

# ABILITIES OF *Lactobacillus plantarum* STRAIN IS-10506 AND IS-20506 IN INHIBITING NFkB ACTIVATION, DOWNREGULATING TNF RECEPTOR-1 (TNF-R1) AND APOPTOSIS IN EPITHELIAL BRUSH BORDER OF *Rattus novergicus* INDUCED LPS

## KEMAMPUAN DARI *Lactobacillus plantarum* GALUR IS-10506 DAN IS-20506 DALAM MENGHAMBAT AKTIVASI NFkB, MEREGULASI TURUN TNF-RECEPTOR 1 (TNF-R1) DAN OPOPTOSIS PADA BRUSH SEL EPITEL BORDER *Rattus novergicus* YANG DIINDUKSI LPS

Titis Sari Kusuma\*, Wibi Riawan\*\*, I Gusti Made Reza Gunadi Ranuh\*\*\*, Ingrid S. Surono\*\*\*\*

\* Jurusan Ilmu Gizi Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\* Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*\* Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

\*\*\*\* SEAMEO TROPMED, Universitas Indonesia

### ABSTRAK

Probiotic bacteria have a beneficial effect on diarrhea. In this study, we have examined effect of *Lactobacillus plantarum* Strain IS-10506 (LIS-10506) and IS-20506 (LIS-20506) on inhibition of NFkB activation, downregulation TNF Receptor-1 (TNF-R1) and Apoptosis in Epithelial Brush Border of *Rattus novergicus* induced with LPS. On the first day, LPS was induced to *Rattus novergicus* per oral. At the 3<sup>rd</sup> day, *Lactobacillus plantarum* Strain IS-10506 and LIS20506 separately were supplemented for 7 days (the 3<sup>rd</sup> day up to the 9<sup>th</sup> day). Rat was sacrificed after anaesthetizing with ether to assess NFkB activation, TNFR1 and apoptosis. Result showed the decreases of activation NFkB in LIS-10506 group as well as in LIS-20506 group, significantly different, in NFkB activation at group with only LPS (average 14.33+4.509) compared to group with LIS-10506 induction (average 2.00+1.732) and LIS-20506 induction (average 1.33+1.528), at  $p < 0.000$ . Downregulation of TNF-R1 was significant at LPS group compared to LIS-10506 induction as well as LIS-20506 induction. The index of apoptosis showed significant of degradation ( $p < 0.000$ ) after induced by LIS, where LPS group (14.67+2.517), LIS-10506 induction (6.33+2.309) and LIS-20506 induction (6.00+3.000). As a conclusion, supplementation of LIS-10506 and LIS-20506 separately will inhibit the NFkB activation, and although the mechanism was not sure, what by significant degrade the expression TNF-R1 (as ekuivalen of activity TNF $\alpha$ ), and the mentioned give the implication that happened by the degradation of occurrence apoptosis at cell of epitel bush border intestine.

**Keywords** : Probiotic, NFkB activation, TNF-R1, and apoptosis

### PENDAHULUAN

Peran penting probiotik pada masalah diare atau diare yang disebabkan karena pemakaian antibiotika oral telah diketahui secara luas. Beberapa strain probiotik, seperti *Lactobacillus gg*, *L. reuteri*, *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacteria sp*, dan *Lactobacillus casei* strain DN-114 001 telah diketahui secara signifikan berperan penting dalam mengatasi masalah diare pada anak (1-8). Beberapa penelitian biomolekuler mengenai probiotik menunjukkan kemampuan probiotik dalam menginduksi produksi sitokin IL-12, IL-18 dan IFN-g pada sel-sel mononuklear darah perifer manusia (9-10) dan sitokin IL-12, TNF-a dan IFN-g pada sel-sel limpa tikus (11). Walaupun banyak sitokin memberikan efek

independent, proses inflamasi selalu saling berhubungan, seperti misalnya pada sindroma sepsis, endotoksin yang diproduksi bakteri dan produk toksis lainnya akan merangsang produksi TNF $\alpha$  dan IL-1. Oleh sel, sitokin-sitokin ini berperan sebagai mediator timbulnya reaksi dari hospes yang terkena infeksi dan akan merangsang makrofag untuk mensekresi sitokin, demikian juga sel-sel yang lain akan dirangsang untuk mensekresi berbagai macam sitokin, seperti misalnya IL-6 dan IL-8. Keadaan di atas bukan saja terjadi pada keadaan infeksi, namun juga terjadi pada proses patobiologi lain, seperti pada asma dan rematoid arthritis. Stimulus untuk memproduksi sitokin, tergantung dari karakteristik sel dan tipe jaringan. Walaupun telah diketahui bahwa *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFkB) berfungsi sebagai activator proses transkripsi, namun dalam proses transkripsi pada produksi sitokin belum sepenuhnya terungkap (12).

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No. 1, April 2008 Korespondensi: Titis Sari Kusuma; Program Studi Ilmu Gizi Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Telp: (0341) 569117

*Nuclear Factor Kappa Beta* (NFkB) diketahui sebagai factor transkripsi yang memainkan peran penting dalam menginduksi regulasi berbagai gen dalam respon inflamasi dan proliferasi sel. Pada keadaan normal *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFkB) berada dalam keadaan *inactive* yang berikatan dengan *inhibitor* kB (IkB) dan berada dalam sitoplasma sel.

*Nuclear Factor Kappa Beta* (NFkB) dapat diaktivasi oleh berbagai stimuli, sitokine, ROS, LPS, ox-LDL dan COX yang akan mengakibatkan pelepasan ikatan IkB sehingga NFkB masuk dalam inti sel dan meregulasi berbagai mediator inflamasi seperti TNF $\alpha$ (13), secara umum sitokine tidak disimpan didalam intaraseluler dan sekresinya sangat tergantung dari sintesis protein baru, yang diproduksi oleh adanya proses transkripsi gen sitokine karena adanya stimulus inflamasi (12; 14). TNF $\alpha$  disintesis sebagai transmembran protein non glikosilasi 26kDa oleh macrofag/monosit, sel endothel, neutrofil dan sel otot polos. *Soluble* TNF $\alpha$  berfungsi sebagai mediator inflamasi endogen dan mengatur banyak respon seluler termasuk aktivasi gen yang terlibat dalam inflamasi dan regulasi imun, proliferasi sel, respon antiviral, inhibisi pertumbuhan dan kematian sel (15).

Pada kejadian apoptosis, jelas kiranya bahwa salah satu jalur apoptosis adalah melibatkan protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam TNF Receptor family) beserta Fas ligand, yang disebut sebagai TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing Ligand*) yang membentuk jalur menuju apoptosis dan disebut sebagai *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway* (16). Jalur apoptosis melalui TNF $\alpha$  ini selanjutnya akan mengaktifasi cascade yang dimediasi oleh caspase-8 sampai akhirnya mengaktifasi caspase-3. Caspase 3 merupakan caspase efektor yang akan meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein kuncinya dan menginisiasi jalur caspase menjadi program kematian sel (17). Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum*

strain LIS10506 dan LIS 20506 terhadap aktivasi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NFkB) dan regulasi dari TNFR1 pada terhadap epitel usus *Rattus norvegicus* yang mendapatkan paparan LPS.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*). Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih *Rattus norvegicus* galur Wistar dengan kontrol dengan induksi LPS, dan kelompok perlakuan 1 dengan induksi LPS dengan suplementasi LIS10506 serta perlakuan 2 dengan induksi LPS dengan suplementasi LIS20506 yang diambil dari strain populasi yang sama.

### Bahan perlakuan

1. Probiotik oral *Lactobacillus plantarum* strain IS10506 dan IS20506 dalam bentuk *concentrated freeze-dried bacterial powder*.
2. *Lipopolysaccharide* (LPS) (2,5mg/kg) (*Escherichia coli* LPS serotype 055;B5, catalog number :L5418;Sigma Chemical co)

### Perlakuan Pada Tikus Putih

Setelah tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Winstar) dengan umur 3 bulan dan berat rata-rata 200gram, diaklimatisasi terhadap lingkungan kandang di laboratorium selama 1 minggu. Secara acak dikelompokkan menjadi 3 dengan masing-masing kelompok terdiri 5 tikus. Kelompok kontrol dengan induksi LPS 2,5mg/kg, pada hari pertama. Kelompok perlakuan 1 dengan induksi LPS dengan suplementasi LIS10506 dan Kelompok perlakuan 2 dengan induksi LPS dengan suplementasi LIS20506 adalah kelompok yang mendapatkan LPS pada hari pertama kemudian diikuti pemberian probiotik pada hari ke 3 sampai hari ke 9 (selama 7 hari berturut-turut) (tabel 1). Tikus dibunuh setelah mendapatkan pembiusan sebelumnya dengan ether pada hari ke 10 pada pagi hari untuk pengambilan jaringan.

Tabel 1. Pemberian perlakuan per oral (po)

Nama Bahan	Sasaran	Waktu	Pembuatan	Dosis
Lipopolysaccharide ( <i>Escherichia coli</i> LPS serotype 055;B5)	5 tikus	hari pertama		2.5mg/kg 250ml/tikus
Probiotik LIS strain 10506 (2,67x10 <sup>9</sup> CFU LIS/mg)	5 tikus	Setiap hari selama 7 hari (dimulai hari 3)	Probiotik LIS strain 10506 : 10 <sup>9</sup> CFU/cc	2,5 cc po
Probiotik LIS strain 20506 (2,67x10 <sup>9</sup> CFU LIS/mg)	5 tikus	Setiap hari selama 7 hari (dimulai hari 3)	Probiotik LIS strain 20506 : 10 <sup>9</sup> CFU/cc	2,5 cc po

### Pembuatan Parafin *Block* Jaringan

Jaringan usus dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan. Kemudian difiksasi pada formalin 10%. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6µm dengan rotary microtome. Dilakukan mounting pada gelas objek dengan gelatin 5%.

### Proses Deparafinisasi

Gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH<sub>2</sub>O selama 5 menit.

### Pengamatan immunohistokimia terhadap TNFRI dan NFκB

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit. Bloking perosida intraseluler menggunakan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Bloking menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan antipode primer, selama 60 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Inkubasi menggunakan anti rabbit HRP conjugated selama 40 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit. Cuci menggunakan dH<sub>2</sub>O, selama 5 menit. Counterstaining menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan tap water. Bilas menggunakan dH<sub>2</sub>O dan kering anginkan. Mounting menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass. Amati pada mikroskop cahaya.

### Pengamatan DNA terfragmentasi (TUNEL)

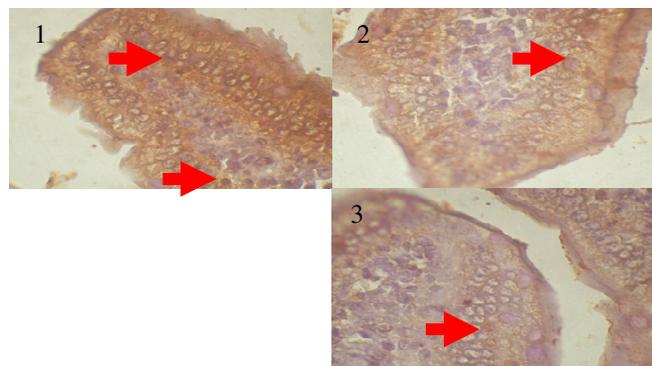
Slide dicuci menggunakan PBS pH 7,4 dan inkubasi menggunakan 20µg/mL proteinase-K selama 15 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi pada 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 15 menit dan selanjutnya cuci dengan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan TUNEL fragmented DNA labelling selama 60 menit pada 37°C. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan Peroksidase solution selama 40 menit pada 37°C. Cuci

menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Tetesi menggunakan substrat untuk Peroksidase (DAB – Diamino Benzidine) selama 20 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS pH 7,4 dan Counterstain dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, bilas dengan air kran dan cuci dengan dH<sub>2</sub>O. Keringkan dan tutup coverglass. Kemudian amati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x, sel-sel apoptosis ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel.

### HASIL PENELITIAN

#### Pemberian Probiotik LIS10506 dan LIS20506 Menghambat Aktivasi NFκB dan Meregulasi Turun TNFRI sel epitel *Brush Border* Usus.

NF-κB pada keadaan normal berada dalam keadaan inaktif karena ikatan dengan *inhibitor* κB (IκB) dan berada di sitoplasma. NF-κB dapat diaktivasi oleh berbagai stimuli seperti LPS, yang mengakibatkan pelepasan ikatan κB sehingga NF-κB masuk kedalam inti sel dan meregulasi berbagai mediator inflamasi, seperti TNF-α. Pada penelitian ini dilakukan pemulasan terhadap NFκB dengan menggunakan monoclonal terhadap NFκB, dengan menggunakan teknik immunohistokimia dan penghitungan sel menurut (Soini, et al. 1998; Pizem, J. and Cor A. 2003) yang dimodifikasi untuk mengkuantifikasi indeks aktivasi NFκB pada *brush border* usus, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan indeks aktivasi NFκB antara kelompok perlakuan LPS (rerata 14.33± 4.509) dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan LPS ditambah dengan pemberian LIS 10506 (rerata 2.00± 1.732) demikian juga LIS 20506 (rerata 1.33± 1.528) dengan nilai p (p≤0.000).

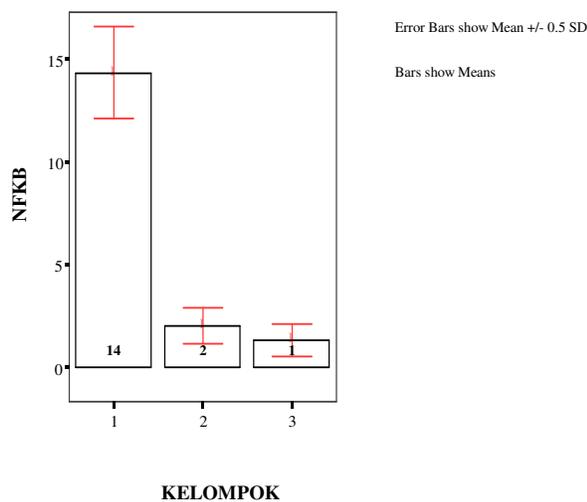


**Gambar 1. Ekspresi dan Aktivasi NFκB sel-sel epitel *brush border*.** Kelompok yang mendapatkan paparan LPS (1) Dengan menggunakan antibody terhadap NFκB, tampak bahwa terjadi peningkatan yang nyata terhadap intensitas warna coklat pada inti sel *brush border* pada ekspresi dan aktivasi NFκB (panah merah). Pada kelompok perlakuan LPS dengan pemberian LIS 10506 (2) dan kelompok LPS dengan pemberian LIS 20506 (3) menunjukkan penurunan aktivasi maupun ekspresi NFκB (tanda panah merah).

**Tabel 2. Rerata Hasil Perhitungan dan Uji Beda Aktivasi NFkB sel-sel epitel brush border pada masing-masing kelompok.**

Kelompok	Rerata	±SD	Notasi
kontrol	14.33	4.509	a
LPS + LIS10506	2.00	1.732	b
LPS + LIS20506	1.33	1.528	b

Menunjukkan perbedaan rerata jumlah sel-sel epitel brush border dengan pemaparan LIS10506 maupun LIS20506 yang mengalami aktivasi NFkB yang signifikan pada masing-masing kelompok. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0.000$ .



**Gambar 2. Rerata aktivasi NFkB sel-sel epitel brush border usus.** Kelompok Kontrol (1); LPS + LIS10506 (2) dan LPS + LIS20506 (3).

Secara umum sitokin tidak disimpan di dalam intraseluler dan sekresi sitokin tergantung oleh sintesis protein baru yang diproduksi oleh adanya proses transkripsi gen sitokin karena adanya stimulus proses inflamasi. Sehingga dengan demikian peran regulasi transkripsi oleh transkripsi faktor seperti NF-kB sangat penting untuk produksi berbagai macam sitokin. Adapun regulasi fungsi transkripsi yang dilakukan oleh NF-kB, dilakukan oleh sitokin melalui *cascades* atau *networks* sitokin atau dengan melibatkan faktor transkripsi yang lain (12; 14). Pada model sepsis dengan induksi bakteri gram negatif, regulasi TNFR1 berat molekul 55kD (p55) namun tidak berat molekul 75kD (p75) merupakan ekuivalen dengan aktivitas TNFa (20), sehingga pada penelitian ini, dengan menggunakan teknik immunohistokimia menggunakan anti TNFR1, sebagai ekuivalen terhadap aktifitas sitokin diamati regulasi TNFR1 pada brush border usus dengan menggunakan teknik immunohistokimia menggunakan anti TNFR1 (p55). Dari

hasil pemulasan tersebut, tampak bahwa terdapat peningkatan intensitas warna coklat. Kelompok kontrol yang merupakan kelompok yang induksi LPS, gambaran ekspresi TNFR1 tampak nyata tampak pada membran sel epitel brush border (tanda panah warna hitam). Namun demikian, pada kelompok induksi LPS dengan pemberian LIS10506 dan kelompok induksi LPS dengan pemberian LIS20506, menunjukkan penurunan intensitas warna coklat pada membran epitel tubulus *brush border* usus.

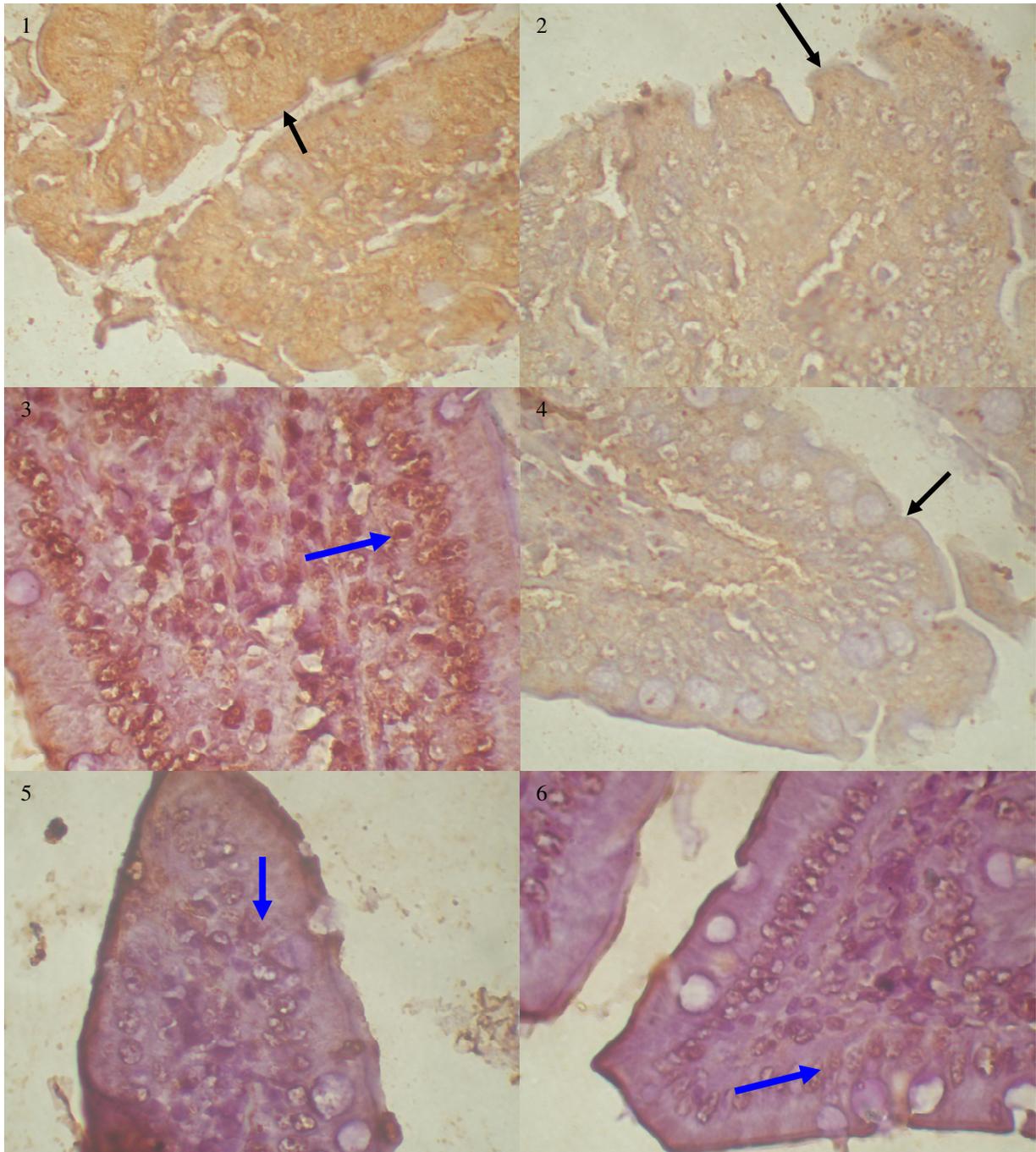
### Regulasi Turun TNF-R1 Menurunkan Indeks Apoptosis Sel Epitel Brush Border Usus.

Telah dilakukan penelitian secara *in-vivo* dengan menggunakan jaringan usus tikus, yang mendapatkan induksi LPS dengan pemaparan LIS 10506 dan LIS 20506, terhadap indeks apoptosis sel-sel epitel brush border. Dinyatakan bahwa beberapa aspek dari apoptosis pada sel, dapat dikarakterisasi melalui morfologi seluler yang bisa diamati dengan menggunakan mikroskop, meliputi *shrinkage*, migrasi kromatin dan membran *blebbing*, kondensasi inti serta kemudian segmentasi dan pemisahan menjadi *apoptotic bodies* (yang akan mengalami fagositosis). Fragmentasi DNA yang terjadi pada proses apoptosis akan berlangsung selama beberapa jam, sebelum akhirnya akan mengalami fagositosis. Dengan menggunakan teknik pelabelan terhadap DNA terfragmentasi (TUNEL) dan penghitungan sel menurut (18-19) yang dimodifikasi untuk mengkuantifikasi indeks apoptosis sel-sel epitel brush border, diketahui bahwa terjadi penurunan indeks apoptosis sel-sel epitel brush border dengan pemaparan LIS 10506 maupun 20506 (Tabel 3). Tampak bahwa, dengan menggunakan uji beda satu arah (ANOVA), menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan jumlah sel-sel epitel brush border yang mengalami apoptosis pada kelompok induksi LPS (rerata  $14.67 \pm 2.517$ ) terhadap kelompok induksi LPS dengan pemberian LIS10506 (rerata  $6.33 \pm 2.309$ ) dan induksi LPS dengan pemberian LIS20506 (rerata  $6.00 \pm 3.000$ ) dengan nilai  $p \leq 0.000$ .

**Tabel 3. Rerata Hasil Perhitungan dan Uji Beda Apoptosis sel-sel epitel brush border pada masing-masing kelompok**

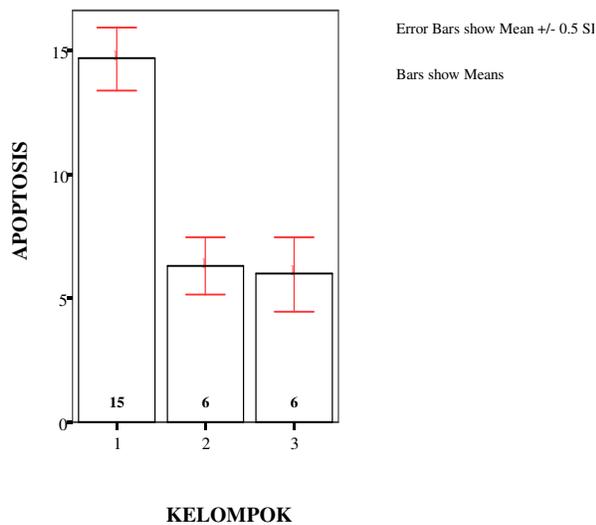
KELOMPOK	RERATA	±SD	notasi
kontrol	14.67	2.517	a
LPS + LIS10506	6.33	2.309	b
LPS + LIS20506	6.00	3.000	b

Menunjukkan perbedaan rerata jumlah sel-sel epitel brush border dengan pemaparan LIS 10506 maupun 20506 yang mengalami Apoptosis yang signifikan pada kelompok LPS terhadap kelompok LPS + LIS10506 dan kelompok LPS + LIS10506. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan yang signifikan, dengan nilai  $p \leq 0.000$ .



**Gambar 3. Ekspresi TNFR1 (1, 2, 3) dan Apoptosis (4, 5, 6) Sel Epitel Brush Border Usus.**

Ekspresi TNFR1 ( 1, 2 dan 3) dengan menggunakan antibodi spesifik terhadap TNF-RI, tampak terdistribusi pada membran palsma sel epitel *brush border* Usus (panah hitam). Tampak bahwa pada kelompok LPS (1), ekspresi TNF-RI meningkat dibandingkan terhadap kelompok LPS+LIS10506 (2) demikian juga terhadap kelompok LPS+LIS20506 (3). Pada kejadian apoptosis (3, 4 dan 5), dengan menggunakan metode pelabelan DNA terfragmentasi, tampak bahwa sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan warna coklat pada inti sel (panah biru). Pada kelompok LPS (1) tampak terjadi peningkatan kejadian apoptosis dibandingkan terhadap kelompok LPS+LIS10506 demikian juga terhadap kelompok LPS+LIS20506.



**Grafik 4. Rerata apoptosis sel-sel epitel brush border usus.** Kelompok Kontrol (1); LPS + LIS10506 (2) dan LPS + LIS20506 (3).

#### DISKUSI

Pertahanan saluran cerna dibentuk oleh lapisan mukosa lumen saluran cerna yang memisahkan tubuh dengan lingkungan luar tubuh. Lumen saluran cerna bukan hanya mengandung bahan-bahan nutrisi, namun juga mengandung mikroorganisme baik normal maupun yang bersifat patogen beserta produknya. Gangguan secara langsung pada bagian mukosa usus ini dapat menyebabkan gangguan fungsi pertahanan usus, yang akhirnya dapat mengakibatkan gangguan secara sistemik. Secara garis besar, pertahanan saluran cerna dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu pertahanan intrinsik dan pertahanan ekstrinsik. Adapun yang dimaksud dengan pertahanan intrinsik adalah bagian yang tersusun dari komponen sel epitel yang melapisi seluruh permukaan saluran cerna bersama dengan bagian *tight junction*. Bagian *tight junction* ini merupakan bagian perekat antar sel. Bagian ini merupakan bagian yang penting dan merupakan bagian pokok pertahanan saluran cerna. Secara umum pertahanan intrinsic saluran cerna ini dipertahankan oleh integritas sel epitel yang melapisi dan bagian *tight junction*. Gangguan yang mengganggu integritas bagian ini akan mengakibatkan gangguan fungsi saluran cerna. (21). *Brush border* akan mengalami kerusakan bila terpapar dengan virus/kuman patogen. (22-24)). Sebagai garis terdepan respons imun *innate* terhadap invasi mikroba masuk melalui saluran cerna, sel epitel usus (25). Bila terpapar oleh LPS, akan mengakibatkan iskemia dan rusaknya sel matur serta akan menghambat pertumbuhan sel imatur (26). *Lipopolysaccharide binding protein* (LBP) yang dibentuk *host* akan

membentuk ikatan kompleks dengan LPS. Adanya paparan LPS, sel epitel usus akan mengekspresikan LBP (*LPS binding protein*) dan TLR (*toll like receptors*), yang mengikat dan mengenali LPS dengan konsentrasi  $<1\text{nM}$  (27). Secara normal, sel intestinal mengekspresikan TLR4 dan MD2 dalam jumlah kecil (28). MD2 akan mengaktifasi faktor transkripsi NF $\kappa$ B, sehingga terjadi transkripsi gen-gen proinflamasi seperti TNF $\alpha$  (29). TNF $\alpha$  diketahui sebagai mediator yang kuat untuk terjadinya peradangan local dalam pembuluh darah dan tempat lain (30). TNF $\alpha$  disintesis sebagai transmembran protein non-glikosilasi 26kDa oleh makrofag/monosit, sel endothel, neutrofil dan sel otot polos. *Soluble* TNF $\alpha$  berfungsi sebagai mediator inflamasi endogen dan mengatur banyak respon seluler termasuk aktivasi gen yang terlibat dalam inflamasi dan regulasi imun, proliferasi sel, respon antiviral, inhibisi pertumbuhan dan kematian sel (31). Dalam bentuk *soluble*, TNF $\alpha$  monomer bersatu dan bersirkulasi sebagai 51kDa homodimer yang stabil. Aktifitas biologisnya terhadap sel target dimediasi oleh 2 macam reseptor permukaan, yaitu TNFR1 dan TNFR2 (32-33). Merujuk pada pernyataan tersebut, pada penelitian ini terbukti bahwa terjadi peningkatan aktivasi NF $\kappa$ B dan ekspresi TNFR1 pada sel-sel epitel *brush border* usus oleh akibat induksi LPS. Namun demikian, aktivasi NF $\kappa$ B maupun ekspresi TNFR1 menurun signifikan dengan pemberian strain *Lactobacillus* LIS10506 maupun LIS20506. Sebagai flora normal dari golongan Bakteri asam laktat yang bekerja mempertahankan kesehatan *host* (34). *Lactobacillus plantarum* merupakan salah satu spesies dari sedikit *Lactobacillus* di saluran cerna manusia dan terlibat baik dalam industri fermentasi maupun tradisional disamping *Lactobacillus crispatus* dan *Lactobacillus gasserii* (35). *Lactobacillus plantarum* IS10506 dan IS20506 (LIS10506 maupun LIS20506) merupakan strain liar alamiah yang diisolasi dari dadih khas Indonesia. Dadih adalah produk susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat dalam tabung bambu, menyerupai yogurt, dari susu kerbau yang difermentasi spontan secara tradisional, tanpa proses pemanasan (36-37).

Ekspresi NF $\kappa$ B meningkat secara signifikan pada kelompok yang mendapatkan perlakuan dengan LPS. Gangguan terhadap proses regulasi produksi sitokin dan mekanisme signaling sel epitel, limfosit mukosa dan makrofag sebagai akibat LPS mempunyai peran yang penting pada patogenesis terjadinya inflamasi (38). Tampak bahwa dengan pemberian strain *Lactobacillus* LIS10506 dan LIS20506 menurunkan secara signifikan aktivasi NF $\kappa$ B. Menurut (39) probiotik kemungkinan meregulasi turun proses inflamasi, dimana bakteri (probiotik) mesekresi produk yang dapat menghambat aktivasi LPS pada respon sel immune, saat ini diketahui bahwa produk dari probiotik membatasi interaksi LPS pada reseptor CD14 monosit/makrofag. Hal ini mengakibatkan turunnya

signaling NFkB pada sel-sel immune sehingga meregulasi turun TNF $\alpha$ . Walaupun makrofag tidak mengekspresikan CD14 pada basal kondisi, namun ekspresinya diregulasi naik pada kondisi inflamasi. Disamping itu epithelial cells mensekresi transforming growth factor b (TGF-b), yang merupakan sitokin anti inflamasi yang diketahui akan menghambat sekresi TNF $\alpha$ . Regulasi turun dari TNF $\alpha$  oleh rendahnya signaling NFkB dan hambatan sekresi TNF $\alpha$  oleh TGFb yang dihasilkan sel epitel, memberikan implikasi pada penurunan apoptosis sel-sel epitel *brush border* usus. Sehingga, dengan memperhatikan hasil yang didapatkan, bahwa penurunan kejadian apoptosis sel epitel *brush border* usus (seperti pada data) karena pemberian LIS10506 dan LIS20506 dipastikan melibatkan jalur *Extrinsic pathway* atau juga *Death Receptor Pathway* bahwa jalur apoptosis, menurut (16), salah satunya melibatkan protein (reseptor) CD95 atau reseptor Fas (yang tergabung dalam *TNF Receptor family*) beserta *Fas ligand*, yang disebut sebagai TRAIL (*TNF Receptor Apoptosis Inducing*

*Ligand*) yang membentuk jalur menuju apoptosis. Jalur apoptosis melalui TNF $\alpha$  ini selanjutnya akan mengaktivasi cascade yang dimediasi oleh caspase-8 sampai akhirnya mengaktivasi caspase-3. Caspase 3 merupakan caspase efektor yang akan meningkatkan sinyal apoptosis dengan mendisosiasi protein kuncinya dan menginisiasi jalur caspase menjadi program kematian sel (17). Jadi secara bermakna tampak bahwa pemberian *Lactobacillus* strain LIS10506 maupun LIS20506 akan menghambat aktivasi NFkB, dan walaupun mekanisme yang pasti belum jelas, namun secara signifikan menurunkan ekspresi TNFR1 (sebagai ekuivalen aktivitas TNF $\alpha$ ), dan hal tersebut memberikan implikasi bahwa terjadi penurunan kejadian apoptosis pada sel-sel epitel *bush border* usus. Dalam rangka memperjelas mekanisme kerja *Lactobacillus* strain LIS10506 maupun LIS20506 dalam kaitannya dengan aktivasi NFkB maupun regulasi gen terkait, maka perlu kiranya untuk dilakukan penggunaan teknik EMSA (*Electro Mobile Sift Assay*).

#### DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Le Luyer, B., C. L. Morin, et al. *Crohn's disease in children and adolescents*. Arch Fr Pediatr 1985; 42(8): 677-82.
2. Saavedra, J. M., A. Abi-Hanna, et al. *Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety*. Am J Clin Nutr 2004; 79(2): 261-7.
3. Ahmed, M., A. G. Billoo, et al. *Risk factors of persistent diarrhoea in children below five years of age*. J Pak Med Assoc 1995; 45(11): 290-2.
4. Vanderhoof, J. A. and R. J. Young. *Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27(3): 323-32.
5. Mack, D. R., S. Michail, et al. *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol 1999; 276(4 Pt 1): G941-50.
6. Van Neil, C. W., C. Feudtner, et al. *Lactobacillus Therapy for Acute Infectious Diarrhea in Children: A Meta-analysis*. Pediatrics 2002; 109: 678-684.
7. Marteau, P. and F. Shanahan. *Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects*. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003; 17(5): 725-40.
8. Bibiloni, R., R. N. Fedorak, et al. *VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol 2005; 100(7): 1539-46.
9. Perdigon, G., S. Alvarez, et al. *Immune system stimulation by probiotics*. J Dairy Sci 1995; 78(7): 1597-606.
10. Mettinen, M., S. Matikainen, et al. *Lactobacilli and Streptococci Induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and Gamma Interferon Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Infect Immun 1998; 66: 6058-52.
11. Matsuzaki, T. and J. Chin. *Modulating immune responses with probiotic bacteria*. Immunol Cell Biol 2000; 78(1): 67-73.
12. Blackwell, T., S. and J. Christman, W. *The Role of Nuclear Factor-kB in Cytokine Gene Regulation*. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol 1997; 17: 3-9.
13. Collins T, Cybulsky M. *NF-kB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?*. J Clin Invest 2001;107:255-265.
14. Worns, M. A., A. W. Lohse, et al. *Five cases of de novo inflammatory bowel disease after orthotopic liver transplantation*. Am J Gastroenterol 2006; 101(8): 1931-7.
15. Palinski, W and Sotirios T. *Immunomodulatory Effects of Statins: Mechanisms and Potential Impact on Arteriosclerosis*. J Am Soc Nephrol 2002; 13:1673-1681
16. Husada, J.J. *The Role of Apoptosis in Brain Injury*. Simposium Neuro Intensif Quality Hotel, Solo. 9-10 Oktober 2004.
17. Boatright, K.M dan Guy S. Salvesen. *Mechanism of Caspase Activation*. Current Opinion in Cell Biology 2003; 15 : 725-731.

18. Soini Y, Paakko P, and Lehto V.P. *Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer*. American Journal of Pathology 1998; 153(4): 1041-1048
19. Pizem, J. and Cor A. *Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section*, Radiol. Onco 2003; 37(4): 225-232
20. Evans, T J. Moyes D, Carpenter A et al . *Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion protein in an animal model of gram-negative sepsis*. J Exp Med 1994; 180: 2173–2179
21. Bowen, R. *The Gastrointestinal Barrier*. 2006, 1-7.
22. Just, I., G. Fritz, et al. *Clostridium difficile Toxin B acts on the GTP-binding protein Rho*. J Biol Chem 1994; 269: 10706-12.
23. Dillon, S., E. Rubin, et al. *Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action Clostridium difficile Toxin A and Toxin B*. Infect Immun 1995; 63: 1421-6.
24. Just, I., J. Selzer, et al. *Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile Toxin B*. Nature 1995; 375: 500-3.
25. Moore, J., H. Garner, et al. *Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report*. Am J Vet Res 1979; 40: 722–723.
26. Ruemmele, F. M. *Chronic enteropathy: molecular basis*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program 2007; (59): 73-85; discussion 85-8.
27. Aderem, A. and R. Ulevitch. *Toll-like receptors in the induction of the innate immune response*. Nature 2000; 406: 782–787.
28. Abreu, M., E. Arnold , et al. *TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells*. J Biol Chem 2002; 277: 20431–20437.
29. Antal-Szalmas, P. *Evaluation of CD14 in host defense*. Eur J Clin Invest 2000; 30: 167–179.
30. Libby, P. *Inflammation in atherosclerosis*, Nature 2002; Dec 19-26;420(6917):868-74.
31. Palinski, W and Sotirios T. *Immunomodulatory Effects of Statins: Mechanisms and Potential Impact on Arteriosclerosis*, J Am Soc Nephrol 2002; 13:1673-1681.
32. Szmítko, P E. Chao-Hung W, Richard D. W, Greg A. J, Todd J. A, Subodh V. *Biomarkers of Vascular Disease Linking Inflammation to Endothelial Activation*. Circulation 2003; 108:2041-2048.
33. Hansson, G. *Regulation of Immune Mechanisms in Atherosclerosis*. Annals of the New York Academy of Sciences 2001; 947:157-166.
34. Montalto, M., F. Arancio, et al. *Probiotics: history, definition, requirements and possible therapeutic applications*. Ann Ital Med Int 2002;17(3): 157-65.
35. Cataloluk, O. and B. Gogebakan. *Presence of drug resistance in intestinal Lactobacilli of dairy and human origin in Turkey*. FEMS Microbiol Lett 2004; 236(1): 7-12.
36. Surono, I. and A. Harsono. *Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from dadih against mutagenic terassi*. Milchwissenschaft 1996; 51: 493-497.
37. Surono, I. *In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria*. Asian-Aus. J.Anim.Sci 2003;16: 726-731.
38. Neurath, M. F., I. Fuss, et al. *Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice*. J Exp Med 1995; 182(5): 1281-90.
39. Menard, S., C Candalh, J C Bambou, et al. *Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport*. Gut 2004; 53:821–828