut mengandung sekuen asam amino yang terlibat untuk pengikatan reseptor yang terletak pada terminal N (Rochard *et al.*, 1995). Transport bentuk imunogenik laktoferin dapat terjadi pada dua sisi, yaitu melalui sel-sel M dan atau enterosit. Adanya reseptor laktoferin pada sel epithelial intestinal mencit telah dilaporkan dapat mengikat laktoferin mencit maupun laktoferin susu sapi. (Hu *et al.*, 1988 dalam Debbabi *et al.*, 1998). Ikatan imunogen-mukosal misalnya sejenis protein lektin dengan epitelium intestinal merupakan prasyarat terjadinya respon imun (De Aizpurua and Russell-Jones 1988 dalam Debbabi *et al.*, 1998). Kemungkinan yang akan muncul apabila protein diabsorpsi dalam bentuk antigen utuh, yaitu berkembangnya respon antibodi sekretori IgA lokal dalam intestin, respon imun sistemik atau berkembangnya respon imun toleran (Mowat, 1987). Fraksi kecil (10 %) laktoferin ASI yang imunogenik ditransport melalui sel-sel epithelial intestinal HT-20 (Mikogami *et al.*, 1994 dalam Debbabi *et al.*, 1998). Pada umumnya protein yang diberikan secara oral dipecah menjadi peptida-peptida kecil oleh enzim pencernaan dan kemudian diabsorpsi melalui epitelium. Namun laktoferin diabsorpsi dengan proses yang berbeda yang melibatkan reseptor spesifik. Disamping itu sel-sel imunokompeten seperti limfosit dan makrofag telah dilaporkan mengekspresikan reseptor laktoferin. Ikatan laktoferin dengan reseptor spesifik yang diekspresikan oleh sel-sel epithelial dan limfosit/makrofag mungkin dapat meningkatkan imunogenisitas laktoferin. Kemungkinan lain pemberian laktoferin secara oral dapat secara langsung

berikatan dengan sel epithelial melalui reseptornya yang menyebabkan absorpsi molekul utuh tanpa fragmentasi oleh pencernaan. Hal tersebut menyebabkan molekul protein dapat dipresentasikan pada sistem imun *host*, yang hasilnya merupakan respon imun yang kuat karena induksi laktoferin. Akhirnya sinyal melalui reseptor laktoferin dapat menghambat proses anergi sel T atau apoptosis yang dapat memelihara respon imun spesifik dalam *setting* toleransi oral. Induksi laktoferin yang lebih mengarah pada respon tipe Th-2 (*T helper-2*), akan mencegah berkembangnya *systemic unresponsiveness* (respon imun toleran) (Yuki *et al.*, 1998).

Laktoferin susu kuda pada penelitian ini dapat mempromosi respon humoral spesifik dengan dua *route* pemberian (oral dan intraperitoneal). Pemberian laktoferin susu kuda secara oral dapat menginduksi respon IgA dan IgG anti laktoferin dalam serum mencit, tetapi pemberian laktoferin secara intraperitoneal hanya menginduksi respon IgG serum saja. *Route* dan jumlah pemberian antigen serta sifat alami protein merupakan faktor kritis untuk mendapatkan respon lokal dan periperal serta besarnya modulasi respon imun. Adanya respon antibodi spesifik IgG di dalam serum mencit yang diberi laktoferin susu sapi secara oral telah dilaporkan (Debbabi *et al.*, 1998), dan juga pada bayi dan tikus (Host *et al.*, 1992; Enomoto *et al.*, 1993 dalam Debbabi *et al.*, 1998). Adanya stimulasi sistemik setelah pemberian laktoferin secara oral, menunjukkan bahwa fraksi antigenik laktoferin yang terabsorpsi dapat mencapai sirkulasi sistemik (Debbabi *et al.*, 1998). Dengan demikian respon imun yang ditimbulkan oleh pemberian laktoferin secara oral dapat melalui mekanisme *direct lactoferrin antigen circulation*. (Debbabi *et al.*, 1998). Dalam jaringan limfoid mukosal (*Peyer's patches*) dan jaringan limfoid periperal (*lymph nodes, spleen*), limfosit yang membawa reseptor sel B dan T dengan spesifitasnya akan mengikat antigen bebas atau fragmen-fragmen yang dipresentasikan oleh makrofag. Pada kondisi tersebut limfosit menjadi teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi sel-sel *mature* (dewasa) anti-laktoferin : sel *T helper* dan sel B bekerja sama mempromosi respon antibodi. Antibodi spesifik anti-laktoferin dan sel plasmanya (limfosit B *mature*) meninggalkan organ limfoid dan masuk pembuluh darah (Debbabi *et al.*, 1998).

KESIMPULAN

Laktoferin susu kuda yang diberikan secara oral sebanyak 0,5 atau 1,0 mg/hari selama 28 hari tanpa adjuvant, dapat menginduksi respon spesifik IgA, IgG, subkelas IgG1 dan IgG2b dalam serum mencit. Laktoferin susu kuda yang diberikan secara intraperitoneal hanya akan menginduksi respon spesifik IgG serum saja. Dengan demikian laktoferin susu kuda merupakan protein yang sangat imunogenik, dapat berperan sebagai imunomodulator dalam respon imun humoral.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Proyek Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi : Penelitian Hibah Bersaing XII/1 Tahun 2004, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Ditjen Dikti, Depdiknas, atas bantuan dana penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, 1995. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Debbabi, H., M. Dubbary, M. Rautureau and D. Tome 1998. Bovine Lactoferrin Induce both Mucosal and Systemic Immune Response in Mice. Journal of Dairy Research. 65 : 283-293.
- Kuwata, H., K. Yamauchi, S. Teraguchi, Y. Ushida, Y. Shimokawa, T. Toida and H. Hayasawa, 2001. Functional Fragmen of Ingested Lactoferrin Are Resistant to Proteolytic Degradation in the Gastrointestinal Tract of Adult Rats. J. Nutr. 131 : 2121-2127.
- Mowat, M. A., 1987. The Regulation of Immune Responses to Dietary Protein Antigens. Immunology Today 8(3) : 93-98.
- Reeves, P. G., F.H. Neilsen and G.C. Fahey, 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.
- Rochard, E. E., A. Roseanu, D. Legrand, M. Trif, V. Salmon, C. Motas, J. Montreuil and G. Spik, 1995. Lactoferrin-Lipopolysaccharide Interaction : Involvement of the 28-34 Loop Region of Human Lactoferrin in the High-Affinity Binding to *Escherichia coli* 055B5 Lipopolysaccharide. Biochem. J. 312 : 839-845.
- Roitt, I., J. Brostoff, D. Male, 1993. Immunology. Mosby-Year Book Europe Ltd. London.
- Schanbacher, F. L., R.E. Goodman, and R.S. Talhouk, 1993. Bovine Mammary Lactoferrin : Implications from Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Sequence and Regulation Contrary to Other Milk Proteins. J Dairy Sci. 76(12) : 3812-3831.
- Sharma, A.K. and T.P. Singh. <http://pdb.weizmann.ac.il/scop/pdb.cgi?sid=d1qjma2> May 2002.
- Sharma, A.K., K. R. Rajashankar, M.P. Yadav and T.P. Singh, 1999. Structure of Mare Apolactoferrin : The N and C Lobes are in the Closed Form. Acta Cryst. D 55 : 1152-1157.
- Steijns, J.M. and A.C.M. van Hooijdonk, 2000. Occurrence, Structure, Biochemical Properties and Technological Characteristics of Lactoferrin. British Journal of Nutrition 84, Suppl. 1, S11-S17.
- Wang, W.P., M. Igo, J. Sato, K. Sekine, I. Adachi and Hiroyuki, 2000. Activation of Intestinal Mucosal Immunity in Tumor-bearing Mice by Lactoferrin. Jpn. J. Cancer Res. 91 : 1022-1027.
- Wei, Z., T. Nishimura, and S. Yoshida, 2000. Presence of Glycan at a Potential N-Glycosylation Site, Asn-281, of Bovine Lactoferrin. J Dairy Sci. 83(4) : 683-689.
- Yuki, Y., K. Fujihashi, M. Yamamoto, J.R. McGhee and H. Kiyono, 1998. Human Milk Proteins Including Secretory IgA Fail to Elicit Tolerance after Feeding. International Immunology 10 (4).