

BERKALA ILMU KEDOKTERAN (Journal of the Medical Sciences)

ISSN 0126 — 1312 CODEN: BIKEDW

Diterbitkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Jilid XXVI

Juni 1994

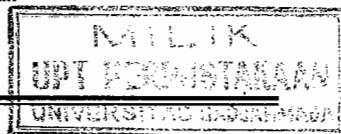
003390

Nomor 2

Responsi IgA Mukosal pada Colon terhadap Antigen Polisakarida Pneumokokal

Oleh: Marsetyawan H.N.E. Soesatyo

Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta



ABSTRACT

Marsetyawan H.N.E. Soesatyo: - *Mucosal IgA response in the colon against pneumococcal polysaccharide antigen*

The humoral IgA response to bacterial polysaccharide antigen in rats was investigated *in vivo*. Rats were immunized with pneumococcal polysaccharide type-3 (PPS-3) via different routes, *i.e.* in the Peyer's patch (iPP), in the colon (I.C.), peritoneal cavity (I.P.), and intravenous (I.V.). The development of specific antibody-forming cells (AFC) and their isotypes in the intestinal mucosa, gut-associated lymphoid tissue (GALT), mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen were studied by immunohistochemistry. The serum antibody levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The results showed that iPP immunization evoked high numbers of anti-PPS-3 AFC of the IgA isotype in the mucosa of the small intestine and in the Peyer's patch. On the contrary, the I.C. route did not elicit a mucosal response, though a few AFC were found in the MLN and spleen. Following I.P. priming, a specific IgA response was found, especially in the MLN and spleen, and low response was detected in the villi. A high response was found in the parathymic lymph nodes (PTLN). The I.V. immunization gave rise

to the development of AFC in the spleen, particularly of the IgM isotype. There was no mucosal responses to PPS-3 antigen in the colon arise irrespective of the route of immunization.

Key-words: IgA – colon – antibody-forming cells – pneumococcal polysaccharide antigen – immunohistochemistry

PENGANTAR

Responsi imun pada permukaan mukosa telah banyak diteliti pada binatang percobaan (Pierce & Gowans, 1975; Dunkley & Husband, 1986; Gyure *et al.*, 1991). Untuk mendapatkan responsi imun mukosal yang optimal pada usus, perlu dipertimbangkan penggunaan jenis antigen, dosis pemberian, serta rute imunisasi yang tepat. Tidak seperti imunisasi sistemik, pemberian antigen per oral umumnya membutuhkan dosis relatif tinggi (Soesatyo *et al.*, 1990). Ini disebabkan karena sebagian molekul antigen tersebut akan mengalami digesti oleh enzim-enzim pencernaan, sehingga molekul-molekulnya tidak dapat dikenal oleh sel-sel imunokompeten di dalam usus. Karena mukosa usus tidak begitu responsif terhadap semua jenis antigen yang diberikan per oral, maka penelitian imunitas mukosal terhadap infeksi saluran pencernaan mengalami keterbatasan. Pada binatang percobaan, rute imunisasi alternatif yaitu secara intraperitoneal (I.P.). Imunisasi I.P. mampu membangkitkan responsi IgA secara ekstensif terhadap *challenge* (paparan ulang oleh imunogen) yang diberikan intraduodenal, terutama bila antigen diberikan bersama-sama dengan ajuvan Freund komplit (*complete Freund's adjuvant*) (Pierce & Koster, 1980). Rute imunisasi lainnya ialah langsung pada lempeng Peyer (intra *Peyer's patch*, iPP) (Dunkley & Husband, 1987). Ini dilakukan untuk menghindari responsi sistemik konkomitan yang berasal dari *priming* (imunisasi primer) I.P.

Penelitian-penelitian tersebut di atas sebagian besar menggunakan protein sebagai antigen. Selain itu, hampir semua laporan penelitian terbatas melihat responsi IgA di dalam usus kecil/halus, sedangkan responsi imun mukosal pada usus besar/colon belum pernah dilaporkan. Sebagaimana diketahui, lempeng limfoid serta akumulasi sel limfosit tersebar di sepanjang mukosa saluran pencernaan, baik pada usus kecil/halus maupun usus besar. Oleh karena itu, perlu diteliti fungsi jaringan limfoid pada usus besar dalam kaitannya dengan sistem imun mukosal.

Karena imunitas mukosal terhadap *Streptococcus pneumoniae* dapat diperantarai oleh antibodi spesifik terhadap membran polisakaridanya, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan jaringan limfoid usus (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) dalam responsi mukosal terhadap kapsul polisakarida pneumokokal (*pneumococcal polysaccharide*, PPS), yaitu jenis antigen tipe-2 yang bersifat independen dari thymus (Mossier & Subbarao, 1982).

BAHAN DAN CARA

Binatang percobaan

Penelitian ini menggunakan tikus jantan (Harlan Sprague Dawley-CPB, Zeist, Nederland), dengan berat berkisar antara 280-300 g. Tikus ini dipelihara dan diberi

perlakuan normal sesuai dengan prosedur laboratorik yang berlaku pada rumah binatang (*animal facility*) Medische Fakuliteit Vrije Universiteit Amsterdam.

Prosedur imunisasi

Sejumlah tikus dibagi menjadi 8 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Tikus tersebut diimunisasi dengan kapsul polisakarida pneumokokal tipe-3 (PPS-3) (Merck, Sharp-Hohme, USA) bersama dengan ajuvan Freund tidak komplit (*incomplete Freund adjuvant*, IFA). Sebagian diimunisasi dengan antigen tanpa menggunakan ajuvan. Dosis pemberian untuk *priming* maupun *challenge* adalah sama.

Kelompok 1 dan 2: *priming* I.P. dengan 100 µg PPS-3; Kelompok 2: *challenge* I.P., Kelompok 3 dan 4: *priming* I.C. dengan 100 µg PPS-3/IFA; Kelompok 4: *challenge* I.C., Kelompok 5 dan 6: *priming* I.V. dengan 5 µg PPS-3 ke dalam pembuluh darah vena ekor; Kelompok 6: *challenge* I.V. Kelompok 7 dan 8: *priming* iPP dengan 20 µg PPS-3/IFA per Peyer's patch (PP); Kelompok 8: *challenge* iPP. Imunisasi iPP dilakukan berdasarkan metode dari Dunkley & Husband (1990), yaitu menyuntikkan 5 µl antigen di bawah lapisan serosa PP, paling sedikit diberikan ke 5 buah PP yang diambil secara acak di sepanjang duodenum sampai ileum. Binatang kontrol diimunisasi dengan salin. Tikus-tikus pada kelompok 3, 4, 7 dan 8 mula-mula dibius secara intramuskuler dengan 0,1 ml/100 gBB Hypnorm (Duphar, Weesp, Nederland) sebelum dilakukan laparatomi dan imunisasi. Tikus-tikus pada kelompok 1, 3, 5 dan 7 dibunuh 5 hari sesudah *priming*, sedangkan tikus pada kelompok 2, 4, 6 dan 8 dibunuh 5 hari setelah *challenge*. Semua binatang dibunuh dengan diberi CO₂ setelah dibius dengan Hypnorm. Kadar antibodi spesifik dan isotipnya diukur dari serum yang diambil. Bagian-bagian usus seperti duodenum, jejunum, ileum PP, colon dan jaringan limfonodi di bagian proksimal colon (LNPC), limfonodi mesenterial (LNM), limpa, dan limfonodi paratimal (LNPT) di-sampling dan segera dibekukan dengan nitrogen cair untuk pemeriksaan imunohistokimiawi.

Pemeriksaan imunohistokimiawi

Sel pembentuk antibodi (SPA) spesifik dideteksi *in situ* dengan metode pewarnaan imunohistokimiawi ganda (Van den Dobbelsteen *et al.*, 1991). Irisan kriostat setebal 8 µm disimpan semalam di dalam kotak tertutup dengan kelembaban relatif tinggi dan diletakkan pada ruangan dengan suhu kamar. Setelah dicuci dengan 0,01 M salin bufer fosfat (*phosphate-buffered saline*, PBS) pH 7,4, irisan-irisan tersebut diinkubasikan secara horisontal semalam pada suhu 4°C dengan campuran PPS-3 (10 µg/ml) dan imunoglobulin (Ig) spesifik mencit anti-tikus, yaitu IgM, IgG atau IgA. Campuran ini dilarutkan ke dalam PBS yang mengandung 5% albumin dari serum bovin (*bovine serum albumin*, BSA) (TABEL 1). Setelah 3x dicuci dengan PBS, irisan tersebut ditutup dengan serum kelinci anti-PPS-3 (Statens Serum Institut, Denmark) yang diencerkan 1:100 dan diinkubasikan selama 60 menit pada suhu kamar. Irisan dicuci lagi, kemudian diinkubasikan dengan alkali fosfatase (AF) yang dikonjugasikan dengan Ig kambing anti-mencit selama 60 menit pada suhu kamar. Setelah dicuci, pada irisan tersebut dilakukan reaksi enzimatik terhadap aktivitas AF dengan menggunakan naftol AS-MX fosfat (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) dan *Fast-blue BB base* (Sigma) sebagai kromogen. Untuk

menghambat aktivitas AF endogen, diberikan 0,025% levamisol (Sigma). Reaksi enzimatis ini berlangsung selama 20 menit pada suhu 37°C. Setelah dicuci, irisan-irisan

TABEL 1. – Daftar antibodi dan konjugat yang digunakan

Antibodi	ELISA	Pengenceran	Sumber ¹⁾
Abm			
IgA mencit anti-tikus	1:2.000	1:400	1
IgM mencit anti-tikus	–	1:200	1
IgG mencit anti-tikus	1:3.500	1:750	2
Abp			
Kelinci anti PPS-3	–	1:100	4
Konjugat			
IgM/HRP mencit anti-tikus	1:1.500	–	3
Ig/HRP kelinci anti-tikus	1:1.000	–	5
Ig/HRP angsa anti-kelinci	–	1:100	5
Ig/HRP kambing anti-mencit	1:10.000	–	5
Ig/AIPh kambing anti-mencit	–	1:75	5

Abm : antibodi monoklonal; Abp : antibodi poliklonal;

¹⁾ Sumber : 1 = Serotec, UK; 2 = Jackson Immunoresearch Lab. Inc., USA.;

3 = Zymed Lab. Inc., USA.; 4 = Statens Institut, Denmark; 5 = Dakopatts, Denmark/Tago, USA.

itu diinkubasikan dengan *horseradish peroxidase* (HRP) yang dikonjugasikan dengan Ig angsa anti-kelinci pengenceran 1:100 selama 60 menit pada suhu kamar. Akhirnya, irisan tersebut diwarnai dengan 3-amino-9 etil karbazol (Sigma) selama 10 menit pada suhu kamar (Claasen *et al.*, 1986), kemudian dicuci, diwarnai dengan hematoksilin, dicuci lagi di bawah air mengalir, dan ditutup dengan gliserin-gelatin. Sebagai kontrol digunakan irisan-irisan yang diinkubasikan hanya dengan PBS sebagai pengganti antibodi spesifik, dan irisan-irisan yang berasal dari tikus yang tidak diimunisasi. Spesifisitas antibodi dan isotipenya dapat secara serempak dideteksi dengan metode pewarnaan ganda seperti tersebut di atas. Reaksi terakhir ini dapat mendeteksi sel plasma pembentuk antibodi spesifik (SPA) pada jaringan dengan tiga jenis warna berbeda. Sel plasma dengan sitoplasma berwarna merah berisi Ig anti-PPS-3 tanpa isotipe tertentu. Sel plasma dengan sitoplasma biru menunjukkan bahwa ia mengandung antibodi nonspesifik dari isotipe tertentu, sedangkan sel plasma dengan warna ungu (sebagai hasil campuran warna merah dan biru) berisi Ig anti-PPS-3 dengan isotipe tertentu.

Deteksi antibodi spesifik di dalam serum

Kadar total Ig serta isotipe spesifik terhadap PPS-3 di dalam serum diukur dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang dimodifikasi oleh Van den Dobbelen *et al.* (1991). Secara singkat, 96 sumuran dari pelat mikrotiter polivinilklorida (Titertek, Flow Laboratories, The Netherlands) dilapisi (*coated*) dengan 10 µg/ml PPS-3 dalam larutan salin semalam pada suhu 25°C. Pelat tersebut kemudian dicuci 3x dengan PBS berisi larutan 0,05% Tween-20 (PBS/T) untuk menghilangkan zat-zat tersisa

yang tidak melekat pada sumuran pelat, kemudian dikeringkan dengan membalikkan pelat dan dipukul-pukulkan perlahan di atas kertas/kain pengering beberapa kali. Sumuran tadi selanjutnya diisi dengan serum yang telah diencerkan 2x secara serial, kemudian diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci lagi dan dikeringkan, pelat tadi diinkubasikan dengan HRP yang dikonjugasikan dengan Ig anti-tikus, baik terhadap jumlah total maupun spesifik isotope (IgM, IgG atau IgA) selama 2 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci kembali, aktivitas HRP-nya kemudian dideteksi dengan penambahan orto-fenilen-diamin-dihidroklorida (Sigma) dan H₂O₂ sebagai substrat. Reaksi ini berlangsung selama 20 menit pada suhu 25°C dalam kondisi gelap. Setelah 20 menit, reaksi ini dihentikan dengan menambahkan 50 µl H₂SO₄ 1 M. Warna yang timbul diukur absorpsinya dengan ELISA reader (Organon, Technika, The Netherlands) pada panjang gelombang 492 nm. Semua sampel serum dites *in duplo*. Penentuan titer dinyatakan sebagai hasil pengenceran terakhir yang masih positif yang memberi nilai absorptif 0,05 di atas nilai kontrol serum negatif. Data kemudian dipresentasikan sebagai log 10 titer rata-rata ± SD (Van den Dobbelsteen *et al.*, 1991).

Evaluasi

1. Kuantifikasi SPA.

Pemunculan SPA di dalam jaringan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran lemah (20x, 40x objektif). Jumlah SPA dihitung paling sedikit dari 30-50 area irisan serial representatif per jaringan/binatang, dan diekspresikan sebagai *mean* ± *SEM*.

2. Titer antibodi.

Titer IgM, IgG dan IgA masing-masing pada responsi primer dan sekunder dibandingkan dengan menggunakan Student's t-test (*paired data*).

HASIL PENELITIAN

Deteksi SPA anti-PPS-3 di dalam jaringan

Rute imunisasi yang berbeda berpengaruh pada distribusi, jumlah serta spesifisitas isotope SPA pada jaringan. Dibandingkan dengan pada usus halus (PP dan lamina propria), usus besar/colon tidak memberi responsi setelah menerima imunisasi tunggal iPP atau I.C. dengan PPS-3/IFA. Demikian pula, responsi mukosal terhadap PPS-3 di dalam colon tidak timbul setelah mendapat suntikan I.P. Imunisasi I.V. tunggal dengan PPS-3 menyebabkan reaksi pembentukan SPA di dalam hampir semua jaringan yang dites, terutama di limpa.

Mengenai isotope SPA anti-PPS-3, imunisasi iPP menghasilkan responsi IgA yang tinggi, di PP, lamina propria usus halus (TABEL 2), LNM dan limpa. Responsi IgM juga ditemukan di PP, meskipun lebih rendah daripada responsi IgA. Responsi IgG pada usus dan limpa adalah rendah. Perlu diperhatikan bahwa imunisasi I.C. tidak mampu membangkitkan baik responsi IgM, IgG maupun IgA di dalam usus halus maupun di dalam colon. Juga responsi yang rendah di LNM dan limpa. *Priming* I.P. menimbulkan responsi sel plasma spesifik IgM dan IgG di daerah medula LNPT dan limpa. Responsi IgA di LNPT adalah rendah. SPA pada LNM terutama mempunyai isotope IgM dan IgA.

Responsi IgA pada lamina propria hanya sedikit dijumpai. Selanjutnya, imunisasi sistemik I.V. menginduksi responsi IgM, IgG dan IgA pada limpa dan LNM. Responsi IgA dijumpai pada villi.

Tanpa terpengaruh oleh rute imunisasi, pemberian *challenge* antigen menyebabkan pembentukan SPA pada hampir semua jaringan. Setelah imunisasi sekunder iPP, sejumlah kecil SPA IgA dan IgM ditemukan di PP, LNM dan limpa; sedikit sekali SPA IgA yang bisa dijumpai pada villi intestinum tenue (TABEL 2).

TABEL 2. - Jumlah SPA anti-PPS-3 isotype IgA pada responsi primer dan sekunder.

Rute imunisasi	Villi	PP	LNM	Colon	LNPC	Limpa
iPP	30,4±2,9	24,2±2,8	35,0±3,5	7,6±1,4	8,6±1,2	23,4±2,1
iPP2*	5,0±1,6	7,4±1,7	12,6±1,7	1,2±0,7	0,8±0,3	10,2±1,9
I.C.	0	0	0,2±0,1	0	0	0,2±0,1
I.C.2*	0	0	0	0	0	0
I.P.	4,2±1,1	1,8±0,6	15,4±0,7	0,2±0,1	0	16,6±1,6
I.P.2*	0,4±0,2	0	5,2±0,7	0	0	10,4±1,1
I.V.	10,0±1,4	3,6±1,1	15,6±2,0	1,8±0,7	1,6±0,4	10,4±0,8
I.V.2	0,4±0,3	0,2±0,1	6,0±1,2	0	0,2±0,1	5,4±0,8

PP = Peyer's patch, LNM = Limfonodi mesenterial, LNPC = Limfonodi proksimal colon

*) *Challenge* antigen

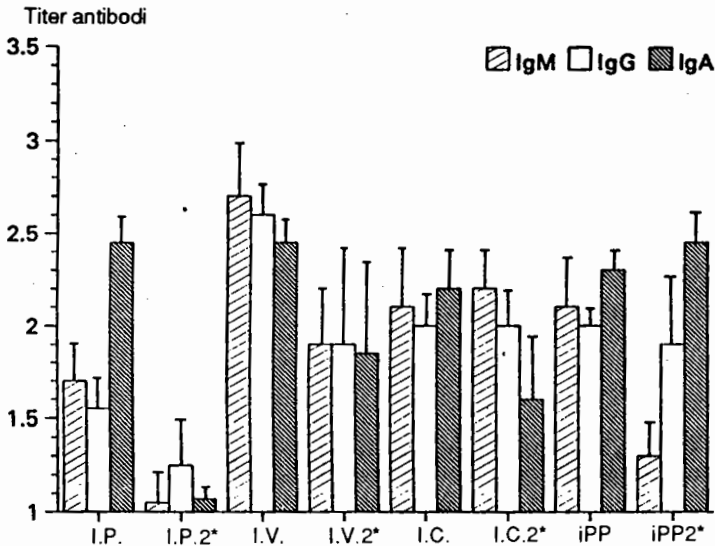
Setelah *challenge* I.C., SPA spesifik tidak ditemukan di sepanjang mukosa usus, tetapi dapat ditemukan isotype di LNM, LNPT dan limpa. *Challenge* I.P. membangkitkan SPA anti-PPS-3 yang lebih rendah daripada *priming* I.P. Hal ini serupa dengan *challenge* I.V., yang memberi responsi lebih rendah daripada *priming* I.V. Pada responsi sekunder, sebagian besar SPA menghasilkan antibodi IgM.

Deteksi antibodi anti-PPS-3 di dalam serum

Priming iPP membangkitkan responsi IgA yang lebih tinggi daripada IgM atau IgG (GAMBAR 1).

Imunisasi I.C. menghasilkan titer IgM, IgG dan IgA yang serupa. Sebaliknya, rute I.P. membangkitkan responsi IgA yang jauh lebih tinggi daripada IgM atau IgG. Setelah *priming* I.V., titer IgM segera naik, mencapai puncaknya, yang diikuti kenaikan titer IgG dan IgA.

Pada responsi sekunder, titer IgA tinggi dicapai setelah imunisasi iPP. IgG lebih rendah daripada setelah *priming*, sedangkan kadar IgM sangat rendah ($p < 0,001$). Setelah *challenge* I.C., titer IgA lebih rendah daripada IgM atau IgA. Selanjutnya, titer IgM dan IgA sangat rendah pada reaksi sekunder dibandingkan dengan responsi primernya ($p < 0,001$). *Challenge* I.V. menghasilkan titer IgM, IgG dan IgA lebih rendah daripada responsi primer masing-masing ($p < 0,002$; $p < 0,02$; $p < 0,05$).



GAMBAR 1. – Titer IgM, IgG dan IgA di dalam serum pada responsi primer (I.P., I.V., I.C., dan iPP) dan sekunder* (I.P.2, I.V.2, I.C.2, dan iPP2) terhadap PPS-3. Bar menunjukkan log₁₀ mean ± SD (n = 5).

PEMBAHASAN

Hasil percobaan di atas menunjukkan bahwa SPA spesifik PPS-3 dengan isotipe berbeda dapat dibangkitkan pada mukosa usus, LNM dan limpa, yaitu setelah dilakukan imunisasi melalui rute yang berlainan. Suntikan lokal dengan sejumlah kecil antigen ke dalam lapisan subserosa PP (iPP) merupakan cara yang paling efektif untuk membangkitkan responsi IgA mukosal, tidak hanya pada jaringan PP, tetapi juga pada lamina propria intestinum tenue, LNM dan limpa (TABEL 2). Hasil ini sesuai dengan penemuan sebelumnya, bahwa imunisasi iPP dengan ovalbumin menghasilkan responsi IgA tinggi (Dunkley & Husband, 1987; 1990).

Untuk lebih mengetahui reaksi imun lokal pada usus besar, serta peranan limfonodi proksimal colon (LNPC) *in vivo*, antigen PPS-3 disuntikkan ke dalam lumen colon. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa LNPC dan PP mempunyai struktur histologik serupa (De Boer *et al.*, 1992). Oleh karena itu, boleh jadi bahwa seperti juga pada PP, LNPC berperan menghasilkan sel-sel plasma IgA. Namun ternyata, berdasarkan penelitian ini, bahwa imunisasi I.C. tidak mampu membangkitkan responsi imun pada mukosa colon; di sini tidak dijumpai SPA spesifik baik dalam colon maupun pada LNPC. Kemungkinannya adalah, dosis antigen yang digunakan tidak cukup untuk menginduksi sel-sel imunokompeten di dalam colon. Kemungkinan lain ialah bahwa kadar antigen PPS-3 di dalam lumen colon tidak cukup untuk dapat diproses oleh sel M (membranous) pada epitel yang melapisi jaringan limfonodi colon (Bland & Britton, 1984; Jacob *et al.*, 1987). Ini berbeda dengan bakteri colon indigenus ataupun *ferritin-India ink* yang mudah diabsorpsi dan diproses oleh sel M colon. Bisa juga terjadi bahwa antigen PPS luminal tersebut tidak dapat mencapai permukaan epitel colon, karena terhalang oleh sisa-sisa makanan di dalam colon yang berperan sebagai barrier fisik.

Perbedaan fungsional antara PP dan LNPC yang berkaitan dengan sensitivitas sel-selnya terhadap steroid, dan responsi terhadap lipopolisakarida (LPS) *in vitro* sudah pernah dilaporkan (Perry & Sharp, 1988; Crouse *et al.*, 1989). Dilaporkan bahwa konsentrasi endotoksin dari bakteri Gram negatif (jadi termasuk LPS) jauh lebih tinggi di dalam colon daripada di dalam intestinum tenue (Goris *et al.*, 1986). Hal ini menimbulkan spekulasi bahwa konsentrasi yang tinggi ini mempengaruhi responsi baik *in vitro* maupun *in vivo* terhadap antigen polisakarida, yaitu dengan cara menginduksi sel T supresor atau mengurangi aktivitas fungsional sel B (De Boer *et al.*, 1992).

Kemungkinan lain bahwa sel B dari LNPC kurang responsif dibandingkan dengan sel B dari PP terhadap stimulasi LPS ialah karena LNPC tidak mengandung sel-sel aksesori yang berperan untuk inisiasi responsi imun (Perry & Sharp, 1991). Tetapi data kami (manuskrip dalam tahap persiapan) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan morfologik antara LNPC dan PP dikaitkan dengan sel makrofag maupun sel dendritik retikular. Ini dibuktikan melalui pemeriksaan/pewarnaan dengan panel antibodi monoklonal seri ED: ED1-ED15 (Dijkstra *et al.*, 1985; Van den Berg *et al.*, 1989).

Selanjutnya, dari hasil pengamatan lainnya (Soesatyó *et al.*, Submitted) tidak berhasil menginduksi responsi imun mukosal di dalam colon dengan antigen yang bersifat dependen T (*thymus-dependent antigen*) yaitu *trinitrophenyl keyhole limpet haemocyanin* (TNP-KLH). Antigen tersebut disuntikkan secara lokal ke dalam colon. Ternyata tidak ditemukan SPA anti-TNP pada mukosa colon maupun LNPC. Tetapi SPA spesifik tersebut dapat dijumpai pada lamina propria usus halus setelah mendapat imunisasi intraduodenal dengan antigen yang sama (Soesatyó *et al.*, 1991). Data tersebut di atas menunjukkan adanya kesukaran dalam membangkitkan responsi imun mukosal pada colon secara *in vivo* baik dengan antigen yang bersifat dependen T maupun independen T.

Tidak seperti rute iPP, imunisasi I.P. membangkitkan responsi IgA rendah pada mukosa usus dan PP. Tetapi rute I.P. mampu menginduksi IgA di dalam LNM dan limpa. Ini menunjukkan bahwa antigen secara langsung atau melalui sirkulasi sistemik memacu sel plasma spesifik pada organ-organ tersebut. Adanya reaksi humoral IgM dan IgG pada LNPT setelah imunisasi I.P. tidaklah mengherankan, sebab LNPT adalah limfonodi regional dari rongga peritoneum.

Ketidakkampuan menaikkan responsi terhadap PPS-3 setelah di *challenge* sudah diduga, karena antigen independen T ini tidak membangkitkan sel *memory*. Meskipun demikian, responsi sekunder yang sangat rendah dibandingkan dengan reaksi primer pada sebagian besar eksperimen ini membuat spekulasi timbulnya sel T supresor (Taylor *et al.*, 1983). Meskipun PPS-3 tergolong jenis antigen independen T, responsi spesifik pada mencit dipengaruhi oleh dua jenis subpopulasi sel T, yaitu sel supresor dan sel T *amplifier*, yang bertolak belakang peranannya (Baker *et al.*, 1970). Dari studi kami secara *in vivo*, disimpulkan bahwa setelah dipacu dengan polisakarida, sel T dari GALT bangkit, dan menjadi sel T supresor efektor yang fungsional di dalam limpa (Soesatyó *et al.*, 1991). Mekanisme terjadinya supresi setelah imunisasi I.P. atau I.V. belum diketahui.

Data tentang antibodi di dalam serum menunjukkan bahwa imunisasi iPP membangkitkan titer IgA tinggi terhadap PPS-3. Tidak seperti rute I.C., I.P. atau I.V., *challenge* antigenik iPP menghasilkan titer IgA tertinggi dibandingkan dengan responsi IgA primer. Meskipun pernah dilaporkan bahwa PPS-3 hanya dapat membangkitkan responsi IgM dan IgG (Perlmutter *et al.*, 1978), dari penelitian kami dapat ditunjukkan bahwa responsi IgA-pun dapat timbul bila imunisasi dilakukan melalui rute yang sesuai.

KESIMPULAN

Imunisasi mukosal dengan antigen PPS-3 ternyata tidak berhasil membangkitkan reaksi imunologik pada colon dibandingkan pada intestinum tenue. Oleh karena itu perlu dilanjutkan suatu penelitian dengan menggunakan antigen mukosal yang bersifat poten, seperti toksin cholera (misal: subunit- β toksin cholera). Ini penting untuk mengetahui peranan sebenarnya dari jaringan limfonodi pada colon (intestinum crassum) dalam sistem imun mukosal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada segenap kolega di Afdeling Celbiologie & Immunologie, Medische Faculteit, Vrije Universiteit, Amsterdam. Biaya penelitian berasal dari Bank Dunia-XVII.

KEPUSTAKAAN

- Baker, P. J., Stashak, P. W., Amsbaugh, D. F., Prescott, B. & Barth, R. F. 1970 Evidence for the existence of two functionally distinct types of cells which regulate the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide. *J. Immunol.* 105:1581-7.
- Bland, P. W. & Britton, D. C. 1984 Morphological study of antigen sampling structures in the rat large intestine. *Infect. Immun* 2:693-9.
- Claassen, E., Boersma, D. M., Kors, N., & Van Rooijen, N. 1986 Double enzyme conjugates producing an intermediate color for simultaneous and direct detection of three different intracellular immunoglobulin determinants with only two enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* 34:423-8.
- Crouse, D. A., Perry, G. A., Murphy, B. A., & Sharp, J. G. 1989 Characteristics of submucosal lymphoid tissue located in the proximal colon of the rat. *J. Anat.* 62:53-65.
- De Boer, N. K., Kroese, F. G. M., Sharp, J. G., & Perry, G. A. 1992 Immunohistological characterization of proximal colonic lymphoid tissue in the rat. *Anat. Rec.* 233:569-6.
- Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Joling, P., & Kraal, G. 1985 The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: Distinct macrophage subpopulation in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-99.
- Dunkley, M. L., & Husband, A. J. 1986 The induction and migration of antigen-specific helper cells for IgA responses in the intestine. *Immunology* 57:379-85.
- _____ 1987 Distribution and functional characteristics of antigen-specific helper T cells arising after Peyer's patch immunization. *Immunology* 61:475-82.
- _____ 1990 Routes of priming and challenge for IgA antibody-containing cell response in the intestine. *Immunol. Letters* 26:165-70.
- Goris, H., de Boer, F., & van der Waaij, D. 1986 Oral administration of antibiotics and intestinal flora-associated endotoxin in mice. *Scand. J. Infect. Dis.* 18:55-63.
- Gyure, L. A., Hall, J. G., Hobbs, S. M., & Jackson, L. E. 1991 IgA antibodies in the bile of rats. -V. Primacy of the GALT as a source of IgA. *Immunology* 72:85-8.
- Jacob, E., Baker, S. J., & Swaminathan, S. P. 1987 "M" cells in the follicle-associated epithelium of the human colon. *Histopathology* 11:941-52.
- Mossier, D. E., & Subbarao, B. 1982 Thymus-independent antigens: Complexity of B-lymphocyte activation revealed. *Immunol. Today* 3:217-22.

- Perlmutter, R. M., Hamsburg, D., Briles, D. E., Nicoletti, R. A., & Davie, J. M. 1978 Subclass restriction of murine anticarbohydrate antibodies. *J. Immunol.* 121:566-72.
- Perry, G. A., & Sharp, J. G. 1988 Characterization of proximal colonic lymphoid tissue in the mouse. *Anat. Rec.* 220:305-12.
- Perry, G. A., & Sharp, J. G. 1991 Functional and morphological aspects of proximal colonic lymphoid tissue, pp 487-92 *dalam*: B. A. Imhof, S. Berrih-Aknim & S. Ezine (eds.): *Lymphatic Tissues and in vivo Immune Responses*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Pierce, N. F., & Gowans, J. L. 1975 Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J. Exp. Med.* 142:1550-63.
- _____, _____, & Koster, F. T. 1980 Priming and suppression of the intestinal immune response to cholera toxoid/toxin in rats. *J. Immunol.* 124:307-311.
- Soesatyo, M., Biewenga, J., Jeurissen, S., & Sminia, T. 1990 The effects of Peyer's patches inactivation in the rat on the development of antibody-forming cells to intestinal antigen. *Immunobiology.* 181:97-107.
- _____, _____, Van Rooijen, N., & Sminia, T. 1991 The immune response of the rat to intestinally-administered thymus-dependent and thymus-independent antigens. *dalam*: A. Imhof, S. Berrih-Aknim & S. Ezine (eds.): *Lymphatic Tissues and in vivo Immune Responses*. pp. 493-96. Marcel Dekker Inc., New York.
- _____, Pery, G., & Sharp, G. J. 1994 Accessory cells in the proximal colonic lymphoid tissue of the rat. *Submitted.*
- Taylor, C. E., Stashak, P. W., Caldes, G., Prescott, B., Chused, T. E., Brooks, A., & Baker, P. J. 1983 Activation of antigen-specific suppressor T cells by B cells from mice immunized with type III pneumococcal polysaccharide. *J. Exp. Med.* 150:703-17.
- Van den Berg, T. K., Döpp, E. A., Breve, J. J. P., Kraal, G., & Dijkstra, C. 1989 The heterogeneity of the reticulum of rat peripheral lymphoid organs identified by monoclonal antibodies, *Eur. J. Immunol.* 19:1747-56.
- Van den Dobbelen, G. P. J. M., Van Rooijen, N., Sminia, T., & Van Rees, E. P. 1991 The immune response in rat to *Streptococcus pneumoniae* type 3 and 4 capsular polysaccharide; detection by double immunocytochemical staining of antibody-containing cells in situ and ELISA. *J. Immunol. Methods* 145:93-103.
- _____, Brunekreef, K., Sminia, T., & Van Rees, E. P. 1992 Effect of mucosal and systemic immunization with pneumococcal polysaccharide type 3, 4 and 14 in the rat. *Scand. J. Immunol.* 36:661-69.
-