

Efek Immunomodulator Kombinasi Susu Probiotik dan Ekstrak Daun Jambu Biji

Isnaeni, Sugiyartono, Idha Kusumawati, Muh. Agus Syamsur Rijal

ABSTRACT : *This research studied the potential and action mechanism of probiotic milk-guava leaf extract combination as an immunomodulator using mice as an experimental animal. The mouse were given the combination of probiotic milk-guava leaf extract for 7 days, then the levels of TNF- α in serum and lymphocytes proliferation were measured. The results showed that the extract of guava leaf can increase levels of TNF- α in serum and the number of lymphoblast, either in single preparation or in combination with probiotic milk. However, administration of probiotic milk cannot improve the TNF- α in serum or increase the number of lymphoblast. It can be concluded that the immunomodulatory effects of the probiotics-milk-guava leaf extract combination was caused by the substances in the extract of guava leaf rather than by the probiotic milk.*

Keywords: *probiotic milk, guava leaf extract, immunomodulator*

ABSTRAK: Konsorsium mikroba probiotik yang dikembangkan dalam bentuk sediaan susu probiotik telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas, antara lain sebagai immunomodulator dan antimikroba. Jus buah jambu biji telah digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk membantu meningkatkan jumlah trombosit penderita demam berdarah *dengue*. Kombinasi susu probiotik-ekstrak daun jambu biji telah terbukti mempunyai efek anti bakteri penyebab diare, namun mekanisme kerjanya belum diketahui. Dalam penelitian ini dilakukan kajian potensi dan mekanisme kerja kombinasi susu probiotik-ekstrak daun jambu biji sebagai *immunomodulator*. Sejumlah mencit diberi perlakuan kombinasi susu probiotik-ekstrak daun jambu biji selama 7 hari, kemudian diukur kadar TNF- α dalam serum dan kecepatan proliferasi limfositnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan kadar TNF- α dalam serum dan dapat meningkatkan jumlah limfoblast, baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasinya dengan susu probiotik. Pemberian susu probiotik saja tidak dapat meningkatkan TNF- α dalam serum ataupun meningkatkan jumlah limfoblast. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa efek immunomodulator kombinasi susu probiotik-ekstrak daun jambu biji lebih disebabkan oleh kandungan zat-zat berkhasiat dalam ekstrak daun jambu biji dari pada oleh susu probiotik.

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,
Surabaya

Korespondensi:

Isnaeni
email: isna.yudi@gmail.com

Kata kunci: *probiotik, Lactobacillus acidophilus, jambu biji, Psidium guajava, immunomodulator.*

PENDAHULUAN

Probiotik telah digunakan secara luas sebagai suplemen untuk terapi penyakit saluran cerna. Istilah probiotik berasal dari bahasa Yunani yang artinya "for life", istilah ini digunakan pertama kali oleh Lilly dan Stillwell untuk menggambarkan "substansi yang dikeluarkan oleh suatu mikroorganisme dan dapat menstimulasi pertumbuhan organisme lainnya". Sifat imunologik probiotik telah menarik perhatian banyak peneliti.

Mekanisme modulasi probiotik terjadi melalui pelepasan *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) yang dikenali oleh reseptor pengenalan, seperti *Toll-like receptors* (TLRs) pada *dendrit cell* yang terdapat pada epitel atau lamina propria. Bakteri probiotik akan melepaskan *sitokin* (seperti misalnya IL-10) yang diketahui dapat menginduksi sel T dan sel B dengan pola tolerogenik *noninflammatory* (1). Respon imunomodulasi terjadi dalam beberapa tahap, yaitu pertama, meningkatkan proses pematangan sel-sel yang berperan dalam respon imun, kedua, meningkatkan proses proliferasi sel, terutama sel-sel makrofag dan limfosit, ketiga, mengaktifkan komplemen, sehingga eliminasi antigen dalam sel menjadi lebih efektif (1)

Susu fermentasi Lactobacillus acidophilus telah dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella thypimurium* dan beberapa bakteri lain penyebab diare (2-4). Kombinasi susu probiotik dengan ekstrak daun jambu biji telah terbukti mempunyai efek antibakteri penyebab diare (4-6). *Daun jambu biji* mengandung banyak komponen, antara lain tanin, minyak atsiri, flavonoid, asam ursolat, asam oleanolat, karoten, vitamin B1, B2, B3, B6, dan vitamin C serta resin, selain senyawa aktif avicularin dan guaijaverin (7, 8). Aktifitas imunomodulator ekstrak daun jambu biji terkait dengan NFκB, yaitu faktor transkripsi yang mengatur ekspresi dari berbagai gen yang terlibat pada apoptosis dan imunomodulator (9).

Mekanisme aksi yang berbeda antara ekstrak daun jambu biji dan probiotik sebagai imunomodulator memberikan peluang terjadinya potensiasi. Dengan latar belakang pemikiran sebagaimana yang diuraikan tersebut,

maka telah dilakukan penelitian tentang efek imunomodulator kombinasi susu probiotik-ekstrak daun jambu biji.

METODE PENELITIAN

Proses Fermentasi

Fermentasi susu dilakukan menurut Rahman dkk. (10). Susu sapi murni (pH 6,43±0,02; viskositas 0,4±0,0 dpas) yang telah dipasteurisasi, ditambah 2% suspensi inokulum *Lactobacillus acidophilus* dalam media deMann Rogosa and Sharpe (MRS) broth berumur 24 jam. *Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari hasil isolasi yang dilakukan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan dibiakkan dalam media MRS broth. Setelah dilakukan pendiaman pada suhu kamar selama 24 jam, dilakukan pengambilan sampel pada jam ke 0, 3, 6, 9, 12, 18, dan 24.

Penetapan pH

Sampel diambil secukupnya, pH diukur menggunakan pH-meter SCHOTT Glass Mainz tipe CG 842, dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Penetapan Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan *Rotational Viscometer*. Rotor dipasang pada alat kemudian dicelupkan ke dalam 300 ml sampel yang ditempatkan dalam wadah gelas. Rotor berputar dan jarum bergerak sampai didapatkan nilai viskositas produk. Pembacaan dilakukan saat jarum tidak bergerak lagi selama 3 menit.

Penetapan Angka Lempeng Total (ALT)

Viabilitas bakteri dalam sampel diukur dengan cara menetapkan ALT. Sebanyak 1 mL sampel diencerkan 10 kali dengan dapar fosfat pH 7,2, diambil 1 mL, dimasukkan ke dalam cawan petri steril, ditambah media MRS agar suhu 45-50°C, dihomogenkan, didiamkan hingga memadat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 42 jam. Jumlah koloni pada cawan petri yang mengandung 30-300 cfu dihitung dan dikalikan pengencerannya.

Perlakuan hewan coba

Setelah diaklimatisasi selama 7 hari, mencit dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 8 ekor.

Perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

Kelompok 1 : diberikan aqua destilata

Kelompok 2 : diberikan susu segar

Kelompok 3 : diberikan susu probiotik

Kelompok 4 : diberikan ekstrak daun jambu biji

Kelompok 5 : diberikan kombinasi susu probiotik-
ekstrak daun jambu biji

Masing-masing mencit mendapat perlakuan selama 7 hari. Hari ke-delapan, mencit dikorbankan dengan pembusuan menggunakan eter. Darah diambil melalui jantung, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan 1-2 jam sampai terjadi pemisahan serum, kemudian disentrifugasi 5 menit, serum diambil, dan siap dianalisis. Jika tidak segera dianalisis, serum disimpan dalam *refrigerator*. Limfa diambil, kemudian dimasukkan ke dalam dapar formalin untuk dibuat sediaan histologis.

Penetapan kadar TNF- α dalam serum

Metode yang digunakan untuk mengukur kadar TNF- α berdasarkan pada metode *Double Sandwich ELISA (Enzyme Linked - Immuno - Sorbent Assay)* sebagaimana yang dilakukan oleh para peneliti lain (11). Prinsip pengukuran dengan metode ini adalah adanya reaksi antara Ab berlabel dan Ag sampel dengan Ab yang telah dilekatkan pada sumuran mikrotiter Kit ELISA.

Selama inkubasi pertama, antigen TNF- α dari serum pada satu sisi berikatan dengan antibodi monoklonal spesifik terhadap TNF- α yang melekat pada dinding sumuran, sedangkan sisi lainnya berikatan dengan antibodi terikat biotin. Setelah pencucian kelebihan biotin, Streptavidin-Peroksidase (enzim) ditambahkan. Setelah inkubasi kedua dan pencucian enzim yang tidak terikat,

ditambahkan pewarna kromogen. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan konsentrasi TNF- α . Proses dihentikan dengan penambahan asam atau *stop solution* dan serapan diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Adanya perbedaan bermakna antara sampel dengan kontrol dianalisis secara statistik menggunakan Anava.

Pengujian proliferasi limfosit

Respon proliferasi limfosit dilihat berdasarkan respon makroskopi berdasarkan perubahan berat limfa dan respon mikroskopi berdasarkan jumlah limfoblas dalam 200 limfosit. Setelah limfa diangkat dan dibersihkan dari lemak yang menempel, kemudian dikeringkan dan ditimbang. Kemudian isi limfa dikeluarkan dengan spuit dan diusapkan pada kaca obyek dan diberi pewarnaan dengan Giemsa-Wright, kemudian dihitung jumlah limfoblas relatif terhadap limfosit.

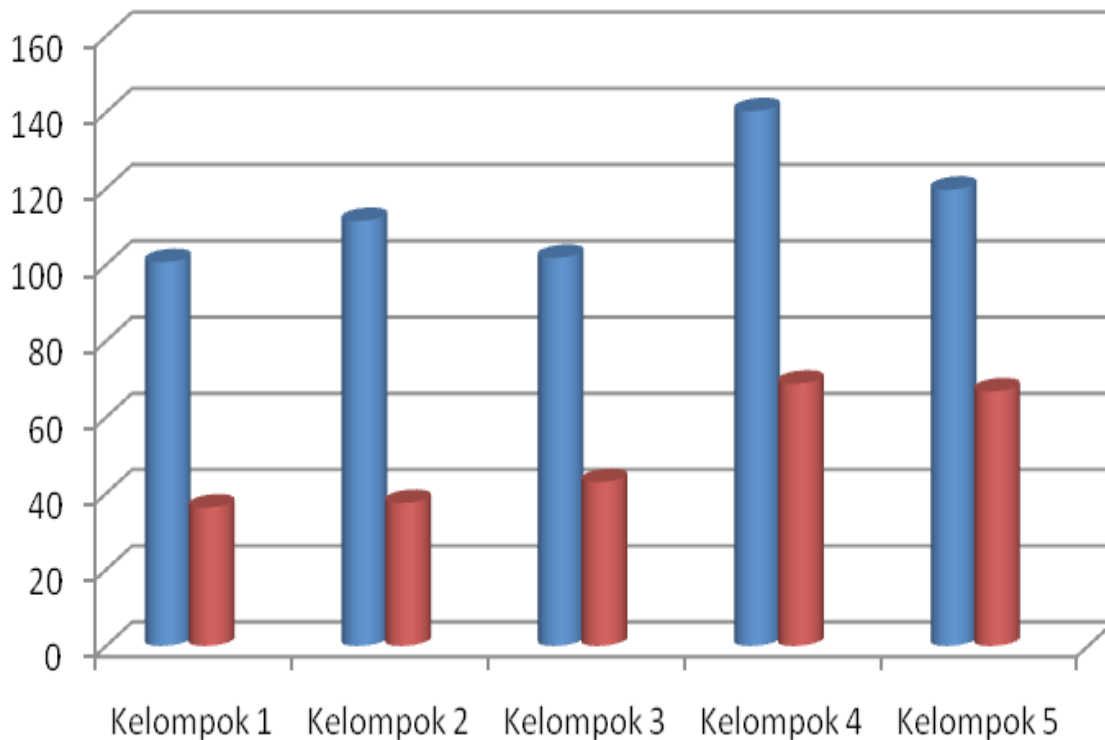
HASIL DAN PEMBAHASAN

pH, viskositas dan viabilitas bakteri dalam susu probiotik dan kombinasinya dengan ekstrak jambu biji

Hasil fermentasi susu dengan *Lactobacillus acidophilus* menunjukkan pH yang lebih rendah dibandingkan susu segar. Hal ini dikarenakan terbentuknya asam laktat dan asam lain sebagai hasil fermentasi susu oleh *Lactobacillus acidophilus*. Penambahan ekstrak daun jambu biji tidak menyebabkan perubahan pH, karena ekstrak air jambu biji juga memiliki pH rendah yang sama seperti susu probiotik (Tabel 1).

Tabel 1. pH, viskositas dan viabilitas bakteri dalam susu sapi, susu probiotik dan kombinasinya dengan infus daun jambu biji

Sampel	pH rata2	Viskositas	Viabilitas
Susu sapi	6,43 \pm 0,02	70,8	0
Susu probiotik	4,15 \pm 0,00	255,7	>1010
Kombinasi susu probiotik dan ekstrak daun jambu biji	4,26 \pm 0,00	75,3	>1010
Ekstrak daun jambu biji	4,10 \pm 0,00	-	0



Gambar 1. Kadar TNF- α (■) dan jumlah limfoblast (■)

Bakteri asam laktat memproduksi enzim laktase yang mengkatalisis perubahan laktosa menjadi asam laktat. Penurunan pH disebabkan adanya akumulasi asam hasil aktivitas mikroba yang menyebabkan terjadinya perubahan misel, sehingga akan terjadi penggumpalan (12). Hal ini yang menyebabkan viskositas susu probiotik jauh lebih tinggi dibandingkan susu segar (Tabel 1).

Penggunaan sediaan probiotik mensyaratkan jumlah koloni hidup dalam sediaan saat dikonsumsi, sehingga memenuhi persyaratan aktivitas ketika sampai pada sel target. Dalam bentuk senyawa tunggal, baik asam laktat maupun asam asetat sering digunakan sebagai preservatif. Proses fermentasi dapat memberikan energi untuk pertumbuhan mikroba serta didukung adanya nutrisi lain di dalam susu. Akibatnya, durasi proses fermentasi juga akan mempengaruhi jumlah mikroba yang terbentuk. Bakteri asam laktat menghasilkan sejumlah senyawa antimikroba yang terdiri dari asam laktat, H₂O₂, diasetil dan bakteriosin,

yaitu senyawa yang disintesis pada ribosom oleh bakteri, yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain (13). Dari Tabel 1 tampak bahwa viabilitas bakteri dalam susu probiotik maupun dalam kombinasi susu probiotik dengan ekstrak daun jambu biji cukup terjaga.

Bakteri asam laktat yang memproduksi bakteriosin bersifat sebagai bakterisidal, terbukti sangat bermanfaat untuk mengembangkan keamanan produk fermentasi pangan. Sampai saat ini baru ditemukan satu bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat, yaitu nisin yang banyak digunakan pada produk pangan. *Lactobacillus acidophilus* dapat memproduksi bakteriosin yakni Acido-philucin A. Efek antimikroba *Lactobacillus acidophilus* dapat disebabkan oleh asam-asam organik dan aktivitas bakteriosin yang dihasilkan serta adanya kompetisi mikroba dengan bakteri lain.

Kadar TNF- α dalam serum dan jumlah limfoblast

Berdasarkan hasil pengukuran TNF α dan jumlah limfoblast, tampak bahwa pemberian

ekstrak daun jambu biji memberikan efek yang cukup bermakna terhadap kedua parameter ini, namun pemberian susu probiotik tidak memberikan pengaruh yang bermakna (Gambar 1). Dari Gambar 1 dan Tabel 1 tampak bahwa kadar TNF α dalam serum mencit yang diberi susu probiotik (kelompok 3) tidak berbeda nyata dengan mencit yang diberi aqua destilata (kelompok 1) ataupun yang diberi susu segar (kelompok 2). Akan tetapi, pemberian ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan kadar TNF α di dalam serum, baik yang diberikan tanpa campuran (kelompok 4) ataupun yang diberikan dalam bentuk kombinasi dengan susu probiotik (kelompok 5).

Pengaruh pemberian perlakuan terhadap kadar limfoblast juga sama. Dari Gambar 1 dan Tabel 2 tampak bahwa jumlah limfoblast mencit yang diberi susu probiotik (kelompok 3) tidak berbeda nyata dengan mencit yang diberi aqua destilata (kelompok 1) ataupun yang diberi susu segar (kelompok 2). Akan tetapi, pemberian ekstrak daun jambu biji dapat meningkatkan jumlah limfoblast, baik yang diberikan tanpa campuran (kelompok 4) ataupun yang diberikan dalam bentuk kombinasi dengan susu probiotik (kelompok 5).

Tabel 1. Kadar TNF α dalam serum mencit perlakuan

N	Kel 1	Kel 2	Kel 3	Kel 4	Kel 5
Ulangan	Aqua dest	Susu segar	Susu Probiotik	Ekstrak	Kombinasi
1	4.008811	3.942731	3.986784	6.563877	7.136564
2	3.414097	4.427313	4.07489	7.136564	7.202643
3	3.920705	3.39207	4.427313	6.960352	5.726872
4	3.414097	3.259912	4.713656		
5	3.414097				
Rata-rata	3.634361	3.755507	4.300661	6.886931	6.688693
SD	0.303214	0.53668	0.334712	0.293318	0.833616
KV	8.34297	14.29048	7.782813	4.259058	12.46307

Tabel 2. Jumlah limfoblast pada mencit perlakuan

N	Kel 1	Kel 2	Kel 3	Kel 4	Kel 5
Ulangan	Aqua dest	Susu segar	Susu Probiotik	Ekstrak	Kombinasi
1	135	117	101	164	114
2	113	117	95	163	117
3	111	126	117	123	126
4	66	104	95	106	117
5	107	95	85	140	134
6	110	110	118	146	110
Rata-rata	107,00	111.50	101.83	140.33	119.67
SD	22.47	10.96	13.18	22.73	8.77
KV	21.00622	9.836893	12.94473831	16.20363	7.336013

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kombinasi susu probiotik (*Lactobacillus acidophilus*)-ekstrak daun jambu memiliki efek imunomodulator, yang ditunjukkan dengan meningkatkan kadar TNF α dalam serum mencit percobaan dan kecepatan proliferasi limfosit. Efek yang ditimbulkan lebih disebabkan oleh senyawa-senyawa berkhasiat yang terdapat dalam ekstrak daun jambu biji dari pada oleh susu probiotik.

Penambahan ekstrak daun jambu biji ke dalam susu probiotik dalam penelitian ini tidak mengganggu viabilitas bakteri dalam susu probiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui anggaran BOPTN tahun 2014/2015

DAFTAR PUSTAKA

1. Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(2): 300-310.
2. Antono A, Pamuji, DB, Sugiyartono, Isnaeni. Daya hambat susu hasil fermentasi *Lactobacillus acidophilus* terhadap *Salmonella thypimurium*. *Pharmascientia* 2012; 1(5): 1-6.
3. Wahyuni R, Isnaeni, Darmawati, A. Prospektif kombinasi susu probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium bifidum* sebagai sediaan anti diare. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2013; 2(1): 42-47.
4. Nelintong N, Isnaeni, Nasution, NE. Aktivitas antibakteri susu probiotik *Lactobacilli* terhadap bakteri penyebab diare (*Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium*, *Vibrio cholera*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian* 2015; 2(1): 25-30.
5. Fadiah R, Izzah Z, Isnaeni, Sugijanto NEN. Aktivitas antibakteri kombinasi probiotik (*Bifidobacterium bifidum* dan *Lactobacillus acidophilus*) dengan infus daun jambu biji (*Psidium guajava*). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* 2014; 3(1): 16-22.
6. Kekkonen RA, Vasankari TJ, Vuorimaa T, Haahtela T, Julkunen I, Korpela R. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2007; 17(4): 352-363.
7. Fu H, Luo Y, Zhang D. Studies on chemical constituents of leaves of *Psidium guajava*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2009; 34(5): 577-579.
8. Wang F, Chen Y, Zhang Y, Deng G, Zou Z, Li A. Chemical Components and Bioactivities of *Psidium guajava*. *International Journal of Food Nutrition and Safety* 2014; 5(2): 98-114.
9. Ravi K and Divyashree P. *Psidium guajava*: A review on its potential as an adjunct in treating periodontal disease. *Pharmacogn Rev* 2014; 8(16): 96-100.
10. Rahman A, Fardiaz S, Suliantri WP, Nurwitri CC. 1992. *Teknologi Fermentasi Susu*. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor; Bogor.
11. Mahapatra SK, Chakraborty SP, Roy S. Immunomodulatory role of *Ocimum gratissimum* and ascorbic acid against nicotine induced murine peritoneal macrophages in vitro. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 734319.
12. Widyastuti Y, Rohmatussolihat, Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences* 2014; 5: 435-442.
13. Yang S, Lin C, Sung CT, Fang J. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol* 2014; 5: 241.