

**KADAR SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A DAN
HUMAN β DEFENSIN-2 TINJA PADA NEONATUS
PREMATUR YANG MENDAPAT AIR SUSU IBU SAJA,
SUSU FORMULA SAJA, DAN KOMBINASI**

Tesis



Oleh :

PUTRI PRIMAWARDANI

Pembimbing :

**dr. Eko Sulistijono SpA (K)
dr. Hidayat Suyuti Sp.M, Ph.D**

**PROGRAM PENDIDIKAN PASCASARJANA
ILMU KEDOKTERAN BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS
BRAWIJAYA
MALANG
2019**

RINGKASAN

Putri Primawardani, NIM. 146070122011021. Program Pendidikan S2 Biomedik Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Oktober 2019. Pembimbing: dr. Eko Sulistijono Sp.A(K); dr. Hidayat Sujuti Sp.M, Ph.D.

Kelahiran prematur memengaruhi $\pm 10\%$ kelahiran hidup di seluruh dunia. Insiden sepsis neonatal terjadi pada 10-40% prematur (usia kehamilan ibu <37 minggu), dan bukti klinis menunjukkan bahwa etiologi patogen sepsis dapat terjadi karena translokasi bakteri dari saluran cerna, dimana kejadian inflamasi tersering berasal dari saluran cerna dan paling cepat terjadi pada usia 8—10 hari. Salah satu komponen kunci untuk meningkatkan angka harapan hidup neonatus prematur adalah pemberian nutrisi optimal yakni penggunaan air susu ibu (ASI). Air susu ibu mengandung zat bioaktif yang melindungi dari infeksi dan menginduksi kolonisasi flora normal yang berperan pada imunitas saluran cerna yakni melalui peran imunoglobulin dan peptida antimikroba.

Imunoglobulin dan peptida teridentifikasi pada tinja neonatus selama minggu pertama kehidupan, salah satunya yakni sekretori imunoglobulin A (SIgA) dan defensin. Sekretori imunoglobulin A yang terdeteksi dalam tinja merupakan bagian dari penghalang mukosa dan berperan protektif terhadap infeksi. Sementara itu, defensin yang disekresi pada epitel (terutama saluran cerna) dan berhubungan dengan reaksi inflamasi yakni *human β -defensin 2*. *Human β -defensin 2* (hBD-2) terbukti memiliki efek protektif selama peradangan dan apoptosis, serta mampu menstimulasi perbaikan epitel saluran cerna. Penelitian yang membandingkan pemberian nutrisi enteral dengan kejadian inflamasi saluran cerna masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui kadar sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* tinja sebagai biomarker inflamasi neonatus prematur terkait nutrisi yang dikonsumsi yakni ASI saja, susu formula saja, maupun ASI dan susu formula pada usia empat belas hari.

Tiga puluh sembilan neonatus prematur sesuai kriteria inklusi dikumpulkan pada bulan Juni sampai Agustus 2019 di ruang neonatologi RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan dikelompokkan menjadi tiga kelompok sampel penelitian (kelompok yang mendapatkan ASI saja, ASI dan susu formula, serta

susu formula saja). Karakteristik dasar sampel penelitian yang diamati adalah neonatus (jenis kelamin, cara persalinan, usia kehamilan, berat badan lahir, panjang badan lahir, dan lingkaran kepala), serta karakteristik dasar ibu (preeklampsia, eklampsia, riwayat ketuban pecah dini, dan kehamilan gemeli).

Kadar SIgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur diambil dari ketiga kelompok sampel pada hari keempat belas serta diukur dengan metode ELISA. Uji komparatif perbedaan *mean* kadar SIgA tinja dan hBD-2 tinja dari setiap kelompok sampel dilakukan dengan uji ANOVA.

Hasil penelitian menunjukkan kadar SIgA tinja tertinggi terdapat pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja (2091,2 µg/mL) dan nilai terendah (194,77 µg/mL) didapatkan pada kelompok neonatus prematur yang mendapatkan susu formula saja. Pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, kadar SIgA tinja pada (835,8—2091,2 µg/mL) lebih tinggi dibandingkan kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula (453,78—1104,02 µg/mL) serta kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja (194,77—714,87 µg/mL). Sementara itu, kadar hBD-2 tinja tertinggi diperoleh pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula yakni 492 ng/mL dan nilai terendah didapatkan pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja yakni 151,775 ng/mL. *Mean* hBD-2 tinja pada kelompok susu formula saja lebih tinggi dibandingkan kelompok lain ($375,73 \pm 69,13$), namun tidak berbeda bermakna dengan yang mengonsumsi ASI dan susu formula ($p=0,463$). Sebaliknya, *mean* kadar hBD-2 tinja neonatus prematur pada kelompok yang mengonsumsi ASI saja berbeda bermakna ($p=0,00$) terhadap kedua kelompok lainnya.

Dapat disimpulkan bahwa kadar SIgA tinja neonatus yang mengonsumsi ASI saja lebih tinggi bermakna dibandingkan kadar SIgA tinja pada kelompok neonatus yang mengonsumsi ASI dan susu formula maupun susu formula saja. Selain itu, kadar *human* β -defensin 2 tinja neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja lebih tinggi bermakna dibandingkan kadar *human* β -defensin 2 tinja neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, namun tidak berbeda signifikan dengan kadar hBD-2 tinja yang mengonsumsi ASI dan susu formula.

Pemberian nutrisi berupa ASI saja, ASI dan susu formula, maupun susu formula saja memengaruhi kadar SIgA dan *human* β -defensin 2 tinja.

SUMMARY

Putri Primawardani, ID. 146070122011021. Magister Study Program of Biomedical Science, Medical Faculty of University Brawijaya Malang, October 2019. Supervisor: dr. Eko Sulistijono Sp.A(K); dr. Hidayat Sujuti Sp.M, Ph.D.

Premature birth affects $\pm 10\%$ of live births worldwide. The incidence of neonatal sepsis occurs in 10-40% of preterm neonates (maternal gestational age <37 weeks), and clinical evidence shows etiology of neonatal sepsis occur due to bacteria translocation of digestive tract which earliest occurs at 8—10 days. One of the key components for increasing life expectancy in premature neonates is the provision of optimal nutrition by giving breast milk. Human breast milk contains bioactive substances that protect babies against infection and induce colonization of normal flora that have role in intestinal immunity. The bioactive substance of breast milk as a barrier function of digestive tract is through the role of immunoglobulins and antimicrobial peptides.

Immunoglobulins and peptides were identified in neonatal feces during the first week of life, one of which is secretory immunoglobulin A (SIgA) and defensins. The secretory immunoglobulin A (SIgA) detected in the stool is part of the mucosal barrier and plays a protective role against infection. Meanwhile, defensins are secreted in the epithelium (especially the digestive tract) and are associated with an inflammatory reaction are mainly human β -defensin 2. Human β -defensin 2 (hBD-2) has been shown to have a protective effect during inflammation and apoptosis, and is able to stimulate epithelial repair in gastrointestinal tract.

Thirty-nine preterm neonates according to inclusion criteria were collected from June to August 2019 in neonatology ward of Dr. Saiful Anwar Malang hospital and grouped into three research sample (breastfeeding, breast milk and preterm formula milk, and preterm formula milk). Basic characteristics of study samples were observed in neonate (gender, mode of delivery, gestational age, birth weight, birth length, and head circumference), and mother (preeclampsia, eclampsia, history of premature rupture of membranes, and *gemelli*). The level of SIgA and hBD-2 fecal of premature neonates were taken from three sample groups on the fourteenth days then measured by ELISA method. Comparative

test of mean differences in level of sIgA and hBD-2 feces from each sample group was carried out by ANOVA test.

This research showed the highest SIgA fecal levels were found in the group of preterm neonates who consumed breast milk (2091.2 $\mu\text{g/mL}$) and the lowest value (194.77 $\mu\text{g/mL}$) was found in the group who received formula milk. In the group who consumed breast milk, SIgA feces levels (835.8-2091.2 $\mu\text{g/mL}$) were higher than those in the preterm neonates who consumed breast milk and formula milk (453.78-1104.02 $\mu\text{g/mL}$) and premature neonates who consumed formula milk (194.77-714.87 $\mu\text{g/mL}$). Meanwhile, the highest levels of hBD-2 fecal were obtained in the preterm neonate who consumed formula milk which was 492 ng/mL and the lowest value was obtained in the preterm neonate who consumed breast milk which was 151.775 ng/mL. In the group who consumed breast milk, levels of hBD-2 fecal (151.77-272.77 ng/mL) were lower than those in the preterm neonate who consumed breast milk and formula milk or formula milk that is 304.27-430.27 ng/mL and 311.22 - 492.27 ng/mL.

This research concluded that level of SIgA fecal consuming breast milk is significantly higher than the level of SIgA fecal in the neonate group that consumes breast milk and formula milk or formula milk only. In addition, the levels of human β -defensin 2 fecal that consume formula milk are significantly higher than premature who consume breast milk, but not significantly different from the levels of hBD-2 fecal that consume breast milk and formula milk. Nutrition in the form of breast milk only, breast milk and formula milk, as well as formula milk only affects the levels of SIgA and human β -defensin 2 fecal.

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur hanya bagi Allah SWT, atas berkat rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Kadar *Secretary Immunoglobulin A* dan *Human Beta Defensin 2* Tinja pada Neonatus Prematur yang Mendapat Air Susu Ibu, Susu Formula, dan Kombinasi” dengan baik.

Dengan selesainya penyusunan tesis ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Hidayat Suyuti Sp.M, Ph.D sebagai Ketua Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan pembimbing, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, dan fasilitas bagi penulis untuk menyelesaikan tesis ini.
2. dr. Eko Sulistijono, Sp.A (K) sebagai pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing dan memberikan saran kepada penulis sehingga tesis ini dapat selesai dengan baik.
3. Prof. DR. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K) sebagai penguji yang telah banyak memberikan masukan dan koreksi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis.
4. dr. Satrio Wibowo, Msi, Med, Sp.A(K) sebagai penguji yang telah memberikan bimbingan, masukan dan koreksi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini dengan baik.
5. Seluruh staf pengajar Program Magister Ilmu Biomedik FK Universitas Brawijaya Malang, atas semua pengetahuan, bimbingan, dorongan, dan nasihat yang telah penulis terima selama proses penyusunan tesis ini.

6. Orang tua (Bapak Toto Priantoro dan Ibu Wiwi Widaningsih), yang telah mendidik, memberikan dukungan, nasehat, dan doa sehingga dapat mewujudkan cita-cita dan pencapaian sejauh ini.

7. Rekan-rekan sejawat mahasiswa/mahasiswi Program Magister Ilmu Biomedik yang telah bersama-sama penulis menempuh pendidikan dan membantu baik secara langsung ataupun tidak langsung dalam menyelesaikan penyusunan tesis ini.

8. Dan semua pihak yang telah memberikan bantuan dan saran demi selesainya tesis ini.

Semoga semua bantuan, saran, dan pengorbanan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan yang lebih baik dari Allah SWT.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam tesis ini, oleh karena itu penulis mohon saran yang membangun dan bermanfaat untuk perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tesis ini dapat memberi manfaat bagi pihak-pihak yang membutuhkan. *Amin Ya Rabbal'alamin.*

Malang, 13 Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN..... **ii**

SUMMARY..... **iv**

KATA PENGANTAR..... **vi**

DAFTAR ISI..... **viii**

DAFTAR GAMBAR..... **xii**

DAFTAR TABEL..... **xiv**

DAFTAR SINGKATAN..... **xv**

BAB I PENDAHULUAN..... **1**

1.1 Latar belakang **1**

1.2 Rumusan masalah **6**

1.2.1 Rumusan masalah umum **6**

1.2.2 Rumusan submasalah **6**

1.3 Tujuan penelitian..... **6**

1.3.1 Tujuan umum..... **6**

1.3.2 Tujuan khusus..... **7**

1.4 Manfaat penelitian..... **7**

1.4.1 Dalam bidang ilmu pengetahuan..... **7**

1.4.2 Dalam bidang pelayanan masyarakat **7**

BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... **9**

2.1 Imunoglobulin..... **9**

2.1.1 Imunoglobulin A..... **11**

2.1.2 Sekretori imunoglobulin A..... **14**

2.2 *Human Beta Defensin 2*..... **18**

2.2.1 Definisi defensin..... **18**

2.2.2 Fungsi human defensin..... **20**



2.3	Nutrisi neonatus prematur.....	22
2.3.1	Air susu ibu.....	22
2.3.1.1	Definisi.....	22
2.3.1.2	Jenis air susu ibu.....	23
2.3.1.3	Komposisi air susu ibu.....	24
2.3.2	Susu formula prematur.....	27
2.4	Anatomi dan fisiologi saluran cerna neonatus.....	32
2.4.1	Fisiologi saluran cerna neonatus.....	33
2.5	Sistem imunitas mukosa saluran cerna.....	38
2.5.1	Sistem imunitas mukosa saluran cerna pada neonatus prematur.....	48
2.6	Inflamasi saluran cerna.....	51
2.6.1	Sekretori imunoglobulin A pada inflamasi.....	57
2.6.2	<i>Human beta defensin 2</i> pada inflamasi usus.....	60
2.7	Biomarker tinja.....	66
2.8	Kerangka teori.....	70
BAB III KERANGKA KONSEP.....		71
3.1	Kerangka konsep.....	71
3.2	Hipotesis.....	74
BAB IV METODE PENELITIAN.....		75
4.1	Desain penelitian.....	75
4.2	Tempat dan waktu penelitian.....	75
4.3	Populasi dan sampel penelitian.....	75
4.3.1	Estimasi besar sampel.....	76
4.3.2	Kriteria inklusi sampel penelitian.....	76
4.3.3	Kriteria eksklusi sampel penelitian.....	76
4.4	Variabel penelitian.....	77

4.4.1	Variabel bebas	77
4.4.2	Variabel tergantung	77
4.5	Kelaikan Etik	77
4.6	Definisi operasional	77
4.6.1	Neonatus prematur	77
4.6.2	Air susu ibu	78
4.6.3	Susu formula neonatus prematur	78
4.6.4	Kombinasi air susu ibu dan susu formula	78
4.6.5	Sekretori imunoglobulin A	78
4.6.6	<i>Human beta defensin 2</i>	78
4.7	Alat dan bahan	79
4.7.1	Alat	79
4.7.2	Bahan	79
4.8	Metode	79
4.8.1	Pengambilan sampel tinja	79
4.8.2	Prinsip pemeriksaan kadar sekretori imunoglobulin A tinja dengan ELISA	80
4.8.3	Prinsip pemeriksaan kadar <i>human beta defensin 2</i> tinja dengan ELISA	81
4.9	Tehnik analisis statistik	83
4.10	Alur penelitian	83
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL		84
5.1	Karakteristik sampel penelitian	84
5.2	Kadar sekretori imunoglobulin A dan <i>human beta defensin 2</i> tinja	86
5.3	Hasil uji syarat parametrik	88
5.4	Uji komparatif kadar sIgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur	88
BAB VI PEMBAHASAN		90
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN		102
7.1	Kesimpulan	102



7.2 Saran	102
DAFTAR PUSTAKA	103
LAMPIRAN	111



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Imunoglobulin A13

Gambar 2.2 Reseptor IgA.....15

Gambar 2.3 Sekretori IgA manusia.....16

Gambar 2.4 Produksi sekretori IgA.....18

Gambar 2.5 Peptida antimikroba (AMPs).....21

Gambar 2.6 Fungsi defensin dalam saluran pencernaan.....22

Gambar 2.7 Kebutuhan protein dan energi pada neonatus prematur.....28

Gambar 2.8 Pertahanan imun mukosa pada instestinal neonatus terkait usia kehamilan37

Gambar 2.9 Sistem imun mukosa saluran cerna40

Gambar 2.10 *Barrier* epitel usus42

Gambar 2.11 Struktur *Apical Junctional Complex*.....45

Gambar 2.12 Faktor-faktor yang terlibat dalam adaptasi sistem imun alami mukosa intestinal pasca kelahiran.....47

Gambar 2.13 Hubungan faktor risiko dengan kejadian inflamasi saluran cerna.....51

Gambar 2.14 Patofisiologi inflamasi saluran cerna53

Gambar 2.15 Peranan TLR4 dalam perlukaan epitel saluran cerna.....56

Gambar 2.16 Representasi skematis dari mekanisme perlindungan IgA59

Gambar 2.17 *Toll like receptor* (TLR) memainkan peran penting dalam gangguan inflamasi mukosa gastrointestinal61

Gambar 2.18 Gambaran skematik mekanisme β defensin menginduksi *mikrobia killing*.....64

Gambar 2.19 Biomarker tinja untuk evaluasi saluran cerna67

Gambar 2.20 Potensi penggunaan berbagai biomarker fekal.69

Gambar 5.1 Kadar Slga tinja neonatus prematur pada kelompok ASI saja,
ASI dan susu formula, serta susu formula saja.....87

Gambar 5.2 Kadar hBD-2 tinja neonatus prematur pada kelompok ASI saja,
ASI dan susu formula, serta susu formula saja.....87



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Distribusi dan sumber beta defensin.....20

Tabel 2.2 Komponen air susu ibu.....26

Tabel 2.3 Perbandingan komposisi nutrisi pada air susu ibu dan susu formula neonatus prematur dan atterm.....32

Tabel 2.4 Berbagai tipe sel epitel dalam usus halus.....33

Tabel 2.5 Komponen sistem imun alami saluran cerna.....38

Tabel 2.6 Imaturitas *barrier* intestinal pada neonatus prematur.....49

Tabel 2.7 Perkembangan *Peyer's patches* pada fetus.....50

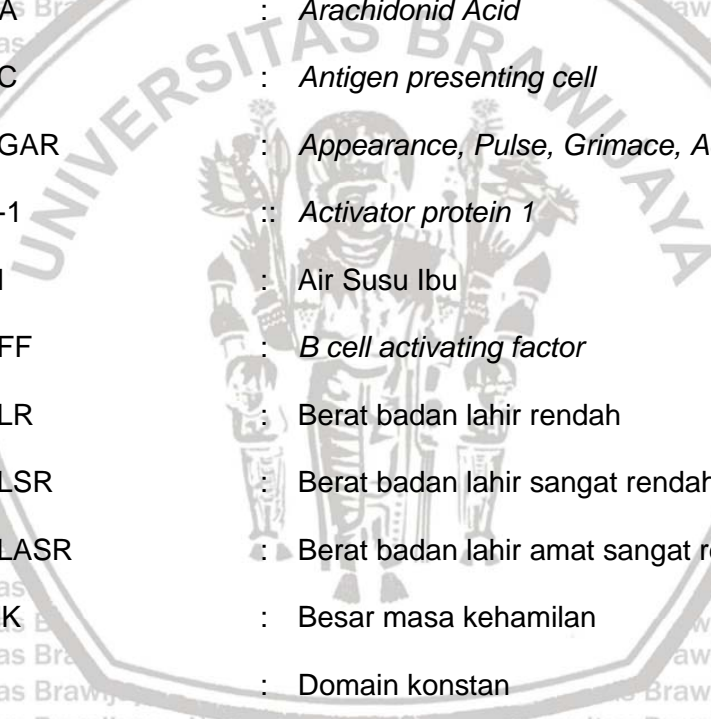
Tabel 5.1 Karakteristik dasar sampel penelitian85

Tabel 5.2 Hasil uji komparatif kadar sIgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur89

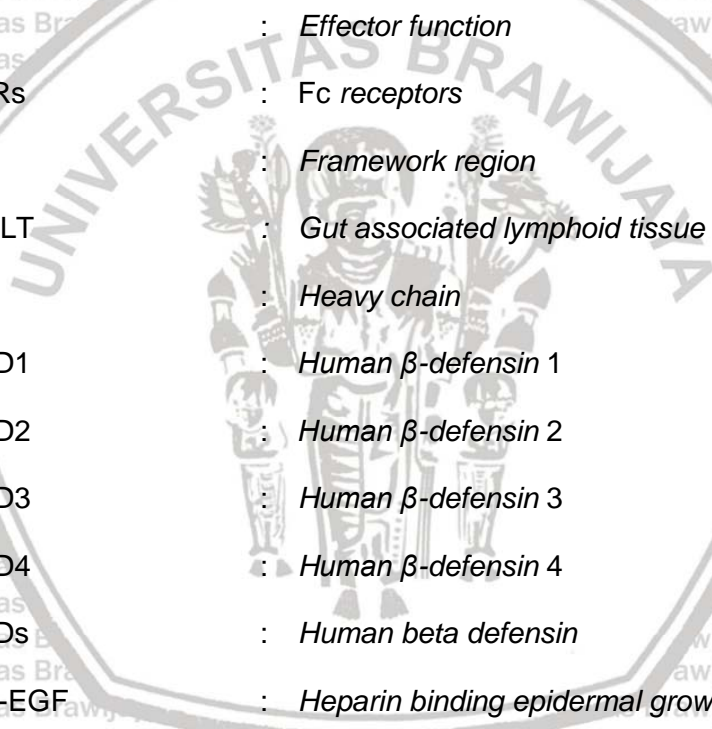


DAFTAR SINGKATAN

- AAT : *Alfa 1 antitrypsin*
- Ag : *Antigen*
- AJ : *Adherens junction*
- AJC : *Apical junction complex*
- AMP : *Antimikroba Peptida*
- ANOVA : *Analysis of Variance*
- APRIL : *A proliferation inducing ligand*
- ARA : *Arachidonid Acid*
- APC : *Antigen presenting cell*
- APGAR : *Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration*
- AP-1 : *Activator protein 1*
- ASI : *Air Susu Ibu*
- BAFF : *B cell activating factor*
- BBLR : *Berat badan lahir rendah*
- BBLSR : *Berat badan lahir sangat rendah*
- BBLASR : *Berat badan lahir amat sangat rendah*
- BMK : *Besar masa kehamilan*
- C : *Domain konstan*
- CCRs : *Chemokine receptor*
- CDR : *Complementarity determining region*
- CD : *Cluster of Differentiation*
- Cl : *Clorida*
- CPAP : *Continous positive airway pressure*
- Cys : *Cystein*
- DAMP : *Damage-associated molecular patterns*



DC/DCs	:	<i>Dendritic cells</i>
DHA	:	<i>Docoso Hexsaconic Acid</i>
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EBM	:	<i>Expressed breast milk</i>
EGF	:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EKN	:	<i>Enterokolitis nekrotikan</i>
ELISA	:	<i>Enzyme-linked immunosorbentassay</i>
Epo	:	<i>Erythropoetin</i>
Fab	:	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	:	<i>Effector function</i>
FcRs	:	<i>Fc receptors</i>
FR	:	<i>Framework region</i>
GALT	:	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
H	:	<i>Heavy chain</i>
hBD1	:	<i>Human β-defensin 1</i>
hBD2	:	<i>Human β-defensin 2</i>
hBD3	:	<i>Human β-defensin 3</i>
hBD4	:	<i>Human β-defensin 4</i>
hBDs	:	<i>Human beta defensin</i>
HB-EGF	:	<i>Heparin binding epidermal growth factor-like growth factor</i>
HDP	:	<i>Human defensin protein</i>
HMF	:	<i>Human milk fortifier</i>
HNP	:	<i>Human neutrophil peptide</i>
HRP	:	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IECs	:	<i>Intestinal epithelial cell</i>
IELs	:	<i>Intestinal epithelial lymphocytes</i>



IESC	: <i>Intestinal epithelial stem cells</i>
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobulin
IgA	: Immunoglobulin A
IgM	: Immunoglobulin M
IgD	: Immunoglobulin D
IgE	: Immunoglobulin E
IgG	: Immunoglobulin G
IGF	: <i>Insulin like Growth Factor</i>
IMD	: Inisiasi menyusui dini
IMT	: Indeks masa tubuh
IL	: <i>Interleukin</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1β</i>
ILF	: <i>Isolated lymphoid follicles</i>
ITAM	: <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
kDa	: Kilo Dalton
KMK	: Kecil masa kehamilan
L	: <i>Light chain</i>
LP	: Lamina propia
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
LTB4	: Leukotrien B4
MALT	: <i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCT	: <i>Medium chain trigliserida</i>
MLN	: <i>Mesenteric lymph node</i>
mOsm	: miliosmole
muc	: mucin



MYD88 : *Myeloid differentiation primary response 88*

NOD : *Nucleotide-binding oligomerization domains*

NFKB : *Nuclear transcription factor kB*

OPG : *Osteoprotegerin*

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PCs : *Paneth cells*

pDC : *Plasmacytoid dendritic cell*

PDF : *Post discharge formula*

PGN : *Peptidoglikan*

pH : *Potensial hidrogen*

plg : *Polimer immunoglobulin / imunoglobulin polimer*

plgA : *Polimer immunoglobulin A*

plgR : *Polimer immunoglobulin receptor / reseptor*

imunoglobulin polimer

PMA : *Phorbol 12-myristate 13 acetate*

PRRs : *Pattern recognition receptors*

PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acid*

p53 : *Protein 53*

RALDP2 : *Retinaldehyde dehydrogenase type 2*

RNA : *Ribonucleic acid*

RPM : *Rate per minutes*

RSCM : *Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo*

RSSA : *Rumah Sakit Saiful Anwar*

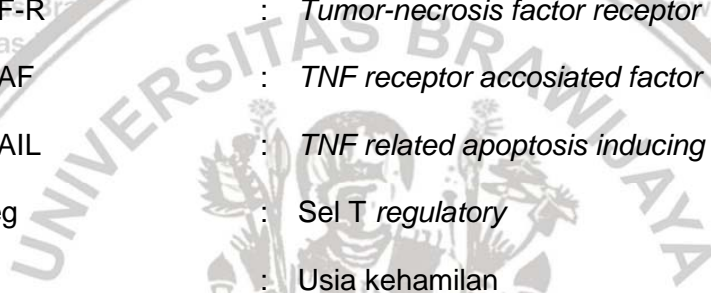
SC : *Secretory component / komponen sekretori*

SCFAs : *Short chain fatty acid*

Sel M : *Sel mikrofold*

slgA : *Sekretori IgA*

- SPSS : *Statistical Package for the Social Sciences*
- TCR : *T cell receptor*
- Th : *T helper*
- TipDC : *TNF- α /iNOS-producing dendritic cell*
- TJ : *Tight junction*
- TGF- β : *Transforming growth factor beta*
- TLRs : *Toll like receptor*
- TMB : *Tetramethylbenzidine*
- TNF : *Tumor-necrosis factor*
- TNF-R : *Tumor-necrosis factor receptor*
- TRAF : *TNF receptor accosiated factor*
- TRAIL : *TNF related apoptosis inducing ligand*
- Treg : *Sel T regulatory*
- UK : *Usia kehamilan*
- V : *Variabel*
- VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
- WHO : *World Health Organization*



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara global, pada tahun 2015 dilaporkan lima juta kematian anak berusia dibawah lima tahun dengan 46% terjadi pada periode neonatal (Smith *et al.*, 2017). Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) juga melaporkan bahwa terdapat 6,6 juta anak di bawah usia lima tahun meninggal pada tahun 2012, dengan 44% kematian pada masa neonatal (Bericelli *et al.*, 2015). Neonatus prematur dan berat badan lahir rendah memiliki risiko yang lebih tinggi untuk terjadinya kematian tersebut. Amerika Serikat menunjukkan bahwa kejadian infeksi bakteri onset dini pada neonatus dengan berat badan lahir sangat rendah adalah 1,5% dan untuk infeksi bakteri onset lambat (lebih dari usia 3 hari) adalah 25% (Utomo, 2010).

Kelahiran prematur mempengaruhi kira-kira satu dari sepuluh kelahiran hidup di seluruh dunia (WHO, 2012). Sepsis neonatal banyak terjadi pada neonatus prematur, prevalensi sepsis neonatal meningkat dari 2% pada neonatus usia kehamilan 32 sampai <37 minggu (*moderately preterm infants*), 10-20% pada neonatus dengan usia kehamilan 28 sampai 32 minggu (*very preterm infants*), dan 30-40% pada neonatus dengan usia kehamilan <28 minggu (*extremely preterm infants*) (Stol *et al.*, 2002; Spearman *et al.*, 2013). Bukti klinis menunjukkan bahwa etiologi patogen sepsis neonatal dapat terjadi karena translokasi dari saluran cerna neonatus prematur (Soeorg *et al.*, 2013).

Enterokolitis nekrotikans (EKN) merupakan penyakit nekrotik iskemik akut saluran cerna terbanyak yang terutama terjadi pada neonatus prematur. Enterokolitis nekrotikans disebabkan oleh berbagai faktor yang mengakibatkan gangguan integritas dan fungsi saluran cerna. Insidens EKN berkisar 1-5% dari

setiap 1000 kelahiran hidup dan sering terjadi pada neonatus berat lahir rendah (BBLR) dengan insidensi 6—10% maupun neonatus berat lahir sangat rendah (BBLSR), dengan angka kematian mencapai 20-30%. Selama tahun 2009, divisi perinatologi departemen ilmu kesehatan anak (IKA) Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) mendapatkan 31 kasus EKN dari sekitar 737 kelahiran kurang bulan (Neu & Walker, 2011; Ramani & Ambalavanan, 2013; Juniarto & Kadim, 2014).

Terkait hal tersebut, dibutuhkan strategi untuk meningkatkan angka harapan hidup neonatus prematur, salah satunya yakni pemberian nutrisi optimal untuk mengurangi masalah yang sering terjadi yakni *feeding intolerance* hingga menyebabkan gangguan nutrisi (Frost, 2014). Strategi yang telah terbukti mengurangi kejadian infeksi, alergi dan *feeding intolerance* pada neonatus prematur adalah penggunaan air susu ibu (ASI). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian air susu ibu dalam 24 jam pertama mampu mengurangi angka kematian 2,4 kali lipat di Ghana dan menurunkan risiko 1,4 kali lipat di Nepal bila dibandingkan dengan pemberian susu formula. Bahkan penelitian di Nepal memperkirakan bahwa inisiasi menyusui pada jam pertama kelahiran dapat mencegah 19% kematian neonatus (Hanson & Korotkova, 2012; Edmond *et al.*, 2016).

Air susu ibu dikaitkan dengan perlindungan terhadap berbagai macam penyakit seperti diare, infeksi saluran pernafasan, dan enterokolitis nekrotikan. Perlindungan ASI terjadi melalui berbagai faktor pertahanan komplementer dan bawaan yang ditemukan pada susu manusia, termasuk antibodi sekretori IgA, oligosakarida dan glikokonjugat, serta peptida antimikroba (AMPs) (Hanson & Korotkova, 2012; Bericelli *et al.*, 2015). Selain komponen tersebut, air susu ibu juga mengandung substansi bioaktif yang berperan meningkatkan maturasi dan

mempertahankan integritas mukosa saluran cerna seperti sekretori imunoglobulin A (SIgA), kalprotektin, serta *alfa 1 antitrypsin* (AAT) (Hayati *et al.*, 2016).

Maturitas saluran cerna merupakan suatu proses dinamis yang terjadi terus menerus dari lahir sampai dengan usia 1—2 tahun, penilaian terhadap maturitas saluran cerna dapat dilihat dari permeabilitas, produksi sekretori imunoglobulin, dan peptida antimikroba. Integritas saluran cerna berhubungan erat dengan kondisi maturitas dimana perubahan permeabilitas mempengaruhi kemungkinan terjadinya infeksi. Pemeriksaan integritas saluran cerna pada neonatus merupakan hal yang cukup penting untuk menilai kesehatan saluran cerna dan deteksi dini inflamasi (Hayati *et al.*, 2016).

Sekretori imunoglobulin A merupakan salah satu marker integritas saluran cerna yang dapat dideteksi pada tinja neonatus. Imunoglobulin A disekresikan oleh selaput lendir dan penting untuk kekebalan mukosa terutama saluran cerna. Antibodi ini dalam bentuk dimer disebut sebagai sekretori imunoglobulin A yang membentuk pertahanan terhadap toksin dan organisme patogen (Corthesy, 2010). Molekul ini secara normal ditemukan dalam tinja sebagai akumulasi SIgA yang disekresi oleh *saliva*, *bile* dan cairan intestinal. Sekretori imunoglobulin A yang terdeteksi dalam tinja merupakan bagian dari penghalang mukosa dan berperan protektif terhadap infeksi, oleh karena itu sesuai literatur sebelumnya, SIgA dianggap sebagai penanda kesehatan saluran cerna (Dion, 2004; Corthesy, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Hayati *et al.*, 2016 membuktikan bahwa SIgA didapatkan lebih banyak pada neonatus yang mengonsumsi ASI dibandingkan susu formula dengan interpretasi peningkatan SIgA tinja berbanding lurus dengan imunitas saluran cerna. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Campeotto *et al.*, 2011 menunjukkan neonatus dengan kadar SIgA yang lebih tinggi dalam observasi selama dua minggu tidak didapatkan

keluhan saluran cerna dibandingkan neonatus dengan kadar SIgA rendah.

Mohan *et al.*, 2008 melaporkan didapatkan peningkatan sekretori IgA tinja pada neonatus prematur yang diberikan prebiotik *B. lactis* Bb12 selama 3 minggu.

Begitu pula penelitian yang dilakukan oleh Retnaningtyas *et al.*, 2008 menunjukkan kelompok neonatus yang mengonsumsi prebiotik memiliki kadar SIgA tinja lebih tinggi, hal ini diasumsikan sebagai peningkatan sistem pertahanan saluran cerna.

Selain sekretori imunoglobulin, peptida juga merupakan substansi bioaktif untuk menilai inflamasi saluran cerna. Beberapa peptida teridentifikasi pada mekonium dan tinja neonatus selama minggu pertama kehidupan, salah satunya yakni defensin (Campeotto *et al.*, 2010). Defensin merupakan pertahanan lini pertama dalam melawan infeksi. Defensin yang disekresi pada epitel saluran cerna dan berhubungan dengan reaksi inflamasi yakni *human β -defensin 2*. *Human β -defensin 2* terbukti memiliki efek protektif selama peradangan dan apoptosis, serta mampu menstimulasi perbaikan epitel pada saluran cerna (Otte *et al.*, 2008).

Penelitian tentang kadar *human β -defensin 2* tinja pada neonatus prematur dihubungkan dengan riwayat pemberian nutrisi enteral masih terdapat hasil yang terbatas. Penelitian pertama terkait nutrisi enteral dan *human β -defensin 2* di Indonesia dilakukan oleh Corebima, 2017 menunjukkan kadar *human β -defensin 2* tinja neonatus prematur usia 14 hari secara signifikan lebih rendah pada neonatus yang mengonsumsi air susu ibu dibandingkan kelompok neonatus yang mengonsumsi kombinasi ASI dengan susu formula maupun susu formula saja. Hal ini menunjukkan proses inflamasi di saluran cerna secara signifikan lebih tinggi terjadi pada kelompok neonatus yang mengonsumsi susu formula baik kombinasi maupun tidak. Penelitian lain terkait *human β -defensin 2* dilakukan oleh Campeotto *et al.*, 2010 menunjukkan bahwa *human β -defensin 2*

sangat mudah diukur dan selalu terdeteksi pada tinja neonatus baru lahir serta menunjukkan pertahanan dalam minggu pertama kehidupan. Avula *et al.*, 2017 menunjukkan bahwa *human β -defensin 2* tinja tereksresi rendah pada inflamasi saluran cerna berat, hal ini dijelaskan sebagai akibat respon imunitas yang tidak adekuat terhadap bakteri luminal. Penelitian lainnya menunjukkan peningkatan *human β -defensin 2* pada mukosa kolon yang mengalami inflamasi (Pang *et al.*, 2014). Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Campeotto *et al.*, 2010 bahwa peningkatan *human β -defensin 2* mencerminkan kuatnya respon imun intestinal sehingga bila terdapat inflamasi saluran cerna yang berat akan meningkatkan kadar *human β -defensin 2* dalam tinja.

Meskipun infeksi saluran cerna merupakan salah satu penyebab kesakitan utama pada neonatus prematur, namun diagnosis definitif untuk menegakkan infeksi tersebut merupakan hal yang cukup sulit oleh karena kondisi klinis serta pemeriksaan penunjang menunjukkan hasil yang relatif sama dengan manifestasi klinis akibat masalah diluar saluran cerna (Avula *et al.*, 2017). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menurunkan angka morbiditas bahkan mortalitas akibat infeksi saluran cerna yakni adanya biomarker tidak invasif yang mampu mendeteksi dini inflamasi saluran cerna bahkan sebelum munculnya gejala klinis. Biomarker tinja menjadi salah satu pilihan pemeriksaan yang tidak invasif dan diharapkan mampu merefleksikan inflamasi serta kondisi patologis spesifik pada saluran cerna (Campeotto *et al.*, 2010).

Peningkatan sekretori imunoglobulin A pada sampel tinja neonatus diinterpretasikan bahwa neonatus memiliki mekanisme pertahanan pertama yang baik. Hal ini oleh karena peningkatan SIgA mampu mencegah adhesi bakteri patogen ke lamina propia sehingga diharapkan mengurangi inflamasi (Dion *et al.*, 2004). Penelitian pendahuluan yang membedakan SIgA dan hBD 2 tinja dilakukan oleh Kabeerdoos *et al.*, 2011 menggunakan tinja wanita dewasa

dengan interval usia 18—21 tahun. Peneliti memberikan perlakuan berupa konsumsi yoghurt yang mengandung *Bifidobacterium lactis* Bb12 selama satu minggu dengan hasil penelitian menunjukkan hanya didapatkan peningkatan kadar SIgA tinja dengan kadar hBD2 tinja tidak meningkat selama observasi. Penelitian yang membandingkan pemberian air susu ibu dan susu formula terhadap kadar *human β -defensin 2* tinja dan sekretori imunoglobulin A tinja neonatus masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui kadar sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* tinja sebagai biomarker inflamasi mukosa saluran cerna pada neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, susu formula saja, maupun kombinasi pada usia empat belas hari.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Bagaimanakah kadar sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja?

1.2.2 Rumusan Submasalah

1. Bagaimanakah kadar sekretori imunoglobulin A dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja?
2. Bagaimanakah kadar *human β -defensin 2* dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan adanya perbedaan kadar sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* dalam tinja pada neonatus prematur yang mengonsumsi air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan adanya perbedaan kadar sekretori imunoglobulin A dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.
2. Membuktikan adanya perbedaan kadar *human β -defensin 2* dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Dalam Bidang Ilmu Pengetahuan

Temuan ini dapat mengetahui perbedaan kadar sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* dalam tinja pada neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja, kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.

1.4.2 Dalam Bidang Pelayanan Kesehatan

Temuan ini dapat mengetahui pengaruh pemberian ASI maupun susu formula terhadap kejadian inflamasi saluran cerna pada prematur dan diharapkan mendapatkan kandidat marker noninvasif yang mampu mendeteksi dini inflamasi saluran cerna meskipun belum adanya manifestasi klinis, sehingga dapat menunjang data dalam upaya pencegahan infeksi saluran cerna (termasuk EKN) yang nantinya

diharapkan mampu mengurangi angka morbiditas dan mortalitas neonatus.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Imunoglobulin

Imunoglobulin adalah protein heterodimerik yang terdiri dari dua *heavy chain* (H) dan dua *light chain* (L). Mereka dapat dipisahkan secara fungsional menjadi domain variabel (V) yang mengikat antigen dan domain konstan (C) yang menentukan fungsi efektor seperti aktivasi komplemen atau mengikat reseptor Fc. Domain variabel dibuat melalui serangkaian peristiwa penataan ulang gen yang kompleks dan kemudian mengalami hipermutasi somatik setelah paparan antigen yang memungkinkan terjadinya pematangan afinitas. Setiap domain V dapat dibagi menjadi tiga urutan variabilitas, disebut regio penentu komplementaritas atau *complementarity determining region* (CDR), dan empat urutan regio yang konstan secara relatif disebut regio kerangka kerja atau *framework region* (FR). Tiga CDR rantai H dipasangkan dengan tiga CDR rantai L untuk membentuk area pengikatan antigen, sebagaimana didefinisikan secara klasik. Terdapat lima kelas utama dari domain *heavy chain* C. Setiap kelas mendefinisikan isotipe IgM, IgG, IgA, IgD, dan IgE. IgG dapat dibagi menjadi empat *subclass*, IgG1, IgG2, IgG3, dan IgG4, masing-masing dengan sifat biologisnya sendiri dan IgA juga dapat dibagi menjadi IgA1 dan IgA2. Domain konstan rantai H dapat diubah untuk memungkinkan perubahan fungsi efektor ketika mempertahankan spesifisitas antigen (Schroeder & Cavacini, 2010).

Pada awal pengembangan sel B, domain variabel yang disusun ulang secara produktif (H dan L) diekspresikan dalam kaitannya dengan rantai berat μ untuk menghasilkan IgM dan kemudian IgD dengan cara *splicing* alternatif. Kemudian selama pengembangan serta sebagai respons terhadap stimulasi antigenik dan regulasi sitokin, domain variabel ini dapat berhubungan dengan

isotipe lain (IgG, IgA, dan IgE) dalam proses terkontrol. Artinya, peralihan isotipe tidak terjadi hanya secara kebetulan. Gen CH untuk setiap isotipe diselaraskan dalam orientasi transkripsi yang sama, pada kromosom 14 manusia. Isotipe dibedakan dalam sejumlah sifat termasuk ukuran, fiksasi komplemen, pengikatan FcRs (Fc receptors) dan respons isotipe terhadap antigen. Pilihan isotipe tergantung pada antigen itu sendiri dan jalur pensinyalan yang diaktifkan, serta lingkungan mikro setempat (Schroeder & Cavacini, 2010).

Imunoglobulin M adalah imunoglobulin pertama yang diekspresikan selama perkembangan sel B. Antibodi IgM dikaitkan dengan respons imun primer dan sering digunakan untuk mendiagnosis paparan akut suatu imunogen atau patogen. Mengingat bahwa IgM diekspresikan awal dalam pengembangan sel B, rantai berat μ berhubungan dengan H dan L yang belum mengalami banyak mutasi somatik sebagai respons terhadap antigen. Akibatnya, antibodi IgM cenderung lebih poli-reaktif daripada isotipe lain yang memungkinkan sel B yang mengandung IgM untuk merespon dengan cepat berbagai antigen. Antibodi IgM yang relatif rendah juga disebut antibodi alami. Beberapa antibodi alami ini tidak hanya berperan sebagai lini pertahanan pertama, tetapi juga berperan dalam imunoregulasi. Antibodi alami dapat bereaksi dengan autoantigen, tetapi jarang bertanggung jawab atas penyakit autoimun atau pathogenesis (Schroeder & Cavacini, 2010).

Imunoglobulin D yang bersirkulasi ditemukan pada level yang sangat rendah dalam serum dengan waktu paruh pendek yang dikaitkan dengan sensitivitas molekuler. Fungsi imunoglobulin D pada sirkulasi masih belum terlalu jelas. Imunoglobulin D yang bersirkulasi dapat bereaksi dengan protein bakteri tertentu, seperti protein pengikat IgD dari *Moraxella catarrhalis*, yang tidak tergantung pada regio variabel dari antibodi. Pengikatan protein bakteri ke

daerah konstan IgD akan menstimulasi dan mengaktifasi sel B (Schroeder & Cavacini, 2010).

Imunoglobulin G adalah isotipe dominan yang ditemukan dalam tubuh.

Imunoglobulin D memiliki paruh paruh terpanjang dari semua isotipe imunoglobulin dan merupakan kelas imunoglobulin yang paling banyak dipelajari.

Subkelas spesifik dapat dikaitkan dengan proses penyakit. Antibodi IgG juga berkontribusi langsung pada respon imun termasuk netralisasi toksin dan virus (Schroeder & Cavacini, 2010).

Kadar IgA jauh lebih tinggi daripada IgG pada permukaan mukosa dan sekresi, termasuk air liur dan ASI. Secara khusus, IgA dapat berkontribusi hingga 50% dari protein dalam kolostrum. Pada umumnya, bentuk IgA di mukosa disebut sebagai sekretori IgA (SIgA) yang merupakan dimer, terkadang trimer atau tetramer. IgA sangat penting dalam melindungi permukaan mukosa dari toksin, virus dan bakteri dengan netralisasi langsung atau dengan mencegah ikatan pada permukaan mukosa. IgA intraseluler juga penting dalam mencegah infeksi bakteri dan virus. Sifat polimerik sekresi IgA sangat penting, sebagai contoh, IgA polimer lebih efektif daripada IgA monomerik dalam mencegah kerusakan akibat toksin bakteri pada sel epitel (Schroeder & Cavacini, 2010).

Imunoglobulin E merupakan imunoglobulin dengan konsentrasi serum terendah dan waktu paruh terpendek, namun merupakan imunoglobulin yang sangat kuat. Imunoglobulin E berhubungan dengan hipersensitivitas dan reaksi alergi serta respons terhadap infeksi cacing parasit (Schroeder & Cavacini, 2010).

2.1.1 Imunoglobulin A

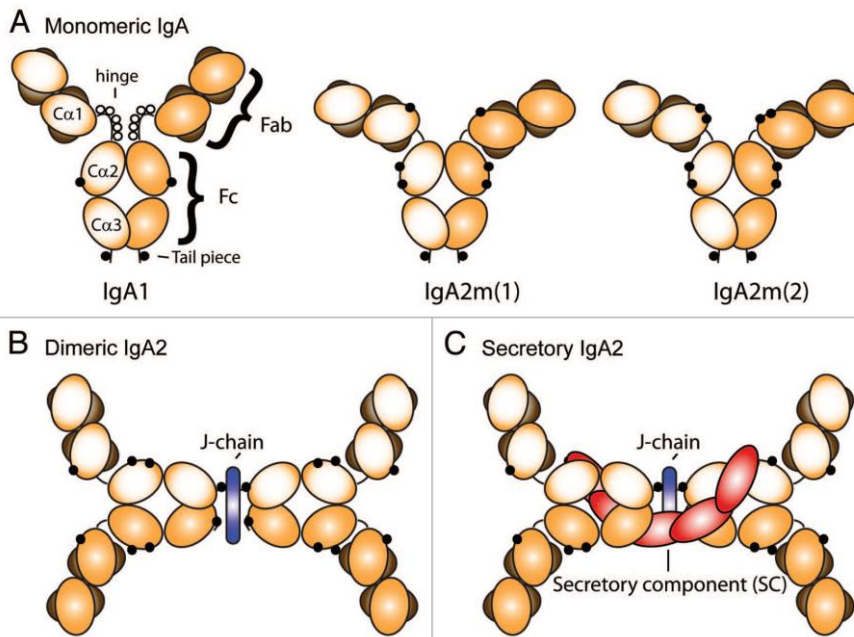
Dalam tubuh manusia, imunoglobulin (Ig) A diproduksi 66 mg/kg/hari setiap harinya merupakan imunoglobulin yang diproduksi paling banyak dibandingkan semua isotipe antibodi lainnya meskipun digabungkan. Selain

menjadi kelas antibodi paling dominan di mukosa, IgA juga merupakan antibodi yang terdapat dalam sirkulasi. Melalui bentuk ekspresi yang berbeda dan interaksi dengan beberapa reseptor yang berbeda, IgA dapat secara pasif dan aktif menghambat atau memulai respons inflamasi, *prototypic myeloid IgA Fc receptor FcαRI* (CD89) berperan penting dalam beberapa proses ini (Bakema & Egmond, 2011).

Imunoglobulin A sebagian besar hadir sebagai monomer dalam serum manusia, sedangkan pada hewan merupakan molekul polimer. Pada manusia, terdapat dua subclass dari IgA yakni IgA1 dan IgA2 yang saling berhubungan erat [terbagi dalam IgA2m (1) dan IgA2m (2)], yang berbeda pada ikatan 18 asam amino di *hinge region*, dengan *hinge region* pada IgA1 adalah 13 asam amino yang lebih panjang daripada IgA2. Akibatnya, berdasarkan pemodelan molekuler, diperkirakan bahwa IgA1 memiliki jangkauan pengenalan antigen yang lebih luas dan berjarak jauh, tetapi lebih rentan terjadinya proteolisis. Karena IgA2 tidak memiliki *hinge region* yang luas sehingga komponen ini tidak terlalu rentan terhadap protease bakteri, hal tersebut yang mungkin mendasari alasan dominasi IgA2 dalam sekresi mukosa (Bakema & Egmond, 2011).

Pada manusia, IgA diekspresikan dalam tiga bentuk berbeda. Satu hingga tiga mg/mL serum IgA dalam sirkulasi sebagai monomer, sedangkan IgA di tempat mukosa diproduksi sebagai molekul polimer. Kebanyakan sel plasma mukosa menghasilkan IgA dimer, yang menggabungkan jembatan disulfida pada terminal-C dari rantai α tunggal dari setiap molekul IgA dengan 16 kDa yang bergabung dengan rantai-J. Imunoglobulin A dimerik, memiliki rantai-J berikat dengan reseptor Ig polimer (pIgR), yang diekspresikan pada membran basolateral sel epitel yang kemudian ditransport melalui sel epitel dan dilepaskan ke dalam lumen sebagai sekretori IgA. Melalui rute ini, SIgA disekresikan ke dalam selaput lendir saluran pencernaan, urogenital dan saluran pernapasan,

serta ke dalam air mata, air liur dan susu. Pembelahan apikal pIgR memastikan bahwa bagian dari reseptor yang disebut sebagai komponen sekretori (SC) tetap melekat pada IgA dimana komponen sekretori tersebut berfungsi menstabilkan IgA dan mencegah kerusakan akibat lingkungan yang tidak bersahabat pada lumen saluran cerna (Bakema & Egmond, 2011).



Gambar 2.1 Imunoglobulin A

Keterangan: Model skematik dari (A) IgA1 manusia monomer, IgA2m (1) dan IgA2m (2), (B) IgA2 dimeric dan (C) IgA2 sekretori. Rantai berat digambarkan dalam oranye terang dan gelap, sedangkan rantai ringan ditampilkan dalam warna coklat. J-chain atau komponen sekretori (SC) masing-masing ditandai dengan biru atau merah. IgA1 mengandung oligosakarida terkait O di *hinge region*, yang digambarkan sebagai lingkaran putih, sedangkan oligosakarida terkait-N ditampilkan sebagai lingkaran hitam.

Sumber: Bakema & Egmond, 2011

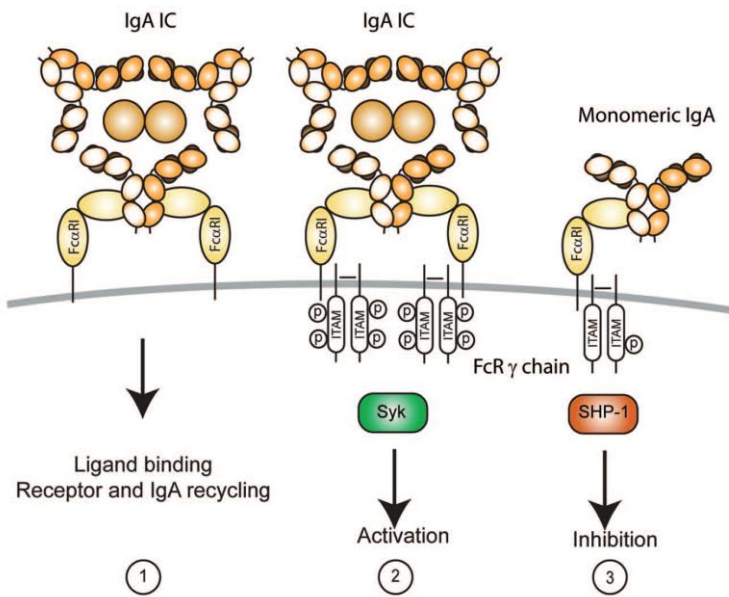
Regio mukosa, dimana IgA adalah kelas antibodi yang paling dominan, merupakan permukaan kritis yang memisahkan bagian dalam dengan dunia luar.

Pada regio tersebut, dibutuhkan keseimbangan yang baik antara pertahanan imunologis efektif terhadap mikroorganisme patogen serta menghindari reaksi terhadap mikroba komensal dan antigen lingkungan. Sekretori IgA memainkan peran penting sebagai garis pertahanan pertama dengan membentuk *anti-septic covering* mukosa yang dapat menghambat adhesi mikroorganisme. Mekanisme

lain yang ditampilkan oleh SIgA termasuk kemampuan untuk menggumpalkan mikroba, mengganggu motilitas bakteri melalui interaksi dengan flagela dan menetralkan produk bakteri seperti enzim dan toksin. Selain itu, IgA dimerik memiliki kemampuan untuk menetralkan virus secara intraseluler dengan memotong partikel virus dan mengganggu replikasi atau perakitan virus saat dalam perjalanan melalui sel epitel yang terinfeksi. Kompleks IgA-virus selanjutnya dapat diekskresikan ke dalam lumen. Penambahan IgA anti-virus spesifik ke permukaan basolateral sel epitel terpolarisasi terbukti mengurangi titer virus Sendai, rotavirus, influenza dan *human immunodeficiency virus*. Sedangkan IgA polimer terbukti mampu bereaksi terhadap bakteri dan toksin A dari *Clostridium difficile* sehingga mencegah penghancuran monolayer epitel (Bakema & Egmond, 2011).

Efek perlindungan IgA lebih jelas pada manusia karena adanya Fc α RI dimana merupakan salah satu reseptor imunoglobulin yang berikatan dengan IgA dan berperan dalam fagositosis oleh IgA (Bakema & Egmond, 2011). Bakteri *Escherichia coli* yang telah diopsonisasi dengan serum IgA manusia akan difagositosis oleh sel-sel yang mengekspresikan Fc α RI yang juga mendukung peran IgA dalam pembersihan patogen sistemik. Granulosit neutrofilik (neutrofil) juga terlibat dalam respons protektif yang dimediasi IgA terhadap patogen. Telah dibuktikan pula bahwa IgA monomer dan dimer memiliki kemampuan unik untuk menginduksi migrasi neutrofil secara langsung, sedangkan isotipe antibodi lain seperti IgG dan IgM menginduksi migrasi neutrofil secara tidak langsung, melalui aktivasi jalur komplemen klasik (menghasilkan *chemoattractants* C3a dan C5a).

Setelah *cross-linking* dari Fc α RI, neutrofil melepaskan LTB₄, yang merupakan *chemoattractant* neutrofil yang kuat. Dengan demikian migrasi neutrofil dimulai sampai agen infeksius dihilangkan (Bakema & Egmond, 2011).



Gambar 2.2 Reseptor IgA

Keterangan: FcγRI memulai hasil fungsional yang berbeda tergantung pada mode interaksi dengan IgA atau rantai FcRγ; (1) Fungsionalitas dari FcγRI reseptor “γ-less” terbatas pada internalisasi pengikatan ligan dan reseptor; (2) Hubungan silang FcγRI melalui kompleks imun IgA (IC) menginisiasi forforilasi (p) kuat FcRγ chain ITAM yang melibatkan Syk, menghasilkan respons aktivasi dan pro-inflamasi. (3) Pengikatan IgA monomerik ke FcγRI memediasi fosforilasi lemah FcRγ chain ITAM dan perekrutan SHP-1, memunculkan sinyal penghambatan, yang dapat menekan aktivasi melalui reseptor Fc lainnya. ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*.

Sumber: Bakema & Egmond, 2011

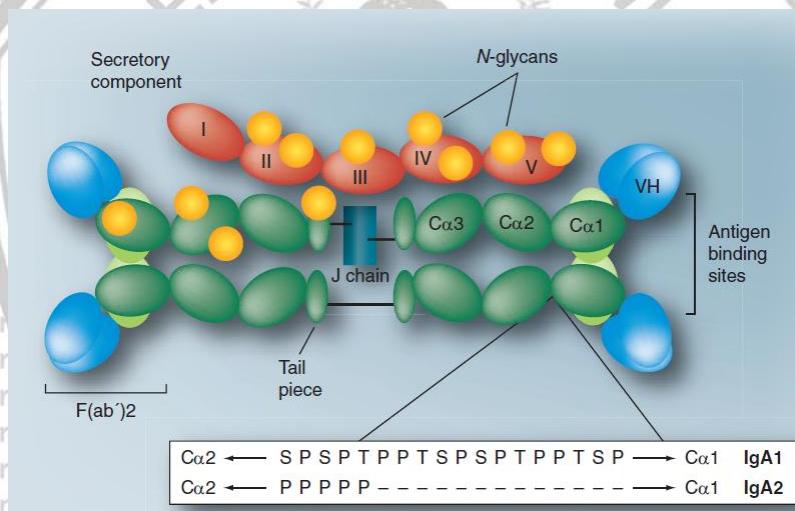
Hingga saat ini, peningkatan *uptake* dari berbagai bakteri dan jamur seperti *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida albicans*, *Bordetella Pertingisidis* dilakukan oleh neutrofil melalui IgA spesifik atau FcγRI. Immunoglobulin A monomer maupun dimerik terbukti efektif dalam memediasi fagositosis baik oleh sel neutrofil maupun Kupfer, tetapi aktivitas opsonik berkurang setelah pengikatan SC, yang konsisten dengan peran SIgA yang lebih sebagai anti-inflamasi (Bakema & Egmond, 2011).

2.1.2 Sekretori Immunoglobulin A

Antibodi utama pada permukaan mukosa adalah sekretori IgA, struktur multimerik terbuat dari polimer IgA (pIgA) yang diproduksi oleh sel B teraktivasi dalam epitel mukosa dan *secretory component* (SC), Sekretori IgA berasal dari

polimer *Ig receptor* (plgR) yang mengalami *selective transcytosis* plgA untuk melewati sel epitel mukosa membran. Setelah disekresi, SIgA berikatan dengan antigen bakteri sehingga mencegah adhesi serta absorpsi ke permukaan epitel luminal dan memfasilitasi eliminasi dengan gerakan peristaltik atau mukosiliar yang lebih dikenal dengan ekskresi imun (Corthesy, 2010).

Dalam saluran cerna, produksi SIgA tergantung pada mekanisme yang melibatkan pengambilan sampel antigen oleh sel M dan diproses oleh sel yang mempresentasikan antigen (APC) termasuk sel dendritik serta *switching* sel B di patch Peyer dan lamina propria. Beberapa sitokin, termasuk TGF- β , IL-4, IL-5, IL-6 IL-10, berperan penting dalam produksi SIgA saluran cerna (Corthesy, 2010; Wells *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Sekretori IgA manusia.

Keterangan: Struktur polipeptida terdiri dari empat *heavy chain* (rantai α), empat *light chain*, rantai J dan SC. *Heavily glycosylated* SC terikat secara kovalen oleh jembatan disulfida tunggal ke dimer IgA melalui C-terminal domain V dan domain C α 2.
Sumber: Corthesy, 2010.

Sekretori imunoglobulin A menampilkan variasi yang luar biasa dalam sifat dan kompleksitas gugus karbohidrat. Glycans yang terkait dengan rantai berkontribusi terhadap 6-7% dari total massa molekul IgA1 manusia dan hingga 10% pada protein IgA2 manusia. Kehadiran urutan tambahan ini dalam molekul

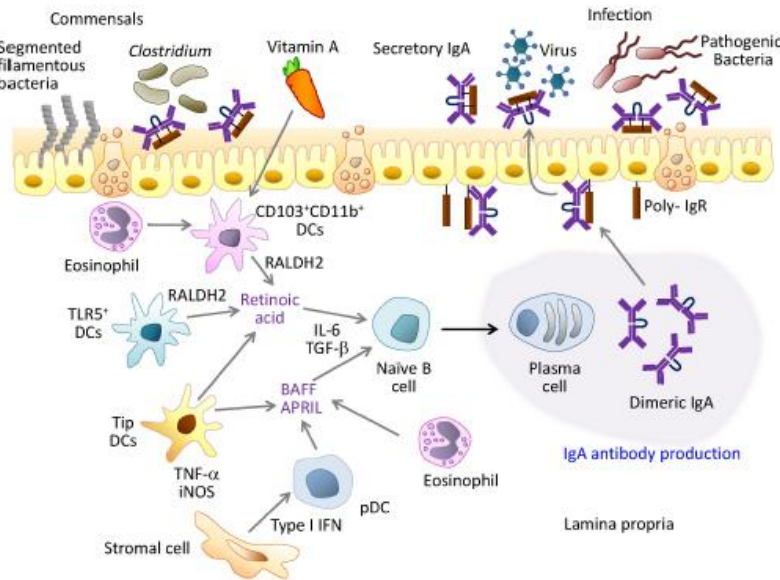
IgA1 bertanggung jawab untuk sensitivitas antibodi terhadap protease spesifik bakteri tertentu (Corthesy. 2010; Wells *et al.*, 2016).

Sekretori IgA1 memiliki struktur planar yang mirip IgA1 dimer, dengan dua monomer tersusun dalam konformasi ekor-ke-ekor, dengan sedikit *bend* pada Fc. Regio Fab terpisah dan menonjol dari lokasi SC yang terletak di bagian luar sepanjang area *convex* regio Fc – Fc. Area *convex* tersebut mungkin mengandung rantai J yang penting untuk pengenalan selektif oleh plgR (bentuk prekursor SC) dari plgA. Model ini juga memprediksi bahwa SC bebas dapat membuka lipatan untuk berhubungan erat dengan plgA1 (Corthesy. 2010).

Sekretori IgA2 memperlihatkan struktur nonplanar, dimana lipatan IgA2 lebih pendek dan adanya SC terikat memindahkan lokasi empat domain Fab diluar molekul Fc. *Secretory component* terletak di sepanjang tepi cembung luar regio Fc – Fc seperti pada SIgA1. Sifat SIgA2 yang lebih terbatas dan nonplanar dapat mendorong interaksi multimerik dengan struktur antigenik yang lebih kaku (lipopolysaccharides, lipoteichoic acid) yang terpapar pada permukaan bakteri, sedangkan SIgA1 yang lebih terbuka dan fleksibel dapat mengakomodasi antigen protein dalam berbagai konformasi yang berbeda (Corthesy. 2010).

Sekretori imunoglobulin A diproduksi dari sel B yang mengalami diferensiasi pada plasma, IgA *class switching* terjadi pada jaringan limfoid usus termasuk *Peyer's patches*, *mesenteric lymph node* (MLNs), dan *isolated lymphoid follicles* (ILF) pada lamina propia. *Segmented filamentous bacteria* menstimulasi perkembangan ILF dan jaringan limfoid dalam lamina propia usus halus. Sel dendritik saluran cerna menstimulasi IgA *class switching* baik bersama dengan sel *T helper* maupun dengan mengekspresikan *B-cell activating factor* (BAFF) dan *a proliferation inducing ligand* (APRIL). *Plasmacytoid DC* (pDC) saluran cerna dapat menstimulasi produksi IgA melalui jalur tersebut. Ketika bakteri komensal dikenali oleh TLR, TNF- α /iNOS-*producing* DC (tipDC) akan

teraktivasi dan mengeluarkan NO yang dapat meningkatkan IgA *class switching*. Lebih jauh lagi, *retinoic acid* dapat dikonversi oleh *retinaldehyde dehydrogenase type 2* (RALDH2) dengan vitamin A yang diperoleh dari *intake* maupun RALDH2 yang diproduksi sendiri oleh sel dendritik. Dalam keadaan normal, lamina propria mengandung eosinofil sekitar 5% dari seluruh leukosit yang berfungsi untuk menstimulasi produksi dan mempertahankan IgA-producing plasma cell dengan menginduksi *B cell activating factor* (BAFF) dan mendukung fungsi CD103⁺DCs (subset sel dendritik yang dominan terdapat pada usus halus).



Gambar 2.4 Produksi SIgA.

Keterangan: Subset CD103⁺CD11b⁺DC, TipDC, dan TLR5⁺DC pada saluran cerna mengekspresikan RALDH2 yang akan dikonversi menjadi *retinoic acid* dari diet vitamin A dan dapat digunakan untuk produksi IgA. *Plasmacytoid DC* and TipDC menginduksi IgA dari sel B dengan mengekspresikan BAFF dan APRIL. Eosinofil mendukung produksi IgA dengan ekspresi BAFF dan APRIL maupun meningkatkan fungsi CD103⁺ DC.

Sumber: Ko & Chang, 2015.

2.2 Human Beta Defensin 2

2.2.1 Definisi Defensin

Defensin adalah peptida kaya sistein, peptida kationik dengan struktur lembaran β -pleated yang distabilkan oleh tiga ikatan disulfida intramolekul antara

residu sistein. Defensin mamalia diklasifikasikan dalam tiga subfamili, α -, β - dan θ -defensin, yang berbeda dalam distribusi dan hubungan disulfida (ikatan) antara enam residu sistein. Hubungan disulfida residu sistein dalam defensin pada α -defensin adalah antara residu sistein pertama dan keenam (Cys1-Cys6), Cys2-Cys4 dan Cys3-Cys5, sedangkan pada β defensin adalah Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 dan Cys3-Cys6. Sebaliknya, θ -defensin memiliki struktur melingkar dengan residu sistein yang dihubungkan sebagai Cys1-Cys6, Cys2-Cys5 dan Cys3-Cys4 (Klotman *et al.*, 2016).

Human α -defensin-1, -2, -3 dan -4 merupakan peptida neutrofil manusia (HNP1, HNP2, HNP3 dan HNP4) karena diproduksi terutama oleh neutrofil. HNP1, HNP2 dan HNP3 disintesis oleh promyelocytes, yang merupakan sel prekursor neutrofil di sumsum tulang, dan peptida mature disimpan sebagai *primary granule of neutrofil*. Teta-defensin terdiri dari dua peptida *α -defensin-like precursor* dari sembilan asam amino yang dihubungkan oleh ligasi post-translasi kepala-ke-ekor. Kontribusi struktur defensin terhadap fungsi defensin berbeda berdasarkan fungsinya. Sebagai contoh, ikatan disulfida tidak diperlukan untuk fungsi antibakteri dari HNP1 dan *human β -defensin-3* (hBD3). Namun, memiliki ikatan disulfida yang penting untuk aktivitas kemotaksis pada hBD3 (Klotman *et al.*, 2016).

Di antara peptida antimikroba alami, *human β -defensin* (hBDs) merupakan kontributor paling penting pada kekebalan host (Nicolau *et al.*, 2017).

Berdasarkan analisis gen, telah teridentifikasi 28 jenis *human β -defensin*, dimana enam *human β -defensin* (hBD1, -2, -3, -4, -5 dan -6) diekspresikan terutama oleh sel epitel. Sedangkan hBD1 secara konstitutif diekspresikan oleh sel epitel, ekspresi hBD2 dan hBD3 dapat diinduksi oleh virus, bakteri, produk mikroba (misalnya endotoksin) dan sitokin pro-inflamasi, seperti *tumor-necrosis factor* (TNF) dan interleukin-1 β (IL-1 β) (Klotman *et al.*, 2016).

Human β -defensin 1, hBD2 dan hBD3 semuanya telah terdeteksi di berbagai jaringan sel epitel, meskipun mekanisme induksi ekspresi mereka sebagai respons terhadap produk mikroba telah terbukti berbeda satu sama lain. Ekspresi hBD1 dan hBD2 terdeteksi pada monosit, makrofag dan sel dendritik monosit (DC), yang menunjukkan bahwa hBD1 dan hBD2 tidak secara eksklusif bersentuhan dengan epitel. Baik *human defensin α - dan β* ditemukan pada ASI yang mengindikasikan peran defensin dalam melindungi neonatus dari infeksi (Klotman *et al.*, 2016).

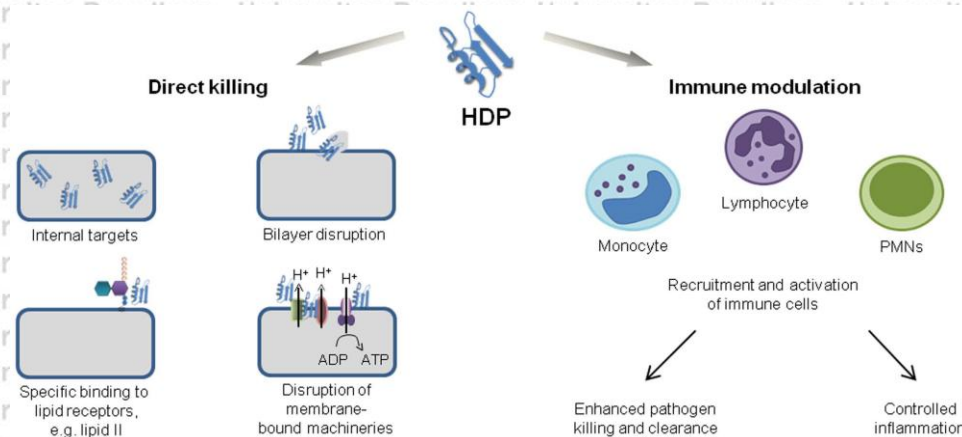
Tabel 2.1 Distribusi dan sumber beta defensin

Defensin	Distribusi jaringan	Sumber	Sintesa dan regulasi
hBD 1	Mukosa oral dan nasal, paru paru, plasma, kelenjar ludah, usus kecil dan besar, lambung, kulit, mata, kelenjar susu, ginjal, traktus urogenital.	Sel epitelial Monosit Makrofag <i>Monocyte-derived dendritic cell</i> Keratinosit	Konstitutif atau dapat diinduksi sebagai respons terhadap interferon- γ , lipopolisakarida dan peptidoglikan.
hBD 2 dan hBD 3	Mukosa oral dan nasal, Paru paru, plasma, kelenjar ludah, usus kecil dan besar, lambung, kulit, mata, kelenjar susu, ginjal, traktus urogenital.	Sel epitelial Monosit Makrofag <i>Monocyte-derived dendritic cell</i> Keratinosit	Dapat diinduksi sebagai respon terhadap virus, bakteri, lipopolisakarida, peptidoglikan, lipoprotein, sitokin (IL-1 β , TNF) dan <i>growth factor</i> .
hBD 4	Antrum gaster, testes.	Sel epitelial	Dapat diinduksi sebagai respon terhadap PMA (<i>phorbol 12-myristate 13 acetate</i>) dan bakteri.

Sumber: Klotman *et al.*, 2016.

2.2.2 Fungsi Human Defensin

Peptida antimikroba (AMP) termasuk salah satunya yakni defensin dianggap sebagai agen terbaik untuk mengatasi infeksi baik membunuh bakteri secara langsung maupun dalam modulasi respon imun. Semua organisme multiselular memproduksi AMP untuk proteksi permukaan maupun jaringan dari invasi bakteri (Ulm *et al.*, 2012).



Gambar 2.5 Peptida antimikroba (AMPs).

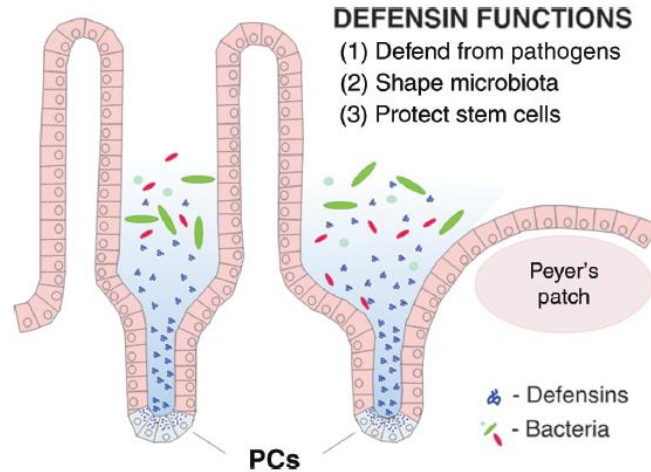
Keterangan: AMPs dianggap sebagai kandidat ideal untuk anti infeksi karena menggabungkan aktivitas membunuh bakteri secara langsung dan modulasi respons imun.

Sumber: Ulm *et al.*, 2012.

Defensin memiliki motif struktural yang sama, sistein menstabilisasikan $\alpha\beta$ struktur yang tersusun dari α heliks yang dihubungkan pada lembar β antiparalel dengan tiga atau empat ikatan disulfida dan memberikan aktivitas sebagai antivirus, antijamur atau antibakteri. Baru-baru ini, telah ditunjukkan bahwa defensin berperan sebagai antibakteri dan antijamur terkait dengan afinitas terhadap prekursor dinding sel bakteri lipid II. Mereka membentuk *equimolar stoichiometric complex* dengan lipid II, sehingga menghambat penggabungan blok dinding sel ke dalam jaringan peptidoglikan.

Defensin dengan afinitas tinggi terhadap lipid II berfungsi terutama melawan bakteri gram positif, sedangkan defensin dengan afinitas lipid II rendah berperan mempertahankan kemampuan untuk berinteraksi dengan target tambahan dan oleh karena itu memiliki spektrum antimikroba yang lebih luas, termasuk bakteri gram negatif atau jamur. *Human β -defensin* mengaktifkan sel antigen profesional (monosit, sel dendritik) melalui TLRs 1 dan 2 dimana akan merangsang respons imun adaptif. Berbagai defensin merekrut sel kekebalan tubuh dengan mengikat langsung reseptor kemokin (CCRs). *Human β -defensin* menunjukkan fungsi

chemoattractant untuk sel dendritik yang belum matang, monosit / makrofag, dan sel mast (Ulm *et al.*, 2012).



Gambar 2.6 Fungsi defensin dalam saluran cerna

Keterangan: sekresi defensin dari sel paneth (PCs). Usus kecil memiliki jari-seperti villi yang berisi sekelompok PCs kaya defensin di bagian bawahnya. Granul dari PCs memiliki konsentrasi prodefensins tinggi bersama dengan PC tripsin. Setelah PCs degranulasi, disebabkan oleh masuknya bakteri ke dalam lumen saluran cerna, tripsin mengaktifkan defensin membentuk perlindungan dari sel-sel induk epitel saluran cerna.

Sumber: Ulm *et al.*, 2012.

2.3 Nutrisi Neonatus Prematur

2.3.1 Air Susu Ibu

2.3.1.1 Definisi

Air susu ibu adalah satu-satunya makanan neonatus yang paling baik, karena mengandung zat gizi yang paling sesuai dengan kebutuhannya dimana sedang dalam tahap percepatan tumbuh kembang. Air susu ibu adalah suatu emulsi lemak dalam larutan protein, laktosa dan garam-garam organik yang disekresi oleh kedua belah kelenjar dari payudara yang berguna sebagai makanan neonatus. Air susu ibu mengandung berbagai zat gizi yang dibutuhkan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan neonatus. Komposisi ASI yang unik dan spesifik tidak dapat diimbangi oleh susu formula. Pemberian ASI tidak hanya bermanfaat bagi neonatus tetapi juga bagi ibu yang menyusui. Dengan

diberikan ASI berarti neonatus sudah mendapatkan imunoglobulin (zat kekebalan atau daya tahan tubuh) dari ibunya melalui plasenta, tetapi kadar zat tersebut dengan cepat akan menurun segera setelah kelahirannya. Neonatus baru lahir akan memproduksi sendiri imunoglobulin secara cukup saat mencapai usia sekitar 4 bulan. Pada saat kadar imunoglobulin bawaan dari ibu menurun dan yang dibentuk sendiri oleh tubuh neonatus belum mencukupi, terjadilah suatu periode kesenjangan imunoglobulin. Selain itu, air susu ibu merangsang terbentuknya antibodi pada neonatus lebih cepat. Oleh karena itu, ASI tidak saja bersifat imunisasi pasif, tetapi juga aktif. Pada beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ASI dapat menurunkan insiden infeksi pada neonatus, termasuk kejadian enterokolitis nekrotikan (Khader *et al.*, 2013).

Dalam buku penuntun diet anak, dijabarkan bahwa air susu ibu merupakan makanan terbaik untuk memenuhi kebutuhan gizi neonatus terkait tumbuh kembang optimal. Pemberian ASI eksklusif dimulai kurang dari 1 jam (inisiasi menyusui dini = IMD) setelah lahir sampai dengan usia 6 bulan. Air susu ibu mengandung zat yang mudah untuk dicerna, diserap, dan digunakan secara efisien oleh tubuh neonatus, serta mampu melindungi dari kejadian infeksi (Utama *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Jenis Air Susu Ibu

Air susu ibu dapat diberikan melalui meneteki langsung atau diberikan dengan metode alternatif yakni dengan ASI donor seperti air susu ibu yang didapat dari bank donor. Di beberapa negara, seperti Brazil, Jerman, Inggris, terdapat bank ASI donor yang ASI nya telah diskruining dan disteril (Ballard *et al.*, 2014). Air susu ibu dapat dibagi tiga jenis yaitu kolostrum, ASI transisi, dan ASI matur. Kolostrum (3-5 hari) merupakan cairan yang pertama dikeluarkan atau disekresi oleh kelenjar payudara pada 4 hari pertama persalinan, komposisi kolostrum ASI setelah persalinan, mengalami perubahan, warna kuning

keemasan pada kolostrum disebabkan tingginya komposisi lemak dan protein, kolostrum merupakan pencahar (pembersih saluran cerna neonatus) yang membersihkan mekonium, sehingga mukosa saluran cerna neonatus yang baru lahir segera bersih dan menerima ASI. Hal ini menyebabkan defekasi dengan tinja berwarna hitam. Jumlah energi dalam kolostrum hanya 65 kkal per 100 ml kolostrum dan pada hari pertama neonatus memerlukan sekitar 20–30 ml untuk setiap minum. Kandungan protein pada kolostrum lebih tinggi dibandingkan kandungan protein dalam susu matur (Ballard *et al.*, 2014).

Air susu ibu masa transisi (5–10 hari) merupakan peralihan dari ASI kolostrum sampai menjadi ASI matur. ASI transisi diproduksi pada hari keempat hingga keempat belas. Pada masa ini, kadar protein berkurang sedangkan karbohidrat dan lemak serta volumenya semakin meningkat. Air susu ibu matur adalah ASI yang diproduksi sejak hari keempat belas dan seterusnya. Pada saat menyusui, susu matur awal disebut *fore milk*, mengandung lebih banyak protein dan karbohidrat (laktosa), sedangkan susu akhir (*hind milk*) mengandung lebih banyak lemak. Air susu ibu matur merupakan nutrisi neonatus yang terus berubah disesuaikan dengan perkembangan sampai usia 6 bulan. Setelah 6 bulan, ASI tidak lagi dapat memenuhi kebutuhan gizi neonatus, sehingga harus mulai dikenalkan dengan makanan pendamping (Ballard *et al.*, 2014; Utama *et al.*, 2014).

2.3.1.3 Komposisi Air Susu Ibu

Air susu ibu mengandung air sebanyak 87.5%, oleh karena itu neonatus yang mendapat cukup ASI tidak perlu mendapat tambahan air walaupun berada ditempat dengan suhu udara panas. Di dalam ASI terdapat laktosa yang merupakan karbohidrat utama dalam ASI dan berfungsi sebagai salah satu sumber energi untuk otak. Kadar laktosa ASI hampir dua kali lipat dibanding laktosa yang ditemukan pada susu formula. Kadar karbohidrat dalam kolostrum

tidak terlalu tinggi, tetapi jumlahnya meningkat terutama laktosa pada ASI transisi (7-14 hari setelah melahirkan). Setelah melewati masa ini maka kadar karbohidrat ASI relatif stabil (Badriul, 2008).

Selain karbohidrat, ASI juga mengandung protein. Kandungan protein ASI cukup tinggi dan komposisinya berbeda dengan protein yang terdapat dalam susu formula. Protein dalam ASI dan susu formula terdiri dari *whey* dan *casein* dimana ASI lebih banyak mengandung protein *whey* yang lebih mudah diserap oleh saluran cerna neonatus, sedangkan susu formula lebih banyak mengandung protein *casein* yang lebih sulit dicerna oleh saluran cerna neonatus.

Jumlah *casein* yang terdapat di dalam ASI hanya 30% dibanding susu formula yang mengandung protein dalam jumlah yang tinggi (80%). Disamping itu, ASI mempunyai asam amino lengkap yakni taurin. Taurin diperkirakan mempunyai peran pada perkembangan otak karena asam amino ini ditemukan dalam jumlah cukup tinggi pada jaringan otak yang sedang berkembang. Air susu ibu juga mengandung lemak, kadar lemak dalam ASI pada mulanya adalah rendah dan akan terus meningkat. Lemak ASI berubah kadarnya setiap kali dihisap yang terjadi secara otomatis. Selain jumlahnya yang mencukupi, lemak dalam ASI mengandung lemak rantai panjang yang dibutuhkan oleh sel jaringan otak dan sangat mudah dicerna yakni dalam bentuk Omega 3, Omega 6, DHA (*Docosahexaenoic Acid*) dan ARA (*Arachidonic Acid*) yang merupakan komponen penting untuk meilnasi neonatus. Disamping karbohidrat, lemak, protein, ASI juga mengandung mineral, vitamin K, vitamin A, vitamin D, vitamin E, dan vitamin yang larut dalam air. Air susu ibu mengandung berbagai komponen imunoterapi alamiah yang dapat mencegah terjadinya enterokolitis nekrotikan (Badriul, 2008).

Beberapa komponen dasar dalam ASI yang berperan antara lain *growth factors*, asam lemak, dan mikroba (tabel 2.2).

Tabel 2.2 Komponen air susu ibu.

Growth Factors	Epidermal Growth Factor (EGF), Neuronal Growth Factors, Insulin-like Growth Factor (IGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Erythropoietin (Epo), Growth-regulating hormones (calcitonin dan somatostatin), Heparin Binding Epidermal-like Growth Factor (HB-EGF), human β -defensin 2
Asam Lemak	Asam Lemak Tak Jenuh (PUFA :Omega 3, asam lemak Omega-6), Branched Chain Fatty Acid
Mikroba (Probiotik)	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Lactobacillus sp.</i>

Sumber: Khader *et al.*, 2013; Ballard *et al.*, 2014.

Air susu ibu mengandung sejumlah peptida biologis aktif atau *growth factors* dalam jumlah bermakna, yang memiliki efek biologis terhadap saluran cerna, pembuluh darah, susunan saraf, dan sistem endokrin. *Epidermal-like growth factor* (EGF) adalah salah satu *growth factors* yang didapatkan pada ASI, EGF sangat penting untuk pematangan dan penyembuhan mukosa saluran cerna. *Epidermal-like growth factor* tahan terhadap pH rendah dan enzim pencernaan, memungkinkan untuk melewati lambung ke usus, dimana EGF merangsang enterosit untuk meningkatkan sintesis DNA, pembelahan sel, absorpsi air dan glukosa, serta sintesis protein. Terdapat beberapa mekanisme protektif EGF pada saluran cerna neonatus, termasuk inhibisi program kematian sel dan perbaikan protein *tight junction* pada saluran cerna dan hati neonatus yang diinduksi oleh faktor pro inflamasi TNF- α . *Heparin-binding growth factor* (HB-EGF) adalah anggota *family* EGF dan faktor pertumbuhan utama yang bertanggungjawab pada perbaikan kerusakan akibat hipoksia, *ischemia-reperfusion injury*, syok hemoragik/ cedera resusitasi, dan enterokolitis nekrotikan. Kadar EGF tertinggi pada ASI awal dan menurun selama laktasi (Frost, 2014)

Susu manusia mengandung sedikit peptida bioaktif, termasuk defensin; *human β -defensin 2* mempengaruhi sinyal TLR, dimana terdapat 8.5 mg/mL pada kolostrum dan 1 mg/mL pada susu matur, dan menampilkan aktivitas

antimikroba luas terhadap bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa kehadiran *human β -defensin 2* dalam susu dapat membantu mempertahankan imunitas saluran cerna neonatus (He *et al.*, 2016).

Imunoglobulin (Ig) A dan Ig G yang disekresi ASI dan telah terbukti menurunkan kejadian inflamasi. Pemberian IgA dan IgG secara oral terbukti memberikan efek protektif pada mukosa saluran cerna. Imunoglobulin A berperan penting dalam imunitas mukosa, sedangkan IgG berperan dalam sistem imun pada neonatus. Namun, belum ada bukti yang menunjukkan bahwa kejadian sepsis neonatorum berkurang dengan pemberian imunoglobulin secara oral (Khader *et al.*, 2013).

Efek biologis ASI pada flora saluran cerna telah banyak diteliti dengan membandingkan komposisi bakteri pada tinja neonatus yang mendapatkan ASI dan susu formula. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan komposisi zat gizi pada ASI dan sterilitas ASI. Banyak penelitian tentang *Bifidobacterium sp.* dan *Lactobacillus sp.*, keduanya berkolonisasi dalam saluran cerna, dan lebih tinggi proporsinya pada neonatus yang mendapat ASI dibandingkan yang mendapat susu formula. Efek probiotik yang menguntungkan diduga karena pengaruh modulasi probiotik terhadap inflamasi saluran cerna dan pengaruhnya terhadap fungsi pertahanan saluran cerna, produksi musin, dan turunnnya kejadian apoptosis (Khader *et al.*, 2013).

2.3.2 Susu Formula Prematur

Studi lainnya menunjukkan bahwa neonatus prematur dengan berat badan lahir sangat rendah yang diberi susu formula tumbuh lebih cepat daripada mereka yang diberi air susu ibu yang diperkaya. Semakin kecil berat badan neonatus semakin besar kebutuhannya akan protein, adapun tabel kebutuhan nutri terkait berat badan dapat dilihat pada gambar 2.7.

Body weight (g)	Enteral feeding		Parenteral nutrition	
	Protein (g/kg/d)	Energy (kcal/kg/d)	Protein (g/kg/d)	Energy (kcal/kg/d)
500–700	4.0	105	3.5	89
700–900	4.0	118	3.5	92
900–1200	4.0	119	3.5	101
1200–1500	3.9	127	3.4	108
1500–1800	3.6	128	3.2	109
1800–2200	3.4	131	3.0	111

Gambar 2.7 Kebutuhan protein dan energi pada neonatus prematur

Keterangan. Berat badan lahir neonatus berhubungan dengan jumlah protein yang dibutuhkan, semakin kecil berat badan lahir maka kebutuhan protein semakin meningkat.

Sumber: Ho & Yen, 2016.

Modifikasi lebih lanjut dalam komposisi formula prematur diadopsi setelah adanya bukti terkait nutrisi spesifik untuk neonatus prematur dengan BBLSR maupun BBLASR (berat lahir <1000 gram). Formula tersebut mengandung energi 68–100 kkal/100 mL, protein 1,7–2,1 gr/100mL, kalsium 133–146 mg/100 mL atau 165–180 mg/100 kkal, dan fosfor 67–81 mg/100 mL atau 83–100 mg/100 kkal (Simmer & Askie, 2013; Hay & Hendrickson, 2017).

Susu formula yang dapat diberikan pada neonatus prematur adalah: (1) Formula prematur, mengandung 24 kkal/oz atau 81 kkal/100mL digunakan jika ASI fortifikasi tidak cukup untuk mencapai berat badan ideal atau indikator antropometri (berat badan, panjang badan, dan lingkar kepala) di bawah persentil 25; (2) *Standard enriched formula* atau *post-discharge formula* (PDF), mengandung 22 kkal/oz atau 74 kkal/100mL digunakan saat berat badan mencapai 1800-2000 gram ketika akan dipulangkan ke rumah dan indikator antropometri (berat badan, panjang badan, dan lingkar kepala) sudah mencapai persentil 25 atau lebih; (3) Formula standar, mengandung 20 kkal/oz atau 67 kkal/100mL digunakan mulai usia koreksi neonatus 0 minggu dan indikator antropometri menurut WHO 2006 berada antara -2 sampai +2 z-score (tidak ada *weight faltering* pada grafik BB/U, status gizi baik pada grafik BB/PB, dan panjang badan sudah mencapai 45 cm); (4) *Nutrient dense formula*, mengandung 30 kkal/oz atau 100 kkal/100mL, formula ini mengandung kalori

paling tinggi dibandingkan jenis nutrisi oral/enteral lain. Formula ini terindikasi pada penderita yang hanya memiliki kapasitas minum sangat sedikit atau memiliki toleransi minum yang buruk sehingga membutuhkan volume kecil namun harus memenuhi kebutuhan kalori untuk kejar tumbuh (Sulistijono *et al.*, 2016).

Asupan protein neonatus prematur dianjurkan dimulai dari 2,0-2,5 g/kg/hari, ditingkatkan bertahap menjadi 3.5 g/kg/hari. Selanjutnya, neonatus prematur dengan nutrisi enteral/oral membutuhkan asupan protein 3,5-4,5 g/kg/hari untuk mencapai kejar tumbuh (Gidrewicz & Fenton, 2014). Target asupan protein ini dapat dicapai dengan ASI yang difortifikasi *Human Milk Fortifier* (HMF) atau formula prematur.

Selain campuran minyak nabati, sumber lemak dalam formula prematur mengandung 10% dan 50% trigliserida rantai medium (MCT). Beberapa peran MCT yang telah dijabarkan yakni berpotensi lebih baik untuk produksi energi dibandingkan asam lemak rantai yang lebih panjang, tidak berkontribusi banyak terhadap penyimpanan lemak serta tidak selalu meningkatkan keseimbangan energi maupun penambahan berat badan (karena kandungan energi per gram MCT sekitar 15% lebih rendah dari trigliserida rantai panjang). Enzim lipase, diproduksi pada lingual serta lambung, merupakan enzim yang berperan dalam hidrolisis asam lemak rantai karbon sedang dan mengurangi kebutuhan garam empedu untuk penyerapan lemak. Hal ini sangat membantu metabolisme lemak pada prematur, dimana neonatus prematur memiliki kandungan garam empedu yang lebih rendah dengan metabolisme lemak yang lebih tinggi (Hay & Hendrickson, 2017).

Kandungan karbohidrat pada formula prematur, merupakan kombinasi laktosa dan sukrosa, sekitar 8—9 gram/100 mL. Kandungan laktosa yang digunakan kurang dari 40%—80% dari total karbohidrat, hal ini bertujuan untuk

mengurangi efek intoleransi laktosa (karena sedikitnya jumlah laktase yang ditemukan pada saluran cerna neonatus prematur), namun tetap memberikan stimulus aktivasi laktosa intestinal. Beberapa penelitian lainnya belum menunjukkan adanya intoleransi laktosa pada neonatus prematur dan peningkatan aktivitas laktase dengan pemberian laktosa. Selanjutnya, neonatus prematur menoleransi ASI atau ASI donor dengan cukup baik, yang hanya mengandung laktosa sebagai karbohidrat. Ketika dihidrolisis, laktosa menghasilkan glukosa dan galaktosa, galaktosa sangat penting untuk memproduksi glikogen di hati. Hidrolisis sukrosa menghasilkan glukosa dan fruktosa, keduanya mudah diserap di seluruh enterosit menggunakan transporter glukosa spesifik dan fruktosa yakni Glut 1 dan 5. Baik glukosa maupun fruktosa tidak menghasilkan glikogen seefektif galaktosa. Formula prematur yang lebih baru, menggantikan sukrosa dengan polimer glukosa osmolar rendah yang relatif lebih mudah dicerna. Namun demikian, laktosa tetap penting untuk nutrisi normal dan pencegahan EKN. Laktosa juga penting untuk pengembangan butirat kolon yang meningkatkan perkembangan kolon, terutama meningkatkan proliferasi, diferensiasi kolonosit serta *tightening of interepithelial junctions* (Hay & Hendrickson, 2017).

Sumber protein untuk formula prematur adalah susu sapi. *Whey* saat ini mendominasi sebagai produk protein utama daripada kasein. Protein *whey* lebih mudah dicerna daripada kasein dan penggunaannya secara nyata telah mengurangi perkembangan laktobezoars pada neonatus yang kelebihan makan dengan produk kasein tinggi. Kasein lebih mudah menggumpal ketika diasamkan dalam lambung, menyebabkan pencernaan lebih lambat dan pengosongan lambung lebih lambat, serta peningkatan konsentrasi asam amino plasma yang lebih lambat. Rasio komposisi *whey* 40% dan kasein 40% menghasilkan pengosongan lambung lebih cepat, pencernaan, dan penyerapan asam amino,

serta menurunkan asidosis metabolik. Formula preterm dominan whey menghasilkan konsentrasi asam amino bebas plasma yang sama dengan asam amino ASI (Hay & Hendrickson, 2017).

Kandungan protein pada susu formula prematur standar, jauh lebih tinggi dibandingkan susu formula atterm maupun susu tambahan yakni 3,5 gram/kg/hari setiap 150 mL/kg/hari volume makanan enteral, protein dianggap perlu untuk memenuhi kebutuhan intrauterin. Penelitian secara konsisten menunjukkan bahwa asupan protein dengan peningkatan energi dan kandungan mineral, menghasilkan penambahan massa otot yang wajar, pertumbuhan tulang dan panjang tubuh yang sesuai, serta konsentrasi albumin dan prealbumin serum yang lebih tinggi pada neonatus prematur dengan BBLSR. Meskipun kandungan protein pada formula prematur standar lebih tinggi (2,2—2,4 gram/100 kkal) dibandingkan susu formula lainnya, namun pada umumnya tidak memenuhi persyaratan protein untuk pertumbuhan neonatus prematur dengan BBLSR, bahkan meskipun ditambah dengan pemberian makanan enteral 150 mL/kg/hari. Generasi terbaru dari formula prematur mengandung protein tinggi 2,7—2,9 gram/100 mL atau 3,3—3,6 gram/100 kkal dan menyediakan protein hingga 4,5 gram/kg/hari. Susu ini diindikasikan untuk neonatus prematur dengan BBLASR dan BBLSR yang tidak tumbuh dengan baik, mengalami defisit kumulatif asupan protein, maupun memiliki pertumbuhan panjang dan/atau lingkaran kepala yang tidak memadai, serta dengan pembatasan cairan atau volume (Hay & Hendrickson, 2017). Adapun komposisi nutrisi dari formula prematur yang tersedia saat ini ditunjukkan pada tabel 2.3.

Tabel 2.3. Perbandingan komposisi nutrisi pada air susu ibu dan susu formula neonatus prematur dan atterm

	Air susu ibu		Susu formula	
	Atterm	Preterm	Atterm	Preterm
Kalori (kkal/100mL)	60—67	60—71	68	80
Protein	1,3—1,8	1,5—2,2	1,5	1,7—2,1

(gram/100mL)				
Kalsium	26—28	25—26	50	75
Fosfor	12—17	11—15	30	42

Sumber: Bhatia, 2013; Simmer & Askie, 2013; Sulistijono *et al.*, 2016.

2.4 Anatomi dan Fisiologi Saluran Cerna Neonatus

Saluran cerna mengalami pertumbuhan luar biasa selama kehidupan janin, memanjang 1000 kali lipat dari usia 5 hingga 40 minggu. Panjangnya berlipat ganda dalam 15 minggu terakhir kehamilan, mencapai panjang rata-rata saat lahir 275 cm. Pada usus kecil, proyeksi seperti jari, vili, sudah terbentuk pada usia kehamilan 16 minggu. Pada usus besar, vili terbentuk sekitar 29 minggu kehamilan. Di dalam perkembangan saluran cerna intrauterin, mikrovilli menutupi seluruh permukaan apikal usus halus. Dalam usus halus, terdapat berbagai tipe sel (tabel 2.4), antara lain epitel absorpsi, sel Paneth (terlibat dalam sekresi defensin dan peptida yang berperan dalam imunitas alami), sel goblet (terlibat dalam sekresi mukus yang melapisi saluran cerna), dan tipe sel lainnya yang berhubungan dengan sistem neuroendokrin saluran cerna dan sistem imun (Neu & Escobar, 2008; Carlson *et al.*, 2013). Setelah sel-sel epitel saluran cerna mengalami mitosis pada kriptas, mereka bermigrasi ke vili dimana sel-sel tersebut mengalami diferensiasi dan penyerapan aktif, namun setelah apoptosis sel epitel dibuang ke dalam lumen saluran cerna. Hanya terdapat satu populasi sel yang bermigrasi lebih dalam pada kriptas yakni sel Paneth (Neu & Escobar, 2008).

Tabel 2.4 Berbagai tipe sel epitel dalam saluran cerna

Tipe Sel	Fungsi
Enterosit	Sel epitel kolumnar, berperan dalam absorpsi elektrolit, zat gizi dan enzim yang terlibat dalam proses metabolisme karbohidrat, protein, lemak serta mampu memproduksi faktor inflamasi.
Sel Goblet	Sel yang mensekresi mukus yang berfungsi melindungi mukosa saluran cerna dan berperan sebagai media organisme probiotik.
Sel Paneth	Sel yang berfungsi pertahanan terhadap pathogen, mensekresi peptida antimikroba yang dapat membunuh bakteri
Sel M	Terdapat dalam <i>Peyer's patch</i> , berperan dalam perkembangan imunitas
Sel enteroendokrin (D-,K-,I-,L-,M-,S-)	Mensekresi hormon dan peptida saluran cerna, sebagai respon terhadap perubahan isi saluran cerna

Sumber: Carlson *et al.*, 2013.

2.4.1 Fisiologi Saluran Cerna Neonatus

Beberapa proses fisiologi berkembang selama masa janin, salah satu yang penting adalah menelan cairan ketuban. Pada trisemester ketiga, janin menelan cairan ketuban sekitar 450 ml/hari. Cairan ketuban mengandung zat gizi dan faktor pertumbuhan, namun saat terjadi kelahiran prematur, cairan ini berhenti diproduksi secara mendadak. Tekanan esofagus paling rendah kurang lebih 4 cmH₂O pada neonatus prematur dan 25 cmH₂O pada neonatus cukup bulan. Hal ini berkaitan dengan tingginya insiden refluks gastroesofageal pada neonatus prematur (Neu & Walker, 2011).

Fungsi mekanikal saluran cerna berhubungan dengan kematangan saluran cerna, salah satunya yakni motilitas usus halus. Motilitas usus halus belum berkembang pada usia kehamilan dibawah 28 minggu. Transit gastro-anal berkisar 8-96 jam pada neonatus prematur dibandingkan dengan 4 hingga 12 jam pada orang dewasa. Berseth *et al* dalam studi usus kecil menunjukkan pola motilitas yang tidak teratur antara usia gestasi 27 dan 30 minggu, yang berkembang menjadi pola yang lebih matang pada usia gestasi 33-34 minggu.

Selain itu, pada neonatus prematur, baik pelepasan motilin siklik maupun reseptor motilin tidak didapatkan sampai dengan usia gestasi 32 minggu (Neu & Escobar, 2008).

Adapun fungsi mekanikal saluran cerna lainnya yakni pengosongan lambung. Pengosongan lambung terjadi lebih lambat pada neonatus prematur dibandingkan neonatus cukup bulan dan menyebabkan volume isi lambung yang lebih besar; hal tersebut terkait erat dengan masalah gastroesofageal refluk (Neu & Escobar, 2008). Pada dewasa, kecepatan pengosongan lambung dipengaruhi oleh mekanisme umpan balik dari usus halus, sedangkan usia kehamilan 25-32 minggu mekanisme tersebut belum diketahui dengan jelas. Adanya stimulasi asam, lemak, karbohidrat, triptofan, bahan osmolalitas tinggi terhadap reseptor duodenum akan menurunkan kecepatan pengosongan lambung. Kecepatan pengosongan lambung menurun oleh bahan densitas kalori tinggi, namun jumlah kalori yang dipindahkan dari lambung ke duodenum akan meningkat sesuai dengan tingkat kejenuhan formula. Perubahan osmolalitas formula isokalori dari 279 sampai 448 mOsm/kg tidak berpengaruh secara bermakna terhadap kecepatan pengosongan lambung. Kurangnya kontrol terhadap fungsi pengosongan akan berakibat terjadinya intoleransi minum dan malabsorpsi (Carlson *et al.*, 2013).

Pada neonatus berat badan lahir sangat rendah, sekresi asam lambung terbatas. Dalam 24-48 jam setelah kelahiran, pH dalam lambung sekitar 5,5-7 dan relatif resisten terhadap pentagastrin. Kadar pentagastrin basal maupun akibat stimulasi asam meningkat 2 kali lipat dari minggu pertama sampai minggu keempat setelah kelahiran. Asam lambung dapat berfungsi sebagai penghalang mikroorganisme, sehingga yang perlu dipertimbangkan adalah penggunaan obat-obatan *antihistamin-2 blocker* yang akan menurunkan sekresi asam lambung dan dapat memicu lebih banyak bakteri pada bagian distal saluran cerna. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemakaian *antihistamin-2 blocker* pada pasien sakit kritis akan meningkatkan insiden sepsis nosokomial (Carlson *et al.*, 2013).

Lemak merupakan 50% sumber kalori non protein yang didapat dari air susu ibu dan susu formula. Pencernaan lemak terbagi menjadi beberapa fase antara lain fase luminal meliputi deesterifikasi dari trigliserida menjadi 3-monogliserida dan asam lemak bebas serta asam empedu. Asam empedu sangat penting untuk pencernaan lemak dan absorpsi, namun pada neonatus berat badan lahir sangat rendah proses pencernaan ini tidak dapat berlangsung optimal, dikarenakan rendahnya konsentrasi asam empedu di duodenum. Neonatus memiliki kemampuan untuk mengubah asam lemak esensial menjadi asam lemak rantai yang lebih panjang dengan 20 atau lebih rantai karbon. Asam lemak rantai panjang yang tidak jenuh penting untuk pembentukan eikosanoid dan komponen struktural susunan saraf pusat. Asam lemak ini terdapat dalam konsentrasi tinggi pada air susu ibu, namun tidak terkandung dalam nutrisi parenteral total atau sebagian besar susu formula. Penambahan asam lemak rantai panjang tidak jenuh ke dalam susu formula dapat memperbaiki perkembangan saraf. Sebagian besar asam lemak esensial berasal dari kelompok linoleik (omega 6), hal ini karena lemak yang terdapat dalam susu formula atau larutan lipid intravena berasal dari minyak sayur, yang banyak mengandung omega 6 dan bukan fraksi omega 3 (Neu & Walker, 2011; Carlson *et al.*, 2013).

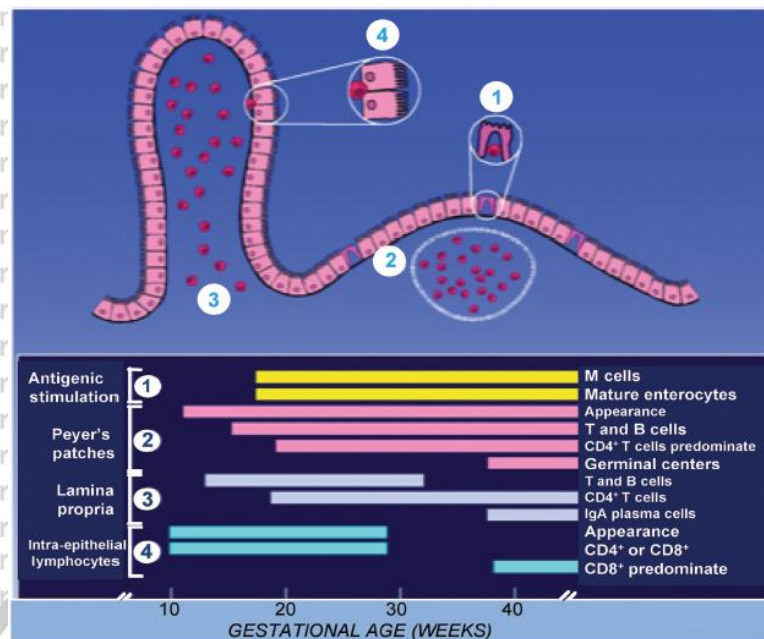
Enzim absorpsi epitel saluran cerna, laktase, sukrase, maltase, isomaltase, dan glukoamilase berada pada tingkat matang pada neonatus atterm. Pada neonatus prematur, sukrase, maltase, dan isomaltase mendekati level aktif, tetapi aktivitas laktase (yang meningkat tajam pada usia kehamilan 24 hingga 40 minggu) mungkin rendah tergantung pada usia kehamilan. Namun, intoleransi laktosa secara klinis jarang terjadi. Respons adaptif paskakelahiran terhadap karbohidrat yang dicerna menyebabkan penggunaan karbohidrat yang kompeten. Selanjutnya, mikrobiota kolon memfermentasi karbohidrat yang tidak

diserap menjadi gas hidrogen dan asam lemak rantai pendek (SCFAs) yang mudah diserap. Komposisi makanan telah terbukti mempengaruhi perkembangan aktivitas laktase. Neonatus prematur yang menerima pemberian makanan enteral dini memiliki aktivitas laktase yang lebih besar pada usia 10 dan 28 hari dibandingkan neonatus yang diberikan makanan sesuai inisiasi pemberian makanan. Pada usia 10 hari, aktivitas laktase juga lebih besar pada neonatus yang diberi ASI dibandingkan susu formula. Disimpulkan bahwa pemberian makan dini meningkatkan aktivitas laktase pada neonatus prematur dimana aktivitas laktase adalah penanda kedewasaan saluran cerna dan dapat mempengaruhi hasil klinis (Neu & Escobar, 2008).

Terkait fungsi pertahanan, traktus gastrointestinal memiliki area permukaan tubuh terbesar dimana antigen dan mikroba terpapar. Oleh karena itu saluran cerna harus memiliki mekanisme yang cukup rumit untuk memungkinkan masuknya nutrisi dan molekul bermanfaat lainnya serta mencegah mikroba yang berpotensi membahayakan dan agen lain untuk masuk ke dalam. Segera setelah lahir, pembentukan komunitas bakteri saluran cerna sangat penting untuk pemeliharaan homeostasis yang normal. Pertahanan saluran cerna dapat secara luas dibagi menjadi kategori bawaan dan adaptif. Pentingnya sistem bawaan merupakan garis pertama pertahanan host. Masing-masing komponen sistem bawaan bertindak bersama untuk menjaga integritas mukosa di saluran cerna (Neu & Escobar, 2008).

Salah satu *barrier* mikroorganisme pertama pada saluran cerna yakni asam lambung. Neonatus prematur tidak mampu mensekresi asam lambung secara optimal, seperti dijelaskan sebelumnya, pH intragastrik dalam 24 sampai 48 jam pertama kehidupan adalah 5,5—7 (dimana nilai normal pH intragastrik adalah 2—3). Kondisi tersebut menunjukkan pertahanan mikroorganisme yang

rendah dan berhubungan dengan peningkatan jumlah bakteri saluran cerna (Neu & Escobar, 2008).



Gambar 2.8 Pertahanan imun mukosa pada instestinal neonatus terkait usia kehamilan.

Keterangan: semua komponen fungsional imun mukosa matang saat usia kehamilan aterm. Stimulus berupa kolonisasi diperlukan sebelum terbentuknya sistem pertahanan saluran cerna yang terdiri dari (1) sel M, (2) *Peyer's pathes* yang tersusun dari agregasi limfoid, (3) limfosit saluran cerna, (4) epitelial limfosit.

Sumber: Walker A *et al.*, 2014.

Lapisan epitel absortif dari saluran cerna primitif pada awalnya bertingkat kemudian menjadi satu lapisan sel kolumnar pada akhir trimester pertama.

Enterosit epitel saluran cerna berasal dari *undifferentiated stem cell* yang sama dengan sel induk yang menghasilkan epitel kolumnar, sel goblet, sel Paneth dan sel M di saluran cerna. Adapun fungsi sel-sel tersebut diluar penyerapan nutrisi yakni *innate barrier function* dan *mucosal crosstalk* (Neu & Escobar, 2008).

Mucosal crosstalk dikenal sebagai komunikasi bakteri dengan epitelium saluran cerna dengan menempelkan glikoprotein membran mikrovilus atau reseptor glikolipid. Melalui komunikasi ini, mikroorganisme patologis menggabungkan jalur transduksi sinyal fisiologis untuk memodifikasi respons efektor dalam struktur dan atau fungsi enterosit untuk tujuan mereka sendiri. Misalnya, lipopolisakarida

permukaan sel bakteri (endotoksin, lipopolisakarida (LPS)) berinteraksi dengan enterosit untuk menstimulasi transkripsi dan translasi sitokin proinflamasi (*tumor necrosis factor* (TNF), IL-6, dan IL-8) melalui aktivasi faktor transkripsi, NF- κ B (Nanthakumar *et al.*, 2010). Adapun pertahanan imun mukosa pada instestinal neonatus terkait usia kehamilan dapat dilihat pada gambar 2.8.

2.5 Sistem Imunitas Mukosa Saluran Cerna

Sistem kekebalan alami merupakan garis pertahanan pertama dalam melawan berbagai macam mikroorganisme sebelum melibatkan respons imun adaptif. *Toll-like receptors* (TLRs) adalah reseptor pertama yang memiliki peran penting dalam respon imun alami dimana TLRs berperan sebagai inisiator dan mampu mengenali *pathogen associated molecular pattern* (PAMPs). Selain itu, peptida antimikroba berfungsi sebagai penyokong penting pada imunitas alami. Peptida antimikroba seperti defensin dan *cathelicidin* merupakan molekul kecil yang terutama diproduksi oleh leukosit dan sel epitel. Peptida ini memiliki kemampuan untuk melawan mikroorganisme, termasuk bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, jamur dan virus (Klotman *et al.*, 2016).

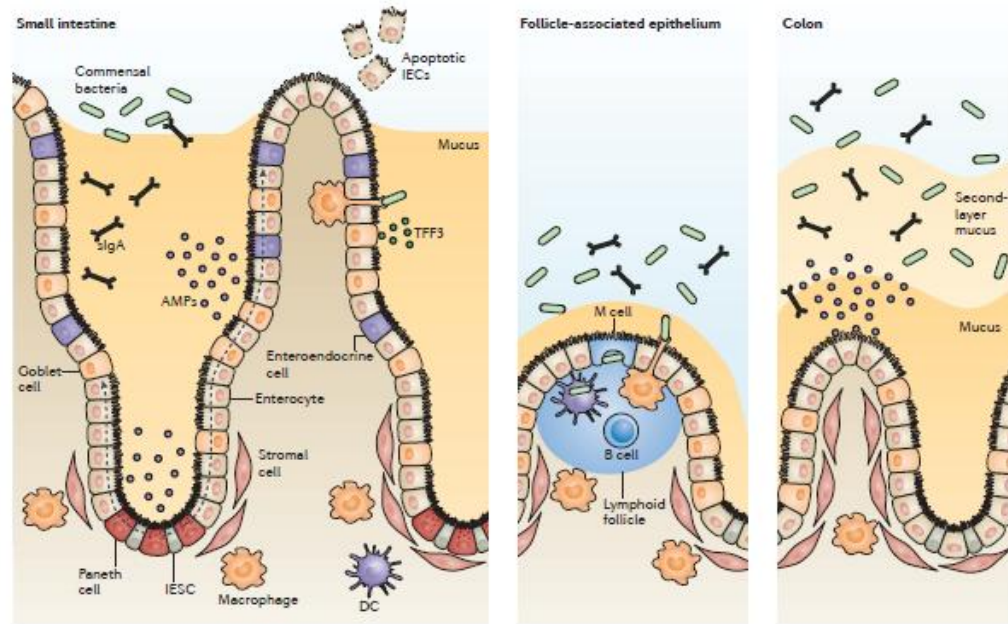
Tabel 2.5. Komponen sistem imun alami saluran cerna

<i>Mechanical barrier</i>	<i>Mucous layer</i> <i>Intestinal epithelial cell layer</i> Motilitas intestinal
Peptida antimikrobia	<i>Defensin</i> <i>Cathelicidins</i> <i>Osteoprotegerin</i> <i>Lactoferrin</i> <i>Secretory phospholipase A2</i> <i>Angiogenins</i>
Protein inflamasi	<i>Calprotectin</i> S100A12
Mikroba komensal dan produk mikrobial	<i>Intestinal microflora</i> <i>Short chain fatty acids</i>
Lainnya	Asam lambung Sekretori IgA Sekresi bilier dan pankreas Sel imun (neutrofil, monosit, makrofag)

Sumber: Pang *et al.*, 2014

Sistem imunitas mukosa merupakan sistem imunitas penting dengan sifat berlawanan dari imunitas sistemik dimana lebih berperan untuk menekan imunitas, hal ini terjadi oleh karena mukosa berhubungan langsung dengan lingkungan luar dan berhadapan dengan banyak antigen yang terdiri dari bakteri komensal, antigen makanan dan virus dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan sistem imunitas sistemik. Antigen-antigen tersebut sedapat mungkin dicegah agar tidak menempel pada mukosa dengan pengikatan oleh IgA, barrier fisik dan kimiawi, enzim-enzim mukosa, ataupun defensin. Antigen yang telah menembus mukosa juga akan dieliminasi dan reaksi imun yang terjadi diatur oleh sel-sel regulator. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya respons imun yang berlebihan dan merugikan oleh karena adanya paparan antigen yang sangat banyak. Sedangkan sistem imunitas sistemik bersifat memicu respons imun oleh karena adanya paparan antigen (Grave *et al.*, 2007).

Sistem imunitas mukosa menggunakan beberapa mekanisme untuk melindungi pejamu dari respons imunitas yang berlebihan terhadap isi lumen saluran cerna. Mekanisme yang dipakai adalah barrier fisik yang kuat, adanya enzim luminal yang mempengaruhi antigen, adanya sel T regulator spesifik yang diatur fungsinya oleh jaringan limfoid saluran cerna, dan adanya produksi sekretori antibodi IgA yang paling cocok dengan lingkungan saluran cerna. Semua mekanisme ini ditujukan untuk menekan respon imunitas. Kelainan beberapa komponen ini dapat menyebabkan peradangan atau alergi (Grave *et al.*, 2007).



Gambar 2.9 Sistem imun mukosa saluran cerna.

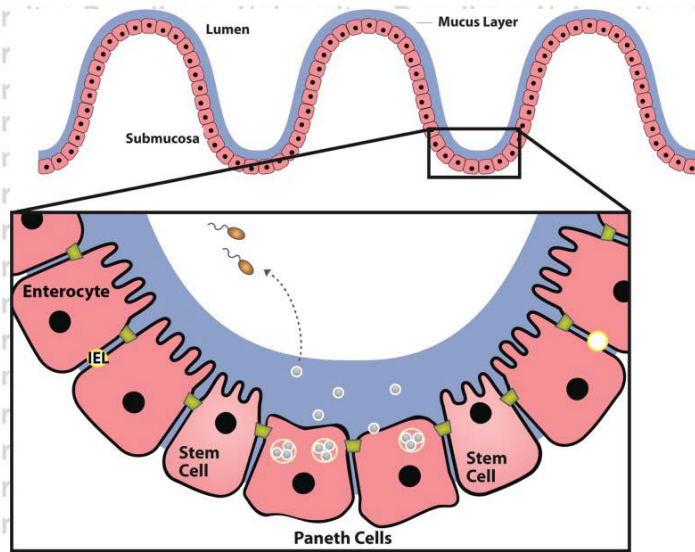
Keterangan: barier sel epitel khusus (IEC). Sel epitel usus membentuk barier biokimia dan fisik yang memisahkan mikroba luminal dan sistem kekebalan mukosa. *Intestinal epithelial stem cells* (IESC) niche, yang mengandung sel epitel, stroma dan sel haematopoietik, mengendalikan pembaharuan lapisan sel epitel secara terus-menerus oleh sel induk kriptokokus. Maturasi IEC - kecuali sel Paneth - bermigrasi melewati kriptas dan villus, seperti yang ditunjukkan oleh panah putus-putus. Sel goblet sekretori dan sel Paneth mengeluarkan mukus dan protein antimikroba (AMPs) untuk mengeliminasi bakteri dari permukaan epitel. *Transcytosis* dan lumen melepaskan sekretori IgA (SIgA) dimana selanjutnya berkontribusi pada fungsi barier mukosa. Sel mikrofold (sel M) dan sel goblet memediasi transport antigen luminal dan bakteri hidup untuk melewati barier epitel menuju sel dendritik (DC), dan makrofag lumen saluran cerna melalui dendrit transepitel.

Sumber: Peterson & Artis, 2014.

Luas permukaan saluran cerna mencapai hampir 400 m² yang terdiri dari kriptas dan vili. Permukaan ini selalu diperbarui oleh *pluripotent intestinal epithelial stem cell* (pluripotent IESCs) (Peterson & Artis, 2014). Saluran cerna ini selalu terpajan dengan berbagai antigen mikroba dan makanan sehingga dapat menerangkan mengapa sistem limfoid saluran cerna (*gut associated lymphoid tissue/ GALT*) memegang peranan pada hampir 2/3 seluruh sistem imun. Pertahanan mukosa adalah struktur kompleks yang terdiri dari komponen selular dan non selular. Pertahanan yang paling kuat masuknya antigen ke jaringan limfoid mukosa adalah adanya enzim yang terdapat mulai dari mulut sampai ke kolon. Enzim proteolitik di dalam lambung (pepsin, papain) dan usus halus

(tripsin, kimotripsin, protease pankreatik) berfungsi untuk digesti. Pemecahan polipeptida menjadi dipeptida dan tripeptida bertujuan agar dapat terjadi proses digesti dan absorpsi bahan makanan, serta membentuk protein imunogenik yang bersifat nonimun (peptida dengan panjang asam amino <8-10 bersifat imunogenik yang buruk). Efek protease berlipat ganda dengan adanya garam empedu yang memecah karbohidrat dan didapatkan suatu sistem yang poten untuk meningkatkan paparan antigen (Ag). Kadar pH yang sangat rendah di dalam lambung dan usus halus berfungsi sebagai respons imun terhadap antigen oral. Sebagian besar respons imun ini berfungsi melindungi manusia dari bahan patogen. Perubahan untuk merespons atau menekan respons imun berhubungan dengan cara antigen masuk ke dalam tubuh. Patogen invasif (yang merusak pertahanan) memicu respons agresif, sedangkan untuk kolonisasi luminal dibutuhkan yang lebih bersifat respons toleran (Grave *et al.*, 2007).

Komponen utama pertahanan mukosa saluran cerna adalah *intestinal epithelial barrier*. Epitelium saluran cerna terbentuk oleh satu lapisan sel yang memisahkan host (sisi submukosa) dari lumen saluran cerna (sisi luminal) (gambar 2.10). Lapisan epitel ini mengatur pengangkutan nutrisi, ion dan aliran cairan dua arah. Permukaan luminal mukosa saluran cerna berada dalam hubungan eukariotik prokariotik simbiotik dengan flora komensal yang terdiri dari ekosistem beragam hingga 10^{11} organisme per gram jaringan usus. Bakteri ini bermanfaat bagi host dengan memetabolisme vitamin dan mendegradasi asam empedu saat berkembang dalam lingkungan luminal yang kaya nutrisi, suhu terkontrol, dan anaerobik. Interaksi host-flora juga penting untuk pengembangan struktur epitel saluran cerna dan fungsi *barrier* (Halpern & Denning, 2015).



Gambar 2.10 Barrier epitel saluran cerna.

Keterangan: satu lapisan epitel (termasuk enterosit, *paneth cells* dan *stem cells*) memisahkan lumen saluran cerna dari submukosa. Kripta *Paneth cells* mensekresi peptida antimikroba yang mengatur populasi mikroba dan melindungi *neighboring stem cells*. IEL adalah sel imun bawaan yang terletak di antara sel epitel. IEL khusus yang mengandung reseptor sel T (TCR) $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ IEL) terbukti mampu mempromosikan fungsi penghalang epitel dengan mencegah translokasi bakteri untuk menghasilkan faktor antimikroba, dan melalui interaksi dengan protein *tight junction*, *occludin*.

Sumber: Halpern & Denning, 2015.

Epitel diorganisasikan ke dalam kripta (invaginasi) dan villi (evaginasi).

Dasar dari kripta ini adalah sel-sel induk yang berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi enterosit, kemudian bermigrasi ke ujung villus, dan akhirnya keluar dari lumen melalui anoikis (bentuk fisiologis dari apoptosis). Keseluruhan proses tersebut menghasilkan pergantian epitelium setiap 5 hari. Dengan demikian, salah satu bentuk pertahanan saluran cerna terhadap inflamasi / *injury* adalah kemampuan proliferasi dan regenerasi diri yang luar biasa. Monolayer epitel saluran cerna juga melindungi dan memisahkan diri secara fisik dari stres eksogen dengan membentuk lapisan pelindung lendir yang tebal di atas mukosa saluran cerna. Lapisan lendir ini tersusun atas mucin yakni glikoprotein kompleks yang disekresikan oleh sel goblet (enterosit sekretorik khusus) dimana melapisi permukaan epitel dari rongga hidung/orofaring sampai ke rectum (Halpern & Denning, 2015).

Lapisan lendir tersebut menghambat ikatan mikroba-epitel secara langsung, menggabungkan bakteri yang melekat, dan meningkatkan penghancuran bakteri dengan mengurangi *shear-forces* aliran luminal. Literatur lain menjelaskan bahwa mucin mampu membuat partikel, bakteri dan virus menjadi terperangkap dalam lapisan mukus dan akan dikeluarkan dengan proses peristaltik. Pertahanan ini mencegah patogen dan antigen masuk ke bagian bawah epitel, disebut sebagai proses eksklusi nonimun. Selain itu, mucin mengandung protein spesifik yang mengikat dan menstabilkan *critical trophic and reparative factors* (misalnya faktor pertumbuhan epidermal (EGF) dan faktor trefoil saluran cerna) di permukaan epitel, berpotensi berkontribusi terhadap pergantian epitel (Halpern & Denning, 2015). Mucin juga berfungsi sebagai cadangan IgA, antibodi ini berasal dari epitel dan dikeluarkan ke dalam lumen (Grave *et al.*, 2007).

Pertahanan kimia disekresi oleh enterosit maupun sel Paneth memberikan perlindungan tambahan. Sel Paneth adalah enterosit sekretorik khusus yang terletak di dasar kriptus usus halus. Berdekatan dengan sel induk, sel Paneth mensekresikan lisozim, fosfolipase A2, dan peptida antimikroba (defensin (α dan β) dan *cathelicidin*) yang mengontrol populasi mikroba sejak usia kehamilan 12 minggu. Jumlah sel Paneth sangat sedikit pada neonatus prematur namun akan bertambah seiring pertambahan usia sampai dengan dewasa (Halpern & Denning, 2015; Maheshwari, 2016).

Defensin pada awalnya ditemukan pada neutrofil manusia, defensin adalah peptida kationik kecil yang memainkan peran kunci dalam pembunuhan mikroba tanpa bantuan oksigen. Defensin berfungsi apabila menginsersi ke dalam membran berbagai sel prokariotik, termasuk bakteri gram positif dan gram negatif, jamur, protozoa, spirochetes, dan virus berkapsul. Ketika berada di dalam selaput sel mikroba, mereka membentuk pori-pori yang memungkinkan

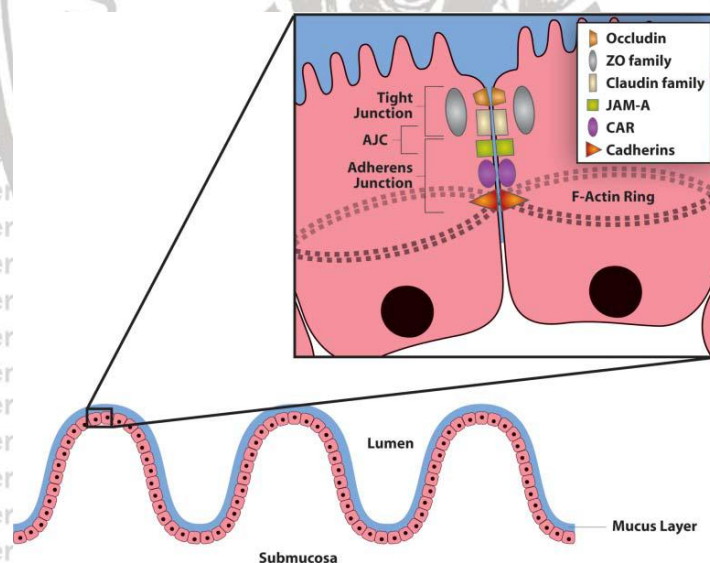
lewatnya anion melalui membran, sehingga terjadi depolarisasi dan membunuh organisme. Sel Paneth mensekresi α -defensin (*human defensin*, HD5 dan HD6) sebagai respons terhadap rangsangan mikroba. Sel-sel epitel saluran cerna terutama mensekresikan β -defensin (hBD1, 2, dan 3) dengan distribusi jaringan spesifik yang bervariasi (Halpern & Denning, 2015).

Studi *in vitro* menunjukkan bahwa peptida antimikroba ini dapat berkontribusi untuk pertahanan host secara tidak langsung (dengan menginduksi *host response*) serta langsung (dengan membunuh mikroba). *Cathelicidin* dan defensin memiliki sifat proinflamasi dengan mengaktifkan pelepasan kemokin yang menghasilkan kemotaksis dan diferensiasi sel imun. Defensin yang dilepaskan ke dalam kripta saluran cerna dapat menstimulasi sekresi klorida dari enterosit terdekat untuk membersihkan patogen dan racun dari *stem cell* yang sensitif (Halpern & Denning, 2015).

Lapisan barier berikutnya adalah integritas epitel. Bersama dengan hubungan bagian apeks dan basal yang kuat, membran dan ruang antara sel membatasi masuknya makromolekul besar. Namun demikian, ikatan yang kuat ini masih dapat dilewati oleh di- dan tripeptida serta ion-ion tertentu. Pada keadaan inflamasi, ikatan tersebut menjadi kurang kuat sehingga makromolekul dapat masuk ke dalam lamina propria, contohnya respon terhadap antigen makanan atau masuknya mikroorganisme. Pada keadaan ini, antigen makanan akan menjadi antigen asing, dimana pada individu yang memiliki bakat alergi akan menginduksi proses alergi (Grave *et al.*, 2007).

Integritas epitel diatur lebih lanjut oleh *apical junction complex* (AJC), *subapical intercellular contacts* terdiri dari protein membran dan protein sitoskeletal, yang berinteraksi membentuk *tight junction* dan *apical junction*. Protein AJC memainkan peran penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel epitel. Lapisan epitel juga mengatur permeabilitas transeluler terhadap ion dan

molekul kecil lainnya melalui perubahan ekspresi membran dan pori pori saluran ion selektif. Enterosit mengontrol sekresi Cl⁻ dan air melalui saluran-saluran tersebut mengakibatkan terjadinya diare sekretorik, mekanisme ini merupakan pertahanan lain yang dapat digunakan untuk mengeluarkan patogen yang tidak diinginkan atau toksin dari lumen saluran cerna. Sel imun bawaan terbukti berkontribusi pada fungsi *barrier* saluran cerna. *Intraepithelial lymphocytes* (IEL) adalah sel imun bawaan yang terletak di antara sel epitel dan membentuk *barrier* saluran cerna. *Intraepithelial lymphocytes* khusus yang mengandung reseptor sel T (TCR) $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ IEL) telah terbukti dapat meningkatkan fungsi *barrier* epitel dengan mencegah translokasi bakteri untuk menghasilkan faktor antimikroba. Dengan demikian, epitelium matur dibutuhkan untuk mencegah infeksi dan mempertahankan serta mengembalikan fungsi *barrier* dalam merespon inflamasi saluran cerna (Halpern & Denning, 2015).



Gambar 2.11 Struktur Apical Junctional Complex.

Keterangan: *Apical Junctional Complex* melindungi host dengan mengatur paracellular flow, AJC dibentuk oleh *tight junctions* dan *adherens junctions*.

Sumber: Halpern & Denning, 2015.

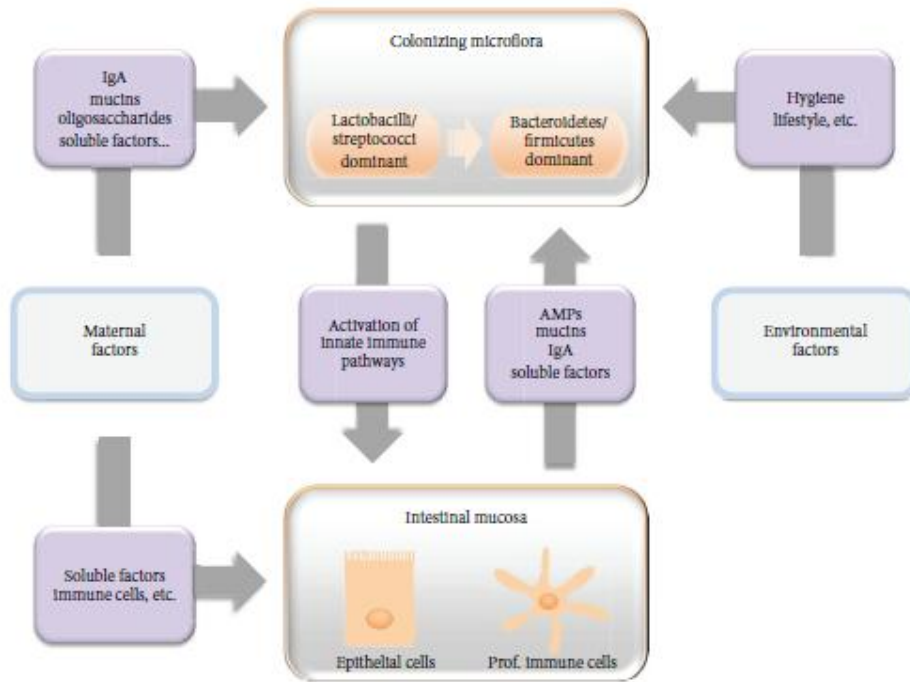
Selain *intraepithelial lymphocytes* (IEL), terdapat *intestinal epithelial cell* (IEC) yang juga berperan sebagai pertahanan saluran cerna. Sel epitel intestinal

(IEC) dapat merespons rangsangan mikroba untuk memperkuat fungsi barrier dan berperan dalam respon kekebalan serta mempertahankan fungsi imunoregulasi mendasar yang memengaruhi perkembangan dan homeostasis kekebalan mukosa. Saluran cerna secara khusus beradaptasi terhadap kolonisasi bakteri komensal yang membantu pencernaan dan fungsi sistem kekebalan mukosa. Kolonisasi mikroba tersebut berisiko menjadi infeksi dan peradangan jika terjadi gangguan pada sel epitel maupun sel imun (Peterson & Artis, 2014).

Antigen bakteri yang mampu melewati pertahanan barrier akan di-uptake oleh sel M dan dipresentasikan pada *naive* sel T lamina propria oleh *antigen presenting cell* (APC) yakni makrofag maupun sel dendritik. Selain itu bakteri akan terdeteksi oleh *pattern recognition receptor* (PRR) melalui *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) dan selanjutnya mengaktivasi *toll like receptor* (TLR) yang diekspresikan oleh sel imun bawaan. Kedua mekanisme tersebut menginduksi produksi sitokin proinflamasi (Maheshwari, 2016). Dalam keadaan normal, saluran cerna dapat mencegah reaksi imunitas yang berlebihan dengan memproduksi protein maupun sitokin antiinflamasi. Seperti dijelaskan sebelumnya, hal ini bertujuan mencegah terjadinya respons imun berlebihan yang pada akhirnya dapat melukai saluran cerna sendiri (Grave *et al.*, 2007; Maheshwari, 2016).

Pada penyakit tertentu (contohnya *inflammatory bowel disease*), aktivasi beberapa sel rusak sehingga menyebabkan inflamasi menetap. Pada alergi makanan, alergen yang menembus epitel akan menempel pada sel mast mukosa. Sel T yang teraktivasi dalam *Peyer's patch* setelah paparan dengan antigen disebut sebagai Th3. Sel ini berfungsi mengeluarkan *transforming growth factor-β*, memicu sel B untuk menghasilkan IgA dan berperan pada terjadinya toleransi oral (aktivasi antigen spesifik non respon terhadap antigen yang masuk

per oral). Sel T regulator yang paling baru dikenal adalah dengan fenotip CD4+ CD25+ CD45RA+. Sel ini awalnya dikenal pada gastritis autoimun dan berfungsi menghambat kontak antar sel serta dapat menyebabkan kelainan autoimun pada neonatus yang mengalami timektomi (Grave *et al.*, 2007).



Gambar 2.12 Faktor-faktor yang terlibat dalam adaptasi sistem imun alami mukosa saluran cerna pasca kelahiran.

Keterangan: kolonisasi mikroflora dan mukosa saluran cerna berinteraksi dalam dua arah untuk membentuk toleransi dan mutualisme antara satu sama lain. Bakteri mengaktifkan jalur imunitas alami pada sel epitel dan imun host yang menginduksi toleransi imun, sel mukosa menghasilkan faktor (peptida antimikroba AMPs, mucin, imunoglobulin A-IgA, dll) untuk mengendalikan jumlah dan komposisi bakteri. Mikroflora juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan (kebersihan, gaya hidup, dll). Faktor ibu, seperti IgA, mucin, oligosakarida, atau faktor-faktor lain, dapat memodulasi mikroflora, dan berkontribusi untuk meningkatkan pertahanan dan maturasi sistem imun (sel kekebalan ibu, dll).

Sumber: Tourneur *et al.*, 2013.

Faktor risiko yang berperan pada infeksi saluran cerna yakni paparan maternal dan lingkungan, status kekebalan tubuh, berat badan lahir, dan masa kehamilan termasuk kelahiran prematur dan berat badan lahir sangat rendah (<1500 gram saat lahir). Integritas *barrier* saluran cerna diperlukan untuk mencegah diseminasi mikroorganisme di kompartemen sistemik. Selain itu, tingkat permeabilitas saluran cerna memainkan peran kunci dalam patogenesis

inflamasi seperti *ischemia reperfusion* atau enterokolitis nekrotikan, maupun gangguan inflamasi lain yang menyebabkan nekrosis usus pada neonatus terutama neonatus prematur (Walker & Iyengar, 2014).

2.5.1 Sistem Imunitas Mukosa Saluran Cerna pada Neonatus Prematur

Pertahanan saluran cerna belum yang matang pada neonatus prematur telah terbukti dapat matang setelah lahir. Beberapa faktor menginduksi pematangan saluran cerna postnatal terkait *barrier* termasuk diet, faktor pertumbuhan epidermal, glukokortikoid endogen, dan bakteri komensal. Bakteri komensal, dikenal untuk menginduksi ekspresi protein *tight junction* yang dapat memperkuat *barrier*. Dengan demikian, neonatus dengan kolonisasi bakteri abnormal atau tertunda dapat meningkatkan risiko inflamasi terkait *barrier* yang belum matang sehingga memungkinkan masuknya mikroba, produk mikroba, atau racun dari lumen saluran cerna ke sistemik. Setelah lahir, kolonisasi mikroba dari jalan lahir dan lingkungan terjadi dalam 24 jam. Neonatus yang tidak mengalami kolonisasi mikroba dari ASI menyebabkan proliferasi mikroorganisme patogen. Struktur intraseluler yang mengatur permeabilitas saluran cerna; *tight junction* (TJ) dan *adherens junction* (AJ), serta komponen *barrier* lain yang berperan dalam integritas saluran cerna terbukti mengalami perubahan pada keadaan inflamasi (Halpern & Denning, 2015).

Segera setelah pembentukan AJC, *barrier* epitel mulai mengembangkan *barrier* fisik dan kimia dengan memproduksi defensin, lisozim serta lapisan gel musin. Sel paneth dapat dideteksi saat usia gestasi 12 minggu dan mulai menghasilkan defensin antimikroba pada 13 minggu serta lisozim pada 20 minggu. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sel-sel Paneth mengalami defisiensi dalam jumlah maupun fungsi pada neonatus prematur, usia gestasi 24 minggu (Halpern & Denning, 2015).

Tabel 2.6 Imaturitas *barrier* saluran cerna pada neonatus prematur

Komponen <i>barrier</i> saluran cerna	Waktu maturasi	Efek imaturitas pada neonatus prematur
<i>Epithelial Apical Junctional Complex</i> (AJC)	Struktur matur pada usia kehamilan 12 minggu (<i>in utero</i>) Fungsi matur pada at term	Meningkatkan permeabilitas saluran cerna Kemampuan absorpsi yang belum matang Kemampuan sekresi yang belum matang
Sel paneth	Terdeteksi pada usia kehamilan 12 minggu. Kemampuan sekresi pada usia kehamilan 13—20 minggu	Penurunan jumlah Penurunan kemampuan sekresi (Kuranganya peptida antimikroba yang diperlukan untuk mengatur kolonisasi usus)
Mucin (sel goblet)	At term	<i>Immature mucus layer</i> memberikan kesempatan bakteri untuk kontak dengan epitel saluran cerna (kurangnya <i>barrier</i> protektif)
<i>Intraepithelial lymphocyte</i> (IEL)	Subset reseptor sel T (TCR) $\gamma\delta$ dikeluarkan awal saat usia kehamilan 24 minggu	Rekrutmen awal dibutuhkan untuk meningkatkan fungsi <i>barrier</i> yang belum matang (penting untuk mencegah translokasi bakteri, meningkatkan fungsi TJ, mengatur inflamasi, dan meningkatkan perbaikan epitel).

Sumber: Halpern & Denning, 2015.

Reseptor sel T (TCR) $\gamma\delta$ ($\gamma\delta$ IEL) telah terbukti direkrut lebih awal pada saluran cerna prematur (dengan usia kehamilan 24 minggu), hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan fungsi *barrier* sementara penghalang epitel belum matang.

Eksresi mucin dapat dideteksi sejak usia kehamilan 6,5 minggu dengan terus mengalami pematangan sepanjang kehamilan (Halpern & Denning, 2015).

Maheshwari, 2016 menjelaskan bahwa sel goblet mulai memproduksi mucin saat usia kehamilan 12 minggu yang masih mengandung *protective mucin 2* (*muc2*) dalam jumlah minimal (Maheshwari, 2016).

Adapun imaturitas *barrier* saluran cerna pada prematur dan efek yang ditimbulkan seperti pada tabel 2.6. Bakteri yang dapat melewati imunitas barier akan mencapai lamina propia dan menginduksi MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*). Makrofag merupakan sistem imun bawaan yang berperan fagositik terhadap antigen antigen yang mampu mencapai lamina propia.

Makrofag pertama kali diproduksi saat usia kehamilan 11—12 minggu dan meningkat saat usia kehamilan 12—22 minggu. Aktivitas berlebihan dari makrofag dikontrol oleh TGF- β yang terdapat pada matriks transelular. Pada saluran cerna neonatus prematur, bioaktivitas dari TGF- β sangat minimal berakibat pada aktivitas makrofag yang berlebihan. Respon inflamasi tersebut diduga merupakan salah satu penyebab terjadinya *mucosal injury* pada prematur. Selain makrofag, sel imun bawaan juga diperankan oleh sel dendritik, sel dendritik terdeteksi pada lamina propia dan *Peyer's patches* setelah usia kehamilan 14 minggu (Maheshwari, 2016).

Peyer's patches pertama kali muncul saat usia kehamilan 11 minggu dan berkembang pada *mid-late gestation*. Pada neonatus atterm, limfoid telah terproduksi secara struktural sejak lahir, namun masih dikatakan '*naive*' dan membutuhkan beberapa minggu untuk berkembang. Neonatus prematur dengan usia kehamilan kurang dari 32 minggu hanya memiliki setengah *Peyer's patches* dari seharusnya (Maheshwari, 2016). Adapun tabel perkembangan *Peyer's patches* pada fetus dapat dilihat pada tabel 2.7.

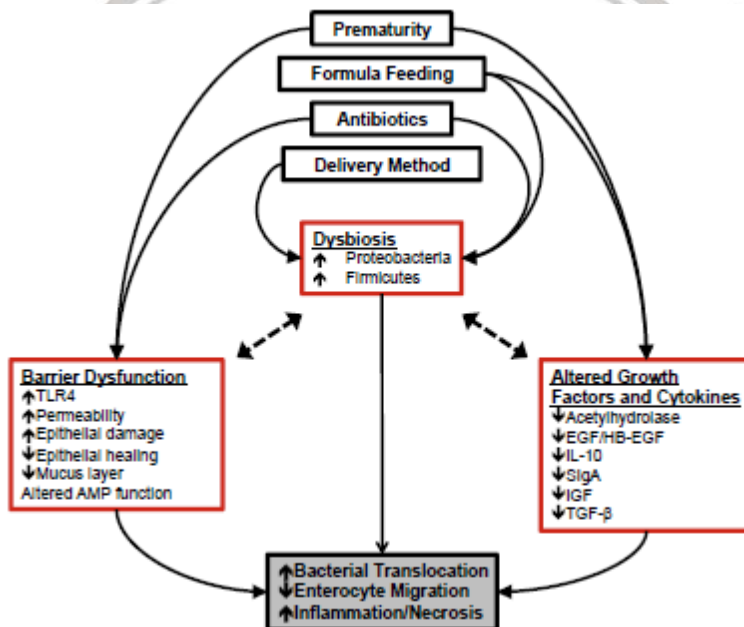
Tabel 2.7 Perkembangan *Peyer's patches* pada fetus.

Usia kehamilan	Perkembangan <i>Peyer's patches</i>
11 minggu	<i>Peyer's patches anlagen</i> dengan HLA-DR, sel limfoid CD4,
16 minggu	Sel B dan sel T Sel CD8
16—18 minggu	Maturasi sel B dengan IgM dan IgD permukaan Sel CD5 B-1 IgA permukaan pada sel B
8—20 minggu	<i>Peyer's patches zonation</i> ke area sel B dan sel T
24 minggu	<i>Peyer's patches</i> teriden tifikasi secara makroskopis
Usia 0—4 minggu (postnatal)	Formasi <i>germinal center</i>

Sumber: Maheshwari, 2016.

2.6 Inflamasi Saluran Cerna

Patofisiologi inflamasi saluran cerna belum sepenuhnya diketahui. Kombinasi berbagai faktor predisposisi antara lain genetik berupa polimorfisme TLR, pemberian susu formula, pemberian antibiotik, kelahiran prematur sehingga terjadinya imaturitas saluran cerna berakibat menurunnya produksi mukus dan *immunoglobulin* (Ig) A, ketidakseimbangan tonus mikrovaskular, disertai kolonisasi mikroba abnormal serta imunoreaktivitas yang tinggi pada mukosa saluran cerna (Markel *et al.*, 2014; Patel & Denning, 2015) diduga menjadi penyebab terjadinya inflamasi saluran cerna.



Gambar 2.13 Hubungan faktor risiko dengan kejadian inflamasi saluran cerna.

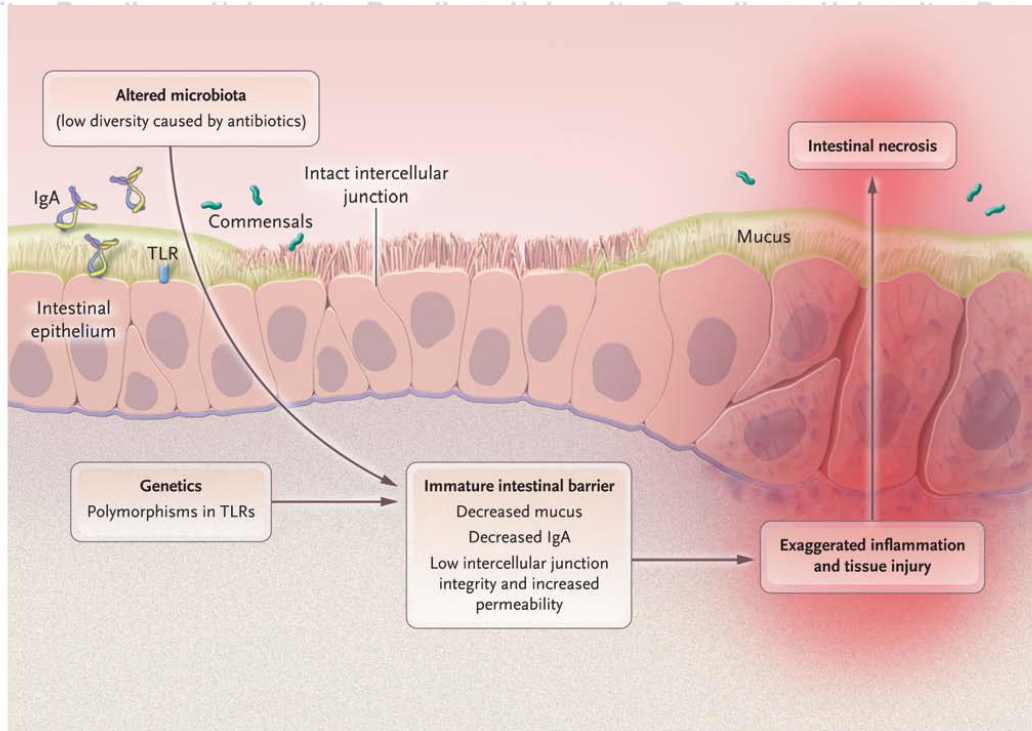
Keterangan: Prematuritas, pemberian susu formula, penggunaan antibiotik, dan metode persalinan dapat mengakibatkan dysbiosis (ketidak seimbangan bakteri komensal dan patogen). *Dysbiosis*, disfungsi *barrier*, serta perubahan faktor pertumbuhan maupun sitokin memiliki hubungan timbal balik, dimana semua mekanisme tersebut meningkatkan translokasi bakteri, menurunkan perpindahan enterosit, dan meningkatkan inflamasi/nekrosis.

Sumber: Tanner *et al.*, 2015.

Ekosistem saluran cerna pada neonatus masih sangat *fragile*. Pada saat lahir, neonatus terpapar oleh lingkungan luar untuk pertama kali namun respon imun harus segera dapat membedakan patogen atau bukan, termasuk

membedakan antigen makanan dan mikrobiota dengan patogen potensial. Hal tersebut sulit dilakukan oleh neonatus terutama yang prematur. Pemberian antibiotik *broad spectrum* pada prematur juga mengganggu sistem imun dimana dapat menghambat kolonisasi bakteri di traktus intestinalis. *Barrier* epitel yang belum matang lebih sensitif terhadap deteksi bakteri dan lebih rentan terhadap translokasi bakteri, yang memungkinkan terjadinya respons inflamasi yang tidak beralasan dan translokasi patogen, dimana keduanya dapat menyebabkan kerusakan saluran cerna (Tanner *et al.*, 2015).

Sistem kekebalan bawaan merupakan garis pertahanan pertama melawan infeksi. Sel kekebalan bawaan merespons secara nonspesifik dan tidak memberi kekebalan jangka panjang pada inang. Komponen utama terdiri dari *barrier* anatomis (seperti epitel dan lapisan mukus saluran cerna) serta sel (termasuk makrofag, neutrofil, sel dendritik, sel pembunuh alami, sel B, sel limfoid bawaan, sel T). Selain itu, kehadiran mikrobiota komensal dapat berfungsi sebagai bagian dari sistem kekebalan bawaan dengan mencegah kolonisasi oleh bakteri patogen (resistensi kolonisasi) (Tanner *et al.*, 2015).



Gambar 2.14 Patofisiologi inflamasi saluran cerna.

Keterangan: faktor-faktor predisposisi mencakup faktor genetik dan imaturitas saluran cerna janin, termasuk perubahan mikrobiota, fungsi pertahanan saluran cerna yang tidak adekuat, dan respons inflamasi yang berlebihan. Faktor-faktor ini berkontribusi pada nekrosis saluran cerna yang merupakan ciri khas enterokolitis nekrotikan. TLR : *toll like receptor*.

Sumber: Neu & Walker, 2011

Beberapa penelitian menggunakan model hewan dan kultur sel fetal menunjukkan bahwa fetus dan neonatus prematur memiliki respon imun yang berlebih terhadap stimulus mikrobial luminal, dimana stimulus tersebut merangsang perubahan *barrier* pertahanan saluran cerna. Penelitian imunologis pada mukosa mengindikasikan bahwa setelah kolonisasi mikrobial postnatal, saluran cerna berusaha mengadaptasi dengan memodifikasi respon imun alami epitelial. Ekspresi *toll like receptor 4* (TLR 4) lebih meningkat pada sel fetal dibandingkan pada dewasa, selain itu faktor regulator yang juga berpengaruh pada inflamasi, berkembang lebih lambat. Perbedaan respon inflamasi yang terjadi pada saluran cerna matur dan prematur merupakan mekanisme dasar terjadinya respon inflamasi pada saluran cerna. Pengamatan pada enterosit

neonatus prematur, tidak dipersiapkan untuk stimulasi yang berlebihan akibat kolonisasi postnatal. Beberapa pengamatan klinis menunjukkan peradangan berlebihan pada saluran cerna sebagai mekanisme perlukaan saluran cerna. Sebagai contoh, kadar serum beberapa sitokin dan kemokin yang merekrut sel inflamasi telah dilaporkan lebih tinggi pada pasien dengan enterokolitis nekrotikan dibandingkan neonatus prematur yang tidak terpengaruh enterokolitis nekrotikan. Di antara peningkatan sitokin ini, interleukin-8, yang diproduksi oleh sel epitel dan memediasi migrasi neutrofil ke tempat peradangan, dapat menyebabkan nekrosis dan peningkatan produksi protein fase akut di saluran cerna. Dengan demikian, peningkatan interleukin-8 dan respons inflamasi berlebihan yang dihasilkan oleh enterosit janin dibandingkan dengan enterosit matang sejalan dengan kerentanan neonatus prematur terhadap kejadian inflamasi saluran cerna (Choi, 2014; Tanner *et al.*, 2015).

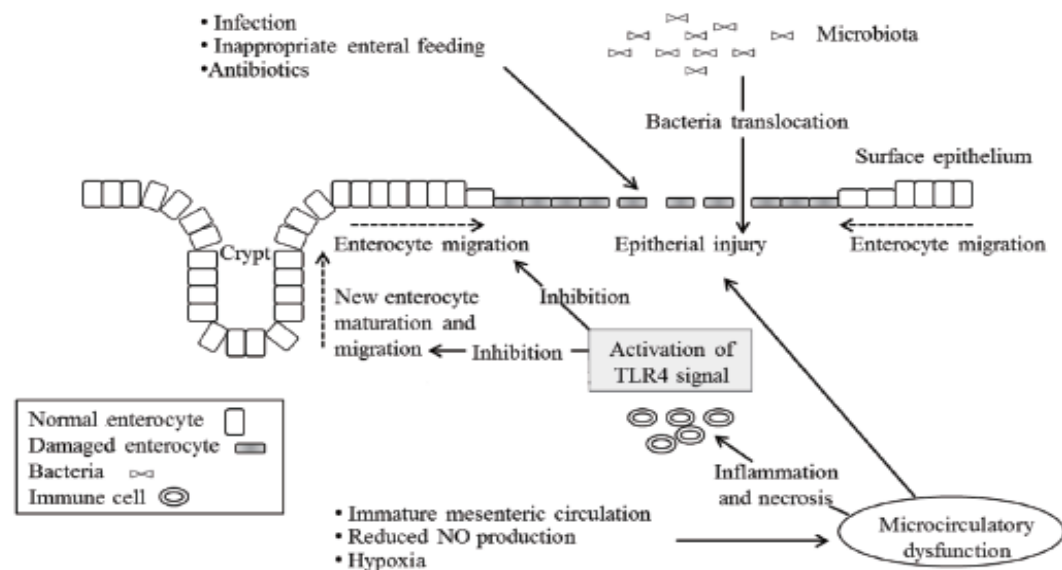
Pemisahan lumen saluran cerna dari organisme lainnya dilakukan melalui penghalang fisik yang dibentuk oleh sel epitel saluran cerna. Semua sel epitel saluran cerna, termasuk enterosit, sel Paneth, dan sel goblet, berperan penting dalam menjaga integritas *barrier*. *Barrier* dipelihara dengan adanya *tight junction* antara sel epitelial. Pada manusia, *tight junction* terbentuk pada usia kehamilan 10 minggu, terdiri dari *claudin*, *junctional adhesion molecules*, dan *zonula occludins*. Sel goblet, terdapat pada seluruh usus, terlibat dalam sekresi mucin glikoprotein yang menghasilkan lapisan mukus. Sel goblet dapat ditemukan pada usia kehamilan 9 sampai 12 minggu, dan mucin mencapai tingkat dewasa pada usia kehamilan 27 minggu. Penelitian model hewan menunjukkan bahwa ekspresi mukus dipengaruhi oleh kolonisasi bakteri, dimana glikosilasi tersebut mengubah interaksi dengan bakteri patogen (Tanner *et al.*, 2015).

Mukus terbentuk dalam dua lapisan yang berbeda; lapisan luar merupakan lapisan tebal berfungsi mencegah bakteri saluran cerna mencapai

lapisan epitel, sedangkan lapisan dalam sangat penting untuk *cell signaling* jika terjadi gangguan. Selain mencegah interaksi bakteri dengan epitel, lapisan lendir juga menyediakan membentuk peptida antimikroba dan sekretori IgA. Jika bakteri patogen atau komensal menembus lapisan lendir dan mencapai sel epitel, *pattern recognition receptors* (PRRs) dapat merasakan adanya bakteri dan melakukan respons yang tepat. *Pattern recognition receptor* yang paling umum adalah *toll like receptor* dan *nucleotide-binding oligomerization domains* (NOD), yang diekspresikan oleh sel epitel dan sel imun, terutama makrofag dan sel dendritik, di seluruh kompartemen saluran cerna. *Pattern recognition receptor* mendeteksi struktur bakteri yang umum, seperti lipopolisakarida, flagella, dan DNA. Dogma saat ini menunjukkan bahwa abnormalitas sinyal TLR4 pada epitel saluran cerna prematur berhubungan dengan kejadian inflamasi. Namun, pada deteksi komponen mikroba, PRR protektif dapat memulai jalur pensinyalan yang mengarah pada produksi peptida antimikroba, IgA, dan *epithelial healing factor* (Choi, 2014; Tanner *et al.*, 2015).

Di antara TLRs manusia yang dikenal, tipe 4 memainkan peran penting dalam terjadinya inflamasi saluran cerna. *Toll like receptor 4* dapat diaktifasi oleh bakteri (yaitu lipopolisakarida) atau komponen imun bawaan lainnya. Aktivasi TLR4 di epitel saluran cerna telah terbukti menghambat migrasi enterosit dan menyebabkan apoptosis enterosit pada model tikus, sementara penghambatan TLR4 telah ditemukan untuk mencegah perkembangan inflamasi saluran cerna dan mengurangi tingkat apoptosis enterosit. Perkembangan janin menunjukkan ekspresi TLR4 yang tinggi sampai akhir masa gestasi, karena TLR4 berperan mengatur proliferasi dan diferensiasi epitel saluran cerna. Ekspresi TLR4 yang terus meningkat selama kehidupan intrauterin tidak meningkatkan risiko EKN untuk janin, hal ini diduga karena janin hidup di lingkungan yang steril. Pada akhir masa gestasi, neonatus menunjukkan ekspresi rendah TLR4, dan sinyalnya

tetap tidak aktif dengan adanya mikroflora usus normal. Namun, ekspresi TLR4 pada neonatus prematur sangat tinggi terlebih lagi ketika saluran cerna prematur didominasi oleh mikroflora patologis baik oleh karena penggunaan antibiotik *broad spectrum* yang mengurangi kolonisasi bakteri komensal pada saluran cerna, sehingga sinyal TLR4 dapat menjadi terlalu aktif. Selain itu kondisi imaturitas menyebabkan penurunan kemampuan tubuh untuk memperbaiki epitel setelah cedera (gambar 2.15) (Choi, 2014; Tanner *et al.*, 2015).



Gambar 2.15 Peranan TLR4 dalam perlukaan epitel saluran cerna.

Keterangan: Beberapa faktor prenatal seperti infeksi, nutrisi enteral yang tidak tepat, penggunaan antibiotika, disfungsi mikrosirkulasi, dan hipoksia menginduksi perlukaan epitel. Hiperaktivasi TLR4 *signaling* mempengaruhi proses penyembuhan dan kemudian menyebabkan translokasi bakteri melewati pertahanan epitel.

Sumber: Choi, 2014.

Sel paneth yang ditemukan di dasar kriptus usus adalah jenis sel sekretori lain yang memberikan perlindungan pada host. Sel paneth terbentuk pada usia kehamilan 13 minggu dan menghasilkan AMPs, yang berfungsi untuk menonaktifkan atau membunuh mikroorganisme yang telah memasuki saluran cerna. Enterosit, makrofag, dan neutrofil manusia juga dapat menghasilkan AMPs, termasuk α -defensin, β -defensin, lisozim, dan fosfolipase, dengan

defensin dan lisozim menjadi yang paling umum di saluran cerna neonatal (Tanner *et al.*, 2015).

Hipotesis lain adalah adanya kolonisasi mikroba yang tidak sesuai pada neonatus prematur merupakan faktor risiko terjadinya inflamasi saluran cerna, dimana enterokolitis nekrotikan terjadi paling cepat 8-10 hari setelah lahir, pada saat bakteri anaerob berkolonisasi di saluran cerna. Penurunan spesies dan keragaman mikrobiota dapat menyebabkan resistensi kolonisasi, sehingga menurunkan fungsi perlindungan tubuh menghadapi patogen yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya inflamasi saluran cerna (Neu & Walker, 2011).

2.6.1 Sekretori Imunoglobulin A pada Inflamasi Saluran Cerna

Manusia mengeluarkan sekitar 3 gram sekretori imunoglobulin A (SIgA) ke dalam lumen saluran cerna setiap hari, yang mencerminkan peran pentingnya dalam melindungi permukaan mukosa. Kadar SIgA saluran cerna tikus meningkat segera setelah kolonisasi dengan bakteri, seperti halnya jumlah sel plasma yang mensekresi SIgA di lamina propia. Sekitar 25 hingga 75% dari SIgA dilaporkan berikatan dengan mikrobiota komensal, menunjukkan bahwa mikrobiota juga membentuk komposisi komunitas mikroba. Kontribusi penting SIgA terhadap fungsi *barrier* terbukti dari penelitian pada tikus yang kekurangan sel B dan pada tikus yang tidak memiliki reseptor imunoglobulin polimer yang diperlukan untuk transportasi SIgA ke lumen. Kedua tikus tersebut telah meningkatkan stimulasi respon bawaan dalam sel epitel saluran cerna di usus kecil dan besar (Wells *et al.*, 2016).

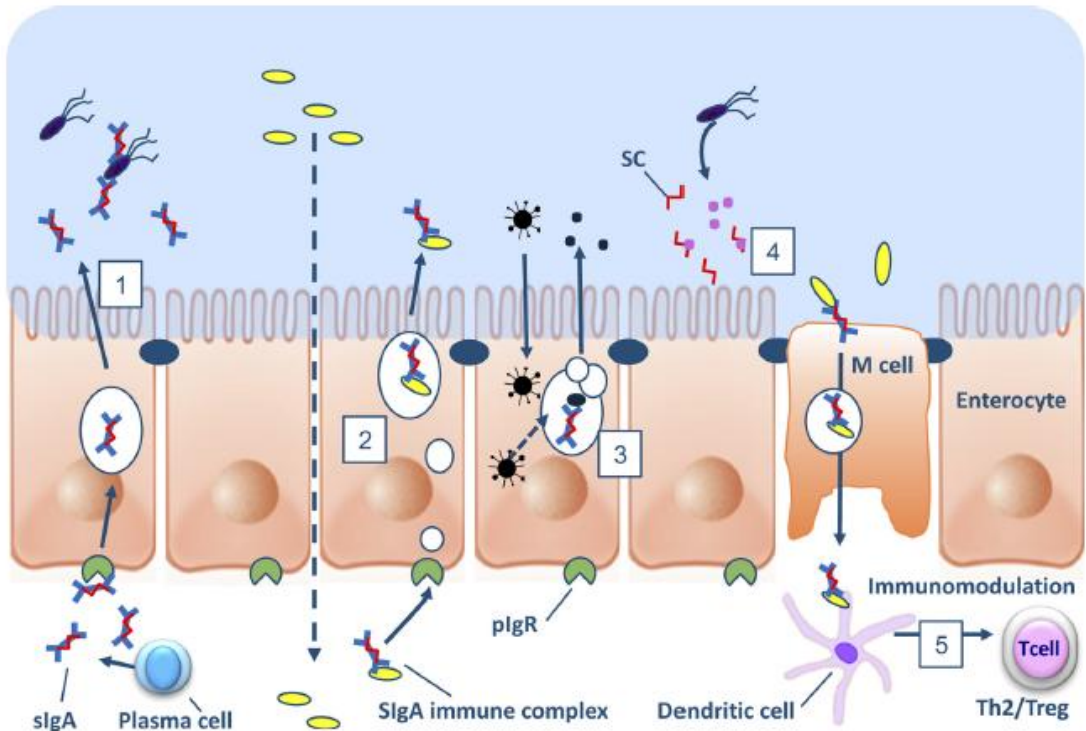
Antigen bakteri yang mampu melewati pertahanan barier akan di-*uptake* oleh sel M dan dipresentasikan pada *naive* sel T lamina propria oleh *antigen presenting cell* (APC) yakni makrofag maupun sel dendritik. Sel T teraktivasi akan mensekresi IgA untuk menginduksi sitokins seperti *transforming growth factor* (TGF- β) dan IL-4 yang selanjutnya memodulasi *class-switching* dari sel B

untuk memproduksi IgA. Sitokin yang disekresi sel T mukosa (IL-4 dan TGF- β) dan sel epitelial (TGF- β) bekerja sama untuk maturasi IgA yang diproduksi oleh sel B (Maheshwari, 2016).

Sekretori IgA yang diproduksi oleh sel-sel plasma dalam mukosa lamina propia (LP) dikenali oleh reseptor Ig polimer (pIgR) yang diekspresikan pada membran basal enterosit. Sekretori IgA berikatan dengan pIgR melalui komponen sekretori mengakibatkan transport melalui vesikel dan dilepaskan ke lumen, suatu proses yang dikenal sebagai *transcytosis*. Komponen sekretori dalam SIgA memberikan sifat hidrofilik ke fragmen Fc dari antibodi IgA, yang dianggap penting untuk berinteraksi dengan mukus dan oleh karena itu berperan sebagai pertahanan pada lapisan lendir (Wells *et al.*, 2016).

Mekanisme utama perlindungan yang dimediasi SIgA adalah eksklusi imun, merujuk pada ikatan antibodi terhadap mikroorganisme dan toksin, sehingga mencegah kolonisasi atau toksisitas dan kerusakan sel epitel. Bukti kuat untuk mekanisme perlindungan ini berasal dari beberapa model hewan in vitro, termasuk penelitian yang menggunakan hibridoma yang ditanamkan di bagian belakang tikus yang mengeluarkan IgA spesifik antigen. Selain itu, SIgA dapat berikatan dengan patogen intraseluler dalam endosome selama *transcytosis* ke lumen. Mekanisme ini terbukti menghambat terjadinya influenza, virus Sendai, dan rotavirus, serta berkontribusi pada kekebalan yang mampu menginfeksi sel epitel mukosa. Lebih lanjut, SIgA juga dapat berikatan dengan kompleks antigen yang terbentuk di LP sebelum transpor yang dimediasi pIgR melalui sel epitel, sehingga mengurangi kemungkinan reaksi inflamasi dan respons sistemik. *Secretory component* yang bebas, polipeptida yang terdiri dari bagian ekstraseluler dari pIgR yang tetap melekat pada IgA dimer setelah *transcytosis*, juga dilaporkan memiliki fungsi protektif pada permukaan epitel. *Secretory component* bebas yang disekresi berfungsi untuk menetralkan

Clostridium difficile toksin A dan enteropatogenik *E. coli* intimin melalui interaksi dengan residu sialic dan galaktosa yang terdapat pada polipeptida SC (Wells *et al.*, 2016).



Gambar 2.16 Representasi skematis dari mekanisme perlindungan IgA,

Keterangan: sekretori IgA (SIgA), atau komponen sekretori (SC) dalam mukosa saluran cerna; 1: sel plasma dalam lamina propria (LP) menghasilkan IgA polimer, yang diangkut melintasi sel epitel (proses yang dikenal sebagai *transcytosis*) ke lumen oleh reseptor Ig polimer (pIgR), dimana dapat berinteraksi dengan antigen bakteri, virus, racun, dll. untuk mengeluarkannya dari kontak dengan epitel; 2: dalam LP, IgA polimerik (pIgA) dapat berikatan dengan kompleks imun, termasuk yang terdiri dari agen infeksi, dikeluarkan dengan cara diangkat oleh *transcytosis*; 3: pIgA yang dimediasi oleh pIgR melalui sel-sel epitel dapat mengganggu perakitan virus intraseluler di aparatus Golgi; 4: SC bebas dalam lumen telah terbukti menetralkan toksin patogen; 5: SIgA memfasilitasi pengambilan patogen ke dalam *IgA-inducing Peyer's patches* dan kompartemen limfoid yang terisolasi serta presentasi ke sel dendritik pada *subepithelial dome region*. Pengenalan SIgA oleh sel dendritik menghambat sekresi sitokin IL-12, yang mengarah pada induksi respon sel T *helper 2* (Th2) atau sel T *regulatory* (Treg).

Sumber: Wells *et al.*, 2016.

Terlepas dari efek langsungnya pada eksklusi imun dan faktor patogenisitas, SIgA dilaporkan berkontribusi pada homeostasis dengan mempromosikan respons anti-inflamasi pada permukaan mukosa. Dalam usus kecil, SIgA memfasilitasi pengambilan patogen ke dalam patch Peyer yang menginduksi IgA serta kompartemen limfoid yang terisolasi, pengenalan SIgA

oleh sel dendritik dilaporkan dapat menghambat sekresi sitokin IL-12, yang mengarah pada induksi sel Th-2 atau respon sel T *regulatory*. Fungsi SIGA tersebut secara kolektif memperkuat integritas penghalang saluran cerna, meredam respons imun proinflamasi, dan dengan demikian berkontribusi terhadap homeostasis saluran cerna (Wells *et al.*, 2016).

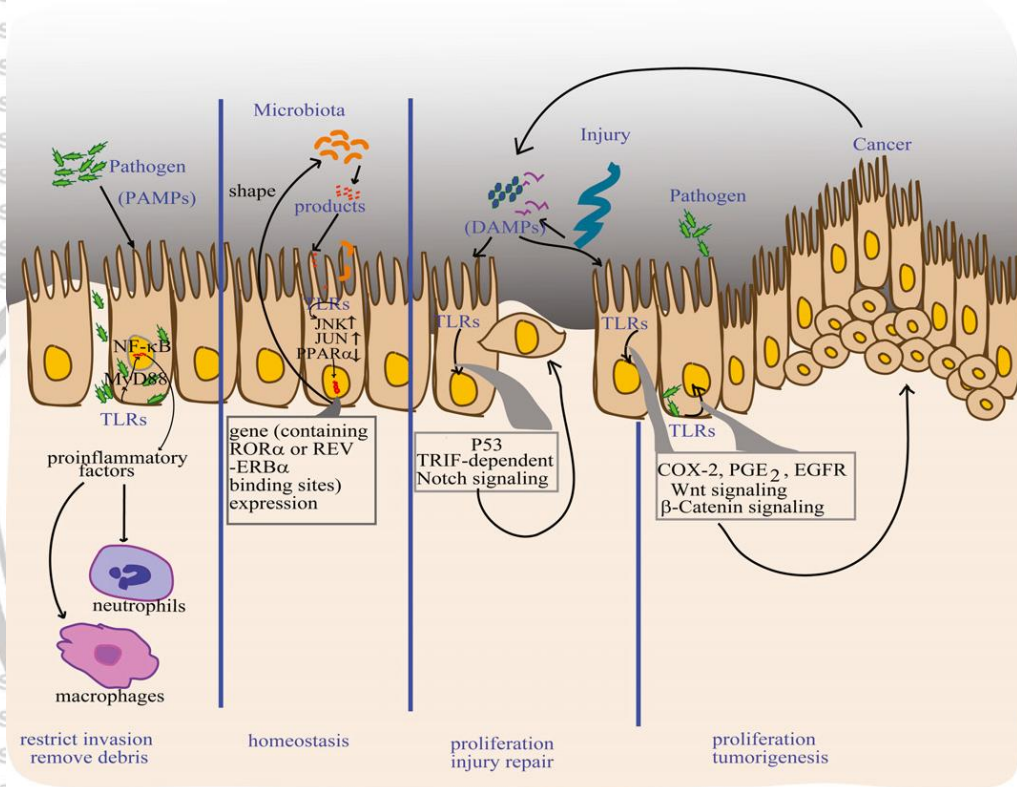
2.6.2 Human Beta Defensin 2 pada Inflamasi Saluran Cerna

Mukosa saluran cerna yang belum matang rentan terhadap respons berlebihan proinflamasi, yang dapat meningkatkan risiko patologi inflamasi.

Selama kehamilan, *T helper 2* berperan mencegah reaksi imunologis yang merugikan antara ibu dan janinnya. Dengan demikian, saluran cerna neonatal yang belum matang, dibandingkan yang matang, mengandung lebih sedikit sel T total. Gen-gen proinflamasi bawaan, seperti NF κ B, *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88), TLR 2, TLR4, dan *TNF receptor associated factor* (TRAF), terlalu banyak diekspresikan, dan umpan balik negatif gen regulator tidak terekspresikan, sehingga mukosa neonatal terlalu sensitif terhadap infeksi bakteri dan alergi makanan (He *et al.*, 2016).

Toll like receptor adalah reseptor pengenalan pola utama dari sistem kekebalan bawaan dan mengenali berbagai macam pola molekuler terkait patogen (PAMPs) yang diproduksi oleh mikroorganisme. Setelah mengenali dan mengikat PAMP spesifik, masing-masing TLR memulai mekanisme peradangan melalui NF- κ B. Sinyal ini menghasilkan sekresi faktor proinflamasi yang selanjutnya menginisiasi berkumpulnya sel kekebalan tubuh, neutrofil, dan makrofag, sehingga pada akhirnya mengarah pada patogen infeksi (gambar 2.17). Pola molekuler terkait patogen (PAMP) pada bakteri komensal memiliki struktur yang berbeda dengan PAMP patogen; tidak hanya ditolerir oleh TLRs, namun pengenalan TLR terhadap mikroflora komensal diperlukan untuk homeostasis saluran cerna (He *et al.*, 2016).

Toll like receptor mampu mengenali *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang merupakan sinyal endogen dari jaringan yang rusak, DAMP akan berikatan dengan TLR4 dan mengaktifkan *p53/MYD88-independent pathway* yang memediasi proliferasi kriptas, mempromosikan penyembuhan luka. Ekspresi TLR dan aktivasi jalur sinyal TLR merupakan target terapeutik potensial untuk pengobatan penyakit inflamasi (He *et al.*, 2016).



Gambar 2.17 Toll like receptor (TLR) memainkan peran penting dalam gangguan inflamasi mukosa saluran cerna.

Keterangan: sinyal TLR memediasi fungsi biologis utama pada epitel mukosa. PAMPs dari patogen mengikat TLR dan mengaktifkan *MYD88-dependent pathway*, merangsang sekresi proinflamasi, dan merekrut sel imun ke tempat infeksi, di mana sel imun akan menghilangkan debris seluler dan mencegah invasi kembali. Melalui TLRs, bakteri mengendalikan ekspresi gen sel epitel, dan produk sel epitel membentuk komposisi mikrobiota. TLRs mengenali DAMPs, yang merupakan molekul sinyal yang dilepaskan saat terjadi cedera sel dan oleh sel kanker. DAMPs mengaktifkan TLRs dan jalur pensinyalan *p53 / TRIF-dependent notch*, yang akan mempromosikan proliferasi sel epitel.

Sumber: He Y *et al.*, 2016.

Neonatus prematur mengekspresikan konsentrasi TLRs yang lebih tinggi dibandingkan neonatus aterm, hal ini dikaitkan dengan risiko sepsis neonatus

atau enterokolitis nekrotikan yang lebih tinggi. Seperti telah dijelaskan sebelumnya, susu manusia mengandung peptida bioaktif, termasuk defensin yakni *human β -defensin 2* yang dapat mempengaruhi sinyal TLR dan menampilkan aktivitas antimikroba luas terhadap bakteri patogen. *Human β -defensin 2* dapat berasal dari air susu ibu dan mukosa, dimana pelepasan *human β -defensin 2* dari mukosa dipicu oleh *hyaluronan* ASI. *Human β -defensin 2* berperan meningkatkan pertahanan epitel saluran cerna TLR4/CD44 yang bergantung pada patogen. Misalnya, konsentrasi *human β -defensin 2* yang rendah dikaitkan dengan konsentrasi antigen TLR4/limfosit yang lebih tinggi dan kejadian enterokolitis nekrotikan yang lebih berat (Lane *et al.*, 2013). Selain itu, *human β -defensin 2* ASI juga berperan menekan ekspresi TLR7 pada sel induk payudara dan kolon. *Toll like receptor 7*, yang diproduksi dalam endosom, dirangsang oleh RNA untai tunggal dan memediasi sinyal yang menyebabkan pelepasan interferon (IFN) pada infeksi virus. Ekspresi TLR7 yang tinggi terjadi pada model tikus serupa dengan enterokolitis nekrotikan (Jenke *et al.*, 2012). Berbeda dengan *human β -defensin* lainnya, *human β -defensin 2* terdiri dari beberapa reseptor terhadap NF- κ B yang berperan pada respon transkripsional terhadap LPS dan sitokin proinflamasi. *Nuclear factor κ B* diketahui memiliki fungsi sebagai elemen yang poten berespon terhadap TNF dan dapat mengintegrasikan informasi dari penghantaran sinyal imun adaptif dan innate sebagai respon terhadap perlukaan maupun invasi mikroorganisme (Liu *et al.*, 2009).

Selain terkait dengan TLR 7, mekanisme antimikroba dari *β defensin* diprakarsai oleh daya tarik elektrostatik antara peptida antimikroba kationik dan membran mikroba elektronegatif. Membran mikroba sebagian besar didasarkan pada stoikiometri dan arsitektur fosfolipidnya. Misalnya, membran bakteri kaya akan asam fosfolipid fosfatidilgliserol dan fosfatidilserine. Selain itu, LPS dari

bakteri gram negatif dan asam *teichoic* atau *teichuronic* dari bakteri gram positif, memberikan muatan negatif tambahan pada permukaan bakteri (gambar 2.18).

Sebaliknya, membran bilayer mamalia inang *less attracting* untuk peptida antimikroba karena kaya akan fosfatidiletanolamine, fosfatidilcoline dan sphingomielin serta pada umumnya bersifat netral. Afinitas elektrostatis ini memungkinkan peptida antimikroba untuk secara cepat melokalisasi dan menumpuk di tempat-tempat infeksi, karena afinitasnya terutama pada target permukaan mikroorganisme daripada jaringan inang. Dengan demikian, dalam rentang tertentu, peningkatan kationisitas peptida dikaitkan dengan peningkatan potensi antimikroba meskipun interaksi peptida yang terlalu kuat dengan fosfolipid dapat menurunkan aktivitas antimikroba dengan mencegah translokasi peptida ke dalam sel (Cobo & Chadee, 2013).

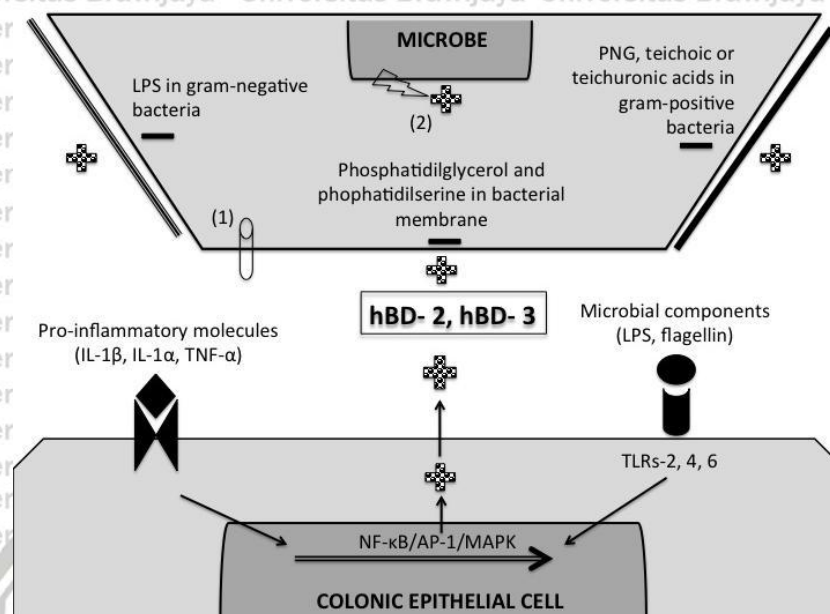
Setelah daya tarik elektro, permukaan hidrofobik dari *amphipathic antimicrobial peptides* dimasukkan ke dalam lapisan lipid dan mengisi rantai arginin berikatan dengan lipid polar untuk membentuk saluran trans-membran.

Masuknya peptida kationik ke dalam inti membran sasaran memprovokasi *dysmetry* yang berlebihan dan *remodeling* fosfolipid pada membran mikroba.

Setelah translokasi fosfolipid atau relaksasi pori-pori, β defensin diangkut dari eksoplasma ke dalam membran sitoplasma. Setelah itu, interaksi antara β defensin dan permukaan mikroba menyebabkan kebocoran ion dan metabolit, kemudian terjadi depolarisasi, gangguan integritas sintesis peptidoglikan dan akhirnya terjadi kematian sel. Kematian mikroba dapat didahului oleh perubahan permeabilitas membran karena akumulasi peptida pada permukaan target yang menginduksi perpindahan fosfolipid dan/atau pengurangan sifat *barier*.

Menariknya, peptida antimikroba juga dapat merusak mikroba dengan mekanisme non-membranolitik, termasuk mengikat asam nukleat muatan negatif kuat dan penghambatan langsung sintesis asam nukleat. Dengan demikian, tidak

Apakah permeabilisasi membran saja cukup untuk menyebabkan kematian sel atau jika disebabkan oleh gangguan proses intraselular (Liu *et al.*, 2009; Cobo & Chadee, 2013).



Gambar 2.18 Gambaran skematik mekanisme β defensin menginduksi *mikrobal killing*.

Keterangan: sitokin pro-inflamasi (misalnya, IL-1 β , IL-1 α , dan TNF- α) dan komponen mikroba (misalnya, lipopolisakarida (LPS) dan peptidoglikan (PGN)) mampu menginduksi ekspresi β defensin 2 pada sel epitel kolon melalui reseptor spesifik (misalnya IL-1R, TNF-R dan TLR) dan jalur pensinyalan (NF- κ B/AP-1/MAPK). Dilepaskannya kationik β defensin 2 (+) mengikat membran mikrobal bermuatan negatif (-). Muatan negatif membran mikroba disebabkan oleh adanya fosfatidilgliserol dan phosphatidilserin. Selain itu, bakteri gram negatif mengandung LPS dan bakteri gram positif PNG, asam teichoic atau teichuronic yang memberikan lebih banyak lagi muatan negatif pada membran bakteri. Interaksi antara membran β defensin 2 dan mikroba dapat menyebabkan kematian mikroba dengan permeabilitas membran karena pembentukan pori (1), dan/atau dengan mengubah sinyal intraselular dan menghambat sintesis asam nukleat (2). Daftar patogen yang rentan terhadap β -defensin-killing mencakup berbagai macam bakteri dan protozoa (misalnya *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, *Cryptosporidium parvum*, dan *Toxoplasma gondii*).

Dikutip: Cobo & Chadee, 2013.

Aktivitas antimikroba dari β defensin mempengaruhi beberapa infeksi pada saluran cerna. *Human β defensin 2* terbukti sangat efektif dalam membunuh bakteri enterik gram negatif *E. coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta *Candida albicans*, namun hanya bersifat bakteriostatik terhadap gram positif *Staphylococcus aureus*. Seperti dijelaskan sebelumnya, perlu dipertimbangkan bahwa kemampuan antimikroba β defensin in vivo bergantung

pada konsentrasi ionik dan adanya komponen bawaan lain di *niche* dimana terjadi interaksi antara peptida patogen dan antimikroba (misalnya di dasar kriptus). Konsentrasi sodium klorida yang tinggi mengganggu efek antimikroba dari hBD-2 terhadap *E. coli*. Hal ini disebabkan oleh karena adanya *competitive inhibition* dimana terjadi peningkatan kekuatan ionik anion dan kation zat terlarut melawan muatan polipeptida kationik dan permukaan mikrobial anionik sehingga mengurangi daya tarik mikroba (Cobo & Chadee, 2013).

Di sisi lain, kehadiran lisozim dan laktoferin meningkatkan kemampuan antimikroba hBD-2 terhadap *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* dan *S. aureus*. Secara keseluruhan, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba dari β defensin 2 penting dalam melindungi epitel saluran cerna dari patogen jahat dan dalam mengatur mikrobiota komensal (Cobo & Chadee, 2013). Selain itu, kemampuan *human* β -defensin 2 untuk menghambat TLR juga mengarahkan pada hipotesis bahwa *human* β -defensin 2 dalam susu manusia dapat menurunkan risiko peradangan saluran cerna pada neonatus termasuk kejadian enterokolitis nekrotikan (Liu *et al.*, 2009).

Selain berperan untuk mengeliminasi paparan mikroba dan mengurangi reaksi inflamasi berlebihan, dalam penelitian Otte *et al.*, 2008 menunjukkan peran hBD 2 dalam *intestinal wound healing*, *Human* β -defensin 2 tidak mengubah viabilitas sel epitel intestinal maupun proliferasi sel, tetapi memengaruhi migrasi enterosit yang merupakan salah satu hal penting dalam penyembuhan luka saluran cerna. Paparan IEC pada hBD 2 menghasilkan reorganisasi *stress fibres* yang merupakan hal penting dalam proses migrasi sel.

Selama terjadinya inflamasi, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) mengaktifkan *caspase cascade* pada lumen saluran cerna yang mengakibatkan lesi epitel. Penelitian ini membuktikan bahwa hBD-2 secara signifikan mampu menurunkan TRAIL yang menginduksi apoptosis pada IEC, sehingga dapat

mengurangi apoptosis enterosit. Lebih dalam lagi dijabarkan hBD-2 mampu memproduksi mucin yang berperan dalam pertahanan epitel saluran cerna serta mampu memperbaiki sel akibat apoptosis yang telah terjadi (Otte *et al.*, 2008).

2.7 Biomarker Tinja

Biomarker merupakan substansi endogen maupun eksogen yang terukur dalam darah, urin maupun tinja. Biomarker digunakan untuk membedakan kondisi patologis dan sebagai salah satu sarana monitoring pengobatan untuk menilai keberhasilan terapi. Identifikasi berbagai biomarker tinja memberikan informasi mengenai lingkungan saluran cerna. Sebagian besar penanda ini terkait dengan sistem kekebalan tubuh bawaan saluran cerna yang berperan dalam menjaga keseimbangan baik antara toleransi terhadap bakteri komensal dan respon imun terhadap patogen potensial. Sistem pertahanan ini merupakan sistem yang kompleks, terdiri dari beberapa elemen, termasuk peptida antimikroba (misalnya: defensin, katelidin, laktoferin, dan osteoprotegerin), protein inflamasi (misalnya: kalprotectin dan S100A12), dan produk mikroba (misalnya: asam lemak rantai pendek). Disfungsi komponen dapat menyebabkan perkembangan penyakit saluran cerna dan penyakit yang berbeda dikaitkan dengan peningkatan biomarker tinja yang berbeda. Setiap biomarker tinja memberikan informasi tentang proses biologis dari penyakit tertentu. Oleh karena itu, kuantifikasi tinja dari biomarker ini dapat dijadikan sebagai metode non-invasif untuk menentukan jalur potensial penyakit dan dapat membantu dalam penilaian serta diagnosis berbagai kondisi pada saluran cerna (Pang *et al.*, 2014).

S#	Name	Source	Function	Indication	Limitations
Biomarkers of inflammatory bowel disease					
1	Cathelicidins	Secreted by Neutrophils, keratinocytes and epithelial cells of gastrointestinal tract, respiratory tract, urogenital tract	Antibacterial activity, modulate inflammation by altering cytokine response, chemoattraction of inflammatory cells in diseased tissues	Marker of inflammation (IBD) and Shigellosis	Antimicrobial peptides so also increased in GI infections
2	Osteoprotegerin	Member of the TNF receptor superfamily	Binds to RANKL and blocks its interaction with RANK	Marker of inflammation (IBD)	Plays a role in bone metabolism so levels are increased in bone diseases
3	Beta-glucuronidase	Produced by colonocytes Also produced by anaerobic gut bacteria (particularly <i>E. coli</i>)	Enzyme that breaks down complex carbohydrates Deconjugate glucuronide molecules from a variety of toxins, carcinogens, hormones, and drugs	Marker of inflammation (IBD)	False results in cases of GI bacterial infection
4	Neutrophil Gelatinase Associated lipocalin	Member of the lipocalin family, secreted by neutrophils	Immunomodulation. Attaches to and neutralizes bacterial formylpeptides	Marker of inflammation (IBD)	Also increased in GI infections like enterocolitis
Eosinophil related proteins					
5	Eosinophil Protein X	When lamina propria is damaged, eosinophils migrate into the gut lumen Released by eosinophil; contribute to ongoing inflammation and tissue destruction	Marker of Eosinophil activity, Allergic and Parasitic influences	IgE-mediated food allergy Intestinal parasitic infection IBD	Also increased in GI inflammation
Biomarker of cell turnover					
6	Defensins	Expressed by neutrophils, epithelial and mucosal lining cell in small and large intestine	Antimicrobial peptide	Markers of colorectal cancer	Also raised in inflammation
Biomarkers of gut health					
7	Fecal secretory IgA	Secreted from mucosal surfaces	Gut epithelial barrier; Defense against the entry of enteric toxins and pathogenic organisms Development of immune tolerance of normal commensal gut organisms	Evaluate immunological response to intestinal pathogens Colorectal cancer	Cannot be used in subjects with immunoglobulin deficiency
8	SCFAs	Products of fermentation by colonic microbial flora; common ones are propionate, acetate, and butyrate	Provides 60%-70% of colonocytes energy requirements Lower colonic pH	Marker of inflammation (IBD)	< 5% of SCFA produced is excreted in stool Also levels altered by diet and rate of transit

SCFAs: Short-chain fatty acids; TNF: Tumor necrosis factor; IBD: Inflammatory bowel disease; GI: Gastrointestinal; RANK: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand.

Gambar 2.19 Biomarker tinja untuk evaluasi saluran cerna

Keterangan: Biomarker tinja dapat dibagi berdasarkan aplikasi klinis yang diperlukan.

Sumber: Siddiqui *et al.*, 2017

Berdasarkan klinis biomarker tinja dapat dibagi menjadi: (a) biomarker *inflammatory bowel disease*, berhubungan dengan *inflammation related protein* yang diproduksi selama proses inflamasi pada pencernaan, contoh: kalprotektin atau antimicrobial peptida; (b) Biomarker kanker kolorektal, berhubungan dengan *undifferentiated tissue and cell* yang mengalami peningkatan ekspresi dan *rapid turnover*, contoh: *M2-pyruvate kinase*; (c) biomarker evaluasi malabsorpsi, berhubungan dengan partikel makanan yang tidak dicerna, contoh: *fecal fat globule*, enzim (alfa1 antitripsin, elastase); (c) biomarker penyakit pencernaan terkait alergi, berhubungan dengan manifestasi alergi maupun parasit pada saluran cerna; (d) biomarker *gut health*, untuk menilai integritas protein saluran cerna dan produk fermentasi mikrobial yang merupakan hasil produksi fermentasi

partikel makanan oleh bakteri, contoh: *secretory immunoglobulin A, short chain fatty acid* (Siddiqui *et al.*, 2017).

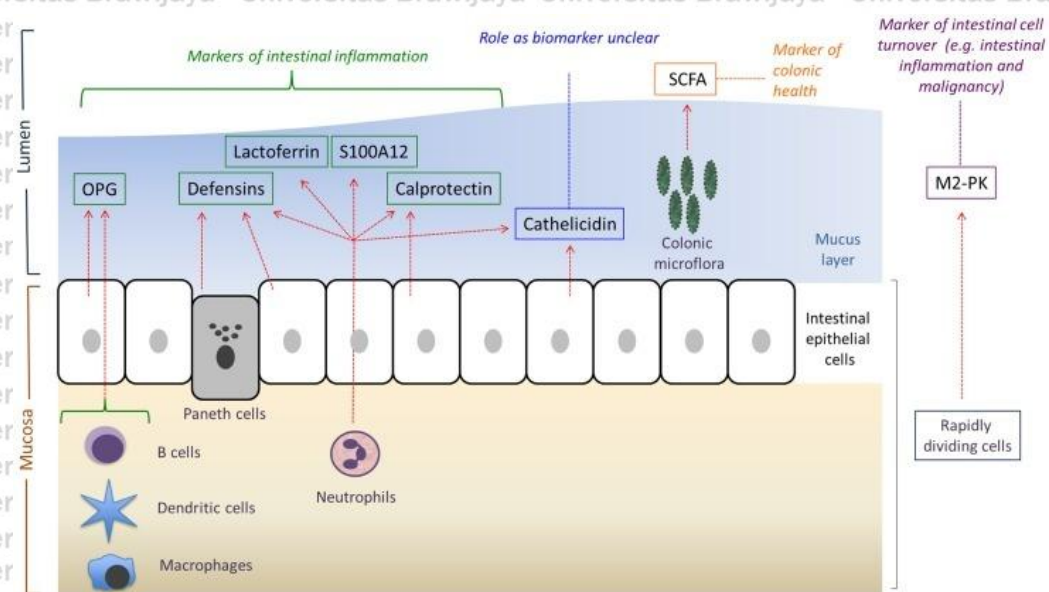
Sistem kekebalan tubuh bawaan saluran cerna terdiri dari beberapa elemen, yang masing-masing berkontribusi pada keseimbangan yang baik antara toleransi terhadap bakteri komensal dan respon terhadap patogen potensial.

Epitel saluran cerna secara terus-menerus terpapar oleh mikroflora saluran cerna dalam jumlah besar namun mampu mempertahankan *barrier* fisik terhadap rangsangan eksogen dan memungkinkan masuknya nutrisi. Sekretori IgA yang terdeteksi dalam tinja juga berperan untuk menghambat peradangan dan memainkan peran protektif, oleh karena itu SIgA tinja dianggap sebagai penanda kesehatan saluran cerna (Siddiqui *et al.*, 2017).

Permukaan mukosa ditutupi oleh lapisan mukus, yang mengandung berbagai peptida antimikroba seperti osteoprotegerin (OPG), defensin, dan katelsidin serta mikrobiota komensal, bersama-sama membentuk garis pertahanan pertama melawan patogen. Jika *barrier* mukosa tidak mampu melawan patogen, sel-sel imun seperti neutrofil dan makrofag berperan sebagai sumber perlindungan kedua melalui protein inflamasi. Telah banyak hipotesis bahwa dysbiosis yang dihasilkan akibat disfungsi salah satu komponen sistem kekebalan tubuh dapat menyebabkan invasi bakteri secara bertahap, peradangan, dan hilangnya toleransi terhadap bakteri saluran cerna (Siddiqui *et al.*, 2017).

Beberapa peptida teridentifikasi pada mekonium dan tinja neonatus selama minggu pertama kehidupan, hal ini diduga berhubungan dengan keterlibatan peptida tersebut sebagai pertahanan saluran cerna untuk melawan infeksi (Campeotto *et al.*, 2010). Defensin merupakan pertahanan lini pertama dalam melawan infeksi dengan mempromosikan interaksi antara imunitas alami dan adaptif pada neonatus baru lahir. Penelitian sebelumnya menunjukkan

adanya peningkatan *human β defensin 2* pada mukosa kolon yang mengalami inflamasi (Pang *et al.*, 2014).



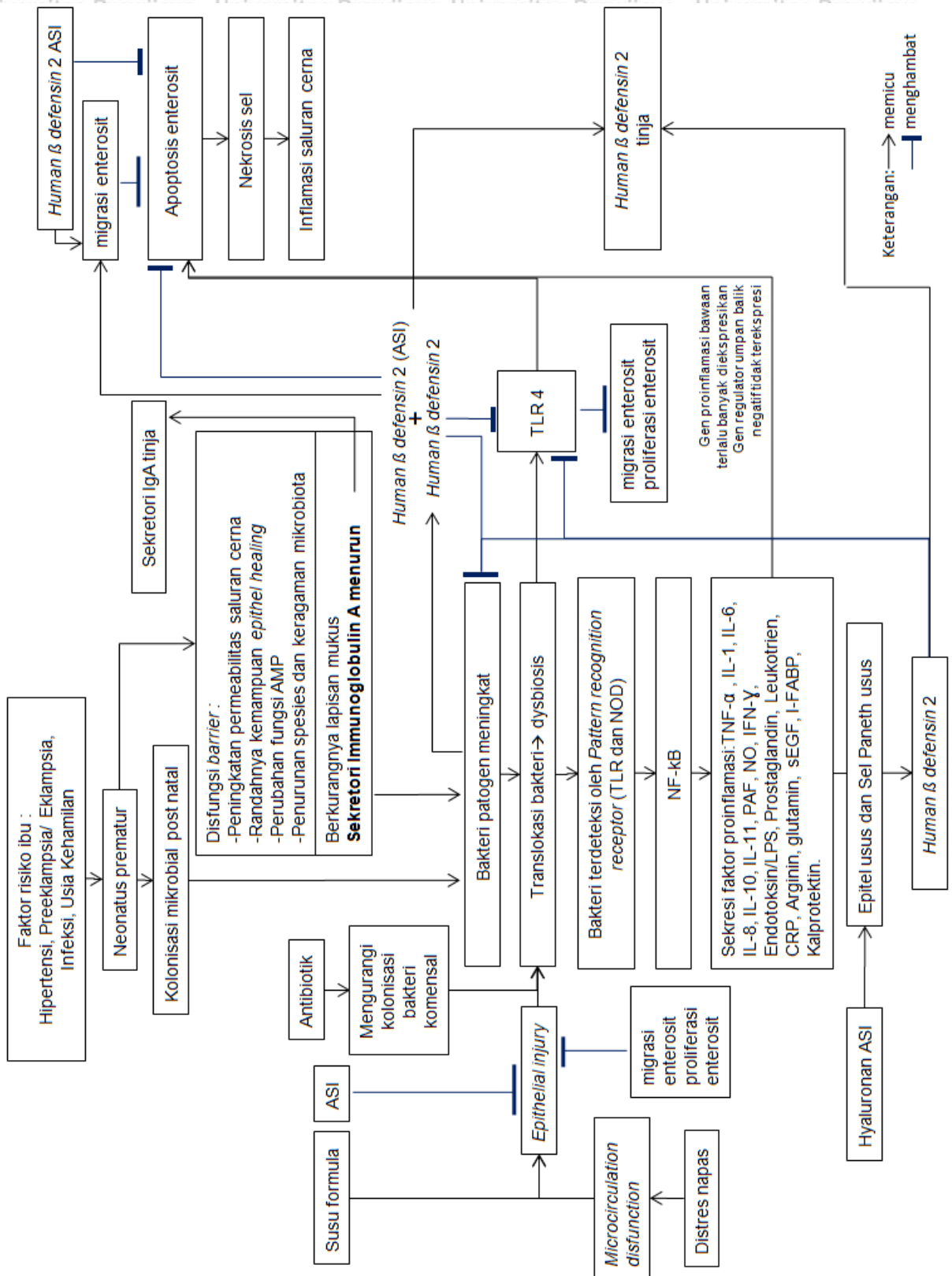
Gambar 2.20 Potensi penggunaan berbagai biomarker fekal.

Keterangan: Identifikasi berbagai AMP saluran cerna, protein inflamasi, dan produk bakteri telah memberikan wawasan potensial mengenai lingkungan usus dengan menggunakan metode non-invasif seperti kuantifikasi tinja.

Sumber: Pang *et al.*, 2014.

Penelitian yang dilakukan oleh Campeotto *et al.*, 2010 menunjukkan bahwa *human β -defensin 2* sangat mudah diukur dan selalu terdeteksi pada tinja neonatus baru lahir dan menunjukkan pertahanan dalam minggu pertama kehidupan. Setelah usia 2 minggu level *human β -defensin 2* terlihat berbeda pada neonatus preterm dan atterm yang berhubungan dengan kejadian infeksi pencernaan.

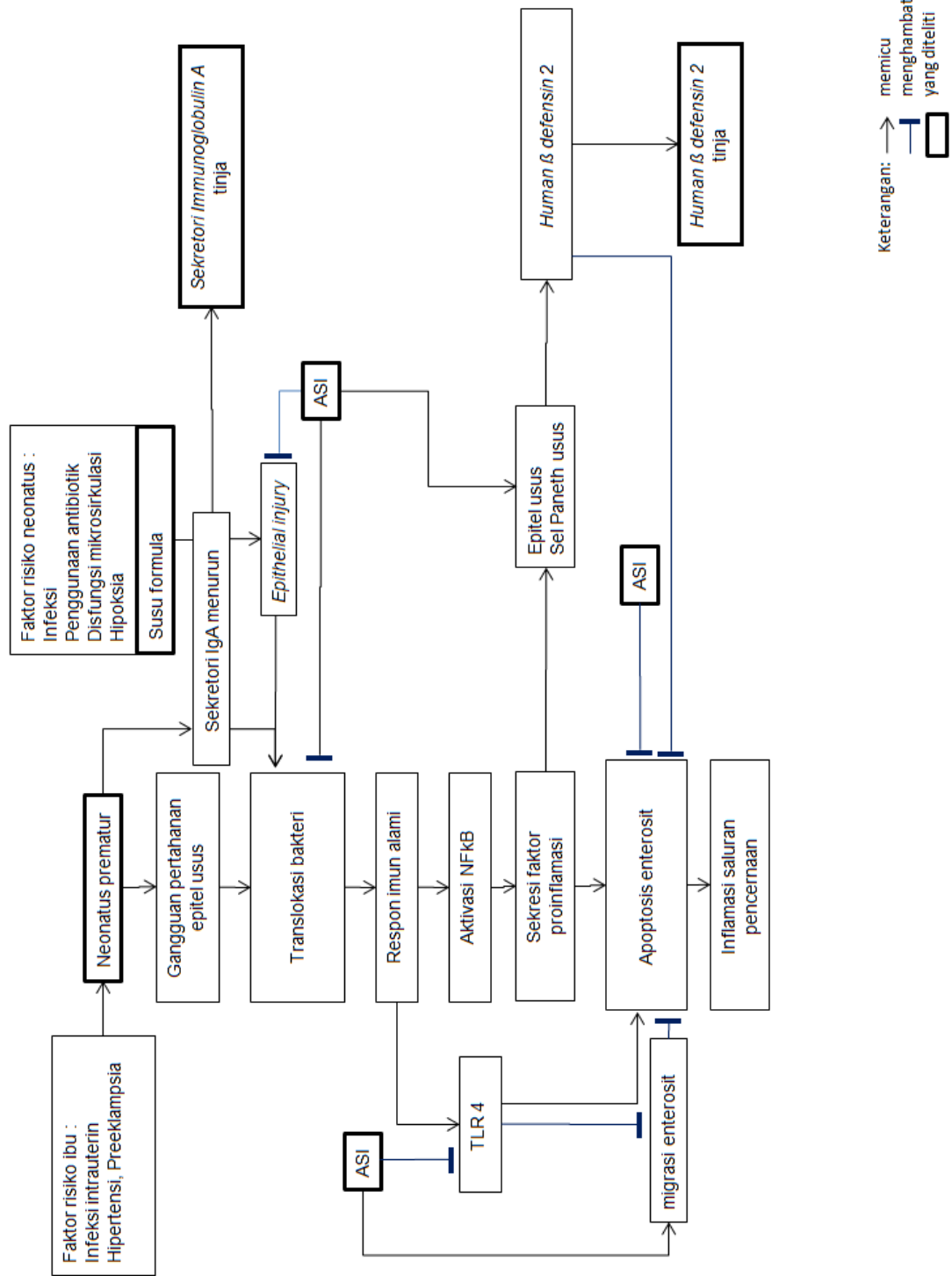
2.8 Kerangka Teori



BAB III

KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan: → memicu
┐ menghambat yang diteliti

Keterangan:

Kelahiran prematur menjadi faktor penentu utama morbiditas dan mortalitas pada neonatus. Meskipun telah banyak dilakukan upaya preventif, insidens kelahiran prematur di kebanyakan negara relatif tetap. Angka kematian prematur secara global sebesar 28% dari 4 juta kematian bayi per tahun. *World Health Organization* menyebutkan sekitar 10% kelahiran menjadi prematur (Kunle *et al.*, 2014). Infeksi pada saluran cerna neonatus termasuk enterokolitis nekrotikan (EKN) merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada neonatus, dengan angka kematian mencapai 20-50%. Insiden EKN berbanding terbalik dengan usia kehamilan saat lahir dan berat lahir. Etiologi dan patogenesis EKN masih belum sepenuhnya jelas, beberapa faktor risiko terjadinya EKN pada neonatus antara lain; prematuritas, pemberian susu formula, infeksi, pemakaian antibiotika, disfungsi mikrovaskuler. Salah satu strategi pencegahan infeksi saluran cerna pada neonatus, difokuskan pada strategi pemberian nutrisi dan memahami karakteristik mikroorganisme di saluran cerna. Pemberian nutrisi enteral dini, pemberian volume awal, penambahan volume, dan macam nutrisi selama periode neonatal telah diteliti, namun banyak hasil penelitian masih bertentangan (Olariu *et al.*, 2014).

Pemberian ASI berhubungan dengan penurunan risiko infeksi saluran cerna pada neonatus prematur. Air susu ibu mengandung banyak faktor pertumbuhan dan zat bioaktif lainnya yang tidak ditemukan dalam formula neonatus prematur standar, dan karena itu faktor-faktor ini dapat berkontribusi terhadap efek perlindungan. Beberapa faktor terbukti mengurangi kejadian inflamasi saluran cerna, antara lain; sekretori immunoglobulin A, *human beta defensin 2*, *growth factors (epidermal growth factor, insulin-like growth factor)*, *polyunsaturated fatty acids (PUFA)*, dan probiotik (Good *et al.*, 2014).

Sekretori imunoglobulin A merupakan salah satu marker integritas saluran cerna yang dapat dideteksi pada tinja neonatus. Imunoglobulin A disekresikan oleh selaput lendir dan penting untuk kekebalan mukosa terutama saluran cerna. Sekretori imunoglobulin A yang terdeteksi dalam tinja merupakan bagian dari penghalang mukosa dan berperan protektif terhadap infeksi (Corthesy, 2010). *Human β -defensin 2* pada susu manusia dapat mempengaruhi sinyal TLR dan menampilkan aktivitas antimikroba luas terhadap bakteri patogen.

Human β -defensin 2 berperan meningkatkan pertahanan epitel saluran cerna TLR4/CD44 yang bergantung pada patogen. Selain itu, *human β -defensin 2* ASI juga berperan menekan ekspresi TLR7 pada sel induk payudara dan kolon, dimana TLR7 berperan memediasi sinyal yang menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi. Ekspresi TLR7 yang tinggi terjadi pada model tikus serupa dengan enterokolitis nekrotikan (Jenke *et al.*, 2012).

Selain terkait dengan TLR 7, mekanisme antimikroba pada *human β -defensin 2* diprakarsai oleh daya tarik elektrostatik antara peptida antimikroba kationik dan membran mikroba elektronegatif (Cobo *et al.*, 2013). Interaksi antara *human β -defensin 2* dan permukaan mikroba menyebabkan kebocoran ion dan metabolit, kemudian terjadi depolarisasi, gangguan integritas sintesis peptidoglikan dan akhirnya terjadi kematian sel.

Selain berperan sebagai antimikrobia, hBD 2 terbukti memiliki peran dalam penyembuhan luka pada epitel saluran cerna. *Human β -defensin 2* tidak mengubah viabilitas sel epitel intestinal (IEC) maupun proliferasi sel, tetapi memengaruhi migrasi enterosit yang merupakan salah satu hal penting dalam penyembuhan luka pada saluran cerna. Paparan IEC pada hBD 2 menghasilkan reorganisasi *stress fibres* yang merupakan hal penting dalam proses migrasi sel.

Selama terjadinya inflamasi saluran cerna, TRAIL mengaktifkan *caspase cascade* pada lumen intestinal yang mengakibatkan lesi epitel. Penelitian ini

membuktikan bahwa hBD-2 secara signifikan mampu menurunkan TRAIL yang menginduksi apoptosis pada IEC, sehingga dapat mengurangi apoptosis enterosit (Otte *et al.*, 2008).

Konsentrasi sekretori imunoglobulin A dan *human β -defensin 2* berhubungan dengan respon imun saluran cerna dimana salah satunya dapat diamati pada tinja. Konsentrasi sekretori imunoglobulin A tinja yang meningkat menunjukkan pertahanan mukosa saluran cerna yang baik, sedangkan kadar *human β -defensin 2* tinja yang meningkat, menunjukkan adanya inflamasi saluran cerna pada neonatus meskipun belum didapatkan tanda klinis. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian tentang kadar sekretori imunoglobulin A sebagai penanda integritas mukosa usus dan *human β -defensin 2* tinja sebagai penanda inflamasi saluran cerna pada neonatus yang mengonsumsi ASI, susu formula, maupun kombinasi.

3.2 Hipotesis

- 1 Kadar sekretori immunoglobulin A dalam tinja neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja lebih tinggi dibandingkan kelompok yang mendapatkan kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.
- 2 Kadar *human β -defensin 2* dalam tinja neonatus prematur yang mendapatkan air susu ibu saja lebih rendah dibandingkan kelompok yang mendapatkan kombinasi air susu ibu dan susu formula, serta susu formula saja.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian prospektif analitik menggunakan rancangan studi *cross sectional*. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui kadar sekretori immunoglobulin A dan *human β -defensin 2* (hBD-2) pada tinja neonatus prematur sebagai marker inflamasi pada neonatus prematus yang mendapatkan nutrisi enteral berupa asupan ASI (*expressed breast milk/ EBM*), susu formula, maupun kombinasi.

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Penelitian dilakukan di ruang neonatologi Rumah Sakit Umum Daerah dr Saiful Anwar (RSSA) Malang serta Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dilaksanakan sekitar 3 bulan yaitu mulai 1 Juni 2019 sampai 31 Agustus 2019 sampai jumlah sampel terpenuhi.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi target penelitian yaitu neonatus prematur (usia gestasi kurang dari 32 minggu), skor APGAR >5 pada menit kelima, dan tanpa kelainan kongenital. Populasi terjangkau adalah neonatus yang dirawat di ruang bayi RSSA pada 1 Juni 2019 sampai 31 Agustus 2019 sampai jumlah sampel terpenuhi. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah tinja neonatus prematur. Teknik pengambilan sampel dengan *consecutive sampling* dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

4.3.1 Estimasi Besar Sampel

Ukuran sampel dalam penelitian dihitung berdasarkan rumus besar sampel sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(3-1) \geq 15$$

$$(n-1)(2) \geq 15$$

$$(n-1)(2) = 15$$

$$n = 8,5$$

keterangan:

n = besar sampel minimum

t = jumlah kelompok studi

Jadi, banyaknya sampel untuk setiap kelompok studi adalah minimal 9 sampel.

4.3.2 Kriteria Inklusi Sampel Penelitian

1. Neonatus prematur dengan usia kehamilan kurang atau sama dengan 32 minggu.
2. Neonatus prematur dengan skor APGAR >5 pada menit kelima.
3. Neonatus prematur tanpa kelainan kongenital maupun kelainan bedah saluran cerna.
4. Riwayat ibu dengan IMT 18—25 kg/m² sebelum hamil.
5. Riwayat tidak mengalami *chorioamnionitis* yang ditandai dengan; leukosit lebih dari 20000/nl; temperatur lebih dari 38°C (Jenke *et al.*, 2012).

4.3.3 Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian

1. Neonatus prematur yang tidak dilahirkan di RS Saiful Anwar Malang (rujukan).
2. Neonatus prematur dengan KMK maupun BMK.

3. Neonatus prematur dengan kelainan endokrin maupun kelainan kromosom.

4. Riwayat ibu dengan penyakit autoimun maupun penyakit kronis lainnya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

- Diet ASI saja,
- Diet ASI dan susu formula (*partial breast feed*),
- Diet susu formula saja.

4.4.2 Variabel Tergantung

- Kadar *human β -defensin 2* pada tinja.
- Kadar sekretori immunoglobulin A pada tinja.

4.5 Kelaikan Etik

Penelitian ini telah disetujui oleh tim kelaikan etik Rumah Sakit Umum

Daerah Dr. Saiful Anwar Malang dengan No: 400/010/K.3/302/2019.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Neonatus Prematur

Neonatus prematur adalah neonatus dengan usia kehamilan kurang dari 37 minggu, yang diklasifikasikan dalam tiga kelompok; *mild preterm* (32-36 minggu), *very preterm* (28-32 minggu) dan *extremely preterm* (<28 minggu).

Pada penelitian ini menggunakan sampel neonatus prematur dengan usia gestasi dibawah 32 minggu.

4.6.2 Air Susu Ibu (ASI)

Air susu ibu adalah neonatus menerima air susu ibu baik dengan menyusui langsung maupun diperah. *Exclusive breast milk* adalah pemberian air susu ibu saja (baik dengan cara menetek langsung maupun ASI perah) pada neonatus, tanpa pemberian cairan apapun kecuali sirup, drop, vitamin, mineral, maupun obat-obatan lainnya (Huang *et al.*, 2018).

4.6.3 Susu Formula Neonatus Prematur

Formula ini dikhususkan untuk neonatus prematur, dengan kalori 80 kkal/100 ml, dan protein 2 gram/100 mL. Dalam penelitian ini menggunakan susu formula preterm S26 dengan nilai kalori 82 kkal/100 mL dan protein 2,1 gram/100mL, *extensive hydrolyze formula* dengan nilai kalori 70 kkal/100 mL dan protein 2 gram/100 mL, serta susu formula BBLR dengan nilai kalori 81 kkal/100 mL dan protein 2,5 gram/100 mL.

4.6.4 Kombinasi Air Susu Ibu dan Susu Formula

Kombinasi ASI dan susu formula atau disebut dengan *partial breast feed* adalah pemberian air susu ibu, minimal satu kali dalam 24 jam, ditambah dengan pemberian susu formula selain susu manusia (Huang *et al.*, 2018).

4.6.5 Sekretori immunoglobulin A

Sekretori immunoglobulin A adalah immunoglobulin A dalam bentuk dimer dan dapat dideteksi pada tinja neonatus prematur yang dihitung dengan teknik pemeriksaan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan *human secretory immunoglobulin A ELISA Kit*. Satuan kadar sekretori immunoglobulin A yang diperoleh adalah µg/ml dengan skala data numerik.

4.6.6 Human Beta Defensin 2

Human β-defensin 2 pada tinja neonatus prematur dihitung dengan teknik pemeriksaan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan *human*

β -defensin 2 ELISA Kit. Satuan kadar *human* β -defensin 2 yang diperoleh adalah ng/ml dengan skala data numerik.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat

Alat pengambilan sampel: sarung tangan, spatula, botol tempat penampung tinja. Alat penunjang ELISA: *microplate reader* 450±10 nm *wavelength filter*, mikropipet, *ependorf*, *absobent paper*, 37°C±0.5°C *incubator*, *refrigerator*, *vortex*, *shaker*, *timer*, *sentrifuge*, *analytic balance*.

4.7.2 Bahan

Tinja neonatus prematus usia 14 hari. *Human secretory immunoglobulin A ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory* Cat.No. E01966Hu: *standard solution* (8 µg/mL), *standard diluent*, *streptavidin-HRP*, *stop solution*, *substrate solution A*, *substrate solution B*, *wash buffer concentrate* (25x), *biotinylated human SIgA antibody*.

Human Beta Defensin 2 ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory Cat.No. E01936Hu: *standard solution* (12.8 µg/mL), *standard diluent*, *streptavidin-HRP*, *stop solution*, *substrate solution A*, *substrate solution B*, *wash buffer concentrate* (25x), *biotinylated human DEFB2 antibody*.

4.8 Metode

4.8.1 Pengambilan Sampel Tinja

Sampel diambil dari tinja yang memenuhi persyaratan pengambilan pada neonatus prematur usia 14 hari, antara lain tabung tempat sampel tinja bersih serta pengiriman dalam waktu kurang dari 30 menit dan dikirimkan dengan menggunakan wadah khusus yang bersih dan dapat menjaga suhu stabil.

4.8.2 Prinsip Pemeriksaan sekretori immunoglobulin A Tinja dengan ELISA

Kadar SIgA tinja dapat diukur dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan *Human secretory immunoglobulin A ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory* Cat.No. E01966Hu. Kadar SIgA tinja dapat diukur jika sampel telah dilakukan homogenisasi dan diekstrak dengan *wash buffer*. Sediaan *wash buffer concentrate* (25x) diambil 20 mL diecerkan dengan *deionized* atau *distilled water* sampai dengan 500 mL.

Sejumlah 10 mL *washbuffer* ditambahkan untuk setiap 100 mg sampel tinja (1:100) kemudian dikocok menggunakan vorteks selama 5 menit, 1 mL dari campuran larutan tersebut dimasukkan dalam *ependorf* dan disentrifus selama 20 menit (2000-3000 RPM) sehingga diperoleh supernatan. Hasil ekstraksi dapat bertahan selama 1 bulan bila disimpan pada suhu -20°C . Sebelum dianalisis, dilakukan pengenceran supernatan 1:10 (100 μL + 900 μL *wash buffer*). Adapun yang digunakan untuk setiap *well* adalah 100 μL dari supernatan yang telah diencerkan. Selanjutnya menyiapkan larutan standar yang akan dikalkulasi dengan *optical density* dari intensitas warna masing masing sampel untuk mengetahui konsentrasi SIgA. Pada penelitian ini menggunakan 5 *standard solution* yang disiapkan sesuai dengan *user intruction*.

Prinsip pengujian menggunakan teknik *immunoassay* enzim non kompetitif atau *sandwich*. Pertama, standar atau sampel berisi antigen dimasukkan dalam plate mikrotiter. *Standard wells* berisi 50 μL *standard solution* dan 50 μL *streptavidin-HRP*. *Sample wells* berisi 40 μL sampel, 10 μL antibodi anti-SIgA dan 50 μL *streptavidin-HRP* yang selanjutnya diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C . Antibodi primer (SIgA) yang ditambahkan bertujuan berikatan dengan antigen, sedangkan antibodi sekunder (antiglobulin yang telah

dilabel dengan enzim *Horseradish Peroxidase* (HRP)) akan berikatan dengan antibodi primer.

Cuci *plate* dengan *wash buffer* sebanyak 5 kali sehingga konjugat antibodi-enzim yang tidak terikat dapat dibuang. Selanjutnya tambahkan 50 μL *substrate solution* A dan 50 μL *substrate solution* B pada masing masing *well*, larutan substrat akan memberi warna pada masing masing sampel. Tutup dengan *sealer* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Langkah terakhir yakni menambahkan *stop solution* 50 μL pada masing masing *well* dan amati perubahan warna (dari biru dan kuning). Hasil ELISA dibaca setelah 10 menit pemberian *stop solution*, intensitas warna yang terbentuk diukur menggunakan *microplate reader set to 450 nm wavelength filter* dan akan didapatkan nilai *optical density*. Selanjutnya, nilai *optical density* setiap sampel akan di plot pada kurva *optical density* larutan standar SlgA, sehingga kadar SlgA dalam sampel tinja dapat diketahui.

4.8.3 Prinsip Pemeriksaan *Human Beta Defensin 2* Tinja dengan ELISA

Kadar hBD-2 tinja dapat diukur dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan *Human Beta Defensin 2 ELISA Kit Bioassay Technology Laboratory* Cat.No. E01936Hu. Kadar hBD-2 tinja dapat diukur jika sampel telah dilakukan homogenisasi dan diekstrak dengan *wash buffer*. Sediaan *wash buffer concentrate* (25x) diambil 20 mL diecerkan dengan *deionized* atau *distilled water* sampai dengan 500 mL. Sejumlah 10 mL *washbuffer* ditambahkan untuk setiap 10 mg sampel tinja (1:100) kemudian dikocok menggunakan vorteks selama 5 menit, 1 mL dari campuran larutan tersebut dimasukkan dalam *ependorf* dan disentrifus selama 20 menit (2000-3000 RPM) sehingga diperoleh supernatan. Hasil ekstraksi dapat bertahan selama 1 bulan bila disimpan pada suhu -20°C. Sebelum dianalisis, dilakukan pengenceran supernatan 1:100 (1 μL + 100 μL *wash buffer*) dilakukan dua kali.

Adapun yang digunakan untuk setiap *well* adalah 100 μL dari supernatan yang telah diencerkan. Selanjutnya menyiapkan larutan standar yang akan dikalkulasi dengan *optical density* dari intensitas warna masing masing sampel untuk mengetahui konsentrasi hBD-2. Pada penelitian ini menggunakan 5 *standard solution* yang disiapkan sesuai dengan *user intruction*.

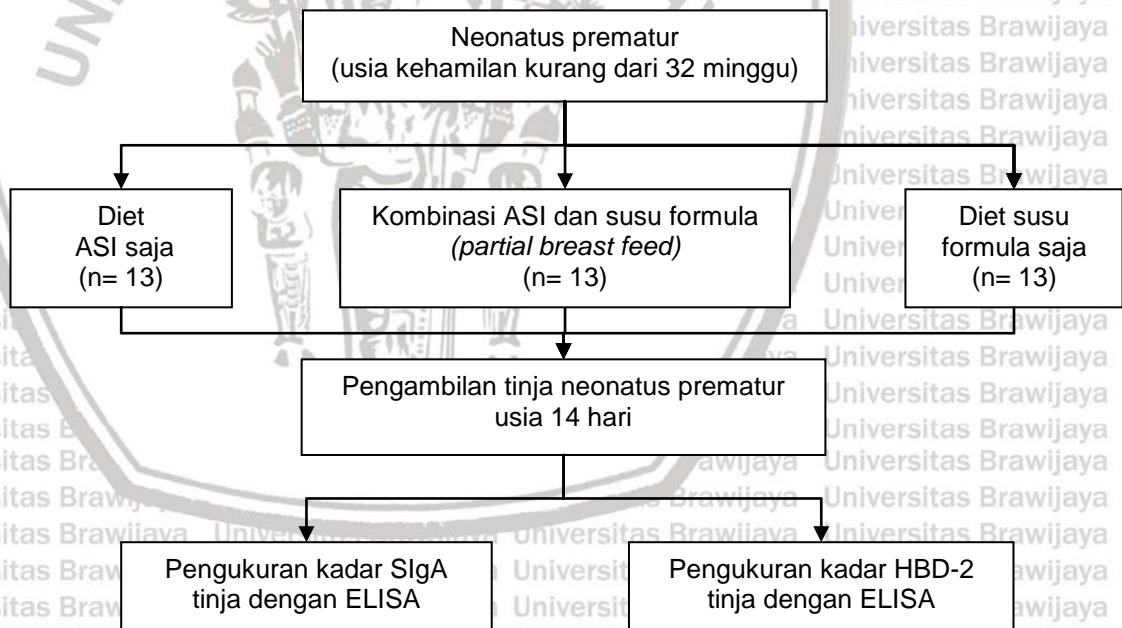
Prinsip pengujian menggunakan teknik *immunoassay* enzim non kompetitif atau *sandwich*. Pertama, standar atau sampel berisi antigen dimasukkan dalam plate mikrotiter. *Standard wells* berisi 50 μL *standard solution* dan 50 μL *streptavidin-HRP*. *Sample wells* berisi 40 μL sampel, 10 μL antibodi anti-DEFB2 dan 50 μL *streptavidin-HRP* yang selanjutnya diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Antibodi primer (hBD-2) yang ditambahkan bertujuan berikatan dengan antigen, sedangkan antibodi sekunder (antiglobulin yang telah dilabel dengan enzim *Horseradish Peroxidase* (HRP)) akan berikatan dengan antibodi primer.

Cuci *plate* dengan *wash buffer* sebanyak 5 kali sehingga konjugat antibodi-enzim yang tidak terikat dapat dibuang. Selanjutnya tambahkan 50 μL *substrate solution* A dan 50 μL *substrate solution* B pada masing masing *well*, larutan substrat akan memberi warna pada masing masing sampel. Tutup dengan *sealer* dan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Langkah terakhir yakni menambahkan *stop solution* 50 μL pada masing masing *well* dan amati perubahan warna (dari biru dan kuning). Hasil ELISA dibaca setelah 10 menit pemberian *stop solution*, intensitas warna yang terbentuk diukur menggunakan *microplate reader set to 450 nm wavelength filter* dan akan didapatkan nilai *optical density*. Selanjutnya, nilai *optical density* setiap sampel akan di plot pada kurva *optical density* larutan standar hBD-2, sehingga kadar hBD-2 dalam sampel tinja dapat diketahui.

4.9 Teknik Analisis Statistik

Data dikumpulkan dari analisis kadar *human beta defensin 2* pada sampel tinja neonatus prematur. Dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk data sampel. Kriteria keputusan dengan melihat *p-value*, jika $p\text{-value} > \alpha = 0,05$ maka data terdistribusi normal dan jika $p\text{-value} < \alpha = 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal. Bila data sampel terdistribusi normal, dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dan bila data sampel tidak terdistribusi normal, dilakukan uji *Kruskal Walls*. Uji statistik ini dilakukan untuk mencari perbedaan pada tiap kelompok sampel penelitian, yang diolah menggunakan perangkat lunak *SPSS for Windows 18* (Dahlan, 2011).

4.10 Alur Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian menggunakan desain penelitian deskriptif dengan rancangan studi *cross sectional*, didapatkan 39 neonatus prematur yang telah memenuhi kriteria inklusi pada bulan Juni sampai bulan Agustus 2019 di ruang neonatologi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang. Tiga puluh sembilan neonatus prematur tersebut dibagi dalam tiga kelompok penelitian; kelompok pertama adalah kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi air susu ibu saja; kelompok kedua adalah kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi kombinasi ASI dan susu formula; serta kelompok ketiga adalah kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja. Sampel tinja dari masing-masing kelompok diambil pada usia empat belas hari.

Karakteristik dasar sampel penelitian yang diamati adalah karakteristik dasar neonatus (jenis kelamin, cara persalinan, usia kehamilan, berat badan lahir, panjang badan lahir, dan lingkar kepala), serta ibu (preeklampsia, eklampsia, riwayat ketuban pecah dini, dan kehamilan gemeli). Data karakteristik dasar sampel penelitian secara rinci ditampilkan pada tabel 5.1. Dari hasil penelitian didapatkan; perbandingan jenis kelamin neonatus laki-laki dan perempuan masing-masing 14 dan 25 ($p=0,64$), cara persalinan *sectio caesarian* didapatkan pada sebagian besar sampel penelitian (26 / 39), median usia kehamilan neonatus yang menjadi sampel penelitian adalah 30 minggu dengan rentang usia kehamilan 25 sampai 32 minggu. *Mean* berat badan lahir pada kelompok neonatus yang mengonsumsi ASI adalah $1553,8 \pm 430,7$ gram, kelompok neonatus yang mengonsumsi ASI dan susu formula adalah

1459,7±406,5 gram, serta kelompok neonatus yang mengonsumsi susu formula saja yakni 1010±506,4 gram ($p=0,84$).

Tabel 5.1 Karakteristik dasar sampel penelitian

Karakteristik	ASI	ASI dan susu formula	Susu formula	P value
Jenis kelamin, (n)				
• Laki-laki	6 / 13	4 / 13	4 / 13	0,64
• Perempuan	7 / 13	9 / 13	9 / 13	
Usia Kehamilan (minggu), median (min—maks)	30 (25—32)			
(n)				
• < 28	2 / 13	1 / 13	-	0,842
• 28—30	4 / 13	6 / 13	5 / 13	
• 30—32	7 / 13	6 / 13	8 / 13	
Berat Lahir (gram), rerata (SD)	1553,8 (±430,7)	1459,7 (±406,5)	1010 (±506,4)	0,267
Panjang lahir, rerata (SD) (cm)	39,2 (±4,6)	39,5 (±2,9)	40,9 (±4,0)	0,525
Lingkar kepala lahir, rerata (SD) (cm)	28,2 (±2,1)	27,8 (±1,7)	28,4 (±1,8)	0,899
Terapi oksigen (n)	6 / 13	7 / 13	5 / 13	-
Riwayat persalinan (n)				
• Normal	7 / 13	3 / 13	3 / 13	0,874
• <i>Sectio caesarian</i>	6 / 13	10 / 13	10 / 13	
Riwayat kehamilan ibu (n)				
• Preeklampsia	3 / 13	4 / 13	6 / 13	
• Eklampsia	-	-	1 / 13	0,052
• Ketuban pecah dini	3 / 13	6 / 13	6 / 13	
• Kehamilan gemeli	2 / 13	-	-	
Klinis (n)				
• Distres napas	6 / 13	6 / 13	6 / 13	0,227
• Muntah	10 / 13	9 / 13	9 / 13	
• Perut membesar	9 / 13	9 / 13	5 / 13	
Penggunaan antibiotika (n)	7 / 13	9 / 13	11 / 13	0,236

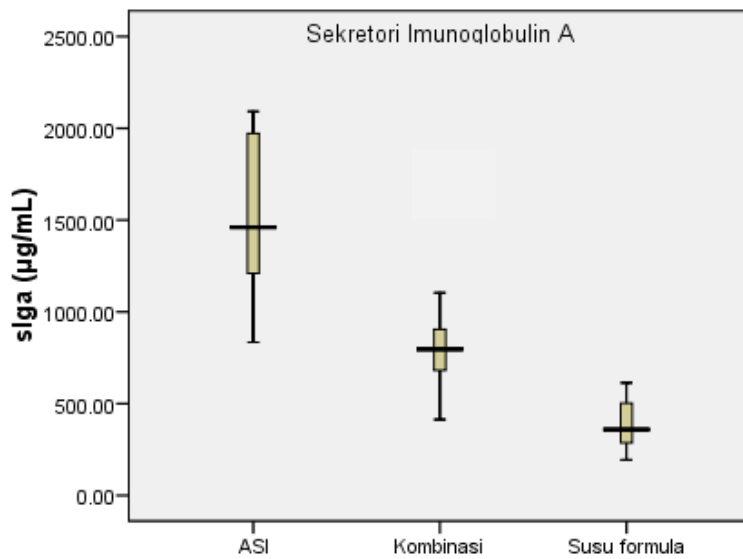
Terapi oksigen diberikan pada 6 sampel di kelompok ASI, 7 sampel pada kelompok ASI dan susu formula, serta 5 sampel pada kelompok susu formula saja. Sampel yang mendapatkan modalitas terapi oksigen berupa CPAP (*continous positive airway pressure*) secara umum diberikan segera setelah lahir dan dilepas paling cepat pada hari kelima perawatan yakni pada neonatus di kelompok ASI dan susu formula. Dari 39 sampel yang diamati selama 14 hari, 27 sampel (27 / 39) tercatat menggunakan antibiotika dengan durasi 5 hari pada 3

sampel, 7 hari pada 14 sampel dan 14 hari pada 10 sampel. Penggunaan antibiotika didasarkan klinis yakni didapatkan keluhan pernapasan pada 18 sampel, keluhan pencernaan berupa muntah (8 sampel), perut membesar (3 sampel) maupun kombinasi muntah dan perut membesar (15 sampel). Keluhan muntah paling dini didapatkan hari ketiga perawatan pada sampel kelompok ASI dan susu formula, sedangkan keluhan perut membesar paling dini didapatkan hari kelima perawatan pada kelompok susu formula saja.

Karakteristik ibu dikelompokkan berdasarkan indikasi persalinan sebagai berikut; ibu dengan faktor risiko preeklampsia pada 13 sampel, eklampsia 1 sampel, ketuban pecah dini (kurang dari 18 jam) pada 15 sampel, dan 2 sampel dengan kehamilan gemeli. Masing masing karakteristik dilakukan analisis menggunakan *chi square* dan didapatkan nilai- $p > 0,05$ yang dapat diartikan tidak didapatkan perbedaan signifikan antar masing masing kelompok.

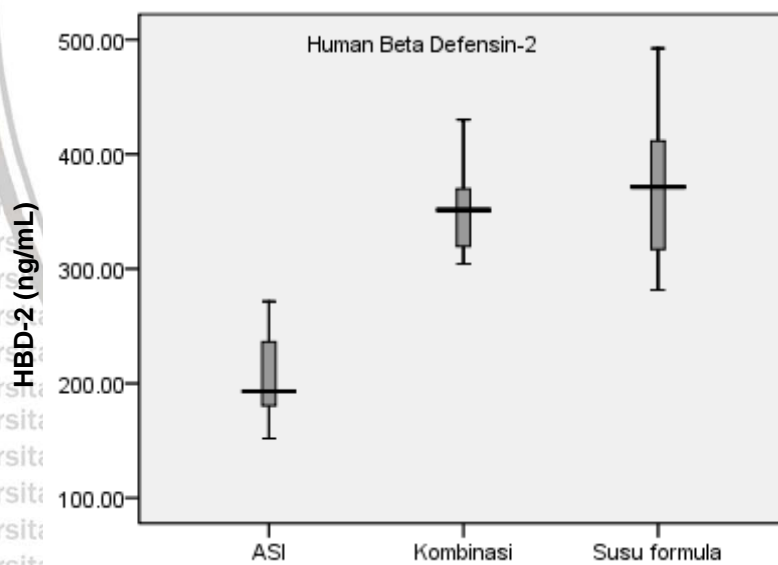
5.2 Kadar Sekretori Immunoglobulin A dan Human Beta Defensin 2 Tinja

Kadar SIgA tinja dijabarkan dalam $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai tertinggi terdapat pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI yakni 2091,2 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai terendah yakni 194,77 $\mu\text{g/mL}$ didapatkan pada kelompok neonatus prematur yang mendapatkan susu formula saja. Pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, kadar SIgA tinja pada usia empat-belas hari (835,8—2091,2 $\mu\text{g/mL}$) lebih tinggi dibandingkan kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula (453,78—1104,02 $\mu\text{g/mL}$) serta kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja (194,77—714,87 $\mu\text{g/mL}$). Adapun diagram nilai SIgA untuk masing masing kelompok penelitian dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Kadar SIgA tinja neonatus prematur pada kelompok ASI saja, ASI dan susu formula, serta susu formula saja dihari keempat-belas

Keterangan: Kadar SIgA tinja pada kelompok ASI lebih tinggi dibandingkan pada kelompok ASI dan susu formula serta susu formula saja; (a) Kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja; (b) kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula; (c) kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja.



Gambar 5.2 Kadar hBD-2 tinja neonatus prematur pada kelompok ASI saja, ASI dan susu formula, serta susu formula saja dihari keempat-belas

Keterangan: Kadar hBD-2 tinja pada kelompok ASI lebih rendah dibandingkan kadar hBD-2 tinja pada kelompok kombinasi ASI dan susu formula serta susu formula saja. (a) Kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja; (b) kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula; (c) kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja.

Kadar hBD-2 tinja dijabarkan dalam ng/mL dimana nilai tertinggi diperoleh pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula yakni 492 ng/mL dan nilai terendah didapatkan pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja yakni 151,775 ng/mL. Pada kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, kadar hBD-2 tinja pada usia empat-belas hari (151,77—272,77 ng/mL) lebih rendah dibandingkan kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula maupun susu formula saja yakni 304,27—430,27 ng/mL dan 311,22—492,27 ng/mL.

Adapun diagram nilai hBD-2 untuk masing-masing kelompok penelitian dapat dilihat pada gambar 5.2.

5.3 Hasil Uji Syarat Parametrik

Dalam penelitian ini data variabel kadar sekretori Immunoglobulin A dan hBD-2 tinja neonatus prematur yang diambil dari tiga kelompok sampel penelitian dilakukan uji normalitas data sebagai prasyarat statistik parametrik dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena jumlah sampel penelitian lebih dari 50. Hasil uji statistik *Shapiro-Wilk* diperoleh hasil *p-value* kadar SIgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur dari ketiga kelompok sampel penelitian adalah $> 0,05$; yang berarti data variabel kadar SIgA dan hBD-2 tersebut terdistribusi normal dan memenuhi prasyarat uji statistik parametrik.

5.4 Uji Komparatif Kadar SIgA dan hBD-2 Tinja Neonatus Prematur

Uji komparatif dilakukan untuk menjawab tujuan penelitian, yaitu membuktikan perbedaan kadar SIgA dan hBD-2 tinja pada neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja, ASI dan susu formula, serta susu formula saja.

Data kadar SIgA dan hBD-2 tinja berdasarkan kelompok pemberian nutrisi

dilakukan uji komparatif numerik tidak berpasangan lebih dari dua kelompok dengan menggunakan uji ANOVA *One Way (analysis of variance)*. Adapun perbedaan *mean* kadar SlgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur secara umum dapat dilihat dari tabel 5.2 berikut:

Tabel 5.2 Hasil uji komparatif kadar SlgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur

Variabel Penelitian	Mean(SD)(ng/mL)	p-value
Sekretori IgA (SlgA)		
ASI saja	1541,92 ± 418,69	
ASI dan susu formula	826,23 ± 311,58	0,00*
Susu formula saja	387,66 ± 135,96	
Human β defensin 2 (hBD-2)		
	Mean(SD)(μ g/mL)	p-value
ASI saja	204,47 ± 40,63	
ASI dan susu formula	351,66 ± 38,19	0,00*
Susu formula saja	375,73 ± 69,13	0,463

Keterangan: *p-value* < 0,05 = signifikan (*)

Berdasarkan hasil uji ANOVA *One Way* diketahui kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja didapatkan dengan kadar *mean* SlgA tertinggi (154192 ± 418,69) yang berbeda bermakna dengan kedua kelompok neonatus prematur lainnya. Sementara itu, kelompok neonatus prematur dengan konsumsi susu formula saja memiliki *mean* hBD-2 tinja lebih tinggi dibandingkan kelompok lain (375,73 ± 69,13), namun tidak berbeda bermakna dengan kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula (*p*=0.463). Sebaliknya, *mean* kadar hBD-2 tinja neonatus prematur pada kelompok yang mengonsumsi ASI saja berbeda bermakna (*p*=0,00) terhadap kedua kelompok lainnya.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian analitik dengan rancangan studi *cross sectional*. Teknik pengambilan sampel secara *consecutive sampling*, didapatkan 39 sampel penelitian tinja neonatus prematur yang terbagi dalam tiga kelompok penelitian; kelompok pertama adalah tinja neonatus prematur yang mengonsumsi air susu ibu, kelompok kedua adalah tinja neonatus prematur yang mengonsumsi kombinasi antara ASI dan susu formula, serta kelompok ketiga adalah kelompok tinja neonatus prematur yang mengonsumsi susu formula saja. Tinja pada masing-masing kelompok penelitian diambil pada usia empat-belas hari dengan jumlah sampel masing masing adalah 13.

Usia kehamilan neonatus yang menjadi sampel penelitian yakni <32 minggu dengan rentang usia kehamilan 25 sampai 32 minggu. Lebih dari 85% inflamasi saluran cerna terjadi pada neonatus dengan berat badan lahir <1500 gram atau usia kehamilan <32 minggu. Penelitian sebelumnya menunjukkan EKN terjadi 50% pada bayi dengan berat lahir 1000—1499 gram dan 30% pada 1500—1999 gram, demikian pula penelitian restrospektif selama 22 tahun menunjukkan insiden EKN paling tinggi pada bayi dengan berat lahir 1000—1499 gram (Ahle *et al.*, 2013; Sidauruk *et al.*, 2014). Berbeda dengan penelitian yang dilakukan Olariu *et al.*, 2014, menunjukkan rata rata berat badan lahir yang mengalami EKN adalah 1078 ± 338.72 gram.

Usia kehamilan berhubungan dengan inisiasi pemberian air susu ibu, seperti yang penelitian oleh Maastrup *et al.*, 2014 membuktikan bahwa semakin muda usia gestasi semakin sulit untuk pemberian ASI eksklusif oleh karena neonatus prematur mengalami kesulitan menetek langsung pada ibu

dibandingkan neonatus atterm. Penundaan pemberian ASI berhubungan dengan peningkatan morbiditas neonatus, hal ini dibuktikan oleh penelitian metaanalisis Smith *et al.*, 2017 yang menjabarkan bahwa neonatus dengan inisiasi ASI 2-23 jam setelah lahir memiliki risiko kematian 33% lebih tinggi dibandingkan neonatus dengan inisiasi ASI ≤ 1 jam, sedangkan yang mendapatkan ASI ≥ 24 jam berisiko 2.19 kali lebih besar untuk terjadi kematian. Selain itu, penelitian tersebut juga menjabarkan diantara kelompok neonatus yang mendapatkan ASI eksklusif, inisiasi pemberian ASI ≥ 24 jam memiliki risiko lebih dari 85% untuk terjadinya kematian dibandingkan neonatus dengan inisiasi menyusui < 24 jam. Kondisi tersebut dapat dipahami mengingat air susu ibu mengandung sejumlah peptida biologis aktif atau *growth factors* dalam jumlah bermakna yang memiliki efek biologis terhadap saluran cerna (Frost, 2014). Susu manusia mengandung imunoglobulin termasuk IgA yang terbukti memberikan efek protektif pada mukosa saluran cerna serta peptida bioaktif, termasuk defensin (*human β defensin-2*) yang menampilkan aktivitas antimikroba luas terhadap bakteri patogen (Khader *et al.*, 2013; He *et al.*, 2016).

Good *et al.*, 2014 membuktikan kelahiran prematur merupakan faktor risiko utama kejadian enterokolitis nekrotikan, hal ini menggambarkan keadaan intestinal yang imatur pada bayi prematur. Imaturitas intestinalis terkait perubahan komponen-komponen sistem pertahanan saluran cerna, kurangnya produksi mukus intestinal, meningkatnya permeabilitas intestinal, turunnya produksi asam lambung dan enzim proteolitik, serta hormon dan enzim pencernaan yang belum sempurna. Hal ini sejalan dengan penelitian Markus *et al.*, 2010 yang menyimpulkan bahwa kadar hBD2 tinja berhubungan secara signifikan dengan usia kehamilan, neonatus dengan UK 24 minggu memiliki kadar hBD2 tinja lebih rendah dibandingkan usia kehamilan 42 minggu. Demikian pula kadar sekretori IgA tinja, penelitian Rodriguez *et al.*, 2019 membuktikan usia

kehamilan lebih dari 30 minggu berhubungan dengan kadar SIgA yang lebih tinggi dibandingkan usia kehamilan kurang dari 30 minggu.

Goedicke *et al.*, 2017 menjelaskan dalam studinya bahwa bayi prematur <32 minggu lebih berisiko mengalami inflamasi oleh karena belum sempurnanya transmisi imunitas ibu secara transplasental yang terutama terjadi pada usia 37—41 minggu, sehingga kadar marker inflamasi tinja cenderung meningkat. Selain hal tersebut, neonatus prematur yang baru lahir akan membentuk mikrobioma pada dermal dan gastrointestinal serta sistem imun adaptif akan menghasilkan respon imun sekunder, oleh karena mukosa saluran cerna neonatus prematur permeable untuk makromolekul dan bakteri, paparan ekstrasuterin dapat dengan mudah mencapai aliran darah dan getah bening yang dapat menyebabkan penyebaran bakteri seluruh tubuh.

Studi lain menjabarkan bahwa konsentrasi TLRs pada neonatus prematur lebih tinggi dibandingkan bayi aterm akibat imaturitas pengaturan respon inflamasi dimana respon inflamasi yang berlebihan dikaitkan dengan risiko sepsis atau inflamasi pencernaan yang lebih berat (Lane *et al.*, 2013). Hasil tersebut berkebalikan dengan penelitian oleh Campeotto *et al.*, 2010 yang menunjukkan peningkatan marker inflamasi (kadar hBD-2 tinja) hanya terjadi bila didapatkan reaksi inflamasi dan tidak terpengaruh oleh usia kehamilan maupun cara persalinan.

Ketika dalam kandungan, gastrointestinal janin diisi oleh cairan ketuban steril, persalinan memicu terjadinya kolonisasi bakteri. Meskipun demikian, mekanisme pertahanan bawaan yang kuat mampu melindungi neonatus dari infeksi. Immunoglobulin dan peptida antimikroba terbukti berperan dalam proses inflamasi terutama pada saluran cerna (Neu & Walker, 2011). Salah satu imunoglobulin yang berperan penting yakni sekretori imunoglobulin A.

Sekretori IgA berfungsi sebagai garis pertahanan pertama dalam melindungi epitel saluran cerna dari enterik toksin dan mikroorganisme patogen melalui proses yang dikenal sebagai eksklusi imun dimana SIgA menginisiasi *clearance* antigen dan mikroorganisme patogen dari lumen saluran cerna dengan menghalangi akses ke reseptor epitel, menjebak dalam lendir, dan memfasilitasi pengeluarannya dengan aktivitas peristaltik dan mukosiliar. Peran lainnya yakni SIgA telah diidentifikasi mampu mengurangi faktor virulensi bakteri secara langsung, memengaruhi komposisi mikrobiota saluran cerna dengan mekanisme terkait Fab, baik *dependent* maupun *independent*, mempromosikan retro-transportasi antigen melintasi epitel menuju sel dendritik di bagian dalam jaringan limfoid saluran cerna, dan, meregulasi respons proinflamasi yang biasanya terkait dengan penyerapan bakteri patogen maupun antigen alergenik (Mantis *et al.*, 2011). Selain itu komponen sekretori yang melekat pada IgA menjadikan SIgA bersifat lebih stabil (tidak mudah dihancurkan oleh enzim proteolitik) dibandingkan imunoglobulin lainnya sehingga dapat dikatakan pengukuran kadar SIgA tinja mencerminkan kompetensi respon imun mukosa gastrointestinal. Beberapa penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa kadar SIgA dapat terdeteksi pada spesimen tinja, terutama neonatus yang mendapatkan ASI di minggu pertama kehidupan (Retnaningtyas *et al.*, 2010; Bridgman *et al.*, 2016). Demikian pula penelitian oleh Hayati *et al.*, 2016 yang membuktikan SIgA dideteksi pada tinja dan memiliki hubungan erat dengan kemampuan saluran cerna untuk netralisasi serta *clearing* mikroba patogen. Sejalan dengan studi lain terkait perkembangan imunologis sistem pencernaan dalam 8 bulan pertama kehidupan menemukan bahwa SIgA tinja terdeteksi pada semua bayi sejak lahir (Kuitunen & Savilahti, 2015).

Penelitian ini dilakukan pada neonatus usia empat belas hari dan diperoleh hasil SIgA tinja tertinggi 2091,2 µg/mL yang berasal dari neonatus yang

mengonsumsi air susu ibu saja. Nilai tersebut sesuai dengan penelitian Maruyama *et al.*, 2009 yang menunjukkan kadar SIgA maksimal pada neonatus yang mengonsumsi ASI dalam satu bulan pertama dapat mencapai 4500 µg/mL dan sedikit lebih tinggi dibandingkan penelitian Hayati *et al.*, 2016 yang menjabarkan nilai SIgA normal yakni 510—2040 µg/mL.

Kadar SIgA tinja pada kelompok neonatus yang mengonsumsi ASI (1541,92 ± 418,69 µg/mL) lebih tinggi secara signifikan dibanding kedua kelompok lainnya yakni ASI dan susu formula (826,23 ± 311,58 µg/mL) serta susu formula saja (387,66 ± 135,96 µg/mL) dengan nilai $p=0,000$. Hasil ini sejalan dengan penelitian pendahuluan oleh Hayati *et al.*, 2016 dimana kadar SIgA tinja pada neonatus usia <2 bulan lebih tinggi pada kelompok yang mengonsumsi air susu ibu dibandingkan susu formula baik usia 2 minggu, 4 minggu, maupun 8 minggu. Studi lain yang dilakukan pada 34 neonatus sehat membuktikan bahwa neonatus dengan air susu ibu memiliki kadar SIgA tinja yang jauh lebih tinggi dibandingkan yang mengonsumsi susu formula pada usia 1 bulan, 2 bulan, dan 5 bulan (Kumagai *et al.*, 2012).

Penelitian oleh Kuitunen & Savilahti, 2015 menjabarkan bahwa kadar SIgA tinja pada kelompok yang mengonsumsi air susu ibu lebih tinggi 3—9 kali dibandingkan yang mengonsumsi susu formula saja. Hal tersebut terjadi diduga karena beberapa mekanisme yakni (1) ASI mampu menstimulasi produksi SIgA dari mukosa gastrointestinal; (2) adanya IgA ASI yang tersimpan di kolon; atau (3) adanya substansi bioaktif lain dari ASI yang mampu meningkatkan produksi SIgA seperti TH17. Demikian pula Bridgman *et al.*, 2016 yang menjelaskan produksi imunoglobulin A tertunda pada bayi yang mendapatkan susu formula saja dan kadar IgA tinja terbukti lebih rendah secara konsisten pada tahun pertama kehidupan. Sementara itu, kadar SIgA tinja pada neonatus yang mengonsumsi ASI saja lebih tinggi delapan kali dibandingkan neonatus yang

mengonsumsi susu formula saja. Maruyama *et al.*, 2009 juga membuktikan SlgA tinja pada neonatus yang mengonsumsi susu formula saja lebih rendah dibandingkan neonatus yang mengonsumsi ASI saja maupun kombinasi ASI dan susu formula. Kadar SlgA tinja diamati meningkat sampai dengan usia 1 bulan yang kemudian menurun sampai usia 3 bulan dan selanjutnya plateau. Oleh karena kadar SlgA intestinal ditemukan paling optimal pada minggu keempat kehidupan, SlgA tinja yang terdeteksi pada neonatus dengan susu formula saja diduga diproduksi oleh tubuh neonatus sendiri.

Meskipun pada penelitian ini tidak dinilai kadar sekretori imunoglobulin A ASI, namun kadar SlgA tinja diduga merefleksikan nilai SlgA ASI. Hal ini berdasarkan beberapa penelitian pendahuluan seperti yang dilakukan oleh Maruyama *et al.*, 2009 membuktikan SlgA tinja mencapai nilai tertinggi pada usia 1 bulan yang kemudian menurun sampai dengan usia 5 bulan, peneliti menjelaskan hal tersebut diduga akibat penurunan rata-rata konsentrasi SlgA ASI dari 1 menjadi 0.5 mg/mL antara usia 1—6 bulan, fenomena ini menunjukkan bahwa kadar SlgA tinja sangat dipengaruhi oleh intake ASI. Bridgman *et al.*, 2016 juga menjelaskan bahwa meskipun sekretori imunoglobulin A terdeteksi pada spesimen tinja neonatus yang mengonsumsi ASI, kemampuan neonatus untuk menghasilkan IgA pada periode waktu tersebut masih sangat terbatas. Adapun imunitas pasif yang didapatkan (berupa IgA dan peptida antimikroba) berasal dari ASI, terutama kolostrum. Selain itu, peneliti juga membuktikan bahwa pemberian ASI berhubungan signifikan secara statistik dengan peningkatan kadar SlgA tinja. Penelitian oleh Kuitunen & Savilahti, 2015 juga menunjukkan penurunan kadar SlgA ASI berbanding lurus dengan penurunan kadar SlgA tinja. Hal tersebut dapat dijelaskan dengan teori oleh Maruyama *et al.*, 2009 bahwa imunoglobulin A disekitar folikel limfoid *Peyer's patches* baru

muncul pada usia 5 hari serta IgA-immunocytes mukosa dapat terdeteksi di saluran cerna neonatus pada minggu pertama dan kedua kehidupan.

Antigen bakteri yang mampu melewati pertahanan barrier akan terdeteksi oleh *pattern recognition receptor* (PRR) dan selanjutnya mengaktifasi *toll like receptor* (TLR) yang diekspresikan oleh sel imun bawaan. Kedua mekanisme tersebut menginduksi produksi sitokin proinflamasi. Dalam keadaan normal, saluran cerna dapat mencegah reaksi imunitas yang berlebihan dengan memproduksi protein maupun sitokin antiinflamasi salah satunya yakni peptida antimikroba (Grave *et al.*, 2007; Maheshwari, 2016). Beberapa peptida telah diidentifikasi dalam mekonium dan tinja neonatus selama minggu pertama kehidupan, menunjukkan adanya partisipasi peptida sebagai *barrier* saluran cerna terhadap infeksi. Satu kelas penting dari peptida antimikroba adalah keluarga defensin. Beberapa penelitian pendahuluan telah membuktikan bahwa *human β defensin-2* dapat dengan mudah terdeteksi pada tinja, seperti penelitian oleh Campeotto *et al.*, 2010 yang mendeteksi hBD-2 pada tinja neonatus usia tiga hari. Demikian pula dengan Corebima, 2017 yang meneliti kandungan hBD-2 neonatus pada usia 14 hari.

Human β defensin-2 tinja yang terdeteksi paling rendah pada penelitian ini adalah 151,775 ng/mL, berasal dari kelompok neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja. Nilai tersebut serupa dengan penelitian sebelumnya oleh Campeotto *et al.*, 2010 yang menjabarkan kadar hBD-2 tinja pada neonatus sehat usia 14 hari adalah 30—154 ng/mL. Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat perbedaan *mean* kadar hBD-2 tinja neonatus prematur pada ketiga kelompok yang bermakna secara statistik. *Mean* kadar hBD-2 tinja neonatus pada kelompok yang mengonsumsi ASI saja yakni $204,47 \pm 40,63$ ng/mL secara spesifik lebih rendah dibandingkan kelompok yang mengonsumsi kombinasi ASI dan susu formula ($351,66 \pm 38,19$ ng/mL), serta susu formula saja ($375,73 \pm$

69,13 ng/mL). Hasil tersebut sesuai dengan penelitian pendahuluan oleh Corebima, 2017 yang menunjukkan kadar hBD-2 tinja neonatus pada kelompok ASI saja jauh lebih rendah dibandingkan kelompok susu formula saja. Kadar hBD-2 tertinggi didapatkan pada neonatus usia empat-belas hari yang mengonsumsi susu formula saja yakni 492 ng/mL. Nilai tersebut lebih tinggi dari kadar hBD-2 neonatus prematur sehat pada penelitian oleh Campeotto *et al.*, 2010 yakni 30—154 ng/mL dan termasuk dalam kadar hBD-2 neonatus yang mengalami *intestinal distress* pada penelitian yang sama yakni 2-1271 ng/mL. Bila dibandingkan dengan penelitian oleh Jenke *et al.*, 2012 nilai hBD-2 tinja tertinggi pada penelitian ini adalah empat kali lipat (5—109 ng/mL). Kadar hBD-2 tinja terkait dengan efek bakterisidal, Routsias *et al.*, 2010 menemukan kadar hBD 2 tinja yang dapat membunuh bakteri tidak resisten terhadap antibiotika adalah 3,25—4,5 mcg/mL, sedangkan kadar yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri *wild type* adalah 3,9—9,35 mcg/mL. Selain itu, penelitian oleh Baricelli *et al.*, 2015 menunjukkan aktivitas antimikrobal adalah 0,25 mcg/mL untuk *S.mercescen*, 0,5 mcg/mL untuk *P.aeruginosa*, dan 4 mcg/mL untuk *Acinobactere baumannii*. Kadar hBD-2 yang terstimulasi dari saluran cerna masih terlalu rendah untuk mencapai efek bakterisidal pada infeksi berat, dalam hal ini ASI berperan meningkatkan kadar hBD-2, adapun kandungan hBD-2 ASI adalah 0,31—19,12 ng/mL pada kolostrum dan 52,65—182,29 pg/mL pada ASI matur. Hasil tersebut berbeda dengan penelitian oleh Markus *et al.*, 2010 dan Campeotto *et al.*, 2010 yang menunjukkan kadar *human β defensin-2* tinja tidak dipengaruhi oleh pemberian nutrisi. Perbedaan hasil dimungkinkan akibat jumlah sampel yang tidak merata pada masing masing kelompok nutrisi di penelitian sebelumnya.

Rata-rata nilai hBD-2 tinja neonatus prematur kelompok susu formula saja secara statistik menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna dengan rata-

rata kelompok kombinasi ASI dan susu formula saja ($p=0,463$), namun berbeda signifikan dibandingkan kelompok ASI saja. Sejalan dengan penelitian Arisanti & Wibowo, 2019 bahwa kadar marker inflamasi tinja pada neonatus yang mengonsumsi ASI dan susu formula tidak berbeda signifikan dibandingkan yang mengonsumsi susu formula saja. Selain itu, penelitian oleh Corebima, 2017 juga menunjukkan kadar hBD-2 tinja neonatus dengan paparan susu formula baik menggunakan ASI maupun tidak, tidak menunjukkan perbedaan signifikan, sebaliknya bila dibandingkan dengan kelompok ASI saja menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal tersebut mampu dijelaskan oleh Willems *et al.*, 2015 bahwa pemberian susu formula dapat menginduksi faktor *proinflammatory* meskipun belum didapatkan tanda klinis inflamasi, sedangkan ASI berperan menekan inflamasi termasuk yang terjadi pada saluran cerna bayi.

Publikasi sebelumnya oleh Bering, 2018 memaparkan bahwa neonatus usia 7 hari yang mengonsumsi ASI menunjukkan berkurangnya reaksi inflamasi oleh karena air susu ibu mampu melindungi saluran cerna bayi dengan menstimulasi sistem imun maupun memberikan substrat terkait perkembangan mikrobiota saluran cerna yang bermanfaat terutama pada minggu pertama kehidupan. Sejalan dengan penelitian tersebut, Bhatia, 2013 membuktikan bahwa pemberian ASI saja mampu menurunkan kejadian inflamasi saluran cerna sebesar 79%, nilai tersebut berbeda signifikan bila pemberian ASI dikombinasi dengan susu formula, baik komposisi ASI $>50\%$ maupun $<50\%$, yakni hanya menurunkan 3,2—10% kejadian inflamasi saluran cerna. Sisk *et al.*, 2017 dalam penelitiannya membuktikan bahwa inflamasi saluran cerna dapat menurun sebesar enam kali pada bayi yang mengonsumsi ASI dalam 14 hari pertama kehidupan. Quigley *et al.*, 2011 melaporkan kejadian inflamasi saluran cerna jauh lebih tinggi pada bayi yang mengonsumsi susu formula saja dibandingkan susu formula dengan ASI maupun ASI saja. Abram *et al.*, 2014 menunjukkan

pemberian susu formula meningkatkan kejadian inflamasi 15% dan kematian sebesar 8%, dijabarkan pula bahwa setiap 10% peningkatan volume susu formula mampu meningkatkan risiko infeksi 17,9%.

Peningkatan hBD-2 tinja selalu dikaitkan dengan peningkatan respon inflamasi baik disebabkan oleh infeksi maupun bukan infeksi. Adapun beberapa hal yang dapat meningkatkan respon inflamasi pada penelitian ini adalah *distres* napas, pemberian antibiotik dalam waktu lama, penyakit kulit, dsb. Empat puluh enam persen sampel (18 sampel) pada kelompok ASI, ASI dan susu formula serta susu formula saja mengalami masalah pernapasan dan mendapatkan terapi oksigen berupa CPAP, 27 pasien mendapatkan antibiotika (15 neonatus dilahirkan dari ibu dengan KPD<18 jam) dengan durasi paling lama adalah 14 hari. Faktor faktor tersebut yang diduga berpengaruh terhadap peningkatan kadar hBD-2 tinja.

Epitel respiratori merupakan salah satu epitel yang sering terpapar oleh patogen dan memiliki beberapa sistem pertahanan, salah satunya adalah defensin. Defensin berperan sebagai pertahanan pertama kali dalam melawan mikroorganisme (Olvera & Guterrez, 2018). Schneider *et al.*, 2005 menjelaskan epitel saluran pernapasan merupakan salah satu organ yang mampu menghasilkan hBD-2 terutama ketika mengalami inflamasi. Liu *et al.* 2013 meneliti hubungan hBD-2 dengan kejadian pneumonia, pasien dengan kadar hBD-2 plasma yang rendah memiliki risiko lebih tinggi terjadi pneumonia berat, penggunaan ventilator bahkan kematian. Scharf *et al.*, 2010 menjabarkan peningkatan hBD-2 pada sel epitel paru yang terinfeksi *L.pneumophila* melalui mediasi dari sel TLR dan NF- κ B.

Neonatus prematur yang tidak ditemukan tanda infeksi bukan merupakan indikasi untuk diberikan antibiotik. Pemberian antibiotik *broad spectrum* akan mengganggu sistem imun dimana menghambat kolonisasi bakteri

pada traktus intestinalis dan mampu mengurangi kolonisasi bakteri komensal yang dibutuhkan oleh saluran cerna neonatus prematur sehingga terjadi dysbiosis (Tanner *et al*, 2015). Penelitian Esmailizand *et al*, 2018 membuktikan bahwa pemberian antibiotik 5 hari atau lebih pada neonatus prematur tanpa bukti adanya infeksi berhubungan dengan peningkatan kejadian EKN secara signifikan. Bahkan penelitian Arboleya *et al*, 2015 menunjukkan pemberian antibiotik prepartum pada ibu hamil tanpa adanya bukti ketuban pecah dini maupun kolonisasi *Streptococcus group B* di vagina dapat mengganggu pertumbuhan mikrobiota saluran cerna neonatus yang selanjutnya meningkatkan risiko terjadinya sepsis awitan lambat maupun EKN pada neonatus.

Penelitian dilakukan secara *cross sectional* sehingga tidak mampu menjelaskan hubungan kadar SIgA tinja terhadap inflamasi saluran cerna (dinilai dari kadar hBD-2 tinja maupun luaran klinis). Namun, dari 13 neonatus pada kelompok yang mendapatkan ASI saja hanya dua yang tidak menunjukkan gejala saluran cerna sedangkan 11 neonatus lainnya didapatkan dengan gejala klinis muntah atau perut membesar, maupun keduanya. Bahkan, neonatus dengan kadar SIgA tertinggi didapatkan dengan keluhan muntah dan perut membesar dengan kadar hBD-2 tinja 154 ng/mL dimana bukan merupakan nilai terendah dalam penelitian ini (nilai terendah 151,775 ng/mL) meskipun masih termasuk rentang normal berdasarkan Campeotto *et al.*, 2010. Kondisi tersebut dapat dijelaskan oleh Gopalakrishna *et al.*, 2019 bahwa kadar SIgA yang terdeteksi pada tinja tidak mencerminkan kemampuan komponen tersebut untuk berikatan dengan bakteri patogen dimana neonatus dengan inflamasi saluran cerna (pada penelitian ini dengan subyek enterokolitis nekrotikan) memiliki ikatan IgA dengan bakteri yang rendah. Penelitian tersebut menemukan bahwa fraksi bakteri IgA+ menurun seiring waktu pada neonatus yang mengalami EKN,

sedangkan ikatan bakteri IgA+ tidak menunjukkan hubungan pada kontrol.

Dengan demikian, tampak bahwa neonatus yang berkembang menjadi EKN mengalami perubahan pada mikrobiota saluran cerna maupun repertoar IgA ASI ibu yang menyebabkan 'escape' bakteri patogen. Adapun hal yang mempengaruhi kualitas SIgA pada neonatus selain pemberian nutrisi ASI dan kualitas SIgA ASI ibu yakni maturitas imunitas saluran cerna yang sebenarnya akan berkembang seiring usia (Retnaningtyas *et al.*, 2010).

Terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini yakni; (1) sampel diperoleh secara *consecutive sampling* dengan keterbatasan waktu penelitian, hal ini dapat mempengaruhi representasi sampel penelitian terhadap populasi umum; (2) masih didapatkan beberapa faktor perancu yang sulit dihindari dan dapat memengaruhi hasil dalam penelitian ini yakni cara penyimpanan dan transport ASI dari ibu ke petugas perinatologi, penggunaan orogastrik, pemberian antibiotik, dan ruang perawatan di perinatologi (infeksi atau non infeksi) selama pengamatan dimana memberikan risiko penularan bakteri nosokomial yang berbeda; (3) mekanisme anti inflamasi juga diperankan oleh sitokin antiinflamasi lainnya yang terinduksi, sehingga dapat memengaruhi kadar *human β defensin-2* yang dinilai; (4) tidak dilakukan pemeriksaan *flowcytometri* untuk menilai efektivitas sekretori IgA terhadap kemampuan untuk *coated bacteria*.

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Kadar sekretori IgA tinja neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja lebih tinggi dibandingkan neonatus permatur yang mengonsumsi ASI dan susu formula maupun susu formula saja.
2. Kadar *human β defensin-2* tinja neonatus prematur yang mengonsumsi ASI saja lebih rendah dibandingkan neonatus prematur yang mengonsumsi ASI dan susu formula maupun susu formula saja.

7.2 Saran

1. Dibutuhkan penelitian lanjutan secara kohort dengan jumlah sampel lebih banyak yang mengukur kadar sekretori IgA tinja dan *human β defensin-2* tinja neonatus untuk mengetahui hubungan, pola perubahan biologis, spesifisitas dan sensitivitasnya sebagai marker diagnostik dini untuk mendeteksi inflamasi saluran cerna.
2. Dibutuhkan penelitian lanjutan yang mengkaji karakteristik klinis ibu yang dapat memengaruhi kadar sekretori IgA dan *human β defensin-2* tinja neonatus (asupan nutrisi, status imunologis, penyakit kronis prekonsepsi, dan sebagainya).

DAFTAR PUSTAKA

- Abram SA, Schanler RJ, Lee ML, Recthman DJ. 2014. Greater mortality and morbidity in extremely preterm infant fed a diet containing cow milk protein products. *Breastfeeding medicine*; 9(6): 281—285.
- Ahle M, Drott P, Anderson RE. 2013. Epidemiology and trends of necrotizing enterocolitis in Sweden: 1987—2009. *Pediatrics*; 132(2):e443—e451.
- Arisanti D, Wibowo S. 2019. Fecal Calprotectin Level of Breast Milk-Formula vs Formula Feeding in Preterm and Low Birth Weight Neonates with Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Tropical Life Science*; 9(1): 29—33.
- Arboleya S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, Solís G, Fernández N, Gavilan R, Ventura M, Margolles A, Gueimonde, M. 2015. Intestinal Microbiota Development in Preterm Neonates and Effect of Perinatal Antibiotics. *The Journal of Pediatrics*; 166(3): 538—544.
- Avula S, Smith LN, Monga R, Lockwood L, Kadrofske M. 2017. Stool Biomarkers to Diagnose Necrotizing Enterocolitis in Preterm Infants: A Pilot Case-Control Study. *Pediatrics*; 140(1):1-7.
- Badriul H. Bedah ASI. 2008. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Bakema JE, Egmond Mv. 2011. Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies?. *mAbs*; 3(4): 352—361.
- Ballard O, Morrow AL. 2014. Human Milk Composition: Nutrient and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*; 60(1): 49—72.
- Baricelli J, Rocafull MA, Vázquez D, Bastidas B, Báez-Ramírez E, Thomas LE. 2015. Beta-defensin-2 in breast milk displays a broad antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *J Pediatr (Rio J)*; 91:36—43.
- Bering SB. 2018. Human Milk Oligosaccharides to Prevent Gut Dysfunction and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *Nutrients*; 10(10): 1461.
- Bhatia J. 2013. Human milk and the prematur infant. *Ann Nutr Metab*; 62 (3): 8—14.
- Bridgman SL, Konya T, Azad MB, Sears MR, Becker AB, Turvey SE, Mandhane PJ, Subbarao P, Scott JA, Field CJ, Kozyrskyj. 2016. Infant Gut Immunity: a Preliminary Study of IgA Association with Breastfeeding. *Journal of Development Origin of Health and Disease*; 7(1): 68—72.

Campeotto F, Baldassarre M, Laforgia N, Viallon V, Kalach N, Amati L, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. 2010. Fecal Expression of Human Beta Defensin 2 following Birth. *Neonatology*; 98:365—369.

Campeotto F, Suau A, Kapel N, Magne F, Viallon V, Ferraris L, Dupriet AJW, Soulaines P, Leroux B, Kalach N, Dupont C, Butel MJ. 2011. A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *British Journal of Nutrition*; 105: 1843–1851.

Carlson J, Chang MI, Nandivada P, Cowan E, Puder M. 2013. Neonatal intestinal physiology and failure. *Seminars in Pediatric Surgery*; 22: 190–194

Choi, Y. 2014. Necrotizing enterocolitis in newborns: update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies. *Korean J Pediatr*; 57(12):505—513.

Cobo ER, Chadee K. 2013. Antimicrobial Human β defensin in the Colon and Their Role in Infection and Non-Infectious Diseases. *Pathogens*; 2:177—192.

Corebima BRV. 2017. Kadar Human Beta Defensin dalam tinja dan pola mikrobiota saluran cerna pada neonatus kurang bulan yang mendapat ASI, susu formula, maupun kombinasi. Tesis. Tidak Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Program Pendidikan Ilmu Spesialis Anak 2. Universitas Indonesia: Jakarta

Corthesy B. 2010. Role of secretory immunoglobulin A and secretory component in the protection of mucosal surfaces. *Future microbiol*; 5(5): 817—829.

Dahlan S. 2011. Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi 5. Jakarta, Salemba Medika.

Dion C, Montagne P, Bene MC, Faure G. 2004. Measurement of fecal immunoglobulin A levels in young children. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; 18: 195–199.

Edmond KM, Zandoh C, Quigley MA, Amenga-ES, Owusu-Agyei S, Kirkwood BR. 2016. Delayed breastfeeding initiation increases risk of neonatal mortality. *Pediatrics*;117(3):e380-6.

Esmailizand R, Shah PS, Seshia M, Yee W, Yoon EW, Dow K. 2018. Antibiotic Exposure and Development of Necrotizing Enterocolitis in Very Preterm Neonates. *Paediatrics & Child Health*; 23(4): e56–e61.

Frost B. 2014. Maternal breast milk transforming growth factor beta and feeding intolerance in preterm infants. *Journal Pediatr Res*; 76(4): 386–393.

Gidrewicz D, Fenton R. 2014. A systematic review and metaanalysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC pediatric journal*; 14: 216.

Grave G.D, Nelson S.A, Walker W.A, Moss R.L, Dvorak B, Hamilton F.A, Higgins R, Raju T.N. 2007. New Therapies And Preventive Approaches For Necrotizing Enterocolitis: Report Of A Research Planning Workshop. *Pediatric Research*; 62: 510-514.

Goedicke FS, Hartel C, Krasteva CG, Kopp MV, Meyer S, Zemlin M. 2017. Preterm Birth Affect the Risk of Developing Immune-mediated Diseases. *Front Immunol*; 8(1266): 1–7.

Good M, Sodhi C. P, Hackam D.J. 2014. Evidence-Based Feeding Strategies Before And After The Development Of Necrotizing Enterocolitis. *Expert Review Of Clinical Immunology*; 2: 1–10.

Gopalakrishna KP, Macadangang BR, Rogers MB, Tometich JT, Firek BA, Baker R, Ji J, Burr AHP, Ma C, Good M, Morowitz MJ, Hand TW. 2019. Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Nature Medicine*; 25: 1110–1115.

Halpern MD, Denning PW. 2015. The role of intestinal epithelial barrier function in development of NEC. *Tissue Barriers*; 3(1) : 1–10.

Hanson LA, Korotkova M. 2012. The Role of Breastfeeding in Prevention of Neonatal Infection. 7: 275–281.

Hayati N, Kadim M, Mangunatmadja I, Soedibyo S, Ifran EB, Sjakti HA. 2016. Gut wall integrity in exclusively breastfed vs formula fed infants. *Paediatr Indones*; 56(4): 199–204.

Hay WW, Hendrickson KC. 2017. Preterm Formula Use in Preterm Very Low Birth Weight Infant. *Seminars in fetal&neonatal medicine*; 22(2017):15–22.

He Y, Lawlor NT, Newburg DS. 2016. Human Milk Components Modulate Toll like Receptor-Mediated Inflammation. *Adv Nutr*;7:102–11

Ho MY, Yen YH. 2016. Trend Nutritional Support in Preterm Infant. *Pediatric and Nonatology*; 57:365–370.

Huang Yi, Ouyang YQ, Redding SR. Previous breastfeeding experience and its influence on breastfeeding outcomes in subsequent births: A systematic review. *WOMBI 2018*; 877(7): 1–7.

Jenke AC, Zilbauer M, Postberg J, Wirth S. 2012. Human-defensin 2 expression in ELBW infants with severe necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*;72:513-20.

Juniarto R, Kadim M. 2014. Faktor Risiko yang Memengaruhi Kolonisasi Mikroflora Saluran Cerna Neonatus Kurang Bulan dengan Enterokolitis Nekrotikans. *Sari Pediatrica*; 15(6): 353—360.

Kabeerdoos J, Devi S, Mary RR, Prabhavanthi D, Vidya R, Mechenro J, Mahendri NV, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal*; 10(138): 1—4.

Khader A, Gallagher J, Woods M, Yang W.L, Wang P, Stylianos S, Prince J. 2013. Necrotizing Enterocolitis: An Update on The Benefits of Breast Milk. *International Journal of Child Health and Nutrition*; 2: 79-84.

Klotman ME, Chang TL. 2016. Defensin in innate antiviral immunity. *Nature Reviews Immunologi*; 6: 447—456.

Ko HJ, Chang YS. 2015. Regulation of Intestinal Immune System by Dendritic Cells. *Immune Network*; 15(1): 1—8.

Kuitunen M, Savilahti E. 2015. Mucosal IgA, mucosal cow's milk antibodies, serum cow's milk antibodies and gastrointestinal permeability in infant. *Pediatr Allergy Immunol*; 6: 30—35.

Kunle O, Peterside O, Adeyemi O. 2014. Prevalence and Outcome of Preterm Admissions at the Neonatal Unit of a Tertiary Health Centre in Southern Nigeria. *Open Journal of Pediatrics*; 4: 67-75.

Kumagai H, Maisawa S, Tanaka M, Takahashi M, Takasago Y, Nishijima A, Watanabe S. 2012. Intestinal microbiota and secretory immunoglobulin A in feces of exclusively breast fed infants with blood streaked stools. *Microbiol Immunol*; 56: 657—663.

Lane JA, O'Callaghan J, Carrington SD, Hickey RM. 2013. Transcriptional response of HT-29 intestinal epithelial cells to human and bovine milk oligosaccharides. *Br J Nutr*;110: 2127—37.

Liu S, He LR, Wang W, Wang GH, He ZY. 2013. Prognostic value of plasma human β -defensin 2 level on shortterm clinical outcomes in patients with community-acquired pneumonia: A preliminary study. *Respiratory Care* ; 58 : 655-661.

Liu Y, Zhu L, Fatheree NY, Liu X, Pacheco SE, Tatevian N, Rhoads JM. 2009. Changes in intestinal toll-like receptors and cytokines precede histological injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 297 :G442–50.

Maastrup R, Hansen BM, Kronborg H, Bojesen SN, Hallum K, Fradsen A, Kyhnaeb A, Svarer I, Hallstrom I. 2014. Factor Associated with Exclusive Breastfeeding of Preterm Infants: Result from a Prospective National Cohort Study. *Plos One*; 9(2): 1–9.

Maheswari A. 2016. Immunological and Hematological Abnormalities in Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol*; 42(3): 567—585.

Mantis NJ, Rol N, Cothersy B. 2011. Secretory IgA's Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut. *Mucosal Immunol*; 4(6): 603—611.

Markus R, Georg H, Michael G, Thorsten F, Anja T, Tobias W, Henrik K. 2010. Influence of Gestational Age, Caesarean Section, and Type of Feeding on Fecal Human beta Defensin 2 and Tumor Necrosis Factor: Alfa. *Journal of Pediatric gastroenterology and nutrition*; 51(1): 103—105.

Markel TA, Engelstad H, Poindexter BB. 2014. Predicting Disease Severity Of Necrotizing Enterocolitis: How To Identify Infants For Future Novel Therapies. *J Clin Neonatol*; 3: 1-9.

Maruyama K, Hida M, Kohgo T, Fukunaga Y. 2009. Changes in salivary and faecal secretory IgA in infants under different feeding regimens. *Pediatrics International*; 51: 342—345.

Mohan R, Koebnick C, Schildt J. 2008. Effects of Bifidobacterium lactis supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin and IgA in preterm infants. *Pediatr Res*; 64: 418–422.

Nanthakumar N, Fusunyan RD, Walker WA. 2010. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *PNAS*; 97(11): 6043—6048.

Neu J, Walker WA. 2011. Necrotizing Enterocolitis. *New England Journal Of Medicine*; 364: 255—264.

Neu J, Escobar MD. 2008. Gastrointestinal Development: Implication for Infant Feeding. *Nutrition in Pediatrics*; 4: 242—249.

Nicolau NMN, Poletini J, Marconi C, Peracoli JC, Miot HA, Silva MG. 2017. Human Beta Defensins 1, 2 and 3 Produced by Amniochorion



- Membranes Is Similar in Term and Preterm Delivery. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*; 7: 846-857.
- Olariu L, Olariu G, Ognean L, Marginean O, Boia. 2014. Necrotizing Enterocolitis In Preterm Infants With Gestational Age < 32 Weeks In Rumania: Incidence And Risk Factors. *Jurnalul Pediatriei*; 17: 36-41.
- Olvera DP, Gutierrez CC. 2018. Multifunctional activity of the β -Defensin-2 during Respiratory Infections. Mexico: Department of Virology and Mycology, National Institute of Respiratory Diseases. p 1—26.
- Otte JM, Werner I, Brand S, Chromik AM, Schmitz F, Kleine M, Schmidt WE. 2008. Human Beta-Defensin 2 Promotes Intestinal Wound Healing. *Journal of Cellular Biochemistry* 104: 2286—2297.
- Pang T, Leach ST, Katz T, Day AS, Ooi CY. 2014. Fecal Biomarker of Intestinal Health and Disease in Children. *Front Pediatr*; 2(6): 1—12.
- Patel RM, Denning PW. 2015. Intestinal microbiot and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*;78(3):233.
- Peterson LW, Artis D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Review Immunology*, 14:141—153.
- Ramani M, Ambalavanan N. 2013. Feeding practice and NEC. *Clin perinatol*; 40(1): 1—10.
- Retnaningtyas LP, Etika R, Sudarmo SM. 2010. Effect of Probiotic Administration on The Levels of Fecal Secretary Immunoglobulin A in Preterm Infants. *Folia Medica Indonesiana*; 46(1): 15—23.
- Retnaningtyas P, Sudarmo SM, Harsono A, Damanik SM. 2008. Effect of probiotic on the fecal sIgA level in preterm infants (A randomized double-blind placebo control study). *Paediatr Indones*; 48(4): 247—252.
- Rodriguez GG, Licon NA, Benitez LD, Sabanero GB, Magdaleno DC, Padilla RA, Ramirez EG. 2019. Single strain versus multispecies probiotic on necrotizing enterocolitis and faecal IgA level in very low birth weight preterm neonates: A randomized clinical trial. *Pediatric and neonatology* (2019); 20: 564—569.
- Routsias JG, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A. 2010. In Vitro Bactericidal Activity of Human Beta Defensin 2 againts Nosocomial Strain. *J.peptide*; 31: 1654—1660.

Quigley MA, henderson G, Anthony MY, McGuire W. 2011. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants.

Cochrane database syst rev. 17(4): 1—7.

Scharf S, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N, N'Guessan PD. 2010. Induction of human α -defensin-2 in pulmonary epithelial cells by *Legionella pneumophila*: Involvement of TLR2 and TLR5, p38 MAPK, JNK, NF- κ B, and AP-1. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*; 298 : L687-L695.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Korting MS, Korting HC. Human Defensins. *Journal of Molecular Medicine*; 83(8):587—595.

Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulin. *Allergy Clin Immunol*; 125(202): S41—S52.

Sidauruk RJM, Amir I, Kadim M, Said M. 2014. Faktor risiko yang memengaruhi kolonisasi mikroflora saluran cerna neonatus kurang bulan dengan enterokolitis nekrotikan. *Sari pediatri*; 15(6): 353—360.

Siddiqui I, Majid H, Abid S. 2017. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*; 8(1): 39—46.

Simmer K, Askie LM. 2013. Preterm formula milk versus term formula milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; 2: 1—9.

Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O'shea TM. 2017. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Journal of perinatology*; 27: 428—433.

Smith ER, Hurt L, Chowdhury R, Sinha B, Fawzi W, Edmond KM. 2017. Delayed breastfeeding initiation and infant survival: A systematic review and metaanalysis. *Plos ONE*; 12(7): 1—16.

Soeorg H, Huik K, Parm U, Ilmoja ML, Metelskaja N, Metsvaht T, Lutsar I. 2013. Genetic relatedness of coagulase-negative staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J*; 32: 389—393.

Spearman PW, Camacho-Gonzalez A, Stoll BJ. 2013. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am*; 60: 367—389.

Sulistijono E, Alasiry E, Irawan G, Utomo TM, Iskandar A, Etika R, Hendrato TW, Wibowo T, Hendarto A, Sjarif D, Lestari ED, Yuliarti K, Nurani N, Prawitasari T, Devaera Y. 2016. Konsensus Asuhan Nutrisi pada Bayi Prematur. Jakarta: IDAI.

Tanner SM, Beryhill Ellenburg JL, Jilling T, Cleveland DS, Lorenz RG, Martin CA. 2015. Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis: Modeling the Innate Immune Response. *The American Journal of Pathology*; 185(1):1—13.

Tourneur E, Chassin C. 2013. Neonatal Immune Adaptation of The Gut and Its Role during Infection. *Clinical and Developmental Immunology*; 2013: 1—17.

Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl HG. 2012. Microbial host defensins-specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Immunology*; 3(249):1—4.

Utomo, MT. 2010. Neonatal sepsis in Low Birth Weight Infants in Dr. Soetomo General Hospital. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*; 1: 86-89.

Utama H, Herqutanto. 2014. Makanan bayi dan anak sehat. Air Susu Ibu. Penuntun Diet Anak Edisi 3. Jakarta: Badan Penerbit FKUI, hal 7—13.

Walker A, Iyengar RS. 2014. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Clin*; 77(1):220-228.

Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Méheust A, de Vos WM, Mercenier A, Nauta A, Garcia-Rodenas CL. 2016. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 312: G171—G193.

Willems R, Rybicki V, Jiang P, Sangild PT, Shen RL, Hensel KO, Wirth S, Postberg J, Jenke AC. 2015. Introduction of formula feeding induces structure in the intestine of preterm pigs. *Mol cell pediatr*; 2(1): A6.

World Health Organization. 2012. March of Dimes, The Partnership for Maternal Newborn and Child Health (2012) Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Geneva: WHO.

Lampiran 1. Analisis SPSS

Tabel 1. Hasil uji normalitas kadar SIgA dan hBD-2 tinja neonatus prematur

Variabel Penelitian	p-value	Distribusi Data
Sekretori IgA (SIgA)		
Tinja usia empat-belas hari		
• ASI saja	0,342	Normal
• ASI dan susu formula	0,225	Normal
• Susu formula saja	0,214	Normal
Human β defensin 2 (hBD-2)		
Tinja usia empat-belas hari		
• ASI saja	0,300	Normal
• ASI dan susu formula	0,473	Normal
• Susu formula saja	0,263	Normal

Tabel 2. ANOVA data Sekretori IgA

Multiple Comparisons

Siga_keempatbelas
Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Hari_keempatbelas ASI keempatbelas	CAMPURAN keempatbelas	715.61538*	1.22132E2	.000	417.0892	1014.1416
	SUFOR keempatbelas	1162.07692*	1.22132E2	.000	863.5507	1460.6031
CAMPURAN keempatbelas	ASI keempatbelas	-715.61538*	1.22132E2	.000	-1014.1416	-417.0892
	SUFOR keempatbelas	446.46154*	1.22132E2	.002	147.9353	744.9877
SUFOR keempatbelas	ASI keempatbelas	-1162.07692*	1.22132E2	.000	-1460.6031	-863.5507
	CAMPURAN keempatbelas	-446.46154*	1.22132E2	.002	-744.9877	-147.9353

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel 3. ANOVA data hBD-2

Multiple Comparisons

HBD_keempatbelas

Tukey HSD

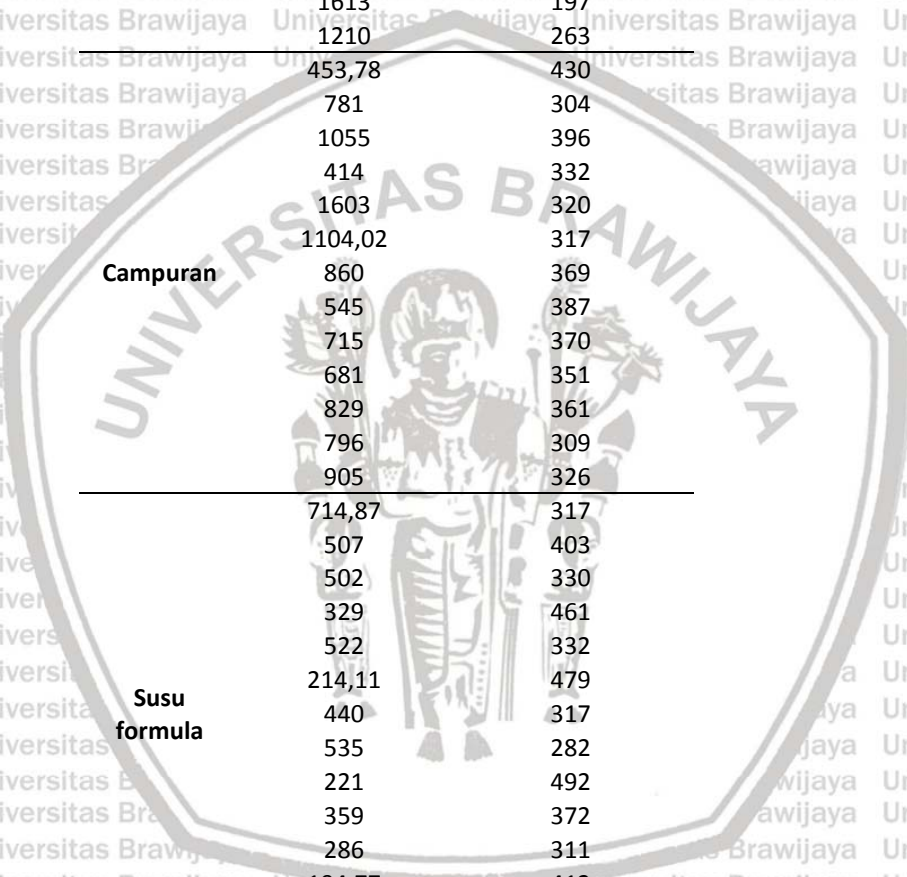
(I) Hari_keempatbelas	(J) Hari_keempatbelas	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ASI keempatbelas	CAMPURAN keempatbelas	-147.19231*	20.11309	.000	-196.3547	-98.0299
	SUFOR keempatbelas	-171.26538*	20.11309	.000	-220.4278	-122.1030
CAMPURAN keempatbelas	ASI keempatbelas	147.19231	20.11309	.000	98.0299	196.3547
	SUFOR keempatbelas	-24.07308	20.11309	.463	-73.2354	25.0893
SUFOR keempatbelas	ASI keempatbelas	171.26538	20.11309	.000	122.1030	220.4278
	CAMPURAN keempatbelas	24.07308	20.11309	.463	-25.0893	73.2354

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Tabel 4. Data kadar SlgA dan hBD-2 tinja pada masing masing sampel

	SlgA	hBD-2
	1976	249
	971	228
	1210	272
	1446	236
	1971	193
	1876	166
ASI	1371	187
	2013	181
	835,8	184
	2091,2	154
	1461	152
	1613	197
	1210	263
	453,78	430
	781	304
	1055	396
	414	332
	1603	320
	1104,02	317
Campuran	860	369
	545	387
	715	370
	681	351
	829	361
	796	309
	905	326
	714,87	317
	507	403
	502	330
	329	461
	522	332
	214,11	479
Susu formula	440	317
	535	282
	221	492
	359	372
	286	311
	194,77	412
	214,86	379



RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SAIFUL ANWAR MALANG

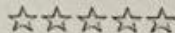


Jl. Jaks Agung Suprpto No.2 Malang

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

TERAKREDITASI KARS VERSI 2012 TINGKAT PARIPURNA

RSSA



24 Februari 2015 s.d. 23 Februari 2018

Jl. Jaks Agung Suprpto No.2 MALANG 65111

Telp. (0341) 362101, Fax. (0341) 369384

E-mail : staf-rsu-drsaifulanwar@jatimprov.go.id

Website : www.rsusaifulanwar.jatimprov.go.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
PELAKSANAAN PENELITIAN**

("ETHICAL CLEARANCE")

No: 400/010/K.3/302 /2019

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN RSUD Dr SAIFUL ANWAR MALANG,
SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : KADAR SEKRETORI IMMUNOGLOBULIN A, *HUMAN B DEFENSIN 2*, DAN
KALPROTEKTIN DALAM TINJA NEONATUS PREMATUR YANG MENDAPAT AIR
SUSU IBU, SUSU FORMULA, DAN KOMBINASI.

PENELITI UTAMA: dr. PUTRI PRIMAWARDANI
dr. RUSDIAN NIATI NINGSIH

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN

RSUD Dr. SAIFUL ANWAR MALANG

DINYATAKAN LAIK ETIK

MALANG, 15 JANUARI 2019

KETUA TIM KOMISI ETIK PENELITIAN

dr. MOHAMMAD SAIFUR ROHMAN, SpJP (K)., PhD



Lampiran 3

LEMBAR PERSETUJUAN

KADAR SEKRETORI IMMUNOGLOBULIN A, KALPROTEKTIN DAN HUMAN β DEFENSIN-2 TINJA PADA NEONATUS PREMATUR YANG MENDAPAT AIR SUSU IBU SAJA, SUSU FORMULA SAJA, DAN KOMBINASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :

Usia :

Alamat :

Telepon :

Merupakan orangtua/wali dari:

Nama :

Jenis Kelamin :

No Rekam Medis :

Tanggal lahir/usia :

Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya. Kami memberikan ijin anak kami untuk diikutsertakan dalam penelitian ini. Kami mengerti bahwa bila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari dr. Putri Primawardani.

Dengan menandatangani formulir ini, kami setuju untuk ikut serta dalam penelitian ini.

Malang, 2019

Tanda tangan orangtua/wali

(.....)



Lembar Pengumpulan Data

KADAR SEKRETORI IMMUNOGLOBULIN A, KALPROTEKTIN DAN HUMAN β DEFENSIN-2 TINJA PADA NEONATUS PREMATUR YANG MENDAPAT AIR SUSU IBU SAJA, SUSU FORMULA SAJA, DAN KOMBINASI

IDENTITAS

Nama :
 Jenis Kelamin : Laki-laki Perempuan
 Nomor Rekam Medis :
 Tanggal lahir/usia :
 Nama orang tua/wali :
 Nomor telepon :
 Hubungan dengan anak : Ayah/Ibu kandung
 Ayah/Ibu angkat

ANAMNESIS

Usia kehamilan : minggu
 Karakteristik ibu : Hipertensi
 Asma
 Pre eklampsia
 HIV
 TB
 Cara persalinan :
 Ketuban : Warna :
 KPD : (+) / (-) bila (+): jam
 APGAR skor : menit pertama
 menit kelima
 Berat badan lahir : gram
 Konsumsi : ASI
 Predominan ASI
 Predominan susu formula
 Susu formula saja

PEMERIKSAAN FISIS

Berat lahir (gram) :
 Panjang lahir (cm) :
 Lingkar kepala (cm) :
 Lingkar dada (cm) :

Tabel pengamatan

Usia	1—6 hari	7 hari	8 hari	9 hari	10 hari	11 hari	12 hari	13 hari	14 hari
BB									
Klinis: Muntah Retensi Distensi abdomen									
Keluhan lain									
Penunjang: Laboratorium									
Foto abdomen									
Tetrapi yang diberikan									

Malang,.....2019