

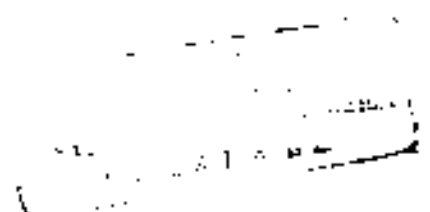
# **DISERTASI**

**IMUNOREGULASI  $T_H1$ ,  $T_{REG}$  DAN  $T_H2$  MELALUI TLR2 DAN TLR4 OLEH  
PROBIOTIK LGG DAN *Lactobacillus plantarum* IS-10506  
DALAM PENURUNAN REAKSI ALERGI  
STUDI EKSPERIMENTAL PADA MENCIT COBA**



**ANANG ENDARYANTO**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2007**



**IMUNOREGULASI  $T_H1$ ,  $T_{REG}$  DAN  $T_H2$  MELALUI TLR2 DAN TLR4 OLEH  
PROBIOTIK LGG DAN *Lactobacillus plantarum* IS-10506  
DALAM PENURUNAN REAKSI ALERGI  
STUDI EKSPERIMENTAL PADA MENCIT COBA**

**DISERTASI**

Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Rabu  
Tanggal : 7 Maret 2007  
Pukul 10.<sup>00</sup> WIB

Oleh :

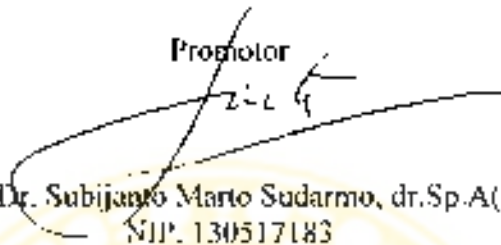
**ANANG ENDARYANTO  
NIM. 090415480D**

Pengesahan:

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 21 MARET 2007

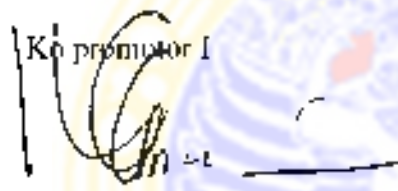
Oleh:

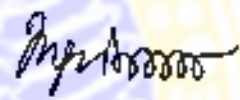
Promotor

  
Prof. Dr. Subijanto Marto Sudarmo, dr.Sp.A(K)  
NIP. 130517183

Ko promotor I

Ko promotor II

  
Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS,  
NIP. 130934628

  
Dr. Ingrid S Surono, Ir., MSc  
NIP. 131881256

## **PENETAPAN PANITIA PENGUJI**

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 7 Februari 2007

---

### **PANITIA PENGUJI DISERTASI**

**Ketua : Prof. Soedarto, dr.,Sp.Par(K), DTM&H., PhD**

**Anggota :**

1. Prof. Dr. Subijanto Maro Sudarmo, dr., Sp.A(K).
2. Prof. Dr. Suhartono Taat Putra dr., M.S.
3. Dr. Ingrid S Surono, Ir., M.Sc.
4. Prof. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH.
5. Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh.
6. Prof. Widya Asmara, drh., M.Sc., PhD
7. Dr. I Ketut Suidiana, drs., MSi.

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomor : 1147/JO3/PP/2007  
Tanggal : 12 Februari 2007**

## UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillah Rabbil Alamin, puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmad dan karuniaNya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Disertasi ini dapat diselesaikan tidak lepas dari dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Tim Promotor, oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, perkenankalah saya menghaturkan terimakasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Subijanto Marto Sudarmo, dr Sp.A(K), sebagai promotor yang telah dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran telah memberikan dukungan mental, meluangkan banyak waktu untuk berdiskusi dan memberi masukan, memperkenalkan saya pada berbagai konsep baru mengenai probiotik dan membukakan jalan untuk mengenal dan berkomunikasi secara langsung dengan para pakar internasional dalam bidang probiotik, saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga.

Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr. MSc, sebagai ko-promotor I yang telah memberikan bimbingan yang besar sekali manfaatnya bagi kemajuan cara berpikir ilmiah saya, memberikan kemampuan untuk melakukan analisis yang tajam, memberi arahan dalam menyusun kerangka konsep penelitian sejak awal, memberi bekal dalam menyusun presentasi ilmiah yang efektif, saya ucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr. Ingrid S Suroso, Ir., MSc, sebagai ko-promotor II yang banyak memberikan masukan penting dan sangat mendasar dari bidang keahliannya yang sangat bermanfaat

bagi peningkatan mutu disertasi ini, serta kesediaannya dengan ikhlas bersusah payah membantu penyediaan probiotik maupun berbagai informasi ilmiah terbaru dari Finlandia untuk penulisan disertasi ini, saya ucapkan terimakasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankanlah saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. Dr. Fasichul Eisan, Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga.; Prof. Dr. Med Puruhito, dr, SpBTKV selaku mantan Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Muhammad Amin, dr Sp.P(K) selaku Direktur Program Pasca Sarjana dan seluruh pimpinan dan staf Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk menjadi mahasiswa Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, Sp.KG selaku Ketua Program Ilmu Kedokteran Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah membantu dalam proses pelaksanaan ujian kualifikasi, proposal dan disertasi.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr HMS Wiyadi, dr.Sp.IHT (K) dan Direktur RSUD Dr. Sutomo dr. Slamet Riyadi Yuwono, DTMH, MARS yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Bambang Permono, dr, Sp.A(K) yang telah memberikan kesempatan dan dukungan

kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Divisi Alergi Immunologi pada Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Dr. Ariyanto Harsono, dr. Sp.A(K) yang telah memberikan kesempatan, dukungan moral dan finansial kepada saya untuk mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Kuntoro dr. MPH, Dr.PH dari Bagian Biostatistik dan Kependudukan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga, yang telah memberikan bimbingan dan saran yang sangat berharga dalam metode penelitian serta analisis data; dan Dr. Hari Basuki, dr.MS, dari institusi yang sama yang telah memberikan bimbingan arahan pada analisis statistik dan interpretasinya.

Prof. Soedarto, dr.Sp.Par(K), DTM&H., PhD. yang telah memberikan koreksi, bimbingan dan saran yang sangat berharga mulai dari kegiatan penyusunan pra usulan penelitian, usulan penelitian hingga penyusunan naskah disertasi.

Widodo Darmo Wandowo, dr.Sp.A(K) yang telah berkenan membaca, menelaah, mengoreksi dan memberi berbagai masukan berharga mulai dari kegiatan penyusunan pra usulan penelitian hingga penyusunan naskah disertasi.

Semua staf pengajar dan semua anggota tim penguji pada Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu dasar dan ilmu terapan yang sangat bermanfaat serta kritik, saran dan perhaikan pada proposal penelitian untuk penulisan disertasi saya.

Terimakasih kepada semua pihak yang telah mendukung dan membantu proses pendidikan dan penelitian untuk penulisan disertasi saya. Penulisan disertasi ini tidak

mungkin selesai tanpa bantuan dari semua staf pengajar Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah bersedia menggantikan semua pekerjaan yang saya tinggalkan selama pendidikan, penelitian, dan penulisan disertasi; Badan Litbangkes Departemen Kesehatan RI bersama Lembaga Biologi Molekuler Eijkmann yang telah menyediakan sebagian anggaran penelitian saya; Dr. Maija Saxellin dari *Research and Development Valio Ltd* Finlandia dan Dr. Ingrid S Surono, Jr. MSc dari *Functional Foods Forum* Universitas Turku Finlandia yang telah membantu penyediaan probiotik dari Finlandia untuk penelitian saya; Prof. Dr. Fedik A Rantam, drh; Dr. Suwamo, drh. MSi; Kusnoto, drh., MSi dan Tunik Juniastuti, drh., M.Kes yang telah membantu menyelenggarakan dan menyediakan tempat untuk eksperimen hewan coba di Bagian Immunologi dan Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga; serta Dr. I Ketut Suidiana, drs., MSi, yang telah membantu semua proses yang diperlukan dalam pemeriksaan imunohistokimia di Granik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Seluruh teman senasib dan seperjuangan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah bahu membahu, bekerjasama dan saling memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan ini.

Akhirnya dalam kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang saya kepada:

Orangtua saya ayahanda Satripto Wardoyo (almatuhum) dan ibunda Dyah Sudarni yang telah mengasuh, mendidik, mengayomi, menafkahi, memberi tauladan yang baik dengan penuh kasih sayang hingga saat ini. Juga kepada kedua mertua saya, ayahanda



Rachmat Santoso dan ibunda Soepiati (almarhumah) yang telah dengan penuh kasih sayang mendampingi saya dan keluarga menjalani kehidupan dan proses pendidikan ini.

Keempat saudara kandung saya Nanang Sudarsono, Nuniék Endardini, Nunuk Endaryanti (almarhumah) dan Edi Prasetyono yang telah menemani dan saling membantu dalam menjalani kehidupan.

Istri saya tercinta Diah Mira Indramaya yang telah bersabar mendampingi saya dalam proses pendidikan dan bersedia terlibat langsung dalam proses penelitian saya. Juga kepada anak-anak tercinta saya Emil Prabowo dan Akmal Prayogo yang selalu memberi suasana damai dan ceria serta pandai menghibur dan memberi kebahagiaan kepada saya dalam kesibukan menjalani pendidikan Doktor ini.

Terimakasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memotivasi, mendukung dan membantu hingga disertasi ini dapat disusun. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik yang telah diberikan kepada saya.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi umat manusia pada umumnya dan ilmu kedokteran khususnya, juga bagi penderita alergi yang semakin meningkat jumlahnya. Semoga Allah Subhana wa Ta'alla melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu dalam bentuk apapun dalam penyelesaian disertasi ini. Amin.

## RINGKASAN

**Imunoregulasi  $T_H1$ ,  $T_{reg}$  dan  $T_H2$  melalui TLR2 dan TLR4 oleh Probiotik LGG dan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dalam Penurunan Reaksi Alergi**

**Studi Eksperimental Pada Mencit Coba**

Alergi adalah penyakit yang dapat menimbulkan berbagai masalah mulai dari yang ringan sampai berat. Eliminasi alergen tidak praktis dan efektivitasnya terbatas. Berbagai uji klinik telah membuktikan kemampuan probiotik menurunkan reaksi alergi. Namun sejauh ini mekanisme penurunan reaksi alergi karena probiotik belum jelas.

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan mekanisme dan keterlibatan *Toll-like Receptor* (TLR) 2 dan 4 dalam penurunan reaksi alergi oleh probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS).

Pada penelitian eksperimental dengan disain faktorial ini, subyek penelitian (mencit *Balb/c* jantan) dibagi menjadi 9 kelompok dengan alokasi random dan disensitisasi dengan OVA. Variabel bebas dari penelitian ini adalah perlakuan dengan probiotik (LGG, LIS dan plasebo) dan inhibitor TLR (PD98059, LY294002 dan plasebo). Pengaruh dari perlakuan tersebut diamati melalui variabel tergantung yaitu aktivasi imunitas *innate* (TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p105/p50); aktivasi imunitas adaptif (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  dan IL-10, IgG<sub>2a</sub>, IgA, IgE serum spesifik OVA, IgA ileum spesifik OVA dan IgE total); dan reaksi alergi (histamin dan skor gejala).

Melalui pemeriksaan imunohistokimia, ekspresi TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, dan NF- $\kappa$ B p105/p50 serta produksi sitokin IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  dan IL-10 dideteksi dengan antibodi monoklonal masing-masing. Kadar IgE, IgG<sub>2a</sub>, IgA serum dan ileum

spesifik OVA dideteksi dengan metode *Indirect ELISA*. Kadar IgE total dideteksi dengan metode *Sandwich ELISA*. Kadar histamin diukur dengan metode *Competitive ELISA*. Proposal penelitian ini telah mendapatkan penilaian dan pengesahan kelaikan etik dari Komisi Etik (*Animal Care and Use Committee*) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Setelah sensitisasi OVA terakhir, mencit yang mendapat probiotik LGG dan LIS tidak mengalami reaksi alergi yang parah dan fatal, sedangkan kelompok kontrol mengalami reaksi tersebut. Pada kelompok LGG dan LIS terjadi modulasi respons imun *innate* dan adaptif yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, kecuali pada IL-4 dan IgE total.

Pada kelompok kontrol terdapat respons imun *innate* yang rendah, respons imun adaptif yang didominasi  $T_H2$  ( $T_H1 < T_{reg} < T_H2$ ) dan reaksi alergi (yang ditandai oleh histamin dan skor gejala yang tinggi) sebagai akibat degranulasi sel *mast*. Pada kelompok LGG terjadi aktivasi respons imun *innate* yang disertai oleh respons imun adaptif seimbang ( $T_H1 = T_{reg} = T_H2$ ) serta kadar histamin dan skor gejala yang rendah. Pada kelompok LIS terjadi aktivasi respons imun *innate* yang disertai oleh respons imun adaptif yang didominasi  $T_H1$  ( $T_H1 > T_{reg} > T_H2$ ) serta kadar histamin dan skor gejala yang rendah.

Pemberian probiotik LGG dan LIS tidak menurunkan  $T_H2$ . Pada kasus ini,  $T_H2$  tetap meningkat, namun peningkatannya dimbangi oleh kenaikan  $T_H1$  dan  $T_{reg}$  untuk mencapai keseimbangan baru. Efek interaksi yang ada antara variabel perlakuan probiotik (LGG, LIS dan plasebo) dengan variabel inhibitor TLR (PD98059, LY294002 dan plasebo) pada

respons imun *innate*, respons imun adaptif dan reaksi alergi membuktikan bahwa ada keterlibatan TLR2 dan TLR4 dalam penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LJS.

Simpulan penelitian ini adalah probiotik LGG dan LJS melibatkan TLR2 dan TLR4 dalam penurunan reaksi alergi melalui aktivasi  $T_H1$ , Treg, dan pembentukan keseimbangan baru  $T_H1$ - $T_H2$ .

Ini adalah laporan penelitian *in vivo* pertama yang menggunakan hewan coba konvensional dan inhibitor TLR untuk menjelaskan keterlibatan TLR2 dan TLR4 dalam menurunkan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LJS.



## SUMMARY

### **T<sub>H</sub>1, T<sub>reg</sub> and T<sub>H</sub>2 immunoregulation through TLR2 and TLR4 by LGG and *Lactobacillus plantarum* IS 10506 probiotics in reducing allergic reaction.**

#### Experimental Study in Mice Subjects

Allergy is a common disease with a substantial risk of life-threatening anaphylactic reactions. Allergen avoidance is neither practicable nor has been shown to be of limited efficacy. Many clinical trials have showed that probiotics bacteria may reduce allergic reaction. The mechanisms by which probiotics bacteria affect the immune system on reducing of allergic reaction are unknown yet.

The purpose of this study is to clarify the mechanisms and involvement of Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 in reducing allergic reaction by *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS) probiotics.

In the factorial design study, male Balb/c mice subjects were randomized into nine experimental groups and were sensitized with OVA. Probiotics (LGG, LIS and placebo) and TLR inhibitors (PD98059, LY294002 and placebo) are independent variable. The expression of innate immune response (TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp105/p50); the activation of adaptive immune response (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  and IL-10, sera OVA-specific IgG2a, IgA, IgE, ileum OVA-specific IgA and total IgE); and the allergic reaction (histamine and symptoms score) are dependent or effect variable.

The TLR2, TLR4, NF $\kappa$ B p65, NF $\kappa$ B p105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  and IL-10-positive cells were measured on histological slices from the small intestine of mice in all groups. Levels of sera OVA-specific IgA, IgE, IgG2a and ileum OVA-specific IgA were determined with an indirect ELISA. Measurement of total IgE antibodies in sera

was done with Sandwich ELISA. Histamine levels were determined with a competitive ELISA. The study protocol was approved by the Animal Care and Use Ethical Committee of the Veterinary Medicine Faculty of Airlangga University.

After final OVA sensitization, the LGG and LIS groups did not experience the severe and fatal allergic reaction, however most of mice in control group did experience. There were significant modulation of the innate and adaptive immune response in the LGG and LIS groups compared with the control group, except IL-4 and total IgE.

In control group, the low level of *innate* immune response (TLR2, TLR 4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p105/p60) was in conformity with  $T_H2$ -skewed ( $T_{H1} < T_{reg} < T_{H2}$ ) and IgE-mediated mast cell degranulation which produce histamine and clinical symptoms.

LGG probiotics enhanced the *innate* immune response (TLR2, TLR 4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p105/p60), formed the new equilibrium of  $T_{H2}$ - $T_{H1}$  cytokine profile ( $T_{H1} = T_{reg} = T_{H2}$ ), and reduced the mast cell degranulation (decreasing the level of histamine and symptoms score).

LIS probiotics enhanced the *innate* immune response (TLR2, TLR 4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p105/p60), formed the  $T_{H1}$ -skewed ( $T_{H1} > T_{reg} > T_{H2}$ ), and reduced the mast cell degranulation (decreasing the level of histamine and symptoms score).

The involvement of Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 in the effect of the probiotic LGG and LIS on decreasing of allergic reaction was proved by the interaction effect between those probiotics and inhibitor TLR in reducing allergic reaction.

In conclusion, LGG and LIS probiotics are involving Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 in reducing allergic reaction through enhancement of the  $T_{H1}$  and  $T_{reg}$  immune responses and forming a new  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  equilibrium. LGG and LIS probiotics are

**ABSTRACT** **$T_{H1}$ ,  $T_{reg}$  and  $T_{H2}$  immunoregulation through TLR2 and TLR4 by LGG and *Lactobacillus plantarum* IS-10506 probiotics in reducing allergic reaction.**

Experimental Study in Mice Subjects

The purpose of this study is to clarify the mechanisms and involvement of Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 in reducing allergic reaction by *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS) probiotics.

In the factorial design study, male Balb/c mice subjects were randomized into nine experimental groups and were sensitized with OVA. Probiotics (LGG, LIS and placebo) and TLR inhibitors (PD98059, LY294002 and placebo) are independent variable. The expression of innate immune response (TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp105/p50); the activation of adaptive immune response (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  and IL-10, sera OVA-specific IgG2a, IgA, IgE, ileum OVA-specific IgA and total IgE); and the allergic reaction (histamine and symptoms score) are dependent or effect variable.

After final OVA sensitization, the LGG and LIS groups did not experience the severe and fatal allergic reaction, however most of mice in control group did experience. There were significant modulation of the innate and adaptive immune response in the LGG and LIS groups compared with the control group, except IL-4 and total IgE. In the LGG and LIS groups the level  $T_{H1}$  and  $T_{reg}$  response were enhanced, the new  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  equilibrium was formed, the mast cell degranulation decreased, and interaction between probiotics and TLR inhibitors was significant.

In conclusion, LGG and LIS probiotics are involving Toll-like Receptor (TLR) 2 and 4 in reducing allergic reaction through enhancement of the  $T_{H1}$  and  $T_{reg}$  immune responses and forming a new  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  equilibrium. LGG and LIS probiotics are suggested to be applied in human subject for preventing fatal and chronic allergic reaction.

**Key Words:** Probiotics, Toll-like Receptor 2 and 4, Allergic Reaction.

## DAFTAR ISI

|   | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| Sampul Depan  | i              |
| Sampul Dalam  | ii             |
| Prasyarat Gelar   | iii            |
| Lembar Pengesahan   | iv             |
| Penetapan Panitia Penguji   | v              |
| Ucapan Terimakasih  | vi             |
| Ringkasan   | xi             |
| <i>Summary</i>  | xiv            |
| Abstrak ( <i>Abstract</i> )   | xvii           |
| Daftar Isi  | xviii          |
| Daftar Gambar   | xxi            |
| Daftar Tabel  | xxii           |
| Daftar Lampiran   | xxiii          |
| Daftar Singkatan  | xxiv           |
| <br>  |                |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>  | <b>1</b>       |
| 1.1 Latar Belakang Masalah  | 1              |
| 1.2 Rumusan Masalah   | 2              |
| 1.3 Tujuan Penelitian   | 3              |
| 1.3.1 Tujuan Umum   | 3              |
| 1.3.2 Tujuan Khusus   | 3              |
| 1.4 Manfaat Penelitian  | 3              |
| 1.4.1 Manfaat teoritis  | 3              |
| 1.4.2. Manfaat praktis  | 4              |
| <br>  |                |
| <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>   | <b>5</b>       |
| 2.1 Alergi  | 5              |
| 2.1.1 Alergi dan Reaksi Alergi  | 5              |
| 2.1.2 Immunopatogenesis   | 7              |
| 2.2 Pencegahan Alergi   | 10             |
| 2.2.1 Penghindaran Faktor Resiko  | 11             |
| 2.2.2 Induksi Toleransi Immunologis   | 12             |
| 2.3 Probiotik   | 13             |
| 2.3.1 <i>Lactobacillus</i>  | 15             |
| 2.3.2 <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>                                       | 17             |
| 2.3.3 <i>Lactobacillus plantarum</i>  | 20             |
| 2.3.3 <i>Lactobacillus plantarum IS 10506</i>                                 | 24             |
| 2.4 TLR dan Inhibitor TLR   | 25             |
| 2.4.1 <i>Toll-like receptor 2 (TLR2)</i>                                      | 29             |
| 2.4.2 <i>Toll-like receptor 4 (TLR4)</i>                                      | 31             |
| 2.4.3 Inhibitor TLR   | 35             |
| 2.5 Hubungan antara Probiotik dan TLR dengan Reaksi Alergi                    | 39             |
| 2.5.1 Probiotik dan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B.                        | 44             |
| 2.5.2 Induksi TLR, T <sub>H</sub> 1, Treg dan T <sub>H</sub> 2 oleh probiotik | 46             |



|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 2.5.3   | Probiotik dan reaksi alergi  | 47        |
| 2.6.  | Pemodelan Reaksi Alergi pada Hewan Coba  | 51        |
| 2.6.1   | Mus musculus Balb/c  | 51        |
| 2.6.2   | Induktor Reaksi Alergi   | 52        |
| 2.6.3   | Pengendalian Ekspresi TLR  | 54        |
| <b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> |  | <b>55</b> |
| 3.1   | Kerangka konseptual  | 55        |
| 3.2   | Hipotesis penelitian   | 58        |
| <b>BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN</b>                 |  | <b>59</b> |
| 4.1   | Rancangan Penelitian   | 59        |
| 4.2   | Sampel, besar dan teknik pengambilan sampel  | 61        |
| 4.2.1   | Sampel   | 61        |
| 4.2.2   | Besar sampel   | 61        |
| 4.2.3   | Teknik pengambilan sampel  | 62        |
| 4.3   | Variabel penelitian  | 63        |
| 4.3.1   | Variabel bebas   | 63        |
| 4.3.2   | Variabel kendali   | 63        |
| 4.3.3   | Variabel tergantung.   | 64        |
| 4.3.4   | Definisi operasional variabel  | 65        |
| 4.4   | Bahan penelitian   | 67        |
| 4.4.1   | Hewan coba yang dikenai perlakuan  | 67        |
| 4.4.2   | Bahan perlakuan  | 68        |
| 4.4.3   | Bahan pemeriksaan laboratorium   | 69        |
| 4.5   | Instrumen Penelitian   | 72        |
| 4.6   | Waktu dan lokasi penelitian  | 72        |
| 4.7   | Prosedur penelitian, pengambilan dan pengumpulan data                              | 73        |
| 4.7.1   | Prosedur penelitian  | 73        |
| 4.7.2   | Pengambilan dan pengumpulan data   | 74        |
| 4.8   | Pengolahan dan analisa data  | 75        |
| <b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS</b>                |  | <b>77</b> |
| 5.1   | Profil bakteriologis paska perlakuan   | 78        |
| 5.2   | Gejala klinik setelah sensitisasi ke 3 ovalbumin                                   | 80        |
| 5.2   | Hasil deteksi TLR2 dan 4, NF- $\kappa$ B dan sitokin dengan metode imunohistokimia | 85        |
| 5.3   | Gambaran respon imun dan reaksi alergi paska perlakuan                             | 80        |
| 5.4   | Aktivasi respon imun <i>innate</i> dan adaptif oleh probiotik LGG                  | 88        |
| 5.5   | Respon imun <i>innate</i> , keseimbangan respon imun adaptif dan reaksi alergi     | 88        |
| 5.6   | Alur hubungan respon imun <i>innate</i> , respon imun adaptif dan reaksi alergi    | 90        |
| 5.7   | Peran TLR 2 dan 4 dalam penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS         | 92        |

|   |     |
|---|-----|
| <b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>   | 96  |
| 6.1 Pemecahan masalah penelitian  | 97  |
| 6.1.1 Konfirmasi peran TLR2 dan TLR4 pada penurunan reaksi alergi                 | 97  |
| 6.1.2 Peran TLR dalam komunikasi alur-lintas, interaksi dan aktivasi respon imun  | 99  |
| 6.1.3 Mekanisme penciptaan homeostasis oleh LGG dan LIS bersama <i>host</i>       | 103 |
| 6.1.4 Toleransi imunologis sebagai hasil interaksi LGG dan LIS dengan <i>host</i> | 106 |
| 6.2 Konsistensi dengan hasil penelitian lain yang serupa                          | 107 |
| 6.2.1 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada TLR dan NF- $\kappa$ B     | 107 |
| 6.2.2 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada respon imun adaptif        | 109 |
| 6.2.3 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada IgA                        | 111 |
| 6.2.4 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada reaksi alergi              | 112 |
| 6.3 Penemuan baru   | 113 |
| 6.4 Implikasi hasil   | 115 |
| 6.4.1 Pemanfaatan hasil penelitian  | 115 |
| 6.4.2 Kewaspadaan terhadap efek samping   | 116 |
| 6.4.3 Tindak lanjut terhadap temuan   | 116 |
| <b>BAB 7 PENUTUP</b>  | 118 |
| 7.1 Kesimpulan  | 118 |
| 7.2 Saran   | 119 |
| <b>Daftar Pustaka</b>   | 120 |

## DAFTAR GAMBAR

|             | Halaman   |
|-------------|---|
| Gambar 2.1  | Mekanisme alergi. 8   |
| Gambar 2.2  | Proliferasi sel B dan produksi IgE. 9   |
| Gambar 2.3  | Ekspresi kelompok fungsional dari gen <i>L. plantarum</i> pada mencit 24  |
| Gambar 2.4  | Toll-like receptor (TLR) sebagai salah satu komponen dari jaringan yang berperan dalam surveilans patogen 27  |
| Gambar 2.5  | Ligan-ligan dan pohon filogenetik dari TLR manusia serta tikus 28   |
| Gambar 2.6  | Struktur, ligan-ligan dan jalur sinyal TLR 33   |
| Gambar 2.7  | Hubungan antara probiotik dengan TLR dan stimulasi respons imun. 40   |
| Gambar 4.1. | Bagan Pengelompokan Subyek Penelitian. 60   |
| Gambar 4.2. | Bagan Prosedur Penelitian. 73   |
| Gambar 5.1  | Profil bakteriologis pasca perlakuan 79   |
| Gambar 5.2  | Reaksi alergi yang timbul pada mencit Balb/c yang telah diinduksi oleh ovalbumin menurut masing-masing perlakuan 80   |
| Gambar 5.3  | Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse TLR2 dan TLR4 81   |
| Gambar 5.4  | Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse NF- $\kappa$ Bp65 dan NF- $\kappa$ Bp105/p50 81                            |
| Gambar 5.5  | Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse IFN- $\gamma$ dan IL2 82   |
| Gambar 5.6  | Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse TGF- $\beta$ dan IL-10 82  |
| Gambar 5.7  | Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse IL-4 dan IL-5 83   |
| Gambar 5.8  | Respon imun <i>innate</i> , keseimbangan respon imun adaptif $T_H1$ , $T_H2$ , dan $T_H17$ , serta reaksi alergi dalam rerata nilai <i>ranking</i> pada kelompok LGG, LIS dan kontrol. 89 |
| Gambar 5.9  | Alur hubungan antara respons imun <i>innate</i> , <i>adaptive</i> dan reaksi alergi 91  |
| Gambar 5.10 | Pengaruh inhibitor TLR2 PD98059 pada aktivitas probiotik LGG, LIS dan kontrol 92  |
| Gambar 5.11 | Pengaruh inhibitor TLR4 LY294002 pada aktivitas probiotik LGG, LIS dan kontrol. 93  |

## DAFTAR TABEL

|  | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 2.1 Ringkasan Analisa Literatur tentang Efek <i>Lactobacillus</i> bagi Kesehatan Manusia (Floch <i>et al</i> , 2005)   | 16      |
| Tabel 2.2 Jenis-jenis inhibitor TLR dan mekanisme kerjanya   | 36      |
| Tabel 2.3 Penelitian-penelitian terbaru pada manusia tentang efek probiotik pada penurunan reaksi alergi.  | 41      |
| Tabel 2.4 Penelitian-penelitian terbaru pada hewan coba tentang mekanisme probiotik dalam penurunan reaksi alergi.   | 41      |
| Tabel 2.5 Kaitan teori imunologi dan fakta empirik tentang mekanisme probiotik dalam penurunan reaksi alergi.  | 43      |
| Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Penelitian dalam Umur dan Berat Badan menurut Kelompok Perlakuan  | 82      |
| Tabel 5.2 Respons Imun <i>Innate</i> , Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LIG, LIS dan Kontrol)   | 84      |
| Tabel 5.3 Respons Imun <i>Innate</i> , Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LIG dan Kontrol Tanpa Inhibitor TLR)  | 85      |
| Tabel 5.4 Respons Imun <i>Innate</i> , Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LIS dan Kontrol Tanpa Inhibitor TLR)  | 86      |
| Tabel 5.5 Respons Imun <i>Innate</i> , Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi pada Kontrol menurut Kelompok Perlakuan (dengan Inhibitor TLR PD98059, Inhibitor TLR LY294002 dan tanpa Inhibitor TLR) | 87      |
| Tabel 5.6 Interaksi TLR 2 dan 4 dengan probiotik (LIG dan LIS) dalam penurunan reaksi alergi   | 95      |

## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Sertifikat Kelaikan Etik
- Lampiran 2 Prosedur Kerja Pemberian Ovalbumin, Probiotik, inhibitor TLR dan pengamatan gejala
- Lampiran 3 Prosedur Kerja Pemeriksaan TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp 105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4 dan IL-5 dengan Metode Immunohistokimia
- Lampiran 4 Prosedur Kerja Pemeriksaan IgG2a spesifik OVA serum, IgA spesifik OVA serum, IgA spesifik OVA ileum, IgE total dan IgE spesifik OVA dan histamin dengan Metode ELISA
- Lampiran 5 Prosedur Kerja dan Hasil Pemeriksaan Bakteriologis MPN (*Coliform* dan *E.coli*) dan TPC (Bakteri Asam Laktat)
- Lampiran 6 Data Lengkap Sampel Penelitian
- Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik

**DAFTAR SINGKATAN**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>ANOVA</b>                   | <b>Analysis of variance</b>   |
| <b>AlOH</b>                    | <b>Aluminium Hidroksida</b>   |
| <b>AP-1</b>                    | <b>Activation Protein-1</b>   |
| <b>APC</b>                     | <b>Antigen Presenting Cell</b>  |
| <b>Balitvet</b>                | <b>Balai Penelitian Veteriner</b>   |
| <b>cAMP</b>                    | <b>cyclic Adenosin Monophosphate</b>  |
| <b>CCL2</b>                    | <b>CC-chemokine ligand 2</b>  |
| <b>CD</b>                      | <b>Cluster Differentiation</b>  |
| <b>CD40</b>                    | <b>Cluster Differentiation (CD) 40 Ligand</b>                                   |
| <b>CFU</b>                     | <b>Colony Forming Unit</b>  |
| <b>cGMP</b>                    | <b>cyclic Guanosine Monophosphate</b>   |
| <b>CRP</b>                     | <b>C-reactive protein</b>   |
| <b>DCs</b>                     | <b>Dendritic Cells</b>  |
| <b>DG</b>                      | <b>Diacylglycerol</b>   |
| <b>DMSO</b>                    | <b>Dimethylsulphonate</b>   |
| <b>DNA</b>                     | <b>Deoxyribonucleic acid</b>  |
| <b>ELISA</b>                   | <b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</b>  |
| <b>ERK</b>                     | <b>Extracellular Regulated Kinase</b>   |
| <b>GM-CSF</b>                  | <b>Granulocyte colony-stimulating factor</b>                                    |
| <b>Gramik</b>                  | <b>Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran</b>                                       |
| <b>GTP</b>                     | <b>Guanosine Triphosphate</b>   |
| <b>h</b>                       | <b>Human</b>  |
| <b>HLA</b>                     | <b>Human leukocyte antigens</b>   |
| <b>HSTF</b>                    | <b>Heat shock protein responsible element recognizing transcription factors</b> |
| <b>ICSBP</b>                   | <b>Interanational consensus sequence-binding protein</b>                        |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>Interferon Gamma</b>   |
| <b>Ig</b>                      | <b>Immunoglobuline</b>  |
| <b>IKKs</b>                    | <b>NF-<math>\kappa</math>B inhibitor kinases</b>                                |

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>IL</b>       | <b>Interleukin</b>  |
| <b>IRAK</b>     | <b>IL-1R associated kinase</b>                                  |
| <b>IRF3</b>     | <b>Interferon Gamma (IFN) regulatory factor 3</b>               |
| <b>JNK</b>      | <b>c-Jun N-terminal kinase</b>                                  |
| <b>ISSAC</b>    | <b>International Study of Asthma and Allergies in Childhood</b> |
| <b>LGG</b>      | <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>                               |
| <b>LIS</b>      | <i>Lactobacillus plantarum IS10506</i>                          |
| <b>LN</b>       | <b>Lymph nodes</b>  |
| <b>LP</b>       | <b>Lipopeptide</b>  |
| <b>LPS</b>      | <b>Lipopolysaccharide</b>                                       |
| <b>UTA</b>      | <b>Lipoteichoic Acid</b>  |
| <b>LY294002</b> | <b>2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran -4-one</b>        |
| <b>m</b>        | <b>murine</b>   |
| <b>Mal</b>      | <b>MyD88 adapter-like</b>                                       |
| <b>MAMP</b>     | <b>microorganism-associated molecular patterns</b>              |
| <b>MAP</b>      | <b>Mitogenic Activated Protein</b>                              |
| <b>MAPK</b>     | <b>Mitogenic Activated Protein kinase</b>                       |
| <b>MAPKK</b>    | <b>Mitogenic Activated Protein Kinase kinase</b>                |
| <b>MAPKKK</b>   | <b>MAPKK kinase</b>   |
| <b>M-CSF</b>    | <b>macrophage colony stimulating factor</b>                     |
| <b>MD-2</b>     | <b>myeloid differentiation</b>                                  |
| <b>MEK</b>      | <b>MAP/ERK kinase</b>   |
| <b>MEKKs</b>    | <b>MAP/ERK kinase kinase</b>                                    |
| <b>MHC</b>      | <b>Major histocompatibility complex</b>                         |
| <b>MPL</b>      | <b>Monophosphoryl lipid A</b>                                   |
| <b>MPN</b>      | <b>Most Probable Number/MPN</b>                                 |
| <b>mRNA</b>     | <b>messenger ribonucleic acid</b>                               |
| <b>MyD88</b>    | <b>Myeloid Differentiation 88</b>                               |
| <b>NFκB</b>     | <b>Nuclear Factor kappa Beta</b>                                |
| <b>NIK</b>      | <b>NF-κB-inducing kinase</b>                                    |
| <b>NOI</b>      | <b>nucleotide binding oligomerization domain</b>                |

|                  |   |
|------------------|---|
| ODN              | oligodeoxy- nucleotida  |
| PAK              | p21-activated kinase  |
| Pam3CSK4         | N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-Cys-[S]-Ser1-[S]-Lys(4) trihydrochloride |
| PAMP             | pathogen-associated molecular patterns  |
| PBMC             | peripheral blood mononuclear cells  |
| PBS              | Phosphate Buffered Saline   |
| PD98059          | 2-(29-amino-39-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-one   |
| PGN              | Peptidoglycan   |
| PI3K             | phosphatidylinositol 3-kinase   |
| PRR              | pattern recognition receptors   |
| PIIns            | phosphatidyl inositol   |
| PIIns(3)P        | phosphatidyl inositol (3) phosphates  |
| RCCN             | Regional Center for Community Nutrition   |
| R&D              | Research and Development  |
| RCT              | randomised controlled clinical trial  |
| R-IVET           | Resolvase-based in vivo expression technology   |
| SEAMEO           | Southeast Asian Ministers of Education Organization   |
| SCORAD           | Score of atopic dermatitis  |
| SD               | Standart Deviation  |
| STAT4            | Signal transducer and activator of transcription  |
| TCR              | T-cell Receptor   |
| TGF- $\beta$     | Transforming Growth Factor Beta   |
| T <sub>H</sub>   | Sel limfosit T helper   |
| TLR              | Toll/IL-1R-like   |
| TLR              | Toll-like Receptor  |
| TNF- $\alpha$    | Toumor necrosis factor- $\alpha$  |
| TPC              | Total Plate Count   |
| TRAF6            | TNF receptor associated factor  |
| T <sub>reg</sub> | Sel limfosit T regulator  |
| TROPMED          | Tropical Medicine   |



**Bab I****PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang Masalah**

Reaksi alergi dapat menyebabkan penyakit kronis dan reaksi anafilaksis yang menimbulkan kematian. Prevalensi alergi telah mencapai lebih dari 20 % populasi manusia atau 5-15 % populasi anak di dunia dan 3,3 % anak di Asia Tenggara. Prevalensi asma alergi pada anak usia sekolah di Indonesia terus meningkat dari 2,1 % pada tahun 1995 menjadi 5,2 % pada tahun 2003 (Sundaru, 2005; WHO, 2002; ISSAC, 1998). Program eliminasi alergen sulit dilaksanakan, sehingga induksi aktif toleransi imunologis menjadi pilihan (Wahn *et al.*, 2004; Hoh dan Jones, 2000). Telah terbukti bahwa probiotik *Lactobacillus* dapat menginduksi respons imun pada micek dan manusia (Flech dan Montrose, 2005). *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) pada berbagai penelitian terbukti menurunkan reaksi alergi (Furrie, 2005). Sementara itu *Lactobacillus* strain asli Indonesia – *L. plantarum* IS-10506 (LIS) – telah diketahui memiliki sifat probiotik sebaik LGG (Collado *et al.*, 2007). Namun sejauh ini penurunan reaksi alergi karena pemberian probiotik LGG dan LIS belum jelas.

Upaya penanggulangan alergi sampai saat ini belum memperoleh hasil yang memuaskan. Bila mekanisme penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS tidak segera mendapat penjelasan, maka manfaat dan komplikasi yang timbul tetap tidak diketahui dan terus diragukan efektivitasnya dalam pencegahan alergi. Di lain pihak, upaya kuratif berisiko menimbulkan ketergantungan pada obat pereda gejala bagi penderita yang sulit menghindarkan diri dari bahan alergenik (Boyle *et al.*, 2006).

Reaksi alergi terjadi karena dominasi  $T_H2$  pada respons imun adaptif yang memicu degranulasi sel mast dan pelepasan histamin akibat sensitisasi alergen (Finkelman, 2006). Respons imun adaptif  $T_H1$ ,  $T_H2$  dan  $T_{reg}$  dapat dimodulasi oleh ligan agonis TLR2 dan TLR4 dengan pembentukan kaskade sinyal TLR2 dan TLR4 pada sistem imun *innate* yang mengaktifasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B (Kaisho dan Akira, 2006). Probiotik *Lactobacillus*, baik LGG maupun LIS, mengandung komponen *peptidoglycan* dan *teichoic acid* yang diketahui merupakan ligan agonis TLR2 dan TLR4 (Sansonetti, 2006; Saito, 2004).

Berdasarkan fakta di atas, maka ada peluang untuk menjelaskan mekanisme penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS melalui peran TLR2 dan TLR4 dalam proses pemulihan imunitas adaptif yang didominasi  $T_H2$  menuju ke imunitas adaptif yang homeostasis. Mekanisme tersebut dijelaskan melalui eksperimen yang didisain untuk mengetahui hubungan antara aktivasi imunitas *innate* (TLR2 dan TLR4) dan faktor yang menjembatani imunitas *innate*-adaptif (NF- $\kappa$ B p65 dan p105/p50) dengan keseimbangan imunitas adaptif  $T_H1$ - $T_{reg}$ - $T_H2$ , aktivitas *Class Switch Recombination* (sintesis IgG<sub>2a</sub>, IgA, dan IgE) dan reaksi alergi (kadar histamin dan skor gejala). Sehubungan dengan prosedur perlakuan dan pemeriksaan akhir yang berakibat fatal, maka eksperimen ini tidak menggunakan subyek manusia tetapi menggunakan subyek mencit.

## 1.2 Rumusan masalah

Apakah pemberian probiotik LGG dan LIS pada mencit Balb/c menurunkan reaksi alergi melalui peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4, serta NF- $\kappa$ B p65 dan p105/p50 pada

sistem imun *innate* yang berhubungan dengan peningkatan respons imun adaptif  $T_{H1}$  dan  $T_{reg}$ , serta penurunan respons imun adaptif  $T_{H2}$ .

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan pengaruh probiotik LGG dan LIS pada penurunan reaksi alergi.

#### 2.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pemberian probiotik LGG dan LIS pada mencit Balb/c menurunkan reaksi alergi melalui peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4, serta NF $\kappa$ B p65 dan p105/p50 pada sistem imun *innate* yang berhubungan dengan peningkatan respons imun adaptif  $T_{H1}$  dan  $T_{reg}$ , serta penurunan respons imun adaptif  $T_{H2}$ .
2. Membuktikan keterlibatan TLR2 dan TLR4 dalam mekanisme penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS pada mencit Balb/c melalui modulasi respons imun *innate* dan adaptif yang berhubungan dengan pembentukan keseimbangan  $T_{H1}$ - $T_{reg}$ / $T_{H2}$  baru dari keseimbangan yang didominasi oleh  $T_{H2}$ .

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat teoritis

Diperoleh informasi mengenai reaksi alergi yang membaik karena probiotik LGG dan LIS yang berkaitan dengan ekspresi TLR2 dan TLR4. Temuan mengenai hubungan antara pemberian probiotik LGG dan LIS, ekspresi TLR2 dan TLR 4 serta respons imun

## Bab 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alergi

Alergi timbul pada orang yang herbakat alergi. Bakat ini biasanya diwariskan dari kedua orangtua. Apabila kedua orangtua menderita alergi kemungkinan anak menunjukkan gejala alergi sekitar 50%, namun apabila hanya salah satu diantaranya yang menderita alergi kemungkinannya hanya 25%. Hubungan alergi dengan faktor genetik ditunjukkan pada lokasi gen yang mengatur produksi atau fungsi mediator, reseptor dan antibodi, misal : (1). 5q31.1q33.1 yang mengandung gen IL-4 (Marsh,1994; Noguchi *et al.*, 1997); (2). 6p21.3 yang mengandung gen dari HLA dan TNF- $\alpha$ ; (3). 12q15-q24.1 yang mengandung gen IFN- $\gamma$  (Barnes, *et al.*, 1996); (4). 14q11.1 yang mengandung gen TCR  $\gamma\delta$  (Noguchi *et al.*, 1997; (5) 14q11.2 yang mengandung gen dari reaktivitas uji kulit. (Mansur *et al.*, 1999); (6) 14q13-23 yang mengandung gen dari serum Ig E total (Mansur *et al.*, 1999) serta; (7). 16p12 yang mengandung gen dari reseptor IL-4 (Deichmann, 1999).

Dampak buruk alergi adalah penurunan kualitas hidup, biaya pengobatan yang tinggi dan komorbiditas seperti asma, sinusitis dan otitis media. (Mc Menamin,1994). Pada anak, pengaruh alergi bahkan sampai pada penurunan kualitas hidup orangtua dan kemampuan belajar anak yang terganggu (Vuurman, 1993).

##### 2.1.1 Alergen dan Reaksi Alergi

Alergen adalah istilah untuk protein atau senyawa yang mampu menimbulkan sensitisasi alergi pada paparan pertama dan reaksi alergi pada paparan selanjutnya.

Alergen yang masuk ke dalam tubuh akan dikenali oleh sistem kekebalan tubuh. Khusus pada individu yang mempunyai predisposisi genetik alergi, sistem kekebalan tubuh cenderung membentuk antibodi IgE yang sensitif terhadap alergen (Prussin dan Metcalfe, 2006).

Berdasarkan cara masuk melalui tubuh, kita mengenal 3 jenis alergen yaitu alergen inhalan, alergen ingesti dan alergen injeksi. Alergen inhalan masuk tubuh melalui mukosa saluran nafas, misal tungau, jamur (terutama sporanya), komponen kulit /saliva/ feses dari binatang, bulu burung dan bagian dari serangga. Alergen ingesti masuk tubuh melalui mukosa saluran cerna seperti makanan dan obat-obatan. Alergen injeksi masuk tubuh melalui kulit dan pembuluh darah misal obat suntik dan toksin serangga (Roeecken *et al.*, 2003).

Reaksi alergi terjadi karena ada interaksi antara alergen, IgE spesifik dan reseptor IgE pada sel mast yang memicu degranulasi sel mast dan pelepasan berbagai mediator. Mediator terpenting yang dilepas adalah histamin. Paparan alergen berikutnya menyebabkan aktivasi lebih lanjut sel  $T_H2$  oleh mediator yang dilepas eosinofil dan basofil (Oettgen dan Ceha, 2003).

Apabila histamin ditangkap oleh reseptor histamin yang berada pada sel target akan timbul gejala klinik. Jenis gejala yang timbul tergantung pada jenis reseptor histamin yang dimiliki oleh sel target pada organ sasaran. Sel target memiliki reseptor histamin H1, H2 dan H3. Interaksi histamin dengan reseptor H1 menimbulkan bronkokonstriksi pada saluran nafas dan peningkatan peristaltik pada usus. Interaksi histamin dengan reseptor H2 menimbulkan rasa gatal dan nyeri pada kulit. Sedangkan interaksi histamin dengan reseptor H3 pada sel dendrit dari susunan saraf pusat akan memicu pelepasan

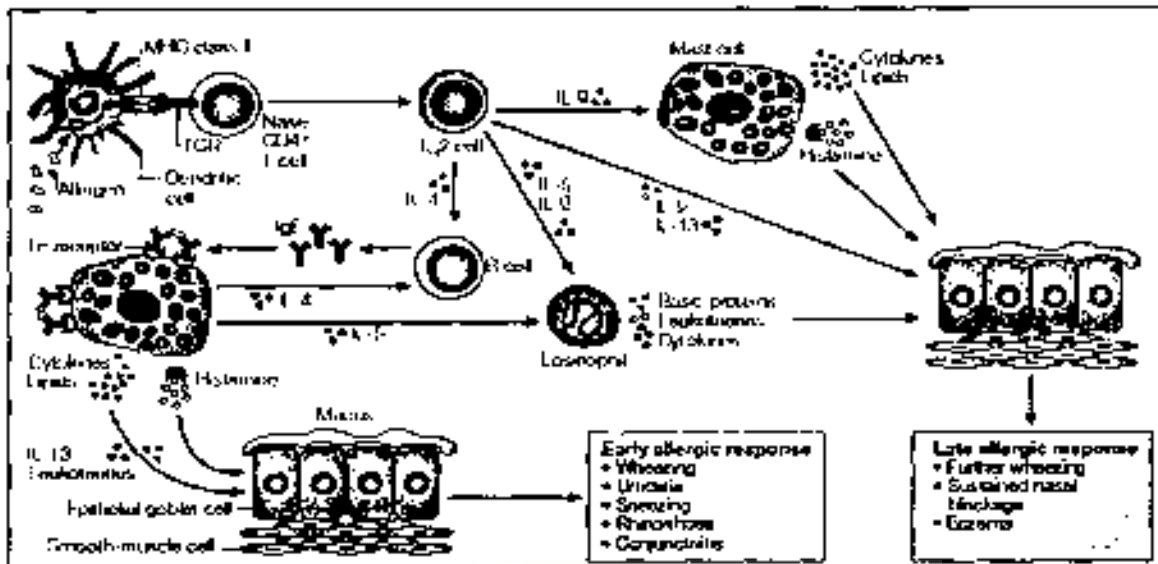
neurotransmitter seperti histamin, norepineprin, asetilkolin, peptida dan 5-hidroksitriptamin (Finkelman, 2006; Prussin dan Metcalfe, 2006; Roecken *et al.*, 2003)

### 2.1.2 Immunopatogenesis

Alergen yang masuk tubuh diproses oleh *APC* yang akan mempresentasikan alergen tersebut sebagai peptida imunogenik melalui molekul *MHC*-nya pada sel imunokompeten lain yaitu limfosit T. Peptida alergen dipresentasikan molekul *MHC-II APC* ke limfosit  $T_H0$ . Limfosit  $T_H0$  kemudian berdiferensiasi menjadi limfosit T efektor dan memori. (Prussin dan Metcalfe, 2006; Plauts-Mills *et al.*, 2001).

Limfosit  $T_H$  yang baru diaktifkan alergen akan berfenotip  $T_H2$ . Produksi sitokin  $T_H2$  terutama IL-4 mensupresi perkembangan  $T_H1$  dan produksi sitokin  $T_H1$  terutama TNF- $\alpha$  mensupresi perkembangan  $T_H2$  (Oettgen dan Geha, 2003; Hawrylowicz dan O'Garra, 2005).

Paparan alergen menimbulkan penarikan sel inflamasi, aktivasi dan pelepasan mediator yang menimbulkan respons akut awal dan respons alergi lambat. Pada respons akut awal, beberapa menit setelah kontak dengan alergen, sel mast yang tersensitisasi IgE mengalami degranulasi dan melepas berbagai mediator pada individu sensitif. Mediator tersebut meliputi histamin, leukotrien dan sitokin yang dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler, kontraksi otot polos dan produksi mukus. Kemokin yang dilepas sel mast dan sel lain menarik sel inflamasi yang menyebabkan respons alergi lambat, yang ditandai oleh influks eosinofil dan sel limfosit  $T_H2$ . (Hawrylowicz dan O'Garra, 2005). Mekanisme alergi secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 2.1.

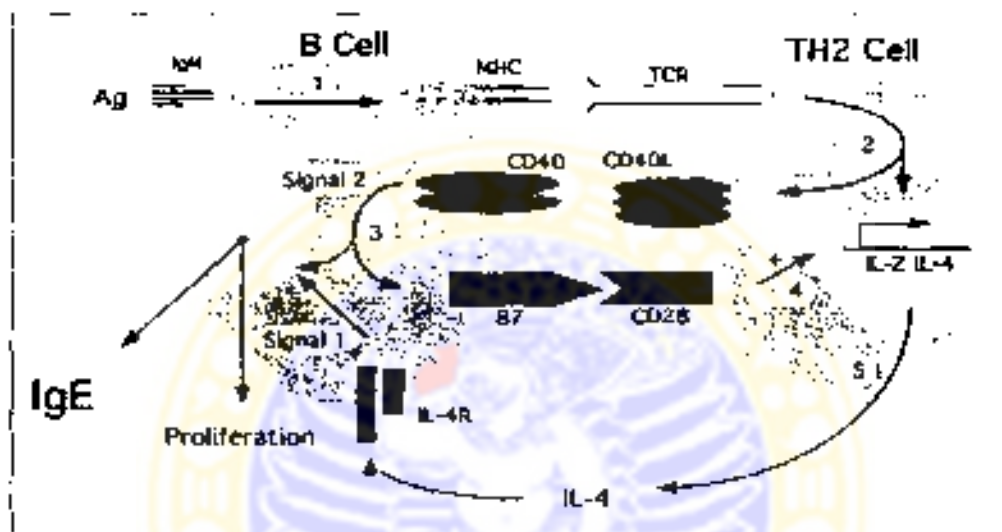


Dikutip dari: Hawrylowicz dan O'Garra, 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 5; 271-83

**Gambar 2.1** Mekanisme alergi. Paparan pertama alergen menimbulkan diferensiasi limfosit  $T_H0$  menjadi  $T_H2$  dan sintesis IgE yang dikenal sebagai sensitisasi alergi. Paparan alergen selanjutnya akan timbul penarikan sel-sel inflamasi dan aktivasi serta pelepasan mediator, yang dapat menimbulkan respons akut awal dan respons alergi lambat. Pada respons akut awal, beberapa menit setelah kontak dengan alergen sel mast yang tersensitisasi IgE mengalami degranulasi dan melepas berbagai mediator pada individu sensitif. Mediator-mediator tersebut meliputi histamin, leukotrien dan sitokin yang meningkatkan permeabilitas vaskuler, kontraksi otot polos dan produksi mukus. Kemokin yang dilepas sel mast dan sel-sel lain merekrut sel-sel inflamasi yang menyebabkan respons alergi lambat, yang ditandai dengan influks eosinofil dan sel-sel limfosit  $T_H2$ .

Produksi IgE diatur secara ketat dan kompleks melibatkan sinyal seluler dan molekuler. Selama berinteraksi dengan limfosit  $T_H0$ , sel dendritik berperan sebagai pelapor dari lingkungan mikro asalnya. Apabila lingkungan mikro asalnya terpajan alergen, maka yang terjadi adalah induksi polarisasi menuju respons  $T_H2$ . IgM memfasilitasi *uptake* alergen oleh limfosit T spesifik yang diikuti oleh pemrosesan dan presentasi alergen oleh molekul *MHC* kelas II (Gambar 2.2). Pengenalan kompleks tersebut oleh *TCR*  $T_H2$  akan menginduksi ekspresi molekul CD40L. CD40 L beragregasi dengan CD40 menghasilkan ekspresi molekul B7(CD80). Interaksi antara molekul B7

dengan CD28 pada permukaan limfosit T menghasilkan sinyal ko-stimulasi yang meningkatkan IL-4 dan proliferasi limfosit T. TCR dan CD28 berikatan dengan reseptor IL-4 (IL-4R) di limfosit B. Konjugasi antara TCR, CD28, reseptor IL-4 (IL-4R) dan molekul CD40-CD40L, menyetuskan *Class Switch Recombination* menuju sintesis IgE, proliferasi Limfosit B dan ekspansi produk klon IgE (Chinen *et al.*, 2006; Hawrylowicz dan O'Garra, 2005; Oettgen dan Geha, 2003).



Dikutip dari: Oettgen dan Geha 1999, IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J.Clin. Invest.* 104: 829-35

**Gambar 2.2 Proliferasi sel B dan produksi IgE.** IgM memfasilitasi *uptake* alergen yang diikuti oleh pemrosesan dan presentasi oleh molekul *MHC* kelas II. Pengenalan kompleks tersebut oleh *TCR* dari sel  $T_H2$  menginduksi ekspresi CD40L. CD40L beragregasi dengan CD40 dan terbentuklah B7(CD80). Interaksi B7 dengan CD28 menghasilkan sinyal ko-stimulasi yang menginduksi sintesis IL-4 dan proliferasi Limfosit T. IL-4 yang diproduksi sebagai respons sinergisme antara *TCR* dan CD28 berikatan dengan reseptor IL-4 (IL-4R) di Limfosit B, yang mana dalam konjugasi dengan molekul CD40-CD40L akan menyetuskan *switch* ke isotip IgE, proliferasi Limfosit B dan ekspansi produk klonal dari IgE.

Populasi limfosit  $T_H2$  dikenal dari sitokin yang diproduksi, misal IL-4 dan IL-5. Sitokin  $T_H2$  menstimulasi produksi sel mast, basofil dan eosinofil. Apabila limfosit B terpajan oleh IL-4, maka sel tersebut akan memproduksi IgE. Apabila limfosit B juga



terpapar oleh IL-5, maka akan terjadi peradangan eosinofilik. Beberapa limfosit T yang diaktifkan alergen bermigrasi ke sumsum tulang dan menstimulasi sumsum tulang untuk memproduksi basofil, sel mast dan eosinofil. Sel baru tersebut setelah memasuki sistem sirkulasi dapat secara selektif kembali ke asal dan menimbulkan eksaserbasi peradangan (Oettgen dan Geha, 2003; Borish, 2003; Platts-Mills, 2001).

## 2.2 Pencegahan Alergi

Penderita alergi yang cukup berat tidak dapat hidup dengan aman dan nyaman, karena harus menjalani penghindaran alergen yang cukup menyulitkan. Penyebab ketidaknyamanan ini karena penatalaksanaan alergi masih dititikberatkan pada konsep penghindaran faktor risiko. Program pencegahan masih menghadapi banyak kendala dari berbagai faktor, misal:

1. Alergen sudah mempengaruhi sistem imun sejak masa fetus. Pencegahan primer di masa ini masih sulit dilaksanakan dan kontroversial karena menyangkut rekayasa in-utero (Holt, 2000). Selain itu kehamilan sendiri merupakan "allergic phenomenon" (sistem imun dengan dominasi Th2) yang bertujuan menghindari penolakan fetus oleh sistem imun ibu (Warner, 2004)
2. Eliminasi alergen pada ibu hamil mempunyai efek yang tidak konsisten pada manifestasi alergi anak di masa depan (Gore dan Custovic, 2004).
3. Program pencegahan berupa imunoterapi yang diketahui dapat memperbaiki *natural course of disease* alergi secara keseluruhan masih menghadapi kendala pada "acceptability" pasien dan hanya efektif pada aeroalergen (Frew, 2003)

Laktat tidak bisa membusukkan makanan. Beberapa efek untuk peningkatan kesehatan sering dilaporkan pada manusia (Perdigón *et al.*, 2000; Perdigón *et al.*, 2001).

Definisi probiotik dalam perkembangannya diperluas menjadi mikrobiota hidup atau mikrobiota campuran yang memiliki efek menguntungkan pada saluran cerna dan saluran nafas *host* melalui kemampuannya memperbaiki keseimbangan mikrobiota usus. Salminen *et al.* (1999) mendefinisikan probiotik lebih luas lagi, yaitu mikrobiota yang bekerja mempertahankan kesehatan *host*. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan menempel pada jaringan epitel *host*, kolonisasi, bertahan dari asam dan mampu mentoleransi empedu, melakukan inhibisi, kompetisi maupun eliminasi patogen, mengurangi penempelan patogen, memproduksi asam, hidrogen peroksida, dan lebih baik lagi apabila menghasilkan senyawa antagonis bakteriosin untuk pertumbuhan patogen, aman, tak bersifat patogenik, tidak karsinogenik, serta memperbaiki keseimbangan mikrobiota usus (Ouwchand *et al.*, 2002).

Mekanisme kompetisi dan antagonisme diantara bakteri saluran cerna juga mampu mempertahankan keseimbangan ekologis dengan mencegah pertumbuhan berlebihan dari masing-masing spesies penghuninya. Kompetisi dari reseptor penempelan, kompetisi makanan, dan produksi senyawa inhibitor (antagonis) juga merupakan mekanisme yang menghalangi berlebihnya kolonisasi dan pertumbuhan bakteri. Senyawa inhibitor (antagonis) tersebut antara lain adalah: asam lemak organik, hidrogen peroksida, asam laktat, antibiotik, enzim-enzim, dan bakteriosin. Produksi asam laktat menghasilkan pH rendah dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Brooks *et al.*, 2004).

Di negara-negara Barat telah begitu banyak probiotik komersial, diantaranya *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Lactobacillus rhamnosus*

GG. Untuk lingkungan Asia, jenis strain *Lactobacillus* yang sudah lama dikenal adalah *Lactobacillus casei* Shirota. *Lactobacillus plantarum* IS adalah jenis strain *Lactobacillus* asli Indonesia yang berasal dari dadih susu fermentasi tradisional di Sumatera Barat. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 telah terbukti dapat menempel dengan baik pada mukosa saluran cerna, memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bahkan mampu membuat bakteri patogen terlepas dari penempelannya pada mukosa saluran cerna (Colfado *et al.*, 2007).

### 2.3.1 *Lactobacillus*

*Lactobacillus* adalah probiotik yang sering dimanfaatkan dalam terapi alergi karena *Lactobacillus* telah terbukti mempunyai kemampuan yang kuat dalam memodulasi respons imun. *Lactobacillus* merupakan salah satu strain dari Bakteri Asam Laktat. *Lactobacillus* terdiri dari lebih 50 spesies yang berbeda dan merupakan bagian terbesar dari Bakteri Asam Laktat (Flech dan Montrose, 2005).

*Lactobacillus* banyak digunakan sebagai pembiakan permulaan (*starter cultures*), karena perannya dalam konservasi, rasa, dan susunan dari makanan fermentasi. Selain mempunyai fungsi utama untuk konversi (fermentasi) bahan kasar gula menjadi asam laktat. *Lactobacillus* juga ada yang menghasilkan peptida anti mikrobiala, eksopolisakarida dan berbagai metabolit penting lainnya (Ross *et al.*, 2002).

Spesies *Lactobacillus* dapat ditemukan, baik pada saluran cerna manusia maupun binatang dengan jumlah yang berbeda, berdasarkan spesies, umur dan lokasi pada *host* (de Vries *et al.*, 2006). *Lactobacillus* telah diteliti selama puluhan tahun dan tidak semua strain yang ada mampu menempel dengan baik pada mukosa manusia dan berpengaruh

Spesies *Lactobacillus* yang telah secara luas dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari adalah *Lactobacillus rhamnosus GG* yang telah dipatenkan di banyak negara dengan nama LGG. Pemasaran LGG telah dilakukan paling sedikit di 40 negara dalam bentuk produk susu, jus, produk keju dan kapsul (Floch dan Montrose, 2005). Spesies *Lactobacillus* strain asli Indonesia yang saat ini dalam penelitian adalah *Lactobacillus plantarum IS*. *Lactobacillus plantarum* berasal dari dadih asal Sumatera Barat. Sifat probiotik secara *in vitro* dan *in vivo* dari *Lactobacillus plantarum IS* telah terbukti (Collado *et al.*, 2007), namun pemanfaatannya pada manusia sehat dan sakit masih memerlukan penelitian lanjutan, antara lain dengan penelitian disertasi ini.

### 2.3.2 *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG)

*Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) merupakan salah satu spesies dari beberapa *Lactobacillus* yang mampu menempel dengan baik pada mukosa usus manusia serta menimbulkan efek yang menguntungkan bagi kesehatan. LGG banyak terlibat dalam kegiatan fermentasi makanan tradisional dan industri disamping *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* dan *Lactobacillus acidophilus* (Doron *et al.*, 2005). LGG merupakan Bakteri Asam Laktat berbentuk batang kayu, bersifat gram positif dan membentuk koloni dengan warna putih krem. LGG mampu memfermentasi *xylose*, *trichalosa*, *sorbitol*, *salisilin*, *ribosa*, *rhamnose*, *melezitose*, *mannosa*, *manitol*, *glukosa*, *fruktosa* dan *selobiosa*. LGG tidak melakukan fermentasi terhadap *amygdalin*, *arabinosa*, *erythriol*, *glukogen*, *inositol*, *raffinosa*, dan *sukrosa*. Pola hasil elektroforesis dari protein terlarut LGG sama dengan *L. casei subspecies rhamnosus*. LGG mampu memproduksi senyawa inhibitor yang mampu melawan berbagai macam spesies bakteri lain, termasuk

bakteri anacrob (*Clostridium*, *Bacteroides* dan *Bifidobacterium*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* dan *Salmonela* (Doron *et al.*, 2005).

Kemampuan LGG tetap hidup setelah melewati saluran cerna adalah karena kemampuan bertahan terhadap pH rendah (2,5-4,0), aktivitas lambung dan garam cempedu. LGG mampu bertahan dalam kondisi sangat asam hanya terjadi apabila tersedia glukosa dan didukung oleh proses metabolisme yang efisien. Glukosa menentukan perubahan ATP menjadi  $F_0F_1$ -ATPase melalui glikolisis.  $F_0F_1$ -ATPase adalah enzim kunci yang menyebabkan bakteri gram positif mampu bertahan pada kondisi asam karena enzim tersebut dapat meningkatkan pH intraseluler pada kondisi pH ekstraseluler yang rendah.  $F_0F_1$ -ATPase membutuhkan ATP untuk ekspulsi ion  $H^+$  sehingga homeostasis pH dan kehidupan sel dapat dijaga dan proses transkripsi gen pada sel tetap dapat berlangsung (Corcoran *et al.*, 2005)

LGG memiliki kemampuan menempel mukosa dengan sangat baik. Di antara *Lactobacillus* lainnya, LGG adalah salah satu spesies yang memiliki kemampuan menempel terbaik (Lehto *et al.*, 1997). Setelah dikonsumsi manusia per oral, LGG masih dapat dikultur dari feses 7 hari kemudian, bisa ditemukan dalam jaringan usus yang dibiopsi 28 hari kemudian, dan dapat dikultur dari saliva 24 hari kemudian. Pemberian LGG dapat mengubah mikroekologi usus yang ditandai dengan peningkatan *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* serta penurunan *Clostridia* lesitinase negatif (Doron *et al.*, 2005). Apabila dibandingkan dengan subyek penderita Alergi Susu Sapi, subyek normal mengalami peningkatan jumlah *Bifidobacterium* yang lebih tinggi pada feses setelah pemberian LGG (Apostolou *et al.*, 2001). Pada neonatus yang memperoleh LGG, kolonisasi LGG terjadi pada kelompok yang memiliki berat lahir lebih dari 1500 gram

(Agarwal *et al.*, 2003). Penelitian pada bayi yang ibu saat hamil mengonsumsi LGG menunjukkan bahwa pada 24 jam setelah lahir kolonisasi LGG sudah terjadi pada sebagian besar bayi (Schultz *et al.*, 2004).

Kompetisi kolonisasi antara LGG dengan mikrobiota patogen dalam saluran cerna membuat LGG efektif dalam mencegah infeksi usus. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa LGG yang menempel pada epitel usus akan menghambat penempelan *E coli* O157:H7 pada usus tersebut. Kompetisi dalam konsumsi monosakarida dengan mikrobiota patogen, misal *Clostridium difficile* pada kolitis, membuat mikrobiota patogen tersebut lambat tumbuh (Doron *et al.*, 2005).

Kemampuan LGG mengubah reseptor toksin melalui proses enzimatis, khususnya pada toksin A *Clostridium difficile*, membuat mikrobiota patogen tersebut menjadi kurang berbahaya bagi *host* (Doron *et al.*, 2005). LGG menghasilkan asam lemak rantai pendek yang menurunkan pH dan menghambat pertumbuhan mikrobiota patogen. Kemampuan LGG berperan sebagai modulator transpor alergen menyebabkan LGG mampu mencegah reaksi alergi. Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa dibandingkan dengan pemberian air atau susu sapi, pemberian LGG mengakibatkan penutupan pori-pori molekuler usus. Inflamasi usus terbukti dapat menyebabkan alergen dapat menembus penghalang mukosa dan menimbulkan sensitisasi alergi pada sistem imun. Maka dengan menutup *gap* permeabilitas usus yang terjadi, LGG mampu melindungi bayi atopik dari sensitisasi oleh makanan alergenik (Doron *et al.*, 2005; Isolauri *et al.*, 2000).

Kemampuan memodulasi respons imun non spesifik membuat LGG bermanfaat bagi kesehatan. Pada penderita diare akut karena rotavirus, LGG meningkatkan produksi IgM

non spesifik rotavirus sehingga memperpendek masa diare dan meningkatkan produksi IgA spesifik rotavirus sehingga reinfeksi rotavirus dapat dicegah (Doron *et al.*, 2005).

LGG juga mampu meningkatkan respons imun adaptif dalam bentuk aktivasi limfosit T CD4+ dalam menghadapi berbagai komponen mikrobiota patogen, meningkatkan sekresi sitokin supresif seperti IL4 dan IL-10, menurunkan sekresi sitokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-5 dan IFN $\gamma$ . LGG dikenal sebagai modulator *bidirectional* karena memiliki kemampuan meningkatkan respons imun apabila dibutuhkan dan menurunkan respons imun apabila tidak dibutuhkan. Respons imun *bidirectional* ini dapat dilihat pada subyek penderita alergi susu sapi yang dengan pemberian LGG ekspresi reseptor fagositosis menurun, sementara pada subyek normal ekspresi fagositosis meningkat (Doron *et al.*, 2005).

Walaupun terjadi peningkatan yang sangat pesat dalam konsumsi LGG oleh masyarakat, kasus bakteremia yang dilaporkan terjadi tidak ikut meningkat (Salminen *et al.*, 2004). Sementara itu hasil penelitian pada kasus bakteremia yang terjadi pada konsumen LGG, menunjukkan bahwa *Lactobacillus* yang ditemukan dalam darah penderita ternyata tidak memiliki kemampuan menempel mukosa usus sebaik LGG, sehingga disimpulkan bahwa *Lactobacillus* tersebut bukan dari spesies LGG (Ouwahan *et al.*, 2004).

### 2.3.3 *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) merupakan salah satu spesies dari sedikit *Lactobacillus* di saluran cerna manusia yang terlibat baik dalam fermentasi industri maupun tradisional disamping *Lactobacillus crispatus* dan *Lactobacillus gasseri* (Cataloluk dan Gogebakan, 2004).

*L. plantarum* merupakan Bakteri Asam Laktat serbaguna yang dapat ditemukan di berbagai lingkungan termasuk di berbagai produk makanan fermentasi, termasuk kelompok produk nabati (misal: buah zaitun, biji coklat, tepung singkong, kol yang diasamkan, minuman anggur dan sebagainya), produk susu (misal: berbagai jenis keju) dan produk daging (misal: berbagai jenis sosis) (deVries *et al.*, 2006). Keberadaan *L. plantarum* di berbagai lingkungan tersebut di atas menunjukkan bahwa *L. plantarum* memiliki gen dan kemampuan menyandi kode gen untuk pengambilan dan pemanfaatan berbagai jenis gula yang berbeda, pengambilan peptida, dan membentuk sebagian besar asam amino.

*L. plantarum* juga memiliki gen penyandi regulator yang membuatnya mampu hidup pada berbagai kondisi lingkungan. *L. plantarum* juga memiliki sejumlah besar gen yang berkemampuan menyandi kode gen untuk ekspresi berbagai protein permukaan (lebih kurang berjumlah 217), yang homolog dengan berbagai protein yang telah diketahui berfungsi sebagai pengikat mukus, promosi-agregasi, dan penempelan antar sel (Kleerebezem *et al.*, 2003). Pada 20 strain *L. plantarum* yang diperbandingkan berdasarkan metode *DNA-micro-array*, terlihat perbedaan utama dalam hal keberadaan dari regio DNA yang *transferable* seperti elemen IS dan *prophage* serta regio DNA lain yang menyandi *plantaricin*, peptida non ribosom dan eksopolisakarida. Variasi spesifik yang sangat tinggi dari berbagai strain *L. plantarum* dapat ditemukan pada regio DNA 200-kb yang menyandi gen utama dalam metabolisme gula yang mungkin diperoleh dari transfer gen horisontal dan mencerminkan kemampuan beradaptasi dalam berbagai gaya kehidupan (Molenaar *et al.*, 2005)



Penelitian terhadap *L. plantarum* NCIMB 8826 menghasilkan penemuan bahwa strain tersebut secara makroskopis dan histologis tidak menginduksi inflamasi atau translokasi melalui penghalang usus mencit. Sebaliknya *L. plantarum* NCIMB 8826 mampu menurunkan gejala inflamasi pada colitis (Pavan *et al.*, 2003). Survei paska pemasaran menunjukkan bahwa *L. plantarum* tidak mengakibatkan kasus bakteriemia (Salminen *et al.*, 2002).

Setelah dikonsumsi per-oral, *L. plantarum* akan menghadapi sistem imun *host* seperti: musin, asam lambung, pH rendah dan garam empedu yang disekresi di bagian proksimal usus (Ouwehand *et al.*, 2005). *L. plantarum* baik dari isolat usus maupun makanan terbukti memiliki ketahanan hidup dalam lingkungan yang mengandung garam empedu maupun pada lingkungan berkeasaman tinggi (pH 2,0). Daya tahan hidup *L. plantarum* setelah dikonsumsi per-oral cukup tinggi, yaitu mencapai 10%, apabila dibandingkan dengan *L. sakei* dan *L. paracasei* yang hanya mencapai 0,001% saja (Haller *et al.*, 2001). Daya tahan hidup *L. plantarum* di ilcum setelah dikonsumsi per-oral dengan dosis  $10^8$  cfu cukup tinggi, yaitu mencapai  $7 \pm 2$  %, apabila dibandingkan dengan *L. fermentum* yang hanya mencapai  $0,5 \pm 0,5$  saja. Daya hidup *L. plantarum* (dari saat dikonsumsi sampai saat pengeluaran feses) pada pemberian sekali sehari selama 7 hari dilaporkan mencapai 25% (Vesa *et al.*, 2000).

Sementara itu penelitian lain melaporkan daya tahan hidup pada pemberian sekali sehari selama 10 hari mencapai 85 % (Johansson *et al.*, 1998). Apabila tidak ada konsumsi per-oral, jumlah *L. plantarum* hidup hanya mencapai  $4 \times 10^4$  CFU/gram feses (deVries *et al.*, 2006; Johansson *et al.*, 1998).

Pemberian *L. plantarum* 299v meningkatkan konsentrasi asam karboksilat, asam asetat, dan sedikit asam propionat. Apabila senyawa-senyawa tersebut dalam feses meningkat dan volume feses meningkat, maka gejala kembung berkurang dan feses melembek. Hal ini menunjukkan perubahan fermentasi pada kolon. Kompetisi antara *L. plantarum* dengan mikrobiota patogen mampu menurunkan jumlah mikrobiota patogen *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, dan *Clostridia*. *L. plantarum* menurunkan jumlah bakteri gram negatif baru setelah sekitar 11 hari, menunjukkan bahwa efek penurunan tersebut memerlukan waktu (Johansson *et al.*, 1993).

Pemberian *L. plantarum* CRL 936 pada mencit melalui stimulasi sel M pada *Peyers patch* menghasilkan peningkatan imunitas spesifik (berupa IgA spesifik) dan imunitas nonspesifik berupa sel T CD4+ (deVries *et al.*, 2006). Pemberian *L. plantarum* 299 menunjukkan aktivitas imunomodulator yang menguntungkan berupa peningkatan sintesis dan sekresi IL-10 dari sel T dan makrofag dari sel-sel yang mengalami inflamasi, sehingga dapat menimbulkan toleransi dan pengendalian inflamasi (Patnakanthan *et al.*, 2004). Penelitian *L. plantarum* NCIMB 8826 pada subyek alergi *Der p 1*, menunjukkan bahwa dengan *L. plantarum monocyte derived Dendritic Cell (MD-DC)* pasien alergi cenderung ber-reorientasi menuju respons imun yang dominan Th1, sehingga reaksi alergi yang terjadi akan menurun (Pochard, 2005).

Dalam kaitannya dengan interaksi *host*-mikrobiota, kondisi saluran cerna baik pada mencit maupun manusia menimbulkan efek yang sama pada ekspresi gen *L. plantarum* yang melibatkan pengambilan dan sintesis makanan, stress dan fungsi-fungsi ekstraseluler. Hal ini dibuktikan dalam hasil eksplorasi fungsional dari kelompok-kelompok gen *L. plantarum* (Gambar 2.3) dengan metode *Resolvase-based in vivo*

dari waktu ke waktu. Dadih dipercaya khususnya oleh seseorang bermanfaat bagi kesehatan. Proses fermentasi yang sangat tradisional dan sederhana serta tidak mengindahkan sanitasi dan higienis, selalu menghasilkan produk dadih yang aman dikonsumsi (Surono, 2003; Surono dan Hosono, 1996).

Penelitian terhadap sifat probiotik secara *in vitro* dari *Lactobacillus plantarum* asal dadih dari Indonesia dibandingkan dengan probiotik komersial baik dari Asia maupun Eropa, menunjukkan bahwa *L. plantarum* asal dadih sangat stabil viabilitasnya pada larutan buffer fosfat (pH 7) selama 48 jam, dan dilaporkan juga dapat mengikat senyawa mutagen Trp-P1, serta sangat efektif menghilangkan sianotoksin microcystin-LR dibandingkan dengan strain probiotik komersial, seperti: *Bifidobacterium lactis* Bb-12, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Lactobacillus rhamnosus* GG (Surono, 2003).

*Lactobacillus plantarum* IS 10506 termasuk probiotik yang mempunyai kemampuan penempelan yang terbaik pada mukus, yaitu 9,8 %. Seperti diketahui, kemampuan penempelan dari Bakteri Asam Laktat sangat bervariasi, yaitu mulai 1,4 % hingga 9,8 % (Collado *et al.*, 2007).

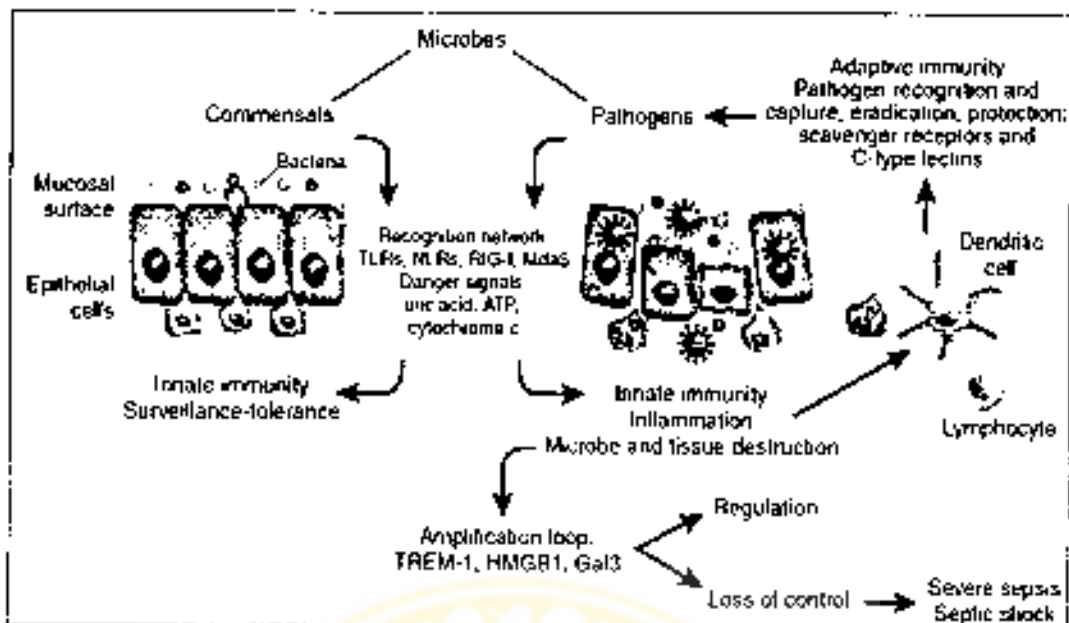
#### 2.4 TLR dan Inhibitor TLR

Dalam menghadapi patogen, mamalia memiliki dari 2 tipe imunitas, yaitu imunitas *innate* dan adaptif. Imunitas *innate* berperan sebagai sensor, eradikasi patogen dan menegakkan imunitas adaptif. Fungsi tersebut sangat tergantung pada peran dari PRR (*pattern recognition receptors*). PRR (*pattern recognition receptors*) secara fungsional dapat diklasifikasikan ke dalam 2 kelas, yaitu *signaling* dan *non signaling PRR* (*pattern recognition receptors*). *Non signaling PRR* (*pattern recognition receptors*) meliputi faktor *soluble* dan faktor protein trans-membran, dimana faktor *soluble* adalah CRP dan

lektin, sedangkan faktor trans-membran contohnya adalah reseptor scavenger. *Signaling PRR (pattern recognition receptors)* meliputi protein trans-membran dan protein sitosolik. Protein *non-signaling PRR* trans-membran yang terkenal adalah *Toll-like receptor (TLR)* yang terdiri dari komponen ekstraseluler yang kaya *leucine* (terdiri dari 550 sampai 980 asam amino dan berkapasitas mengikat ligan) dan komponen intraseluler (yang dikenal sebagai *TIR (Toll/IL-1R-like)* dengan panjang sekitar 200 asam amino, berfungsi meneruskan sinyal untuk respons selanjutnya) (Kaiso dan Akira, 2006).

Sedangkan protein sitosolik dari *signaling PRR (pattern recognition receptors)* contohnya adalah *nucleotide binding oligomerization domain (NOD)* yang terdiri dari Nod1 dan Nod2 (Kaiso dan Akira, 2006). Peran TLR dan *NLR (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors* pada surveilans patogen dapat dilihat pada Gambar 2.4 yang menunjukkan bahwa mikrobiota patogenik dan non patogenik menghasilkan dua akibat yang berbeda pada permukaan mukosa, yaitu: dalam menghadapi mikrobiota komensal respons yang terjadi adalah toleransi dan homeostasis, sedangkan dalam menghadapi mikrobiota patogen respons yang terjadi adalah inflamasi (Sansonetti, 2006).

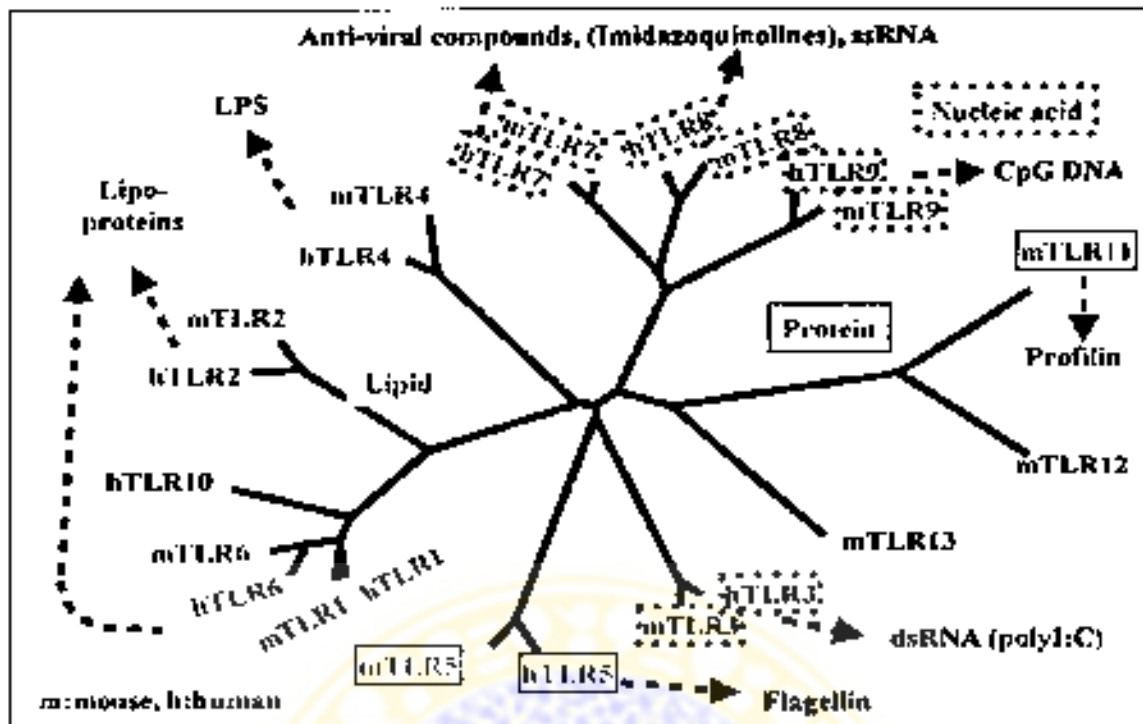
Peran utama *Toll-like receptor (TLR)* adalah induksi inflamasi dan menegakkan imunitas adaptif. TLR dapat mengenali struktur molekul umum dari mikroorganisme yang dikenal sebagai PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*). Nama yang lebih tepat untuk PAMPs sebenarnya adalah MAMPs (*microorganism-associated molecular pattern*), karena tidak hanya ditemukan pada mikrobiota patogen, tetapi juga pada mikrobiota komensal atau flora normal (Sansonetti, 2006).



Dikutip dari: Sansonetti, 2006. The *innate* signaling of dangers and the dangers of *innate* signaling. *Nat. Immunol.* 7: 1237-1242

**Gambar 2.4** Toll-like receptor (TLR) sebagai salah satu komponen dari jaringan yang berperan dalam surveilans patogen. Mikrobiota patogenik dan non patogenik menghasilkan dua akibat yang berbeda pada permukaan mukosa. Mikrobiota komensal menghasilkan respons toleransi dan homeostasis. Sementara itu mikrobiota patogen melalui jalur sinyal yang berbeda menghasilkan inflamasi. Protein TREM dan protein lainnya seperti HMGB1 dan Gal akan memperkuat sinyal yang apabila tak terkontrol akan menyebabkan sepsis dan syok. Apabila patogen mengaktifasi sistem imun *innate*, respons imun adaptif yang menguntungkan akan mengenali, menangkap dan menenyapkan patogen yang semuanya dimediasi oleh molekul *innate* yang disandi *germline* seperti scavenger receptors dan lektin tipe C. (TREM, triggering receptors expressed on myeloid cells; HMGB, High-mobility group box 1 protein; NLRs, nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors).

Ligan dari banyak *TLR* telah banyak dikarakterisasi (secara garis besar dapat dilihat pada Gambar 2.5, misal: *TLR4* memediasi respons imun untuk LPS; *TLR2* untuk lipoprotein dari jamur dan bakteri gram positif (Kaisho dan Akira, 2006). Beberapa sifat dari *TLR* adalah: (1). Diregulasi dan diekspresikan secara berbeda dalam berbagai jenis jaringan dan tipe sel; (2). Mengaktifasi respons seluler secara spesifik, termasuk



Dikutip dari: Kaisho dan Akira S, 2006; Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:976-987

**Gambar 2.5** Ligan-ligan dan pohon filogenetik dari TLR manusia serta tikus. TLR pada manusia dan tikus dihubungkan dengan garis tebal dengan dasar analisis filogenetik dari struktur asam aminonya. Panjang cabang melambangkan secara proporsional jarak evolusi antar keduanya. Garis panah terputus menunjukkan ligan-ligan yang mewakili. (h, Human; m, murine).

kapasitas menyalurkan sinyal melalui NF- $\kappa$ B, AP-1, dan MAP kinases yang pilihannya tergantung pada protein adapter yang digunakan; (3). Berkemampuan untuk melakukan oligomerisasi pada *cytoplasmic domains* mereka. Oligomerisasi ini tidak ekuivalen, karena TLR tertentu membutuhkan penyusunan dalam kompleks heterodimerik, sedangkan yang lain dalam kondisi homomerik; (4). Mampu berkomunikasi satu sama lain, misal: TLR2 dapat berfungsi sendiri maupun memfungsikan diri sebagai bagian dari TLR6 dan TLR1, TLR4 dan TLR2 sering sulit dibedakan karena mereka bisa saling berganti ekspresi dalam situasi tertentu (Taylor *et al.*, 2006; Horner, 2006; Kaisho dan Akita, 2006; Takeda, 2005; Iwasaki dan Medzhitov, 2004).

### 2.4.1 *Toll-like receptor 2 (TLR2)*

Gen TLR2 pada tikus secara struktural mirip dengan gen manusia (Gambar 2.5). Pada tikus, gen TLR2 telah dipetakan dalam kromosom 4 dan manusia pada kromosom 4q32. Sama dengan tikus, pada manusia juga ditemukan gen TLR2 yang tersusun dari 3 ekson, di mana ekson pertama dan kedua tidak berkode dan *open reading frame* yang lengkap berlokasi di ekson ketiga. Ekspresi TLR2 meliputi berbagai jaringan dan sel. Lokasi ekspresi TLR2: (1). Pada jaringan sistem limfoid, seperti misal limpa, kelenjar getah bening, timus dan sumsum tulang, paru, jantung, otot, dan otak; (2). Pada sel imunokompeten: adiposit, fibroblast gusi, sel epitel, keratinosit, sel alveolar tipe II, hepatosit, dan otot polos (Kaisho dan Akira, 2006; Takeda, 2005; Iwasaki dan Medzhitov, 2004)

TLR2 terlibat pada pengenalan komponen dari berbagai MAMPs, seperti: peptidoglycan dan *lipoteichoic acid (LTA)* dari bakteri gram positif, lipoarabinomannan dari *mycobacteria*, *glycosylphosphatidylinositol* dari *Trypanosoma Cruzi*, *phenol-soluble modulins* dari *Staphylococcus epidermis*, *zymoan* dari jamur, dan *glycolipids* dari *Treponema maltophilum* (Takeda, 2005).

Komponen dinding bakteri gram negatif sirkulasi juga menyebabkan peningkatan dalam transkripsi TLR2. Berbagai macam sitokin, seperti: IL-2, IL-15, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$ , juga menginduksi ekspresi TLR2 baik secara langsung maupun tidak melalui NF- $\kappa$ B yang aktif. Sisi NF- $\kappa$ B pada promotor TLR2 penting pada regulasi TLR2. IFN- $\gamma$  dan *macrophage colony stimulating factor (M-CSF)* juga meningkatkan ekspresi TLR2 pada makrofag dan monosit darah perifer. (Tripathi dan Aggarwal, 2006; Kaisho dan Akira, 2006; Takeda, 2005; Iwasaki dan Medzhitov, 2004)

Pemberian LPS pada sel kultur yang mengekspresikan TLR2 menghasilkan aktivasi NF- $\kappa$ B secara signifikan yang mana efek ini tak terlihat pada TLR4. Mutasi pada daerah sitoplasmik TLR2 yang menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B, menunjukkan bahwa domain sitoplasmik memulai kaskade sinyal LPS. Respons terhadap LPS pada tikus dengan defisiensi TLR4 yang rendah, dan respons terhadap tikus dengan defisiensi TLR2 yang normal, menunjukkan peran alternatif dari TLR2 (Tripathi dan Aggarwal, 2006; Kaisho dan Akira, 2006)

Tikus dengan defisiensi TLR2 merespons LPS dengan kemampuan yang sama dengan tikus *wild-type*. Berdasarkan homologi struktural, fungsional dan hasil, *signaling* pada TLR2 tampaknya berjalan melalui mekanisme yang sama dengan IL-1R dan TLR4. Jalur alternatif dan jalur spesifik juga ada pada TLR2. Analog dengan TLR4, beberapa stimuli endogen dapat mengaktifkan TLR2, misal inflamasi yang diinduksi sel nekrotik dan respons terhadap pemulihan jaringan oleh aktivasi NF- $\kappa$ B. Aktivasi tersebut tergantung pada TLR2 dan membutuhkan kaskade sinyal TLR2. Untuk memediasi produksi sitokin, TLR2 menginduksi maturasi sel dendritik dengan cara yang sama, seperti yang dilakukan di TLR4 (Tripathi dan Aggarwal, 2006; Kaisho dan Akira, 2006)

TLR2 menunjukkan kemampuan dalam internalisasi antigen untuk dipresentasikan pada sel imun adaptif. Aktivasi TLR2 juga menimbulkan efek berbahaya, TLR2 telah dibuktikan sebagai "death receptor" yang dimediasi oleh apoptosis yang disebabkan lipoprotein bakteri. TLR1 dan TLR6 secara struktural memiliki hubungan dengan TLR2 dan keduanya berhubungan dengan TLR2. Defisiensi fungsi TLR2 dan polimorfisme TLR2 menimbulkan gangguan aktivasi NF- $\kappa$ B dan produksi sitokin (Tripathi dan Aggarwal, 2006; Kaisho dan Akira, 2006; Takeda, 2005; Iwasaki dan Medzhitov, 2004)

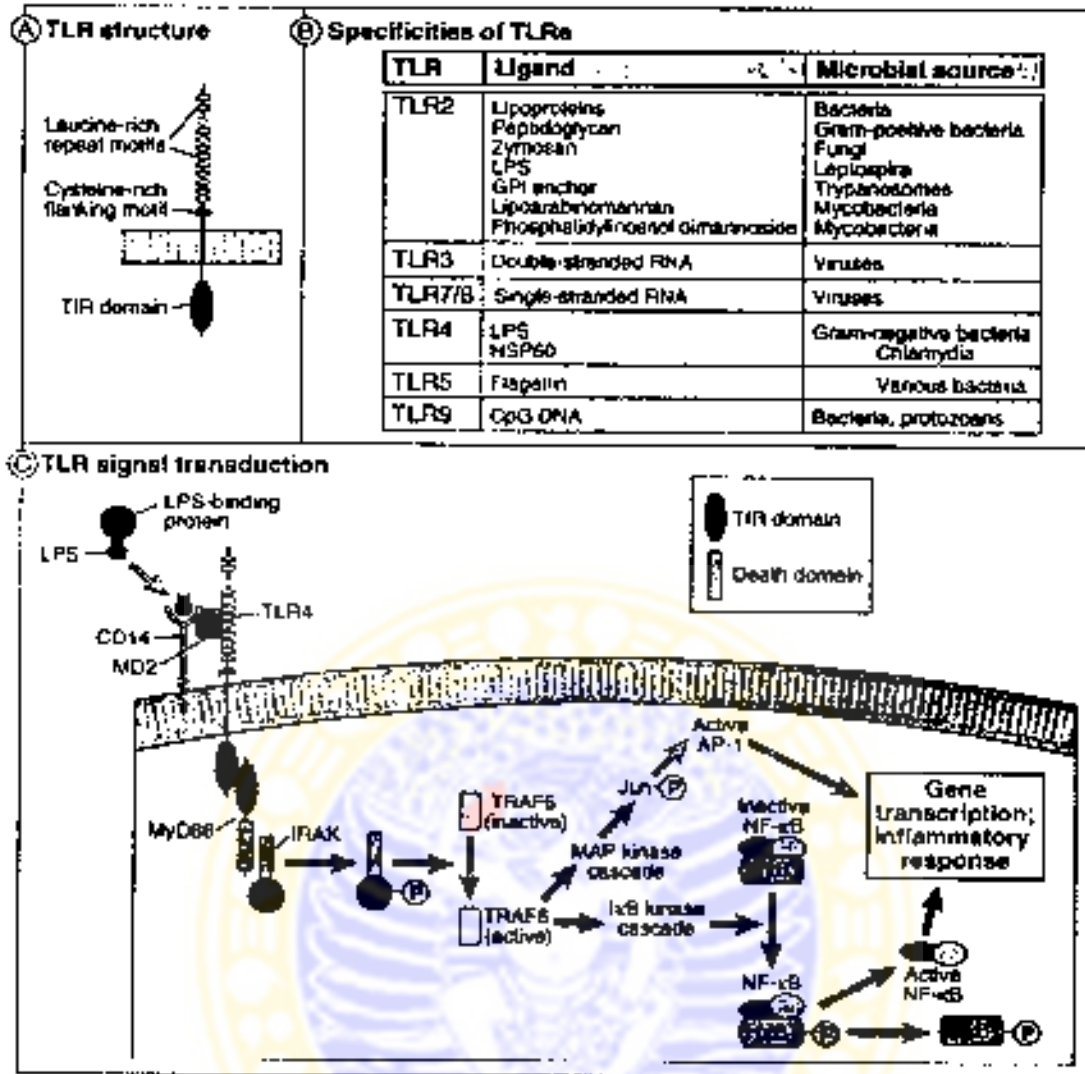


#### 2.4.2 *Toll-like receptor 4 (TLR4)*

Gen TLR4 pada tikus secara struktural mirip dengan gen TLR4 manusia (Gambar 2.5). Pada tikus TLR4 telah dipetakan dalam kromosom 4 dan manusia pada kromosom 9q32-33. Sekuen gen TLR4 pada tikus dan manusia telah dikloning dan diteliti. Pada manusia panjang gen 19 kb 3 ekson, dengan lokasi promotor sekitar 75 bp ke arah hulu dari lokasi permulaan transkripsi. Ukuran gen TLR4 pada tikus adalah 91,7 kb, lebih panjang pada sekuen intron, namun secara struktural mirip dengan gen manusia. Ekspresi TLR4 meliputi berbagai jaringan dan sel. Lokasi ekspresi TLR4 adalah: (1). Pada jaringan meliputi jantung, paru, kulit fetus, otak fetus, plasenta, ileum dan banyak yang lainnya; (2). Pada sel imunokompeten meliputi: enterosit intestin fetus, sel gaster, osteoblasts, sel endotel, adiposit, fibroblast gusi, sel otot polos, Kupffer cells, sel stellate hepar, keratinosit, dan sel epitel (Kaisho dan Akira, 2006; Takeda, 2005; Iwasaki dan Medzhitov, 2004)

TLR4 merupakan reseptor penting untuk respons yang dimediasi LPS. TLR4 juga mampu mengenali Taxol dari *Taxus brevifolia* dan berbagai ligan endogen seperti *heat shock proteins (HSP60 dan HSP70)* dari fibronektin, oligosakarida dari asam hialuronik, heparan sulfat, dan fibrinogen. TLR4 mengenali beberapa ligan endogen walaupun tidak ada proses infeksi, namun ligan endogen ini hanya menstimulasi sel imun pada konsentrasi yang sangat tinggi (Takeda, 2005).

Regulasi TLR4 bersifat kompleks, melibatkan jaringan dan sel spesifik yang berbeda. Regulasi sangat menentukan sistem imun *innate*. Jumlah TLR4 pada sel sangat kecil (sekitar 1000 per sel). Ekspresi berlebihan tidak hanya meningkatkan sensitivitas pada LPS, tetapi juga berkontribusi pada gangguan jantung. Ekspresi gen TLR4 yang menurun



Dikutip dari Abbas dan Lichtman, 2003: *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Saunders, Philadelphia.

**Gambar 2.6** Struktur, ligan-ligan dan jalur sinyal TLR. *Toll-like receptor (TLR)* terdiri dari komponen ekstraseluler yang kaya *leucine* dan komponen intraseluler *TIR (Toll/IL-1R-like)* yang berfungsi meneruskan sinyal untuk respons selanjutnya. Dalam sinyal transduksi TLR, efektor hilir dari TLR2 dan TLR4 adalah protein adapter MyD88 (yang berinteraksi dengan reseptor transmembran melalui domain C-terminal *TIR*) yang akan mengikat *Ser/Thr kinase IRAK (IL-1R associated kinase)* untuk membentuk kompleks reseptor. IRAK yang mengalami autofosforilasi (dan mengalami disosiasi dari MyD88) selanjutnya akan mengaktifasi molekul *TNF receptor associated factor (TRAF6)*. TRAF6 yang sudah berbentuk aktif akan menggulirkan 2 jalur kaskade sinyal, yaitu: (1). Kaskade *IκB kinase*, yang akan bermuara pada pembentukan faktor transkripsi NFκB aktif, dan (2). Kaskade *MAP kinase* yang akan bermuara pada pembentukan faktor transkripsi AP-1 aktif.

### 2.4.3 Inhibitor TLR

TLR (*Toll-like Receptors*) merupakan bagian dari struktur umum dan komponen sinyal yang menimbulkan aktivasi NF $\kappa$ B. Bukti murakhir menunjukkan bahwa aktivasi NF- $\kappa$ B tidak seragam dan ligan TLR yang berbeda dapat mencetuskan jalur ganda yang polanya dapat beraneka macam. Inhibitor TLR dapat merupakan bermacam jenis molekul yang dapat mengintervensi tahap yang berbeda dari TLR *signaling cascade* dengan berbagai cara yaitu: mengikat TLR (*TLR binding*), merelokasi TLR (*TLR relocation*) dan mengaktivasi MAP kinase (Kaisho dan Akira, 2006).

#### 2.4.3a Inhibitor TLR PD98059

Dua jalur utama dalam meneruskan sinyal intraseluler dimulai dengan aktivasi reseptor transmembran. Pada jalur pertama, aktivasi reseptor transmembran diawali dari senyawa pembawa pesan yang mampu berdifusi yang mengikat protein efektor dan mengaktivasi untuk penerusan sinyal selanjutnya. Pada jalur pertama ini sinyal dapat dibawa sampai ke inti sel dan reaksi sementara yang beragam dapat diecetuskan. Pada jalur kedua, sinyal ekstraseluler, misal alergen atau senyawa *lipoteichoic acid* dari *Lactobacillus*, didokumentasi oleh reseptor di membran sel, misal: TLR, dan diteruskan melalui kaskade sinyal pada molekul efektor di bawahnya (Krauss, 2001).

Melalui protein *Ras* atau anggota dari *Ras protein superfamily*, sinyal ekstraseluler diteruskan dengan bantuan protein kinase dalam kaskade berurutan ke dalam sel atau inti sel. Karena aktivasi reseptor transmembran jalur kedua ini diaktifkan oleh sinyal mitogenik (sinyal yang mengaktivasi peningkatan aktivitas pembelahan sel), seperti sinyal hormon pertumbuhan, maka jalur ini dikenal sebagai jalur "*Mitogenic Activated Protein Kinase*" (*MAPK pathway*). Penyampaian sinyal melalui protein kinase dalam

oleh *MEK1/2*. *MAP kinase MEK (MAPK ERK1/2)* merupakan senyawa yang terlibat dalam produksi sitokin yang diinduksi TLR. (Alessi, 1995; Reiling, 2001; Martin, 2003)

Telah banyak penelitian *in vivo* pada mencit yang menggunakan PD98059. Pada model *in vivo* reaksi hipersensitivitas memakai mencit Balb/c, dosis yang digunakan adalah 10 mg/kg (dilarutkan dalam pelarut DMSO) melalui pemberian injeksi intraperitoneal (Tamaki *et al.*, 2004). Pada penelitian lain yang juga menggunakan model hewan coba mencit, dosis PD98059 yang diberikan adalah 5µg melalui injeksi intracerebroventricular (Rahmouni *et al.*, 2004)

#### 2.4.3b Inhibitor TLR LY 294002

Sinyal ekstraselular, misal alergen atau senyawa *lipoteichoic acid* dari *Lactobacillus* didokumentasi oleh reseptor di membran sel, misal: TLR, dan diteruskan melalui kaskade sinyal. Salah satu cara untuk memancarkan sinyal adalah melalui bantuan senyawa pembawa pesan yang memiliki berat molekul rendah yang dikenal sebagai *second messenger* (Krauss, 2001).

*Second messenger* terpenting adalah dari jenis: (1). hidrofilik dan sitosolik, yaitu: cAMP, cGMP, inositol fosfat dan  $Ca^{2+}$ ; dan (2) hidrofobik, berhubungan dengan membran, yaitu: *diacylglycerol* (DG); dan *phosphatidyl inositol* (PtdIns) phosphates. Berbagai macam *phosphatidyl inositol* (PtdIns) difosforilasi oleh enzim *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3Ks) pada posisi 3' dari *phosphatidyl inositol* (PtdIns) membentuk PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P2 dan PtdIns(3,4,5)P3. Salah satu senyawa yang dihasilkan, yaitu peran PtdIns(3,4,5)P3 sangat penting sebagai pembawa pesan intraseluler (Krauss, 2001).

LY294002 yang sebutan lengkapnya adalah *2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one* adalah inhibitor sintetik dari *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3Ks)*. *Phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase (PI3Ks)* adalah enzim yang bekerja, baik pada sinyal transduksi faktor pertumbuhan (*growth factor signal transduction*) dengan bekerjasama pada reseptor maupun bukan reseptor dari tyrosine kinase termasuk reseptor faktor pertumbuhan yang merupakan turunan platelet (*platelet-derived growth factor receptor*) (Vlahost *et al.*, 1994).

Inhibitor LY294002 ini baru dieksplorasi setelah inhibitor sejenis - quercetin - tidak hanya menghambat PI3Ks saja, tetapi juga menghambat PtdIns dan protein kinase lainnya. LY294002 mampu secara lengkap dan spesifik menghambat aktivitas PtdIns 3-kinase (PI3Ks). Karena *Phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase (PI3Ks)* adalah enzim utama yang bekerja pada sinyal transduksi faktor pertumbuhan (*growth factor signal transduction*), maka inhibitor ini sangat penting dalam mengendalikan proliferasi, motilitas dan adhesi sel (Vlahost *et al.*, 1994).

PI3Ks dapat digunakan untuk menjelaskan peran biologis dari kinase pada proliferasi, motilitas dan adhesi sel serta respons dari faktor pertumbuhan. Saat ini LY294002 secara luas diteliti dalam perannya sebagai penghambat apoptosis. LY294002 terbukti terlibat dalam penerusan sinyal oleh TLR (Vlahost *et al.*, 1994; Fukao dan Kotasu, 2003; Rhee *et al.*, 2003).

Berbagai penelitian *in vivo* pada mencit yang menggunakan LY294002 telah dilakukan. Pada sebuah model *in vivo* dari pankreatitis pada mencit, dosis yang digunakan adalah 1,4 mg/kg dan 100 mg/kg (dilarutkan dalam pelarut DMSO, diberikan

sebanyak 0,1 ml setiap mencit) melalui pemberian injeksi intraperitoneal (Singh *et al.*, 2001).

Pada penelitian lain dengan model hewan coba yang sama dosis LY294002 yang diberikan adalah 5µg melalui injeksi intracerebroventricular (Rahmouni *et al.*, 2004) dan bahkan ada penelitian yang menggunakan dosis sampai 300 mg/kg melalui injeksi subkutan (Ferrandi *et al.*, 2003).

## 2.5 Hubungan antara Probiotik dan TLR dengan Reaksi Alergi

Pemberian probiotik dalam pencegahan alergi juga merupakan upaya perbaikan homeostasis sistem biologis penderita yang ditujukan pada imunomodulasi respons imun dengan mencincangkan respons imun  $T_H1$  dan  $T_H2$ . Alergi merupakan bentuk “ $T_H2$  - disease” yang upaya perbaikan memerlukan pengembalian *host* pada kondisi “ $T_H1$ - $T_H2$ ” yang seimbang (Furrie, 2005).

Pada tingkat molekul, sistem imun *innate* dipusatkan pada aktivasi dari NF- $\kappa$ B, mempunyai kemampuan menginduksi transkripsi dari beberapa sitokin proinflamasi dalam merespons stimulasi oleh mikrobiota. Dalam peran membantu menjembatani sistem imunitas *innate* ke sistem adaptif, TLR mampu menginduksi respons imun, baik ke arah  $T_H1$  maupun  $T_{reg}$ . TLR2 dan TLR4 diketahui mempunyai peran penting dalam polarisasi respons imun oleh paparan mikrobiota (Iwasaki dan Medzhitov, 2004; Supajatura, 2002).

Molekul biologis aktif probiotik berupa peptidoglycan dan *teichoic acid* (Gambar 2.7) merupakan *microbial-associated molecular patterns (MAMPs)* akan dikenali *PRRs (pattern recognition receptors)* dalam hal ini TLR2 dan TLR4. TLR2 dan TLR4 menginduksi faktor transkripsi beberapa sitokin proinflamasi dalam merespons stimulasi

**Tabel 2.3 Beberapa penelitian terbaru pada manusia tentang efek probiotik pada penurunan reaksi alergi**

| No. | Peneliti                          | Hasil Penelitian  |
|-----|-----------------------------------|---|
| 1.  | Viljanen <i>et al.</i> , 2004.    | Pemberian probiotik LGG pada penderita DA, menurunkan gejala klinik (SCORAD)  |
| 2.  | Rosenveldt <i>et al.</i> , 2004.  | Pemberian probiotik LGG pada anak DA, menurunkan gejala klinik (SCORAD, dsb)  |
| 3.  | Wang <i>et al.</i> , 2004.        | Pemberian probiotik <i>L. paracasei</i> (LP-33) pada penderita Rhinitis Allergica, menurunkan gejala klinik.  |
| 4.  | Pohjavouri. <i>et al.</i> , 2004. | Pemberian probiotik LGG pada anak Alergi Susu Sapi, meningkatkan kadar IFN- $\gamma$ .  |
| 5.  | Hari <i>et al.</i> , 2004.        | Pemberian VSI #3 (4 <i>lactobacilli</i> , 3 <i>bifidobacteria</i> , dan 1 <i>streptococcal</i> ) pada sel kultur (dari usus manusia) meningkatkan IL-10, menurunkan IL-12 dan IFN- $\gamma$ |
| 6.  | Viljanen <i>et al.</i> , 2005a.   | Pemberian probiotik LGG pada anak Alergi Susu Sapi, meningkatkan kadar IgA fecal.   |
| 7.  | Mohamadzadeh, 2005                | Pemberian probiotik <i>Lactobacillus</i> meningkatkan kadar IFN $\gamma$ , IL-12, IL-10.  |
| 8.  | Viljanen <i>et al.</i> , 2005b.   | Pemberian probiotik LGG pada anak Alergi Susu Sapi, meningkatkan kadar IL-6, IL-10 dan E-selectine  |

**Tabel 2.4 Beberapa penelitian terbaru pada hewan coba tentang mekanisme probiotik dalam penurunan reaksi alergi**

| No. | Peneliti                     | Hasil Penelitian   |
|-----|------------------------------|--|
| 1.  | Von der Weid, 2001           | Pemberian probiotik pada mencit BALB/c meningkatkan IFN $\gamma$ , IL-12, TGF- $\beta$ dan IL-10, serta menurunkan IL-4 dan IL-5   |
| 2.  | Priouh <i>et al.</i> , 2003  | <i>Lactobacillus paracasei</i> (NCC 2461), <i>Lactobacillus johnsonii</i> (NCC 533) and <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (NCC 362) pada mencit yang disensitisasi BLG, menurunkan IgE, IgG1 dan IgG2a  |
| 3.  | Matsuguchi, 2003             | TLR2 berperan dalam aktivasi NF $\kappa$ B oleh <i>Lactobacillus</i>   |
| 4.  | Hiev, 2004.                  | Pemberian probiotik LGG motif TTTCGTTT oligodeoxy-nucleotida (ODN) 135 meningkatkan mRNA IL-12 dan mRNA IFN- $\gamma$  |
| 5.  | Me'nard, 2004                | Probiotik menurunkan kemampuan agonist TLR dalam aktivasi NF $\kappa$ B  |
| 6.  | Bashir <i>et al.</i> , 2004. | Defisiensi TLR4 pada mencit menyebabkan peningkatan IgE, dan reaksi anafilaktik sedangkan IFN- $\gamma$ menurun dalam merespons alergen Ara h 1 (PN) dibandingkan pada TLR4 normal.<br>Pemberian antibiotik pada mencit menyebabkan peningkatan IgE, dan reaksi anafilaktik sedangkan IFN- $\gamma$ menurun dalam merespons alergen Ara h 1 (PN) dibandingkan dengan yang tak diberi, baik pada TLR4 normal maupun mutant atau defisien. |

Syarat dari terapi medis, termasuk terhadap penyakit alergi, adalah terapi tersebut dapat dievaluasi secara sistematis menggunakan metode evaluasi yang tidak bias, universal, diperoleh melalui metode penelitian ilmiah yang baku, tidak bertentangan dengan pandangan masyarakat ilmuwan dan senantiasa terbuka untuk diuji kebenarannya. Untuk itu digunakan pendekatan terapi melalui Kedokteran Berbasis Bukti (*Evidence Based Medicine*) berupa uji klinik (Ashcroft, 2004).

Pada uji klinik terhadap probiotik (ditampilkan pada Tabel 2.3) telah dibuktikan bahwa probiotik dapat menurunkan gejala alergi yang berhubungan dengan dermatitis atopik dan alergi makanan (Isolauri *et al.*, 2000; Rosenfeldt *et al.*, 2003), mencegah penyakit atopik dini pada anak dengan risiko tinggi alergi (Kalliomäki, 2001), mencegah dermatitis atopik pada 2 tahun pertama kehidupan anak (Rautava *et al.*, 2002), memodifikasi mikrobiota usus anak atopi sehingga mampu mencegah reaksi alergi pada penderita (Isolauri, 2002), pada penderita dermatitis atopik menurunkan gejala klinik (Viljanen *et al.*, 2004; Rosenfeldt *et al.*, 2004), pada penderita Rinitis Alergika menurunkan gejala klinik (Wang *et al.*, 2004), pada anak Alergi Susu Sapi meningkatkan kadar IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, kadar IgA fecal dan E-selectine (Pohjavouri, *et al.*, 2004; Viljanen *et al.*, 2005a; Viljanen *et al.*, 2005b), dan pada penderita atopik mampu meningkatkan kadar IL-10, menurunkan kadar IL-12 dan IFN- $\gamma$  (Hart *et al.*, 2004).

Manfaat pendekatan terapi alergi melalui Kedokteran Berbasis Bukti telah diakui, namun tidak dapat disangkal bahwa masih banyak yang mengkhawatirkan kredibilitas epistemologinya. Baku emas dari Kedokteran Berbasis Bukti adalah *randomised controlled clinical trial (RCT)* yang dianggap benar, memuaskan dengan *blinding* yang memadai (Ashcroft, 2004).



**Tabel 2.5 Kaitan teori imunologi dan fakta empirik tentang mekanisme probiotik dalam penurunan reaksi alergi**

| Reaksi alergi  | Teori imunologi  | Fakta hasil penelitian probiotik   |
|--|--|--|
| Tahap aktivasi sel-sel immuno-kompeten (APC, DC, Sel T Naive)                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>Sistem imun <i>innate</i> dipusatkan pada aktivasi NF-<math>\kappa</math>B, (Zhang dan Ghosh, 2001).</li> <li>TLR2 dan TLR 4 berperan dalam aktivasi NF<math>\kappa</math>B. (Matsuguchi, 2003 )</li> <li>TLR 2 dan 4 berperan dalam peningkatan IFN-<math>\gamma</math> serta penurunan IL-4, IL13 dan eosinofil. (Revelt <i>et al.</i>, 2005)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Probiotik menurunkan kemampuan agonist TLR dalam aktivasi NF<math>\kappa</math>B (Mc'nard <i>et al.</i>, 2004)</li> <li>TLR2 berperan dalam aktivasi NF<math>\kappa</math>B oleh <i>Lactobacillus</i> (Matsuguchi, 2003)</li> </ul>   |
| Tahap aktivasi sel-sel struktural. (T <sub>H1</sub> , T <sub>H2</sub> dan Treg.) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hampir semua TLR mengontrol induksi respons imun ke arah T<sub>H1</sub> (Miettinen <i>et al.</i>, 2001; Murch, 2001; Miettinen <i>et al.</i>, 1998).</li> <li>Sebagian besar TLR mengontrol aktivasi Limfosit T<sub>H1</sub> (Matsuguchi, 2003).</li> <li>TLR2 mampu mengontrol aktivasi Limfosit T<sub>H2</sub> (Umetsu <i>et al.</i>, 2002; Eder, 2004)</li> <li>TLR4 mengontrol optimalisasi aktivasi Limfosit T<sub>H2</sub> (Dabbagh <i>et al.</i>, 2002).</li> <li>TLR4 mampu mengaktivasi Limfosit T<sub>H1</sub> dan T<sub>reg</sub>. (Drachenberg <i>et al.</i>, 2003; Mothes, 2003).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Probiotik menginduksi Limfosit T<sub>H1</sub> (Matsuzaki dan Chin, 2000; Lambrecht, 1998; Schon <i>et al.</i>, 1991).</li> <li>Probiotik menginduksi Limfosit T<sub>reg</sub> (Prioult, 2003; von der Weid <i>et al.</i>, 2001; Murch, 2001; Isolauri <i>et al.</i>, 2000).</li> <li>Probiotik menginduksi Limfosit T<sub>H1</sub> dan T<sub>reg</sub> melalui reseptor di APC. (Hart <i>et al.</i>, 2004; Christensen <i>et al.</i>, 2002; Miettinen <i>et al.</i>, 1998; Matsuguchi, 2003; Miettinen <i>et al.</i>, 2001; Murch, 2001).</li> <li>Probiotik meningkatkan IFN<math>\gamma</math>, IL-12, TGF-<math>\beta</math> dan IL-10, serta menurunkan IL-4 dan IL-5 (von der Weid <i>et al.</i>, 2001)</li> <li><i>Lactobacillus paracasei</i> (NCC 2461), <i>Lactobacillus johnsonii</i> (NCC 533) and <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (NCC 362) pada mencit yang disensitisasi BLG, menurunkan IgE, IgG1 dan IgG2a (Prioult <i>et al.</i>, 2003)</li> <li>Probiotik 1.GG motif TTTCGTT oligodeoxy- nucleotida (ODN) 135 meningkatkan mRNA IL-12 dan mRNA IFN<math>\gamma</math> (Iliev <i>et al.</i>, 2004)</li> </ul> |

Namun peran *RCT* dalam Kedokteran Berbasis Bukti menimbulkan kontroversi dalam beberapa hal antara lain *RCT* (hampir semuanya) merupakan solusi dari metodologi ke epistemologi klinik yang tak menghasilkan informasi eksplanasi dan hubungan sebab akibat. Diakui bahwa pada umumnya *RCT* telah memberikan yang benar, dipercaya dan digunakan secara luas di riset klinik (Ashcroft, 2004).

Pemakaian probiotik dalam terapi alergi selalu disertai oleh pertanyaan bagaimana mekanisme kerjanya dan di mana organ targetnya. Walaupun beberapa uji klinik menunjukkan dampak yang bermakna pada penurunan reaksi alergi, namun banyak praktisi klinis yang belum mantap dengan mekanisme kerjanya. Sejauh ini beberapa penelitian biomolekuler mengenai probiotik yang berusaha mengetahui mekanisme kerja probiotik menunjukkan bahwa terdapat kemampuan probiotik cukup beragam dalam modulasi respons imun, namun sayang karena problem etik, banyak penelitian yang hanya dapat dilaksanakan pada hewan coba (Tabel 2.4)

### 2.5.1 Probiotik dan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B.

Peran TLR2 dan TLR4 berkaitan dengan aktivasi faktor transkripsi *NF- $\kappa$ B* dan produksi sitokin. Probiotik *Lactobacillus GG* telah terbukti mampu menginduksi respons imun  $T_H1$  mukosa melalui *NF- $\kappa$ B* dan aktivasi protein *Toll-related* seperti TLR2 dan TLR4 (Furie, 2005; Murch, 2001). Aktivasi faktor transkripsi ini dikontrol dengan beberapa cara. Terdapat beberapa faktor transkripsi yang mengontrol ekspresi gen. Semua faktor transkripsi berfungsi dengan dikenali elemen respons dari promoter spesifik dalam gen yang diregulasi dan pengikatan dengan DNA yang disertai polimerisasi RNA untuk memulai proses transkripsi (Tripathi dan Aggarwal, 2006).

Aktivasi faktor transkripsi ini dikontrol dengan beberapa cara yakni melalui: (1). sintesis protein (misal: *homeoprotein*): (2). fosforilasi (*heat shock protein responsible element recognizing transcription factors, HSTF*) atau defosforilasi (*AP1*) protein; (3). ikatan dengan ligan (reseptor steroid); (4). perubahan ikatan *partner* pada protein (*helix-loop-helix proteins*); dan (5). pelepasan inhibitor (*NF- $\kappa$ B*) (Tripathi dan Aggarwal A. 2006).

Pada tingkatan molekuler, sistem imun *innate* yang dipusatkan pada aktivasi dari *NF- $\kappa$ B* mempunyai kemampuan menginduksi transkripsi dari beberapa sitokin proinflamasi, kemokin, molekul adesi, dan NO dalam merespons stimulasi oleh sinyal yang berhubungan dengan patogen atau stres. Selain itu *NF- $\kappa$ B* mengontrol ekspresi dari banyak gen adaptif, seperti protein MHC dan gen penting untuk regulasi proses apoptosis (Zhang dan Ghosh, 2001).

Kloning sub-unit *NF- $\kappa$ B* menghasilkan famili protein yang dikenal sebagai domain *Rel homology* yang dilibatkan pada pengikatan dengan DNA. Terdapat 5 anggota famili pada manusia yang diidentifikasi, yaitu: *NF- $\kappa$ B1* (*p50/p105*), *NF- $\kappa$ B2* (*p52/p100*), *p65* (*RelA*), *RelB*, dan *c-Rel*. Bentuk klasik adalah heterodimer subunit *p50* dan *p65*. *NF- $\kappa$ B* berada dalam sitoplasma dalam bentuk tidak aktif bersama dengan protein regulator I- $\kappa$ B. Yang paling penting dari inhibitor ini adalah  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ , dan nuclear  $\zeta$ , yang mempunyai spesifitas yang berbeda namun tumpang tindih dalam regulasi gen tertentu di berbagai jaringan. Translokasi dan aktivasi *NF- $\kappa$ B* biasanya sebagai hasil fosforilasi dan degradasi dari inhibitor. *NF- $\kappa$ B* dapat berfungsi dalam keterpaduan dengan faktor transkripsi yang lain seperti misal *AP-1* (Tripathi dan Aggarwal, 2006)

### 2.5.2 Induksi TLR, T<sub>H1</sub>, Treg dan T<sub>H2</sub> oleh probiotik

TLR menentukan respons imun adaptif ke arah T<sub>H1</sub>, Treg maupun T<sub>H2</sub>. Mikroorganisme tertentu termasuk probiotik, diketahui dapat memodifikasi APC (sebagian melalui TLR), sehingga mereka mampu menginduksi respons imun baik ke arah T<sub>H1</sub> maupun Treg. TLR2 dan 4 diketahui mempunyai peran penting dalam polarisasi respons imun oleh paparan mikrobiota (Iwasaki dan Medzhitov, 2004; Supajatura, 2002).

TLR pada umumnya mengontrol induksi respons imun ke arah T<sub>H1</sub> (Iwasaki dan Medzhitov, 2004). Sebagian besar TLR mengontrol aktivasi Limfosit T<sub>H1</sub>. Dari beberapa penelitian *in vivo* didapatkan bahwa patogen-patogen tertentu misal bakteri gram positif dapat mengaktivasi TLR2 untuk menginduksi respons imun ke arah T<sub>H1</sub> (Iwasaki dan Medzhitov, 2004). Juga ditemukan bahwa aktivasi komponen *lipoteichoic acid* probiotik melalui TLR2 pada tikus menghasilkan TNF- $\alpha$  (Matsuguchi, 2003).

Beberapa laporan menunjukkan bahwa TLR2 mampu menginduksi diferensiasi respons imun ke arah T<sub>H2</sub>. Aktivasi melalui reseptor CD14 dan TLR2 dapat menginduksi deviasi respons imun baik ke arah T<sub>H1</sub> maupun T<sub>H2</sub>, tergantung pada konsentrasi LPS yang dipajankan. TLR4 sel dendritik mempunyai peran pada optimalisasi respons imun ke arah T<sub>H2</sub>, sehingga apabila terjadi defisiensi TLR4, respons imun adaptif ke T<sub>H2</sub> akan terganggu (Hornet, 2006).

Walaupun ada penelitian yang melaporkan bahwa TLR4 pada sel dendritik mempunyai peran optimalisasi respons imun ke arah T<sub>H2</sub>, namun ada juga penelitian yang menunjukkan bahwa TLR4 mampu menginduksi diferensiasi respons imun ke arah T<sub>H1</sub>. Apabila antigen berupa LPS hirupan dosis rendah, maka TLR4 menginduksi respons imun ke arah T<sub>H2</sub>. Sedangkan apabila antigen berupa LPS hirupan dosis tinggi,

maka TLR4 menginduksi respons imun ke arah  $T_H1$  (Eisenbarth, 2002). Aktivasi melalui TLR4 juga dilaporkan dapat menginduksi respons imun  $T_{reg}$  (Eisenbarth, 2002; Pasare dan Medzhitov, 2003). Saat ini TLR4 merupakan target dari berbagai uji klinik mengenai terapi alergi (Drachenberg *et al.*, 2003; Mothes, 2003).

### 2.5.3 Probiotik dan reaksi alergi

Mekanisme kerja probiotik dalam menurunkan reaksi alergi belum jelas, walaupun banyak penelitian telah dilakukan. Bukti-bukti mengenai input spesifik dari flora usus/fekal ke sistem imun *innate* sangat penting untuk kelangsungan toleransi imun mukosa. Walaupun beberapa uji klinik menunjukkan dampak yang bermakna pada penurunan reaksi alergi, namun mekanisme penurunan masih tidak jelas (Murch, 2001).

Beberapa penelitian biomolekuler mengenai probiotik menunjukkan kemampuan probiotik yang cukup beragam dalam memodulasi respons imun yaitu menginduksi produksi sitokin  $T_H1$  (IL-12, IL-18 dan IFN- $\gamma$ ) pada sel-sel mononuklir darah perifer manusia (Miettinen *et al.*, 1998), menginduksi produksi sitokin  $T_H1$  (IL-12, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$ ) pada sel-sel limpa tikus (Matsuzaki dan Chin, 2000), menginduksi populasi  $CD4^+$  *Tcell* yang memproduksi sitokin IL-10 dan TGF- $\beta$  pada sel-sel limpa tikus (von der Weid *et al.*, 2001), memodulasi respons imun ke arah  $T_H1$ ,  $T_H2$  dan  $T_{reg}$  melalui sel target DC (dari sel-sel sumsum tulang tikus) dengan faktor penentu berupa jenis mikroflora usus dan jenis probiotik (Christensen *et al.*, 2002), menghasilkan TNF- $\alpha$  karena aktivasi komponen *lipoteichoic acid* probiotik melalui TLR2 pada sel makrofag tikus (Matsuguchi, 2003), mencegah reaksi alergi susu sapi pada mencit dengan

Tidak semua bakteri probiotik mempunyai efek sama dalam menurunkan reaksi alergi, dan tidak semua dermatitis alergi (DA) patogenezisnya sama (Murch, 2001). Diduga penurunan reaksi alergi yang terjadi karena pemberian probiotik adalah sebagai hasil dari peningkatan kadar IL-10 dan TGF- $\beta$ . Toleransi terhadap aeroalergen (sebagai hasil imunoterapi) maupun alergen susu sapi ternyata terjadi berkaitan dengan produksi IL-10 yang merupakan IgG4 isotype switch factor (Nouri-Aria, 2004) dan produksi TGF- $\beta$  yang merupakan IgA isotype switch factor (Frossard *et al.*, 2004).

Diduga penurunan reaksi alergi yang terjadi karena pemberian probiotik berhubungan dengan peningkatan kadar IFN- $\gamma$ . Imunoterapi aeroalergen telah terbukti berhasil menimbulkan toleransi terhadap aeroalergen melalui deviasi respons imun dari T<sub>H2</sub> ke T<sub>H1</sub> sehingga didapatkan peningkatan kadar IFN- $\gamma$  yang merupakan IgG isotype switch factor (Nouri-Aria, 2004).

Dengan terbentuknya kompleks IgE-IgG maka akan terjadi ko-agregasi reseptor inhibitory Fc- $\gamma$  RIIIb dengan reseptor berafinitas tinggi Fc $\epsilon$ RI-IgE (Daeron, 1995) yang akan menghasilkan hambatan sinyal Fc $\epsilon$ RI (Zhu *et al.*, 2002; Malbec, 1998). Selain itu adanya kompleks IgE-IgG juga dapat menghambat presentasi alergen ke sel T (Wachholz *et al.*, 2003) dan menghambat respons imun ke T<sub>H2</sub> (Chatchatee *et al.*, 2001).

Apabila respons imun regulasi di mukosa yang diperankan T<sub>reg</sub> yang memproduksi IL-10 dan TGF- $\beta$  berkembang dengan baik, maka sel-sel plasma akan memproduksi J-chain yang mengandung IgA dimer dan IgA polimer yang akan memperkuat fungsi pertahanan epitel dengan mengeksklusi alergen sebelum alergen tersebut menimbulkan reaksi alergi (Brandtzaeg, 2002).

Sampai saat ini masih banyak ketidakpastian dari terapi alergi yang menggunakan probiotik, ketidakpastian tersebut meliputi:

1. Spesifisitas dari efek probiotik. Efek probiotik dapat berbeda antar spesies bahkan antar *strain specific* yang satu dengan yang lain, contoh antara *Lactobacillus* strain yang satu dengan strain yang lain (Matto *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 1997)
2. Dosis probiotik. Dosis probiotik efektif agar dapat menimbulkan efek, selama ini adalah  $10^9$  CFU/ hari. Yang sering dipertanyakan adalah, apakah dosis itu sama apabila dipakai pada individu dengan makanan penyerta, pH asam lambung, motilitas usus dan komposisi flora normal yang berbeda (McCartney *et al.*, 1996; Saxelin *et al.*, 1991).
3. Mekanisme biologis. Walaupun efek biologis dan imunologis sudah banyak diteliti, namun temuan-temuan yang sekarang telah ada belum banyak dapat secara memuaskan meyakinkan klinisi untuk menggunakannya dalam terapi alergi. Penelitian secara terintegrasi mengenai mekanisme probiotik dalam menimbulkan efek, misal dalam menurunkan reaksi alergi, perlu dilakukan dengan lebih mendalam (Boyle *et al.*, 2006)
4. Mekanisme imunologis. Sampai saat ini efek imunologis dari mikrobiota probiotik masih belum jelas. Mengapa probiotik *Lactobacillus GG* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis pada individu sehat, sedangkan pada individu alergi susu sapi probiotik *Lactobacillus GG* menurunkan aktivitas fagositosis? Jawaban terhadap fenomena ini masih dalam dugaan dan fakta empirik yang telah ada belum mampu menjawab. Sejauh ini masih diduga bahwa mekanisme imunologis probiotik adalah

melalui jalur homeostasis yang dimediasi oleh TLR yang bersifat kurang spesifik dan jalur yang dimediasi oleh strain spesifik probiotik yang bersifat spesifik. (Steidler *et al.*, 2003; Pessi *et al.*, 2000; Peltto *et al.*, 1998).

## 2.6 Pemodelan Reaksi Alergi pada Hewan Coba

Penelitian pada hewan coba dapat dipergunakan untuk mencari bukti efek terapeutik, keamanan dan efek samping dari suatu bahan atau senyawa tertentu. WHO telah merekomendasikan keharusan melakukan uji biokimia dan toksisitas bahan tertentu sebelum obat tersebut digunakan pada manusia. Walaupun nilai prediksi hewan dan interpretasi yang berkenaan dengan aplikasi untuk manusia jauh dari mutlak atau absolut, cara kerja suatu senyawa dapat serupa dengan yang berlaku pada manusia.

Kriteria pemilihan hewan coba yang akan digunakan untuk menguji cara kerja, efek terapeutik, keamanan dan efek samping dari suatu bahan atau senyawa tertentu, adalah meliputi hal-hal berikut : (1) Berat badan hewan kurang dari 1 kg; (2). Mudah diambil darahnya dan jumlah darah yang dapat diambil cukup banyak; (3). Mudah dikendalikan; (4). Dalam memberikan materi mudah dilakukan dari berbagai rute; (4). Mudah dipelihara di laboratorium dan mudah dikembangbiakkan; (5). Lama hidup relatif singkat; (6). Fisiologinya diperkirakan identik atau sesuai dengan manusia yang dituju. (Kusumawati, 2005).

### 2.6.1 *Mus musculus* Balb/c

*Mus musculus* adalah hewan yang sering digunakan sebagai organisme model untuk penelitian sistem imun pada *Homo sapiens*. Sekuens genom pada mencit dan manusia tersusun dengan organisasi yang sangat mirip dengan banyak kesamaan (homolog).



Mencit termasuk dalam *genus Mus, subfamily Murinae, family Muridae, order Rodentia*. Pada umur 4 minggu beratnya mencapai 18-20 gram, sedangkan pada umur 8-12 minggu berat mencapai 20-40 gram. Lama hidup 1-3 tahun, memiliki temperatur tubuh sekitar 36,5 °C, frekuensi nafas sekitar 163 kali per menit. Kebutuhan makan setiap hari adalah 4-5 gram, dengan komposisi ideal protein 20-25 %, lemak 5-12 %, serat kasar 2,5 % dan karbohidrat 45-60 % (Fox *et al.*, 1984).

Untuk model percobaan alergi, mencit yang biasa digunakan adalah mencit yang memiliki bias genetik respons imun ke arah  $T_H2$ , yaitu *Mus musculus* Balb/c. Pada umumnya mencit Balb/c mudah sekali menginduksi respons ke arah  $T_H2$  setelah mengalami infeksi tertentu misal oleh *L. major* atau imunisasi alergen misal Ovalbumin atau BSA (Scott dan Scharton, 1994; Chatelain *et al.*, 1992; Scott, 1991)

Mekanisme respons imun ke arah  $T_H2$  pada Balb/c ditandai dengan kadar IL-4 yang cepat meningkat setelah infeksi atau imunisasi alergen dan ekspresi IL-12R yang hilang serta IFN- $\gamma$  yang menurun. Yang membedakan dengan mencit strain lain, mencit Balb/c memiliki kemampuan mengekspresikan STAT4 dan produksi IFN- $\gamma$  yang lebih rendah, sehingga sangat mudah mengalami deviasi sistem imun ke arah  $T_H2$  (Kuroda *et al.*, 2002; Scott dan Scharton, 1994; Chatelain *et al.*, 1992; Scott, 1991)

### 2.6.2 Induktor Reaksi Alergi

Pemodelan reaksi alergi menggunakan mencit Balb/c telah banyak dilakukan pada berbagai penelitian yang mempelajari efektivitas dan mekanisme kerja obat-obatan penurun reaksi alergi. Jenis-jenis induktor reaksi alergi (alergen) yang sering digunakan adalah ovalbumin, bovine serum albumin (BSA), peanut agglutinin dan potato agglutinin.

Rute yang biasa digunakan untuk menginduksi reaksi alergi adalah injeksi subkutan, intraperitoneal, per-oral, dan jalur saluran nafas dengan *nebulizer*. Sedangkan bahan penyerta atau pelarut alergen yang digunakan adalah aluminium hidroksida dan PBS (Dearman *et al.*, 2003; Atherton *et al.*, 2002).

Proses sensitisasi alergen yang biasa dilakukan pada penelitian uji efektivitas suatu bahan atau obat-obatan anti alergi terdiri dari 3 tahap proses, yaitu: (1). Sensitisasi awal pada minggu pertama, biasanya melalui rute injeksi intraperitoneal dengan bahan alergen yang dikombinasi dengan Aluminium Hidoksida; (2). Sensitisasi ke dua, dilakukan pada akhir minggu ke 3, biasanya melalui injeksi intraperitoneal dengan bahan alergen yang dilarutkan dalam PBS; (3). Sensitisasi ke tiga, dilakukan pada minggu keempat, biasanya melalui pemberian per oral atau nebulizer dengan dosis alergen yang tinggi dan biasanya dilarutkan dalam PBS (Hsieh *et al.*, 2003; Morokata *et al.*, 2000).

Respons mencit Balb/c terhadap induktor alergenik biasanya dinilai dari produksi IL-4, IL-5, IgE spesifik dan IgG1 spesifik, sedangkan untuk kelompok perlakuan dengan bahan atau obat-obatan anti alergi indikator keberhasilannya biasanya ditambahkan penilaian terhadap produksi IFN $\gamma$  dan IgG2a spesifik (Dearman *et al.*, 2003; Hsieh *et al.*, 2003; Morokata *et al.*, 2000).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pada pengukuran respons mencit Balb/c terhadap dosis dan jenis bahan-bahan alergenik, kadar IL-4 dan IgE spesifik menunjukkan hasil yang paling akurat, sedangkan pada pengukuran respons mencit Balb/c terhadap dosis dan jenis bahan-bahan anti alergenik, kadar IFN $\gamma$  dan IgG2a

spesifik menunjukkan hasil yang paling akurat (Dearman *et al.*, 2003; Atherton *et al.*, 2002 ; Hsieh *et al.*, 2003; Morokata *et al.*, 2000).

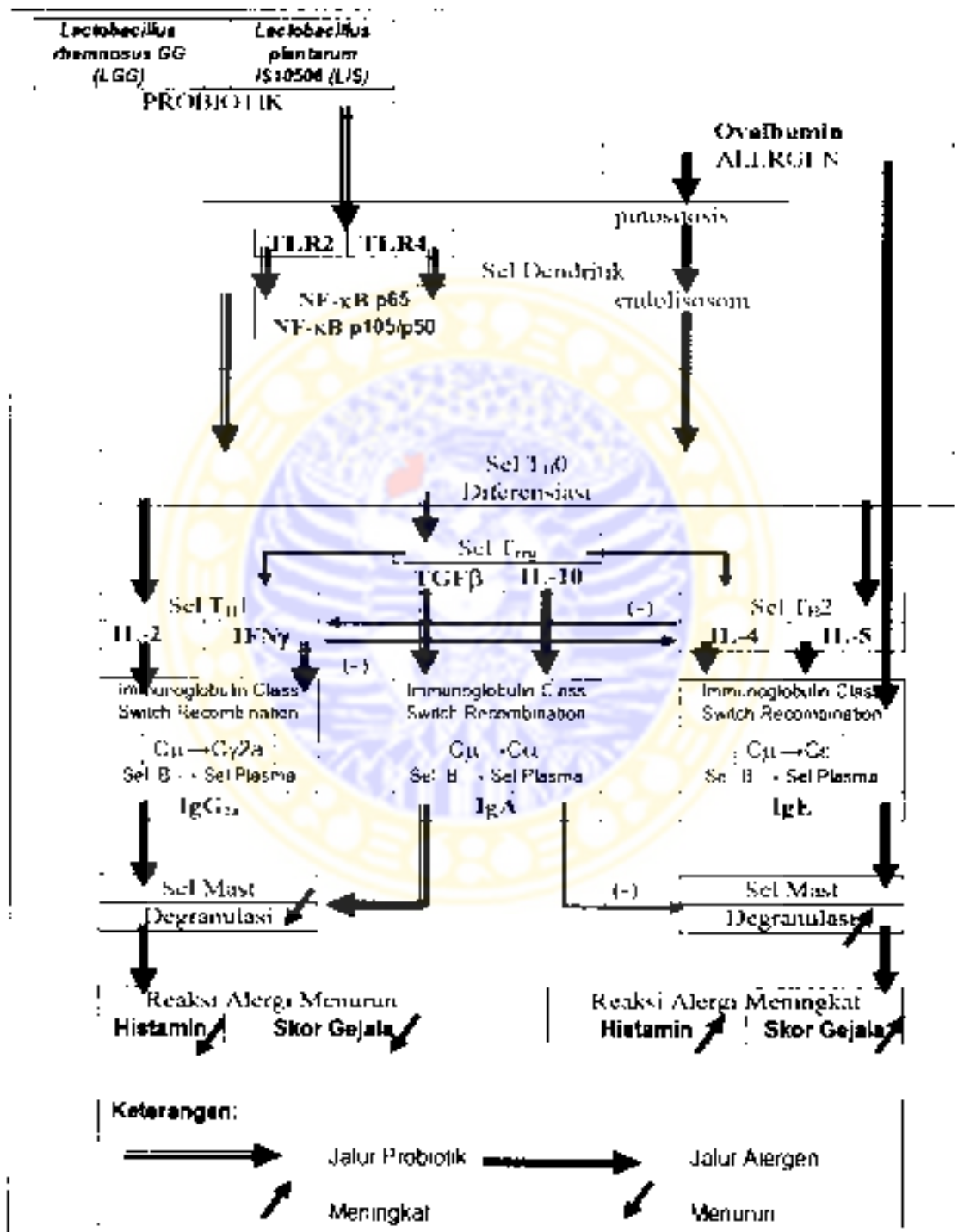
### 2.6.3 Pengendalian Ekspresi TLR

Pengendalian ekspresi TLR sering diperlukan dalam suatu penelitian yang ingin mengetahui peran TLR dalam suatu respons imun *host* terhadap senyawa tertentu. Pengendalian ekspresi TLR dapat dilakukan melalui agonis TLR dan antagonis TLR. Senyawa yang dapat mengendalikan ekspresi TLR pada penelitian di laboratorium baik yang dilakukan secara *in vivo* pada hewan coba maupun secara *in vitro* dikenal senyawa agonis TLR dan antagonis/inhibitor TLR. Senyawa antagonis atau inhibitor TLR, yang digunakan untuk penelitian ini adalah inhibitor TLR4 LY294002 dan inhibitor TLR2 PD98059.

Bab 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual



Sensitisasi ovalbumin pada mencit Balb/c menghasilkan respons patobiologis berupa reaksi alergi yang ditandai oleh peningkatan histamin dan skor gejala. Setelah melewati proses pinositosis dan endositosis, ovalbumin oleh sel dendritik diproses menjadi peptida dan dipresentasikan *MHC-II* pada limfosit  $T_H0$  yang selanjutnya berdiferensiasi menjadi limfosit yang memproduksi *IL-4* dan *IL-5* (limfosit  $T_H2$ ) (Prussin dan Metcalfe, 2006; Platts-Mills *et al.*, 2001).

*IL-4* (sitokin yang diproduksi limfosit  $T_H2$ ) - yang sudah meningkat setelah pemberian ovalbumin pertama - menecetuskan *Immunoglobuline Class Switch Recombination* (C $\mu$ →C $\epsilon$ ) menuju sintesis IgE, proliferasi limfosit B, pembentukan sel B memori dan ekspansi produk klon IgE (Oettgen dan Geha, 2003; Platts-Mills *et al.*, 2001). Pada paparan ovalbumin berikutnya, limfosit B memori mampu secara langsung memproduksi IgE dan interaksi antara IgE spesifik, ovalbumin dan sel mast menghasilkan degranulasi sel mast yang berakibat pelepasan histamin. Interaksi histamin dengan reseptor histamin pada target organ menimbulkan gejala alergi (Prussin dan Metcalfe, 2006)

Pemberian probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* IS 10506 (LIS) pada mencit Balb/c yang disensitisasi ovalbumin akan meningkatkan ekspresi TLR2 dan TLR4, karena probiotik LGG dan LIS memiliki komponen *peptidoglycan* dan *teichoic acid* yang merupakan ligan TLR2 dan TLR4 (Sansonetti, 2006; Saito, 2004). Peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4 akan diikuti oleh kaskade sinyal TLR dan aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B p65 dan atau NF- $\kappa$ B p105/p50 yang mempengaruhi tingkat kesiagaan dan kualitas persepsi (*stress perception*)

mencit Balb/c dalam menghadapi stresor ovalbumin yang mengancam (Sansone, 2006; Eder *et al.*, 2004; Dabbagh *et al.*, 2003; Drachenberg *et al.*, 2003; Mothes 2003).

Melalui TLR2 dan TLR4, komunikasi alur-lintas (*cross-talk*) baik antara probiotik LGG maupun LIS dengan *host* dapat terjadi secara intensif untuk memantau ketidaksesuaian respons *host* menghadapi alergen sehingga persepsi *host* dalam merespon stresor ovalbumin dapat ditindaklanjuti dengan modulasi respons imun *innate* dan adaptif sehingga kondisi toleransi imunologis dan homeostasis dapat dicapai melalui perbaikan keseimbangan  $T_H1$ - $T_{reg}$ - $T_H2$  yang didukung oleh peningkatan respons imun adaptif  $T_H1$ ,  $T_{reg}$  (Mohammadzadeh *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2004; Hiev *et al.*, 2004; Poljavori. *et al.*, 2004; Von der Weid *et al.*, 2001) dan penurunan  $T_H2$  (Horner, 2006; Zhu *et al.*, 2002; Wachholz *et al.*, 2003). Bila kondisi homeostasis terbentuk, maka degranulasi sel mast menurun dan toleransi imunologis terjadi (Sansone, 2006).

Sitokin yang diproduksi oleh sel  $T_H1$  (IL-2 dan IFN- $\gamma$ ) mencetuskan proses *Immunoglobuline Class Switch Recombination* ( $C_\mu \rightarrow C\gamma2\alpha$ ). IgG2a membentuk kompleks dengan IgE dan menurunkan reaksi alergi melalui penghambatan pada sinyal Fc $\epsilon$ RI, penurunan presentasi alergen ke limfosit T dan penghambatan respons imun  $T_H2$  (Zhu *et al.*, 2002; Wachholz *et al.*, 2003). Sedangkan sitokin yang diproduksi oleh  $T_{reg}$  (IL-10 dan TGF- $\beta$ ) mencetuskan *Immunoglobuline Class Switch Recombination* ( $C_\mu \rightarrow C\alpha$ ) menuju sintesis IgA yang dalam bentuk sekretorik menurunkan reaksi alergi melalui eksklusi alergen (Brandtzaeg, 2002). IL-2 dan IFN- $\gamma$  menghambat produksi sitokin  $T_H2$  (Karlsson *et al.*, 2004; Tiemessen *et al.*, 2004; Nouri-Aria *et al.*, 2004; Frossard *et al.*, 2004) sehingga dominasi  $T_H2$  berkurang dan reaksi alergi menurun.

### 3.2 Hipotesis penelitian

1. Probiotik LGG dan LIS menurunkan reaksi alergi pada mencit Balb/c melalui peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4, serta NF $\kappa$ B p65 dan p105/p50 pada sistem imun *innate* yang berhubungan dengan peningkatan respons imun adaptif T<sub>H1</sub> dan T<sub>reg</sub>, serta penurunan respons imun adaptif T<sub>H2</sub>.
2. Terdapat keterlibatan TLR2 dan TLR4 dalam penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS pada mencit Balb/c melalui modulasi respons imun *innate* dan adaptif yang berhubungan dengan pembentukan keseimbangan T<sub>H1</sub>-T<sub>reg</sub>-T<sub>H2</sub> baru dari keseimbangan yang didominasi oleh T<sub>H2</sub>.



**Bab 4****MATERI DAN METODE PENELITIAN****4.1 Rancangan Penelitian**

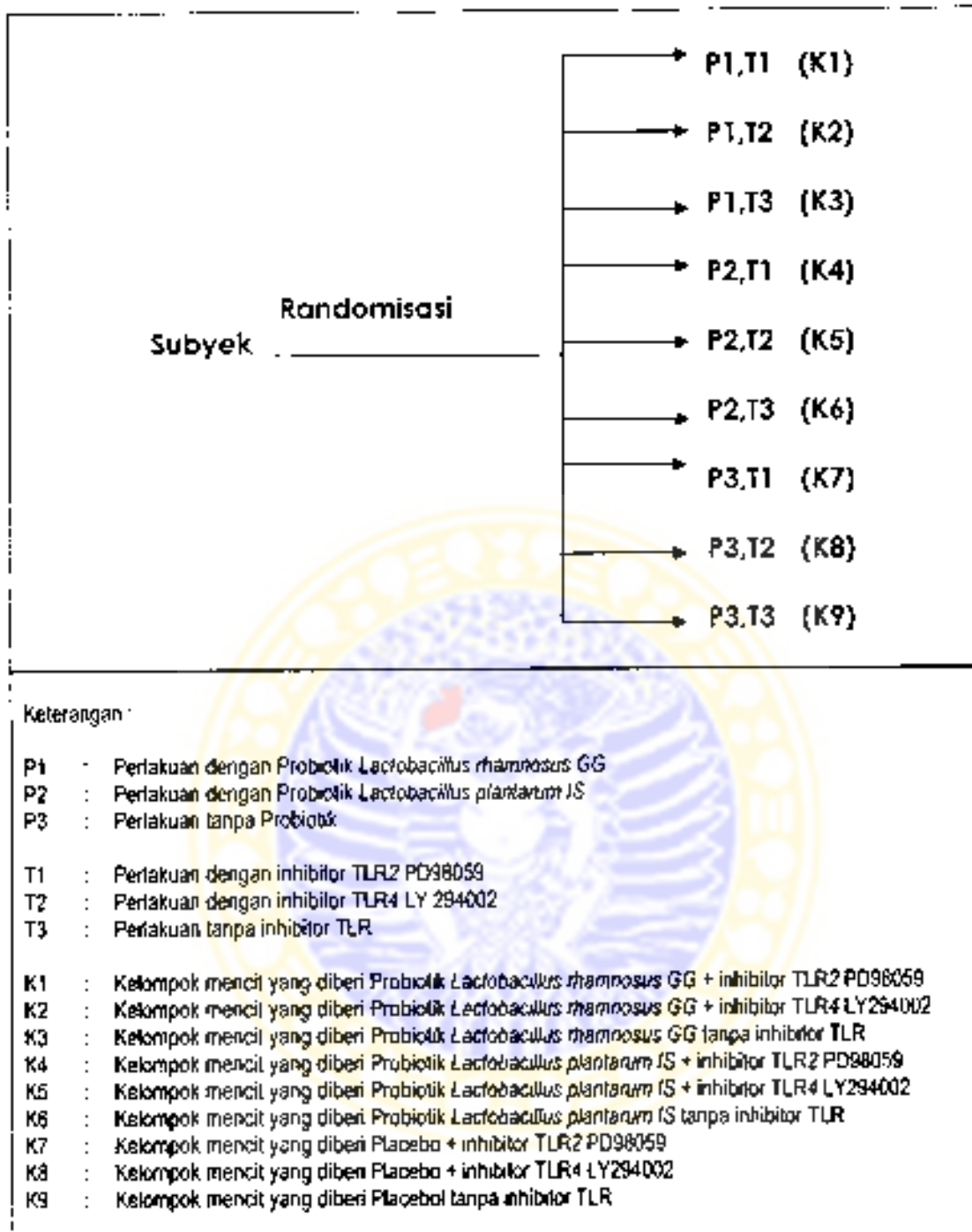
Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental. Sampel maupun perlakuan diharapkan terkendali, terukur, dan pengaruh perlakuan dapat lebih dipercaya. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai reaksi alergi yang membaik karena probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* IS 10506 (LIS) yang berkaitan dengan ekspresi TLR2 dan TLR4.

Rancangan penelitian disusun untuk membuktikan bahwa pemberian probiotik LGG dan LIS menurunkan reaksi alergi melalui peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4, serta NF- $\kappa$ B p65 dan p105/p50 pada sistem imun *innate* yang berhubungan dengan peningkatan respons imun adaptif TH1 dan T regulator, serta penurunan respons imun adaptif TH2.

Rancangan yang digunakan adalah *Factorial Design*, untuk mengetahui efek kombinasi dua perlakuan pada unit eksperimen dengan pengukuran variabel yang hanya dilakukan setelah pemberian perlakuan dan memiliki kriteria sebagai berikut: (Pratiknya, 2003; Zainuddin, 1995; Hulley *et al.*, 1988)

1. Pengambilan sampel dilakukan secara acak
2. Ada suatu pengulangan / replikasi
3. Ada kontrol pembanding





**Gambar 4.1 Bagan Pengelompokan Subyek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan hewan coba *Balb/c mice* dengan kontrol, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 yang tidak sama subyek, namun diambil dari strain populasi yang sama. Sampel yang diteliti homogen dalam jenis kelamin, umur dan berat badan.

Untuk meningkatkan validitas interna, saat pembagian sampel menjadi 9 kelompok dilakukan dengan alokasi *random (random assignment)* yang menggunakan bilangan *random*. Kemudian data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan statistik inferensial untuk mencapai tujuan penelitian.

## **4.2 Sampel, besar sampel dan teknik pengambilan sampel**

### **4.2.1 Sampel**

Sampel penelitian menggunakan mencit BALB/c jantan yang diperoleh dari Balai Penelitian Veteriner Bogor, dewasa, jantan, umur 8-12 minggu, berat badan antara 17-20 gram, dengan alasan perubahan berat badan selama penelitian relatif kecil (Hume, 1972).

### **4.2.2 Besar sampel**

Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus replikasi. Replikasi adalah banyaknya suatu perlakuan dalam suatu percobaan. Replikasi mempengaruhi jumlah ulangan ( $r$ ) dari suatu penelitian. Jumlah ulangan ( $r$ ) tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan dan kualitas pengendalian keragaman yang mempengaruhi percobaan (bahan, alat, media dan lingkungan). Kualitas pengendalian keragaman dijamin dengan memberikan kondisi yang homogen untuk lingkungan, media dan alat-alat yang berkaitan dengan pemberian perlakuan serta mendiskripsikan secara jelas bahan-bahan perlakuan yang digunakan (Hanafiah, 2004). Selanjutnya dengan pertimbangan-pertimbangan di atas, digunakan rumus besar sampel sebagai berikut :

$$(t_1-1)(t_2-1)(r-1) \geq 20$$

$t_1$  = jumlah perlakuan jenis pertama ( $t_1=3$ )

$t_2$  = jumlah perlakuan jenis kedua ( $t_2=3$ )

$r$  = jumlah ulangan

Sehingga perhitungan untuk memperoleh nilai  $r$ , adalah:

- $(1-1)(2-1)(r-1) \geq 20$ ;
- $(3-1)(3-1)(r-1) \geq 20$ ;
- $4(r-1) \geq 20$ ;
- $4r-4 \geq 20$ ;
- $r \geq (20+4)/4$
- $r \geq 6$

Oleh karena dari hasil perhitungan diperoleh angka minimal 6 untuk setiap kelompok, maka jumlah sampel secara keseluruhan adalah 54 ekor mencit BALB/c.

#### 4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Mencit *BALB/c* Hewan didapat dari Institusi penyedia yang memiliki kualifikasi standar dan reputasi yang baik (Balai Penelitian Veteriner Bogor). Sebelum digunakan sebagai subyek penelitian, hewan dilakukan evaluasi klinis dan dikondisikan dalam lingkungan yang sesuai (selama 14 x 24 jam) untuk meyakinkan bahwa hewan tersebut tidak berpenyakit atau tidak berpotensi menularkan penyakit. Sebelum mendapatkan perlakuan penelitian, dilakukan skrining dengan beberapa kriteria, yaitu:

1. Kriteria Inklusi;
  - a. Usia 8-12 minggu.
  - b. Jenis kelamin jantan.
  - c. Berat badan 17-20 gram.

3. Pemberian injeksi intraperitoneal inhibitor TLR PD98059
4. Pemberian injeksi intraperitoneal inhibitor TLR LY 294002

#### 4.3.2 Variabel kendali

1. Mencit jantan BALB/c
2. Kandang mencit
3. Pakan pelet
4. Minuman aqua
5. Pemeliharaan mencit
6. Metode pemeriksaan
7. Cara pemberian dan dosis bahan perlakuan
8. Jumlah fekal bakteri patogen *E coli* dan *Coliform* mencit

#### 4.3.3 Variabel tergantung

1. Ekspresi TLR2
2. Ekspresi TLR4
3. Ekspresi faktor transkripsi NFkB p105/p50
4. Ekspresi faktor transkripsi NFkB p65
5. Sel limfosit penghasil IL-2
6. Sel limfosit penghasil IFN- $\gamma$
7. Sel limfosit penghasil IL-10
8. Sel limfosit penghasil TGF- $\beta$
9. Sel limfosit penghasil IL-4
10. Sel limfosit penghasil IL-5

11. Kadar IgE total serum
12. Kadar IgF serum spesifik OVA
13. Kadar IgG2a serum spesifik OVA
14. Kadar IgA serum spesifik OVA
15. Kadar IgA jaringan mukosa ileum OVA
16. Kadar histamin
17. Skor gejala klinik setelah paparan OVA

#### 4.3.4 Definisi operasional variabel

- 1) **Mencit**: mencit (*Mus musculus*) galur BALB/c, jantan, dewasa, berumur 8-12 minggu, dan berat badan antara 17-20 gram yang berasal dari kandang hewan percobaan Badan Penelitian Veteriner (Balitvet) Bogor.
- 2) **Pemberian probiotik**: pemberian secara oral *Lactobacillus rhamnosus* GG (*GeneBank accession n° AY370682*) atau *Lactobacillus plantarum* IS 10506 (*GeneBank accession n° DQ860148*) dalam media skim 1% melalui sonde lambung setiap hari selama 28 hari dengan dosis  $10^8$  CFU/ hari dalam volume 0,2 cc.
- 3) **Sensitisasi alergi**: sensitisasi alergi pada *Mus musculus* galur BALB/c yang dilakukan dalam 3 tahap, yaitu pada hari ke 4, ke 20 dan ke 30 dengan dosis secara berurutan adalah 100 ml Ovalbumin intraperitoneal 10 µg dalam AlOH<sub>3</sub>, 20 µg dalam PBS dan 50 mg dalam PBS.
- 4) **Pemberian inhibitor TLR intraperitoneal** : pemberian injeksi intraperitoneal 20 µg inhibitor TLR PD98059 dalam 0,10 larutan DMSO atau 10µg inhibitor TLR LY 294002 dalam 0,10 larutan DMSO sesuai dengan kelompok perlakuan.

- 5) **Eksresi TLR2 dan TLR4:** ekspresi protein reseptor TLR2 dan TLR4 yang diukur dengan menggunakan teknik pemeriksaan imunohistokimia dari spesimen jaringan ileum mencit paska perlakuan.
- 6) **Eksresi faktor transkripsi NF $\kappa$ B p105/p50 dan NF $\kappa$ B p65:** ekspresi protein NF- $\kappa$ B p105/p50 dan NF- $\kappa$ B p65 yang diukur dengan menggunakan teknik pemeriksaan imunohistokimia dari spesimen jaringan ileum mencit paska perlakuan.
- 7) **Tingkat respons imun adaptif TH1:** tingkat respons imun yang diukur secara kuantitatif dari jumlah limfosit penghasil IL-2 dan IFN- $\gamma$  dengan teknik imunohistokimia dari spesimen jaringan ileum mencit paska perlakuan.
- 8) **Tingkat respons imun adaptif T<sub>regulator</sub>:** tingkat respons imun yang diukur secara kuantitatif dari jumlah limfosit penghasil IL-10 dan TGF- $\beta$  dengan teknik imunohistokimia dari spesimen jaringan ileum mencit paska perlakuan.
- 9) **Tingkat respons imun adaptif TH2:** tingkat respons imun yang diukur secara kuantitatif dari jumlah limfosit penghasil IL-4 dan IL-5 dengan teknik imunohistokimia dari spesimen jaringan ileum tikus paska perlakuan.
- 10) **Kadar IgG<sub>2a</sub>:** Kadar Immunoglobulin G2a spesifik OVA serum mencit paska perlakuan yang diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- 11) **Kadar IgA:** Kadar Immunoglobulin A spesifik OVA serum dan hasil kerokan dari 3 cm mukosa ileum mencit paska perlakuan yang diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

- 12) **Kadar IgE:** Kadar Immunoglobulin E total maupun spesifik OVA serum mencit paska perlakuan yang diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- 13) **Kadar histamin:** Kadar histamin plasma mencit paska perlakuan yang diperiksa dengan metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- 14) **Skor gejala:** Skor yang secara kuantitatif dihitung dari gejala yang timbul setelah dilakukan sensitisasi dengan 200  $\mu$ L (50mg) Ovalbumin (250mg/mL dalam PBS) sampai 30 menit sesudahnya, dengan perincian skor 0 apabila tak ada gejala/tanda-tanda; skor 1= apabila terdapat tanda *scratching /rubbing* di sekitar hidung/kepala/ekor.; skor 2= apabila terdapat bengkak di sekeliling mata dan mulut. *pilar erecti*, aktivitas berkurang, atau aktivitas yang menurun disertai peningkatan frekuensi pernafasan; skor 3= apabila ada wheezing, usaha bernafas dengan susah payah, dan sianosis di sekitar mulut dan ekor; skor 4= apabila ada penurunan atau tidak adanya aktivitas setelah *prodding*, atau tremor dan konvulsi; dan skor 5= apabila tikus mati.
- 15) **Penurunan reaksi alergi:** Penurunan kadar histamin dan atau penurunan skor gejala.

#### 4.4 Bahan penelitian

##### 4.4.1 Hewan coba yang dikenai perlakuan

*Mus musculus* BALB/c yang memenuhi kriteria inklusi dan dikeksklusi sesuai dengan paragraf 4.2.4 di atas mendapatkan pembagian kelompok sesuai hasil randomisasi.

Selama proses percobaan dilakukan:

- 1) Pengawasan dan pengamatan yang meliputi :

- a) Perilaku hewan (perilaku makan/minum, kondisi mental dan psikis, kewaspadaan dan sebagainya) dan tanda-tanda klinis penting (berat badan, suhu tubuh, pola nafas, syok, anafilaksis, perdarahan, diare, mual, muntah, gangguan sistem saraf, paralisis, kebutaan kejang dan sebagainya) yang dapat digunakan untuk memantau kesehatan mencit.
- b) Kondisi lingkungan: suhu, kelembaban dan kondisi kandang yang lain seperti: ventilasi, kebisingan, polusi, banjir dan sebagainya.
- c) Persediaan makanan: kecukupan makanan sesuai standart untuk mencit, dengan komposisi protein 20-25%, lemak 5-12%, serat kasar 2.5%, dan karbohidrat 45-60%
- d) Pengamatan efek samping dan komplikasi setelah pemberian materi penelitian pada mencit meliputi perilaku hewan (perilaku makan/minum, kondisi mental dan psikis, kewaspadaan dan sebagainya) dan tanda-tanda klinis penting (berat badan, suhu tubuh, pola nafas, syok, anafilaksis, perdarahan, diare, mual, muntah, gangguan sistem saraf, paralisis, kebutaan kejang dan sebagainya) setelah pemberian materi per oral (probiotik) atau injeksi (Ovalbumin, PBS, dan inhibitor TLR), serta setelah pengambilan sampel darah pada akhir penelitian dari ekor setelah mencit dianaestesi
- e) Pengamatan gejala (*symptoms*) *systemic anaphylaxis-like* dilakukan dalam 30 menit setelah pemberian Ovalbumin pertama, kedua dan ke tiga
- f) Pengamatan respons imun melalui pemeriksaan laboratorium dilakukan: (1). Setelah mencit dianaestesi dan diambil spesimen darahnya; (2). Setelah dilakukan euthanasia untuk kepentingan pemeriksaan jaringan dan imunohistokimia.



- 2) Pengamanan hewan agar tidak mengganggu lingkungan sekitar :
  - a) Kandang ditempatkan pada lokasi yang tidak mengganggu kehidupan masyarakat sekitar.
  - b) Limbah hewan (sisa makanan, kotoran, jasad hewan setelah dilakukan euthanasia, dan sisa-sisa jaringan) dikelola sesuai dengan standar yang berlaku (dilakukan dekontaminasi dan insenerasi) agar tidak menimbulkan polusi.
  - c) Pengelolaan kandang dan limbah hewan dilakukan oleh tenaga terlatih dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### 4.4.2 Bahan perlakuan

- 1) Probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG grade P (concentrated freeze-dried bacterial powder, batch number B50130) diperoleh dari Valio Ltd R&D Finlandia (GeneBank accession n° AY370682).
- 2) Probiotik *Lactobacillus plantarum* IS10506 (concentrated freeze-dried bacterial powder) strain asli Indonesia (GeneBank accession n° DQ860148). Probiotik ini dibiakkan dan dikirim langsung penelitiannya dari *Functional Foods Forum* Universitas Turku Finlandia oleh DR. Ingrid S Soetono, Ir. MSc dari SEAMEO TROPED RCCN Universitas Indonesia.
- 3) Inhibitor TLR PD98059 (*MAP Kinase Kinase Inhibitor*) diperoleh dari produsen InvivoGen Amerika Serikat dengan nomor katalog tlr-pd98.
- 4) Inhibitor TLR LY 294002 (*Phosphatidylinositol 3-kinase Inhibitor*) diperoleh dari produsen InvivoGen Amerika Serikat dengan nomor katalog tlr-ly29.
- 5) Ovalbumin (*Albumin Chicken Egg Grade V*) yang diperoleh dari Sigma-Aldrich Jerman dengan nomor katalog A.5503.

#### 4.4.3 Bahan pemeriksaan laboratorium

- 1) Antibodi monoklonal terhadap *Toll-Like Receptor 2* (TLR2, CD282) mencit dari HyCult Biotechnology Belanda dengan nomor katalog HMI047.
- 2) Antibodi monoklonal terhadap *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) / MD-2 mencit dari HyCult Biotechnology Belanda dengan nomor katalog MON 4032.
- 3) Antibodi monoklonal terhadap faktor transkripsi NF- $\kappa$ B p105/p50 mencit dari Abcam Inggris dengan nomor katalog ab18313.
- 4) Antibodi monoklonal terhadap faktor transkripsi NF- $\kappa$ B p65 mencit dari Biovision Amerika Serikat dengan nomor katalog 3012-100.
- 5) Antibodi monoklonal (Purified anti-mouse) terhadap IL-2 mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog 503701.
- 6) Antibodi monoklonal (LEAF™ Purified anti-mouse) terhadap IFN- $\gamma$  mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog ab505705.
- 7) Antibodi monoklonal (Purified anti-mouse) terhadap IL-10 mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog 505001.
- 8) Antibodi monoklonal terhadap TGF- $\beta$  mencit dari Abcam Inggris dengan nomor katalog ab27969.
- 9) Antibodi monoklonal (Purified anti-mouse) terhadap IL-4 mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog 504101.
- 10) Antibodi monoklonal (Purified anti-mouse) terhadap IL-5 mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog 504301.
- 11) Bahan untuk Deteksi Antibodi yang terikat pada antigen di jaringan ileum (Imunohistokimia):

- a) Ultra V Block dari LabVisioan Corporation Amerika Serikat dengan nomor katalog TA-060-UB.
  - b) Biotinylated Goat Anti-Polivalent dari LabVisioan Corporation Amerika Serikat dengan nomor katalog TP-060-BN.
  - c) Streptavidin Peroxidase dari LabVisioan Corporation Amerika Serikat dengan nomor katalog TS-060-HR.
- 12) Antibodi monoklonal (Purified anti-mouse) terhadap IgE mencit dari BioLegend Amerika Serikat dengan nomor katalog 406901.
  - 13) IgE mencit (purified mouse IgE) dari Immunology Consultant Laboratory, Inc. Amerika Serikat dengan nomor katalog RS-90E.
  - 14) Antibodi monoklonal terhadap IgG<sub>2a</sub> mencit dari Zymed Laboratories Inc. (berupa Mouse MonoAb-ID Kit) Amerika Serikat dengan nomor katalog 90-6550.
  - 15) IgG<sub>2a</sub> kappa mencit (purified mouse IgG<sub>2a</sub>) dari Immunology Consultant Laboratory, Inc. Amerika Serikat dengan nomor katalog RS-90G<sub>2a</sub> Kappa.
  - 16) Antibodi monoklonal terhadap IgA mencit dari Zymed Laboratories Inc. (berupa Mouse MonoAb-ID Kit) Amerika Serikat dengan nomor katalog 90-6550.
  - 17) IgA mencit (purified mouse IgA) dari Immunology Consultant Laboratory, Inc. Amerika Serikat dengan nomor katalog RS-90A-K.
  - 18) Bahan-bahan untuk pemeriksaan IgE total serum mencit dalam bentuk *mouse serum IgE ELISA Kit* diperoleh dari Alpha Diagnostic Amerika Serikat dengan nomor katalog 6370.

- 19) Bahan-bahan untuk pemeriksaan kadar histamin plasma mencit dalam bentuk *Histamin ELISA Kit* diperoleh dari IBL Hamburg Jerman dengan nomor katalog RE59221.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan adalah:

- 1) Metode *skoring* dari Hsieh dan kawan-kawan (2003) untuk menilai gejala alergi.
- 2) Metode imunohistokimia dari Suidiana (2004) untuk deteksi sel penghasil TLR2, TLR4, NF $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p105/p50, IFN $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10; IL-4 dan IL-5.
- 3) Metode *Indirect ELISA* untuk mengukur kadar IgE, IgG<sub>2a</sub>, IgA serum dan ileum spesifik OVA (Rantam, 2005).
- 4) Metode *Sandwich ELISA* untuk mengukur kadar IgE total serum.
- 5) Metode *Competitive ELISA* untuk mengukur kadar histamin plasma.
- 6) Metode *Most Probable Number/MPN* dan *Total Plate Count/TPC* untuk pemeriksaan fekal *E. coli*, *Coliform* dan Bakteri Asam Laktat.

#### 4.6 Waktu dan lokasi penelitian

1. Penelitian di kandang hewan coba:
  - a. Fase adaptasi selama 2 minggu di Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
  - b. Fase perlakuan dan pengamatan gejala selama 30 hari di Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dengan persiapan bahan perlakuan di Laboratorium Imunologi dan Virologi Bagian Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

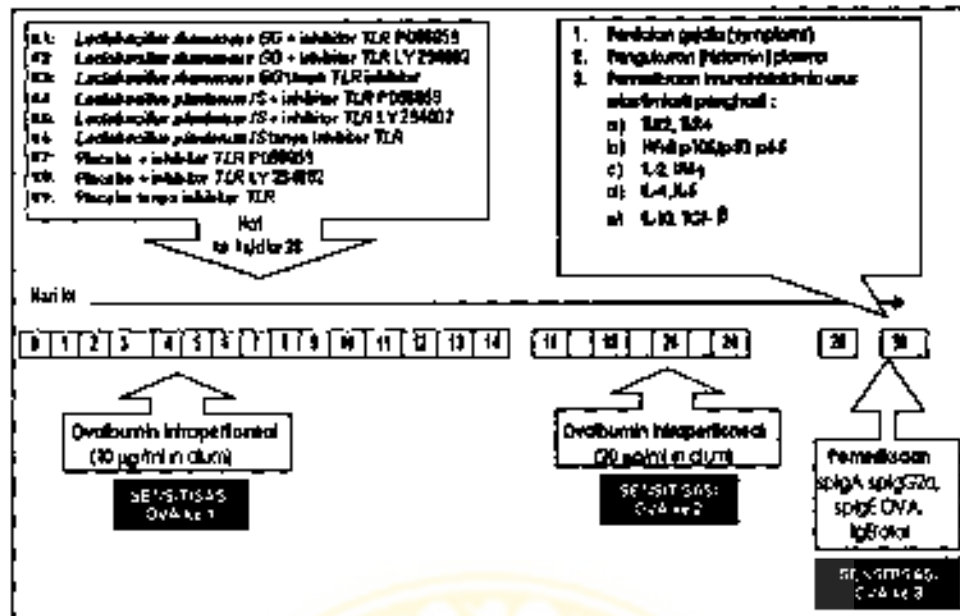
2. Penelitian di laboratorium (terhadap spesimen serum, jaringan mukosa ileum dan jaringan hewan):
  - a. Pemeriksaan bakteriologis di Laboratorium Bakteriologi Bagian Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
  - b. Pemeriksaan kadar antibodi menggunakan metode *Indirect, Competitive* dan *Sandwich ELISA* di Laboratorium Imunologi dan Virologi Bagian Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
  - c. Pemeriksaan jumlah limfosit penghasil dengan teknik imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran (Gramik) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

#### **4.7 Prosedur penelitian, pengambilan dan pengumpulan data**

##### **4.7.1 Prosedur penelitian**

Proposal penelitian telah diajukan pada Komisi Etik (*Animal Care and Use Committe*) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Pengesahan kelayakan etik telah diberikan dalam sertifikat sebagaimana yang dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Setelah mencit beradaptasi terhadap lingkungan kandang laboratorium selama 2 minggu, perlakuan dikerjakan sesuai dengan kelompoknya sebagaimana pada Gambar 4.2, dengan prosedur rinci sesuai dengan yang tertulis pada **Lampiran 2** (Prosedur Kerja Pemberian Ovalbumin, Probiotik, inhibitor TLR dan Pengamatan Gejala).



Gambar 4.2 Bagan Prosedur Penelitian

Pada akhir eksperimen, darah vena mencit diambil sebanyak 150  $\mu$ L untuk pemeriksaan kadar IgE, IgG<sub>2b</sub>, IgA serum dan 150  $\mu$ L untuk pemeriksaan kadar histamin plasma. Selanjutnya hewan coba dikorbankan, jaringan ileum diambil untuk persiapan pemeriksaan imunohistokimia.

Prosedur kerja lengkap mulai dari persiapan sampel sampai pemeriksaan imunohistokimia ditulis pada Lampiran 3. Sedangkan prosedur kerja mulai dari persiapan sampel sampai pemeriksaan ELISA ditulis pada Lampiran 4. Untuk pemeriksaan bakteriologis, prosedur kerja mulai dari persiapan sampel sampai pemeriksaan ditulis pada Lampiran 5 buku ini.

#### 4.7.2 Pengambilan dan pengumpulan data

Data yang dimasukkan sebagai hasil penelitian dikumpulkan dalam bentuk data primer. Untuk menjamin reliabilitas dan validitasnya, penelitian dilakukan di laboratorium yang standar dan mempunyai :

1. Peralatan lengkap dan pengalaman memadai dalam pemeliharaan hewan coba. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan di Kandang Hewan Coba di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang memiliki peralatan dan tenaga yang standar.
2. Peralatan lengkap dan pengalaman memadai dalam pemeriksaan ELISA. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan di Laboratorium Imunologi dan Virologi Bagian Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dibawah bimbingan konsultan yang berkualifikasi Doktor.
3. Peralatan lengkap dan pengalaman memadai dalam pemeriksaan Imunohistokimia. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan di Laboratorium Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran (Gramik) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dibawah bimbingan konsultan yang berkualifikasi Doktor.

Reliabilitas dan validitas penelitian dicapai melalui langkah-langkah berikut :

1. Untuk menjamin realibilitas, pada evaluasi obyek pengamatan yang sama peneliti menggunakan tenaga peneliti atau tenaga laboratorium yang sama.
2. Untuk menjamin validitas, pada penilaian variabel penelitian dipilih alat dan bahan uji yang mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi, konsisten dan dapat dipertanggungjawabkan.
3. Peneliti (dengan konsultasi pada tim promotor dan tenaga ahli/konsultan) mengelola, mengawasi dan memantau sendiri berbagai tahap pelaksanaan penelitian yang meliputi: pengadaan hewan coba, perlakuan pada hewan coba, penilaian gejala, pengambilan spesimen, pengadaan bahan, pemakaian, bahan dan alat, pemeliharaan bahan dan alat, pemeriksaan spesimen dan pengumpulan data penelitian.

#### 4.8 Pengolahan dan analisa data

Untuk kebutuhan inferensial, maka data hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan beberapa uji statistik, yaitu:

1. **Uji homogenitas.** Untuk meyakinkan bahwa sampel berasal dari populasi yang berat badan dan umurnya homogen, dilakukan uji homogenitas dengan Anova.
2. **Uji normalitas.** Untuk menguji apakah data berasal dari distribusi normal dilakukan uji Normalitas menggunakan frequency histogram dari Kolmogorov dan Normal Probability Plot. Uji ini merupakan prasyarat uji Manova.
3. **Uji konsistensi pengamatan.** Untuk mengetahui apakah tidak ada perbedaan antara pengamat I dan II digunakan uji konsistensi. Apabila distribusi data normal digunakan Manova, apabila distribusi data tidak normal digunakan uji korelasi *Spearman Rank*.
4. **Uji perbedaan efek utama, efek sederhana dan efek interaksi.** Untuk menguji perbedaan efek pada masing-masing kelompok pemaparan, dilakukan uji statistik dengan Anova/Anova Factorial untuk data yang berdistribusi normal, dan digunakan uji statistik Kruskal Wallis A dan Kendall Tau untuk data yang berdistribusi tidak normal
5. **Analisis alur hubungan.** Untuk menguji alur hubungan dari berbagai variabel yaitu: "probiotik" yang diwakili oleh *Lactobacillus rhamnosus GG* dan *Lactobacillus plantarum JS*; "respons imun innate" yang diwakili TLR2, TLR 4 dan NF- $\kappa$ B; "respons imun adaptif" yang diwakili IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5 IgE, IgG<sub>2a</sub> dan IgA serta "reaksi alergi" yang diwakili oleh histamin dan skor gejala secara integral.



## Bab 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

Melalui alokasi random ke dalam 9 kelompok perlakuan dan skrining sebelum perlakuan dengan kriteria inklusi: usia mencit 8-12 minggu, kelamin jantan dengan berat badan 17-20 gram; kriteria eksklusi: hewan terbukti berpenyakit dalam kurun waktu evaluasi klinis, terdeteksi memiliki kelainan bawaan, dan berperilaku sering menyerang anggota kelompok yang lain, serta kriteria putus uji sebagaimana dirinci dalam Bab 4, didapatkan subyek penelitian dengan karakteristik umur dan berat mencit *Balb/c*, sebagaimana Tabel 5.1. Uji homogenitas menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ) pada masing-masing kelompok perlakuan dalam hal umur maupun berat mencit.

**Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Penelitian dalam Umur dan Berat Badan menurut Kelompok Perlakuan**

| Kelompok  | Jenis Perlakuan              | Umur (minggu) |   |       | Berat (gram) |   |       |
|-----------|------------------------------|---------------|---|-------|--------------|---|-------|
|           |                              | n=6           |   |       | n=6          |   |       |
|           |                              | Rerata        | ± | SD    | Rerata       | ± | SD    |
| Probiotik | LGG + inhibitor TLR PD98059  | 11,000        | ± | 0,894 | 17,783       | ± | 0,571 |
| LGG       | LGG + inhibitor TLR LY294002 | 11,500        | ± | 0,837 | 17,717       | ± | 0,581 |
|           | LGG tanpa inhibitor TLR      | 10,833        | ± | 0,753 | 17,767       | ± | 0,731 |
| Probiotik | LIS + inhibitor TLR PD98059  | 10,667        | ± | 0,816 | 17,650       | ± | 0,589 |
| LIS       | LIS + inhibitor TLR LY294002 | 11,333        | ± | 0,816 | 18,017       | ± | 0,649 |
|           | LIS tanpa inhibitor TLR      | 11,333        | ± | 0,816 | 18,150       | ± | 0,677 |
| Tanpa     | PBS + inhibitor TLR PD98059  | 10,667        | ± | 0,816 | 17,950       | ± | 0,423 |
| Probiotik | PBS + inhibitor TLR LY294002 | 11,000        | ± | 0,894 | 18,183       | ± | 0,778 |
|           | PBS tanpa inhibitor TLR      | 10,667        | ± | 0,816 | 17,883       | ± | 0,436 |
| Total     |                              | 11,000        | ± | 0,824 | 17,900       | ± | 0,594 |

Selama berlangsung perlakuan tidak didapatkan efek samping dan komplikasi karena perawatan dan pemberian materi penelitian yang meliputi tanda-tanda klinis penting seperti abnormalitas pola nafas, syok, anafilaksis, perdarahan, diare, muntah, gangguan sistem saraf, paralisis, kebutaan, kejang dan sebagainya.

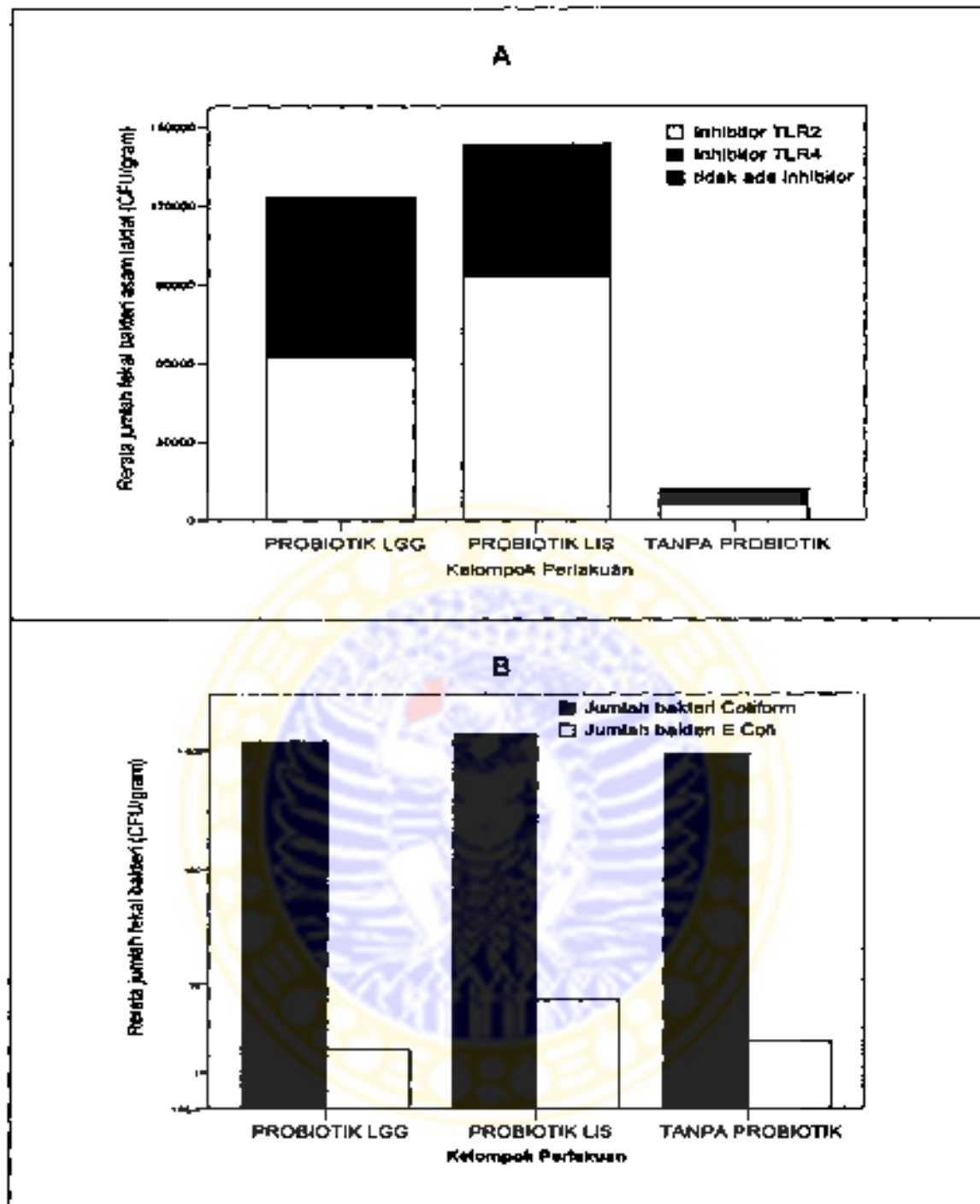
### 5.1 Profil bakteriologis paska perlakuan

Hasil pemeriksaan bakteriologis paska perlakuan menunjukkan bahwa jumlah fekal bakteri asam laktat pada kelompok LGG dan LIS lebih tinggi bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada penelitian ini, pemberian probiotik LGG dan LIS secara efektif telah mencapai tujuannya yaitu mempertahankan viabilitas probiotik LGG dan LIS pada saluran cerna mencit.

Viabilitas probiotik LGG dan LIS pada saluran cerna mencit merupakan syarat untuk memberikan efek pada imunitas *innate* dan adaptif *host* yang dicapai melalui komunikasi alur-lintas (*cross-talk*) dan interaksi antara probiotik baik LGG maupun LIS dengan *host* sehingga kondisi protektif terhadap sensitisasi ovalbumin dapat dicapai.

Jumlah bakteri patogen yang paling sering ditemui pada usus mencit - yaitu *Coliform* dan *Escherichia coli* - paska perlakuan pada kelompok LGG, kelompok LIS dan kelompok kontrol tidak berbeda secara bermakna (Gambar 5.1). Hal ini menunjukkan bahwa faktor perancu yang diperkirakan mempengaruhi imunitas mencit paska perlakuan terkendali.

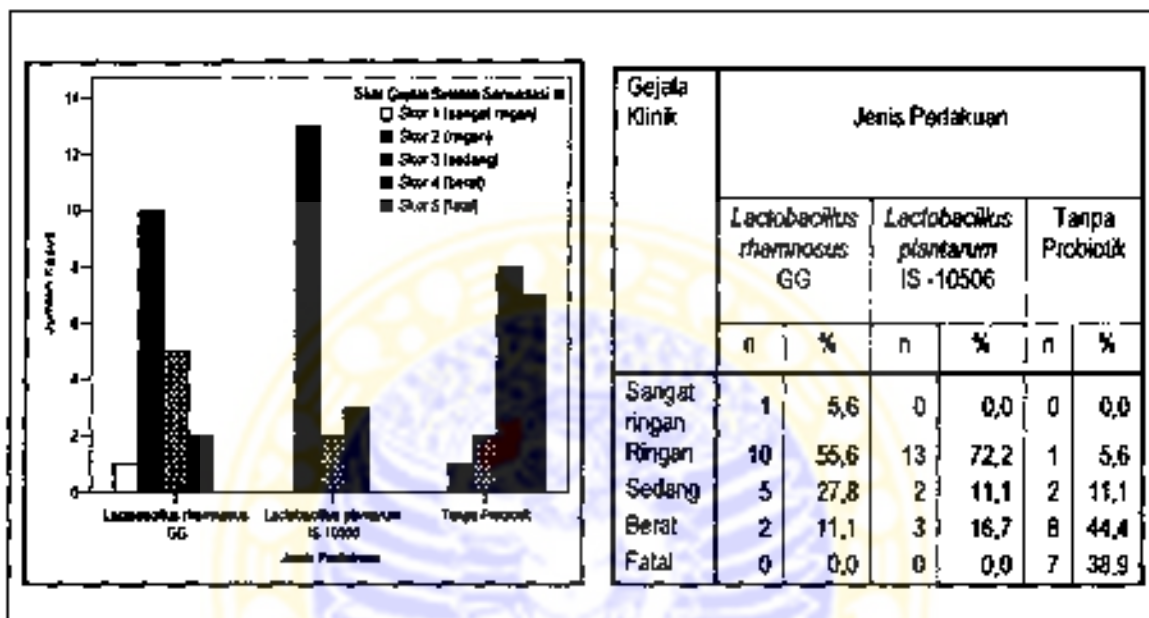
Dengan jumlah fekal bakteri patogen yang sama pada kelompok LGG, kelompok LIS dan kelompok kontrol, maka pengaruh bakteri patogen tersebut pada imunitas mencit dari masing-masing kelompok perlakuan tidak akan berbeda.



**Gambar 5.1** Profil bakteriologis paska perlakuan probiotik LGG dan LIS pada mencit Balb/c yang telah disensitisasi ovalbumin. A. Rerata jumlah fekal bakteri asam laktat paska pemberian perlakuan pada kelompok LGG dan LIS lebih tinggi bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. B. Pada kelompok LGG dan LIS jumlah fekal *Coliform* dan *Eschericia coli* paska perlakuan tidak berbeda bermakna bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## 5.2 Gejala klinik setelah sensitisasi ke 3 ovalbumin

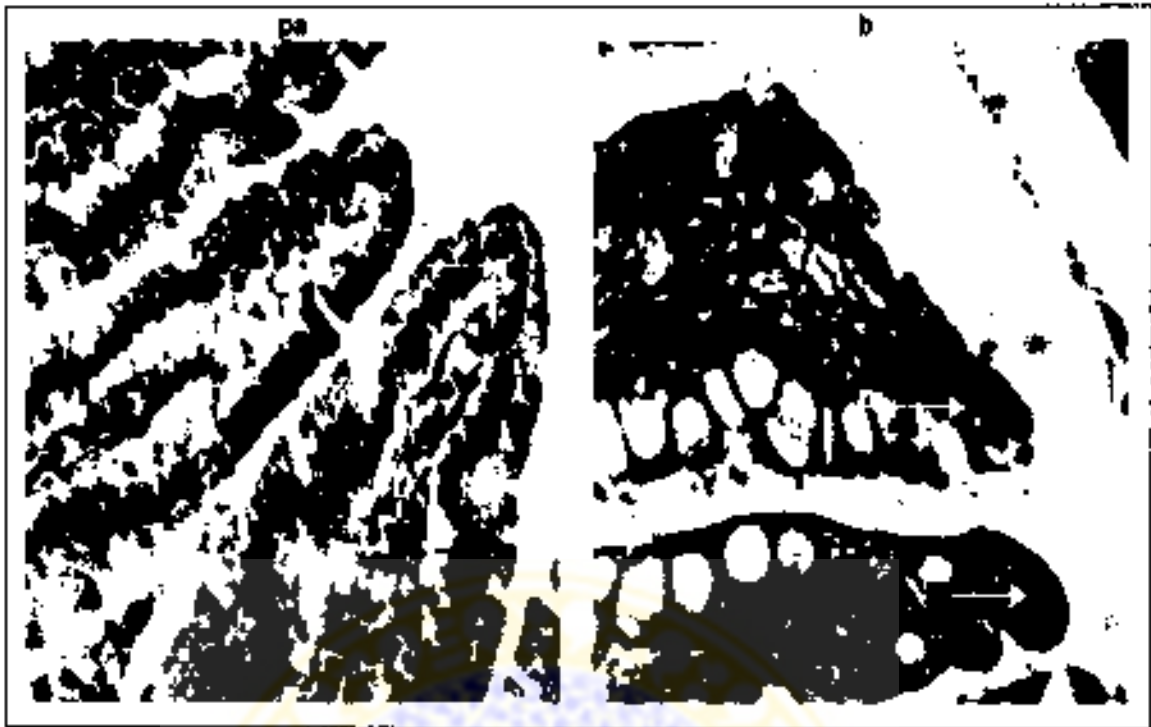
Reaksi alergi yang timbul pada kelompok LGG, LIS dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 5.2. Setelah sensitisasi ovalbumin ke 3, pada kelompok yang mendapatkan perlakuan LGG dan LIS tidak terjadi kasus fatal dan jumlah yang mengalami gejala klinik berat jauh lebih rendah dibanding kelompok kontrol.



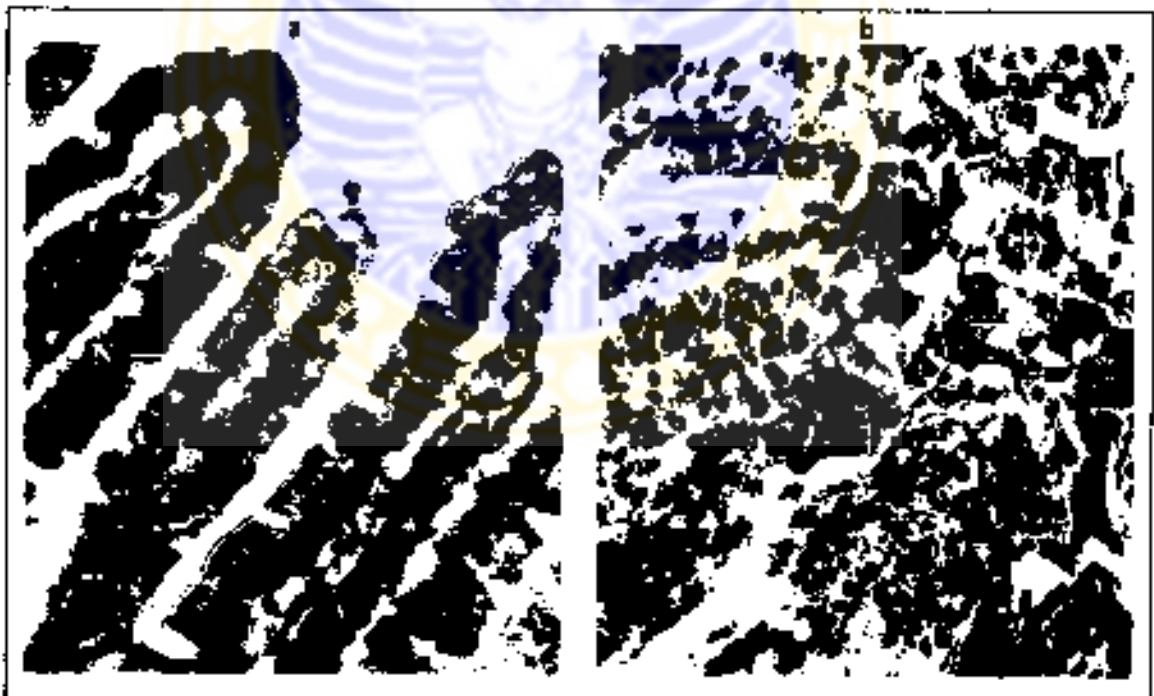
Gambar 5.2 Reaksi alergi yang timbul pada mencit Balb/c yang telah diinduksi oleh ovalbumin menurut masing-masing perlakuan. Reaksi alergi yang timbul pada mencit Balb/c dari kelompok kontrol (kelompok tanpa probiotik) setelah sensitisasi OVA yang ke 3 sebagian besar (82,3 %) sangat parah (44,4 % berat dan 38,9 % fatal). Pada kelompok yang mendapatkan perlakuan LGG, kasus fatal tidak terjadi dan sebagian besar (61,2 %) gejala yang timbul adalah ringan dengan rincian 5,6 % sangat ringan dan 55,6 % ringan. Pada kelompok yang mendapatkan perlakuan LIS kasus fatal juga tidak terjadi dan sebagian besar gejala (72.2 %) yang timbul adalah ringan.

## 5.2 Hasil deteksi TLR2 dan 4, NF- $\kappa$ B dan sitokin dengan metode imunohistokimia

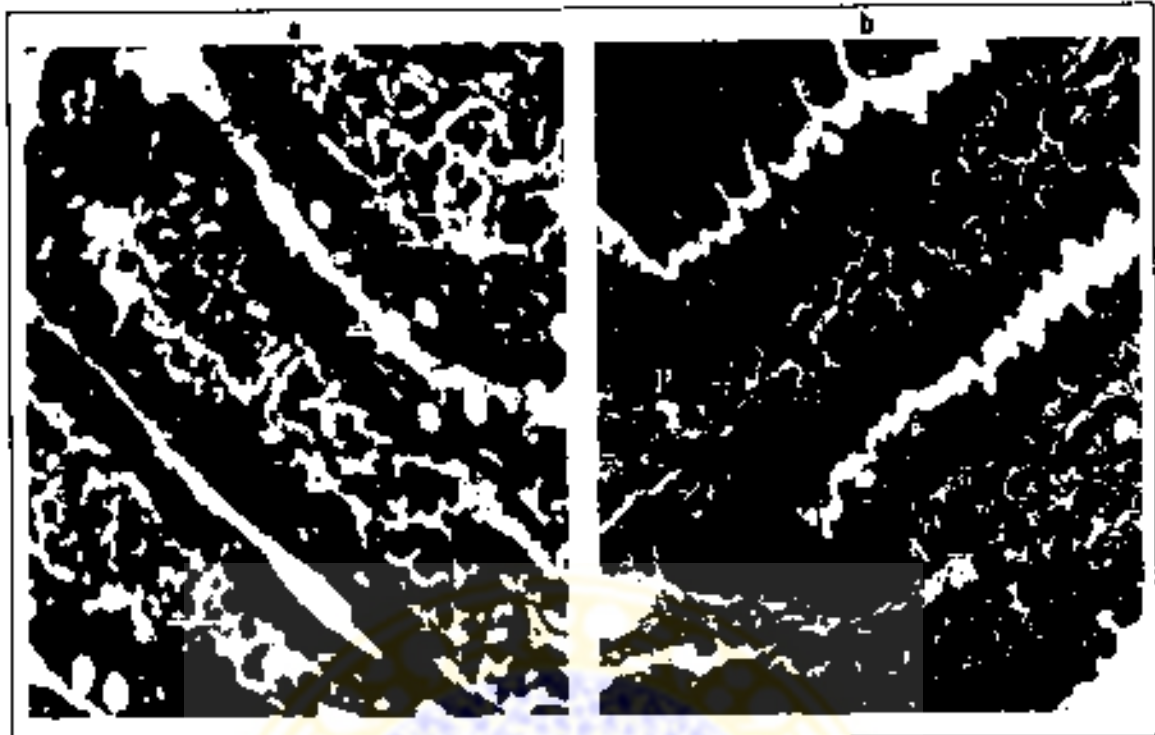
Hasil deteksi *Toll-like receptors* (TLR) 2 dan 4, NF- $\kappa$ B p65 dan p105/p50, IFN $\gamma$  dan IL-2, TGF $\beta$  dan IL-10 serta IL-4 dan IL-5 pada sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia dapat dilihat pada Gambar 5.3, Gambar 5.4, Gambar 5.5, Gambar 5.6, dan Gambar 5.7.



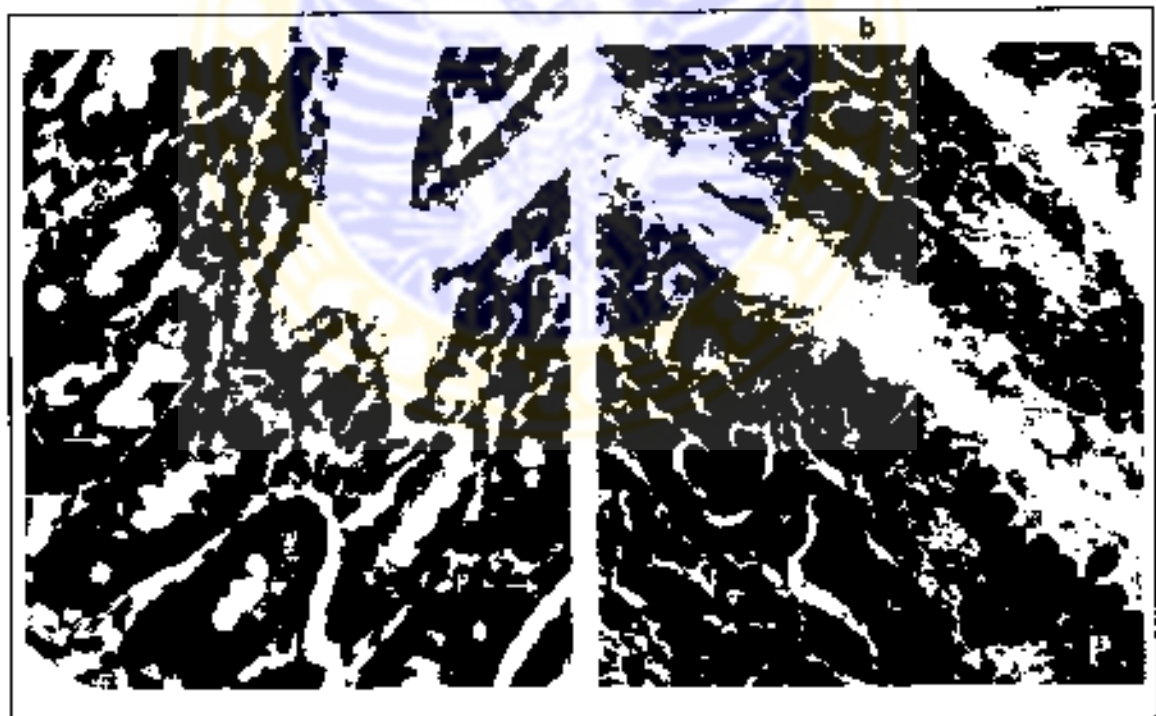
**Gambar 5.3** Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse TLR2 (a) dan TLR4 (b). P: reaksi positif, N: reaksi negatif, sediaan no.D2(a) dan no.G4(b), x 400.



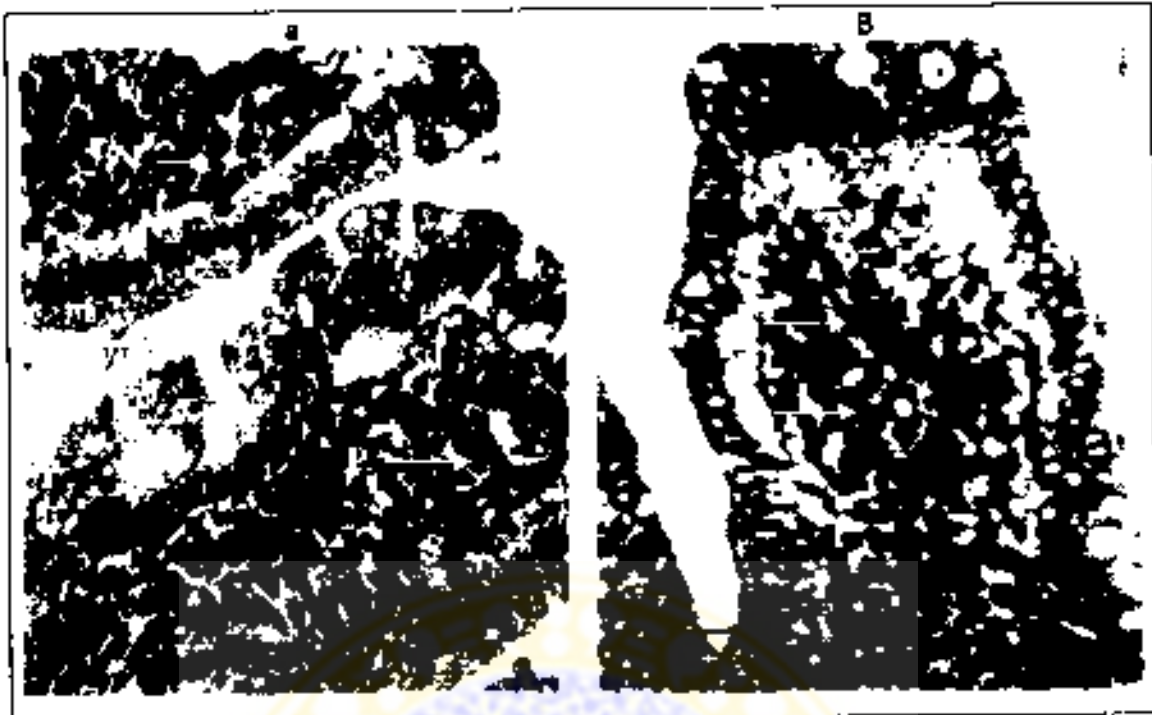
**Gambar 5.4** Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse NF-κBp65 (a) dan NF-κBp50/p105(b). P: reaksi positif, N: reaksi negatif, sediaan no.B4 (a) dan no.D2 (b), x 400.



**Gambar 5.5** Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse IFN $\gamma$  (a) dan IL-2 (b). P: reaksi positif, N: reaksi negatif, sediaan no.B8 (a) dan no.B3 (b), x 400.



**Gambar 5.6** Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse TGF $\beta$  (a) dan IL-10 (b). P: reaksi positif, N: reaksi negatif, sediaan no.D2 (a) dan no.B3 (b), x 400.



**Gambar 5.7** Sayatan jaringan ileum mencit dengan pulasan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti mouse IL-4 (a) dan IL-5 (b). P: reaksi positif, N: reaksi negatif, sediaan no.B4 (a) dan no.C5 (b), x 400.

### 5.1 Gambaran respons imun dan reaksi alergi paska perlakuan

Gambaran respons imun *innate* (yang dicerminkan oleh jumlah sel yang mengekspresikan TLR2, TLR4, NFκBp105/p50, NFκBp65), respons imun adaptif (yang dicerminkan oleh jumlah sel yang mengekspresikan IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-5, TGF-β dan IL-10, serta kadar IgG2a serum, IgA serum, IgA mukosa ileum, IgE spesifik OVA serum, IgE total serum) dan reaksi alergi (yang dicerminkan oleh kadar histamin plasma dan skor gejala) pada kelompok LGG dan LIS dibandingkan kontrol terdapat pada Tabel 5.2; pada kelompok LGG dan LIS yang diberi inhibitor TLR PD98059/Ly294002 dibandingkan tanpa inhibitor terdapat Tabel 5.3 dan 5.4; pada kelompok kontrol yang diberi inhibitor TLR PD98059/Ly294002 dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa inhibitor dapat dilihat pada Tabel 5.5.

**Tabel 5.2 Respons Imun *Innate*, Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LGG, LIS dan Kontrol)**

| Variabel Tergantung Penelitian         | Probiotik <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG) |            | Probiotik <i>Lactobacillus plantarum</i> IS 10506 (LIS) |          | Tanpa Probiotik (Kontrol) |      |          |            |
|--|---|------------|---|----------|---------------------------|------|----------|------------|
|  | n=18  | n=18       | n=18  | n=18     | n=18                      | n=18 |          |            |
| (1)                                    | Rerata  | ± SD       | Rerata  | ± SD     | Rerata                    | ± SD |          |            |
| (1)                                    | (2)   | (3)        | (4)   | (5)      | (6)                       | (7)  |          |            |
| <b>Respons Imun <i>Innate</i></b>      |   |            |   |          |                           |      |          |            |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR2   | 49,167  | ± 48,107   | ••  | 34,333   | ± 58,388                  | ••   | 1,389    | ± 3,500    |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4   | 17,889  | ± 31,182   | ••  | 3,944    | ± 6,169                   | ••   | 1,778    | ± 3,766    |
| Jumlah sel penghasil NFκBp65           | 52,167  | ± 34,538   | ••  | 29,667   | ± 32,382                  | ••   | 10,444   | ± 7,656    |
| Jumlah sel penghasil NFκBp105p50       | 32,111  | ± 25,704   | ••  | 19,111   | ± 13,128                  | •    | 7,389    | ± 4,354    |
| <b>Respons Imun Adaptif</b>            |   |            |   |          |                           |      |          |            |
| Jumlah sel penghasil IFN-γ             | 26,778  | ± 30,815   | ••  | 13,389   | ± 23,160                  | ••   | 2,778    | ± 2,967    |
| Jumlah sel penghasil IL-2              | 11,389  | ± 14,361   | ••  | 5,556    | ± 14,209                  | ••   | 0,611    | ± 1,461    |
| Jumlah sel penghasil TGF-β             | 4,389   | ± 2,524    | ••  | 3,500    | ± 2,455                   | •    | 1,778    | ± 1,987    |
| Jumlah sel penghasil IL-10             | 85,556  | ± 30,021   | ••  | 57,000   | ± 35,056                  | ••   | 24,278   | ± 10,498   |
| Jumlah sel penghasil IL-4              | 54,444  | ± 49,039   | ••  | 23,911   | ± 25,591                  | •    | 9,000    | ± 6,607    |
| Jumlah sel penghasil IL-5              | 12,167  | ± 16,364   | ••  | 17,333   | ± 19,119                  | •    | 3,278    | ± 3,409    |
| Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml) | 929,973   | ± 1225,399 | ••  | 795,234  | ± 1425,699                | ••   | 554,790  | ± 1194,705 |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)   | 877,682   | ± 209,956  | ••  | 1433,414 | ± 702,377                 | •    | 540,633  | ± 384,476  |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)   | 5695,072  | ± 1528,932 | ••  | 5985,223 | ± 1550,864                | •    | 4617,159 | ± 1383,629 |
| Kadar IgE total serum (ng/ml)          | 1386,372  | ± 201,375  | ••  | 1289,854 | ± 269,181                 | •    | 1293,802 | ± 243,975  |
| Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)         | 170,958   | ± 120,331  | ••  | 147,811  | ± 70,811                  | ••   | 1118,983 | ± 1965,056 |
| <b>Reaksi Alergi</b>                   |   |            |   |          |                           |      |          |            |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)           | 2,767   | ± 0,705    | ••  | 2,848    | ± 1,187                   | ••   | 8,936    | ± 10,106   |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III    | 2,444   | ± 0,784    | ••  | 2,444    | ± 0,784                   | ••   | 4,167    | ± 0,858    |

**Keterangan:**

- , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol (kolom 3) p < 0,01 dengan uji Kruskal-Wallis H
- , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol (kolom 3) p < 0,05 dengan uji Kruskal-Wallis H
- , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol (kolom 3) p < 0,01 dengan uji Anova
- , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan kelompok kontrol (kolom 3) p < 0,05 dengan uji Anova



**Tabel 5.3 Respons Imun *Innate*, Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LGG dan Kontrol Tanpa Inhibitor TLR)**

| Variabel Tergantung Penelitian   | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)<br>-Inhibitor TLR2(PD98059)<br>n=6 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)<br>+Inhibitor TLR4(LY294002)<br>n=6 | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG<br>(Kontrol)<br>n=6 |
|--|--|---|---|
|  | Rerata + SD  | Rerata + SD   | Rerata + SD   |
| (1)  | (2)  | (3)   | (4)   |
| <b>Respons Imun <i>Innate</i></b>  |  |   |   |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR2   | 58,500 ± 66,624  | 59,830 ± 35,352   | 29,170 ± 38,196                                       |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4   | 6,830 ± 4,401  | 40,500 ± 47,103 **  | 6,330 ± 12,144  |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp65  | 16,830 ± 7,574   | 60,500 ± 26,342 c   | 19,000 ± 6,450  |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp105/p50   | 60,670 ± 37,367  | 43,170 ± 28,400   | 52,670 ± 40,849                                       |
| <b>Respons Imun Adaptif</b>  |  |   |   |
| Jumlah sel penghasil IFN-γ   | 3,330 ± 1,211  | 55,830 ± 28,799   | 21,170 ± 26,218                                       |
| Jumlah sel penghasil IL-2  | 4,830 ± 1,722  | 21,500 ± 20,935   | 7,830 ± 8,353   |
| Jumlah sel penghasil TGF-β   | 4,170 ± 1,941  | 6,670 ± 1,506 c   | 2,330 ± 2,066   |
| Jumlah sel penghasil IL-10   | 96,830 ± 12,024  | 83,000 ± 9,960  | 76,830 ± 50,689                                       |
| Jumlah sel penghasil IL-4  | 55,667 ± 38,975  | 48,667 ± 54,383   | 59,000 ± 60,276                                       |
| Jumlah sel penghasil IL-5  | 3,330 ± 2,503 *  | 7,170 ± 4,491   | 26,000 ± 23,039                                       |
| Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml)   | 569,833 ± 673,884  | 933,957 ± 670,679   | 1286,129 ± 1973,230                                   |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)   | 789,502 ± 197,998 c  | 817,350 ± 206,240 *   | 1026,194 ± 167,251                                    |
| Kadar IgA ileum spesifik OVA (ng/ml)   | 6943,029 ± 1842,595  | 5904,482 ± 256,735 **   | 4237,705 ± 129,177                                    |
| Kadar IgE total serum (ng/ml)  | 1515,506 ± 255,775   | 1343,119 ± 158,495  | 1300,490 ± 127,391                                    |
| Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)   | 133,275 ± 51,977   | 252,703 ± 178,924   | 126,894 ± 49,625                                      |
| <b>Reaksi Alergi</b>   |  |   |   |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)   | 2,720 ± 0,337  | 3,120 ± 1,042   | 2,462 ± 0,476   |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III  | 3,000 ± 0,894 *  | 2,500 ± 0,548 *   | 1,830 ± 0,408   |
| <b>Keterangan:</b>   |  |   |   |
| ** nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,01 dengan uji Kruskal-Wallis H |  |   |   |
| * nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,05 dengan uji Kruskal-Wallis H  |  |   |   |
| c nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,05 dengan uji Anova             |  |   |   |

**Tabel 5.4 Respons Imun Innate, Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi Menurut Jenis Perlakuan (Probiotik LIS dan Kontrol Tanpa Inhibitor TLR)**

| Variabel Tergantung Penelitian  | <i>Lactobacillus plantarum</i> IS 10506 (LIS) + Inhibitor TLR2 (PD98059) | <i>Lactobacillus plantarum</i> IS 10506 (LIS) + Inhibitor TLR4 (LY294002) | <i>Lactobacillus plantarum</i> IS 10506 (Kontrol) |
|---|--|---|---|
|   | n=6<br>Rerata ± SD   | n=6<br>Rerata ± SD  | n=6<br>Rerata ± SD                                |
| (1)   | (2)  | (3)   | (4)   |
| <b>Respons Imun Innate</b>  |  |   |   |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR2  | 91,830 ± 74,569 *  | 8,330 ± 6,919   | 2,830 ± 3,656                                     |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4  | 8,330 ± 8,454  | 2,670 ± 4,320   | 0,830 ± 1,602                                     |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp65   | 24,170 ± 14,811  | 23,830 ± 12,844   | 9,330 ± 5,428                                     |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp105 p50  | 56,830 ± 41,945 *  | 22,330 ± 18,938   | 9,830 ± 4,997                                     |
| <b>Respons Imun Adaptif</b>   |  |   |   |
| Jumlah sel penghasil IFN-γ  | 25,000 ± 39,105  | 9,830 ± 7,195   | 5,330 ± 5,955                                     |
| Jumlah sel penghasil IL-2   | 13,330 ± 23,880 **   | 2,330 ± 2,422   | 1,000 ± 0,632                                     |
| Jumlah sel penghasil TGF-β  | 3,500 ± 3,271  | 3,670 ± 2,944   | 3,330 ± 1,033                                     |
| Jumlah sel penghasil IL-10  | 76,330 ± 26,334  | 59,670 ± 43,771   | 35,000 ± 8,246                                    |
| Jumlah sel penghasil IL-4   | 38,167 ± 39,529  | 20,000 ± 13,491   | 13,667 ± 9,688                                    |
| Jumlah sel penghasil IL-5   | 28,330 ± 27,001 *  | 5,330 ± 4,131   | 3,330 ± 5,785                                     |
| Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml)  | 1457,420 ± 1996,957 *  | 169,187 ± 181,739   | 759,096 ± 1375,483                                |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)  | 1491,588 ± 584,760   | 962,332 ± 736,498 ○   | 1846,322 ± 563,921                                |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)  | 6801,845 ± 714,828   | 5858,659 ± 2002,245   | 5295,165 ± 1505,576                               |
| Kadar IgE total serum (ng/ml)   | 1264,583 ± 336,621   | 1398,262 ± 293,176  | 1206,718 ± 154,693                                |
| Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)  | 149,691 ± 52,046   | 133,350 ± 90,833  | 160,392 ± 75,124                                  |
| <b>Reaksi Alergi</b>  |  |   |   |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)  | 2,747 ± 1,298  | 2,947 ± 0,760   | 2,851 ± 1,584                                     |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III   | 2,330 ± 0,816  | 3,000 ± 0,894 **  | 2,000 ± 0,000                                     |
| <b>Keterangan:</b>  |  |   |   |
| ** , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,01 dengan uji Kruskal-Wallis II |  |   |   |
| * , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,05 dengan uji Kruskal-Wallis II  |  |   |   |
| ○ , nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) p ≤ 0,05 dengan uji Anova              |  |   |   |

**Tabel 5.5 Respons Imun *Innate*, Respons Imun Adaptif dan Reaksi Alergi pada Kontrol menurut Kelompok Perlakuan (dengan Inhibitor TLR PD98059, Inhibitor TLR LY294002 dan tanpa Inhibitor TLR)**

| Variabel Tergantung Penelitian<br>(1)  | PBS<br>+ Inhibitor TLR2(PD98059)<br>n=6 |             | PBS<br>+ Inhibitor TLR4( LY294002)<br>n=6 |            | PBS<br>(Kontrol)<br>n=6 |            |
|--|---|-------------|---|------------|-------------------------|------------|
|  | Rerata                                  | + SD        | Rerata                                    | + SD       | Rerata                  | + SD       |
|  | (2)                                     | (3)         | (4)                                       | (5)        | (6)                     | (7)        |
| <b>Respons Imun <i>Innate</i></b>  |   |             |   |            |                         |            |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR2   | 1,667                                   | ± 2,422     | 0,000                                     | ± 0,000    | 2,500                   | ± 5,648    |
| Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4   | 3,833                                   | ± 5,076     | 0,000                                     | ± 0,000    | 1,500                   | ± 3,674    |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp65  | 9,000                                   | ± 2,098     | 5,670                                     | ± 2,805    | 7,500                   | ± 6,745    |
| Jumlah sel penghasil NF-κBp105/p50   | 17,500                                  | ± 5,718     | 4,170                                     | ± 1,941    | 9,670                   | ± 7,421    |
| <b>Respons Imun Adaptif</b>  |   |             |   |            |                         |            |
| Jumlah sel penghasil IFN-γ   | 0,167                                   | ± 0,408     | 1,830                                     | ± 1,722    | 2,330                   | ± 4,412    |
| Jumlah sel penghasil IL-2  | 8,167                                   | ± 5,115     | 0,000                                     | ± 0,000 *  | 1,670                   | ± 2,251    |
| Jumlah sel penghasil TGF-β   | 3,000                                   | ± 2,191     | 0,330                                     | ± 0,816    | 2,000                   | ± 1,897    |
| Jumlah sel penghasil IL-10   | 34,833                                  | ± 9,745 *   | 18,000                                    | ± 5,215    | 20,000                  | ± 7,043    |
| Jumlah sel penghasil IL-4  | 2,667                                   | ± 2,658     | 8,167                                     | ± 5,115    | 12,500                  | ± 7,969    |
| Jumlah sel penghasil IL-5  | 6,000                                   | ± 4,290     | 1,170                                     | ± 0,983    | 2,670                   | ± 2,338    |
| Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml)   | 1451,990                                | ± 1815,818  | 46,580                                    | ± 92,331   | 165,800                 | ± 299,489  |
| Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)   | 707,399                                 | ± 532,066   | 428,163                                   | ± 113,312  | 486,337                 | ± 393,161  |
| Kadar IgA ileum spesifik OVA (ng/ml)   | 5836,887                                | ± 606,358 * | 3750,825                                  | ± 607,896  | 4263,765                | ± 1091,018 |
| Kadar IgE total serum (ng/ml)  | 1386,010                                | ± 235,646   | 1310,002                                  | ± 294,998  | 1185,395                | ± 187,637  |
| Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)   | 343,231                                 | ± 278,936   | 2332,485                                  | ± 3186,659 | 681,232                 | ± 420,835  |
| <b>Reaksi Alergi</b>   |   |             |   |            |                         |            |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)   | 4,338                                   | ± 3,051     | 9,697                                     | ± 9,281    | 12,772                  | ± 14,426   |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III  | 3,833                                   | ± 0,753     | 4,330                                     | ± 1,211    | 4,330                   | ± 0,516    |
| <b>Keterangan:</b>   |   |             |   |            |                         |            |
| * nilai rerata ± SD mempunyai perbedaan bermakna dibandingkan nilai rerata ± SD kelompok kontrol (kolom 3) $p \leq 0,05$ dengan uji Kruskal-Wallis H |   |             |   |            |                         |            |

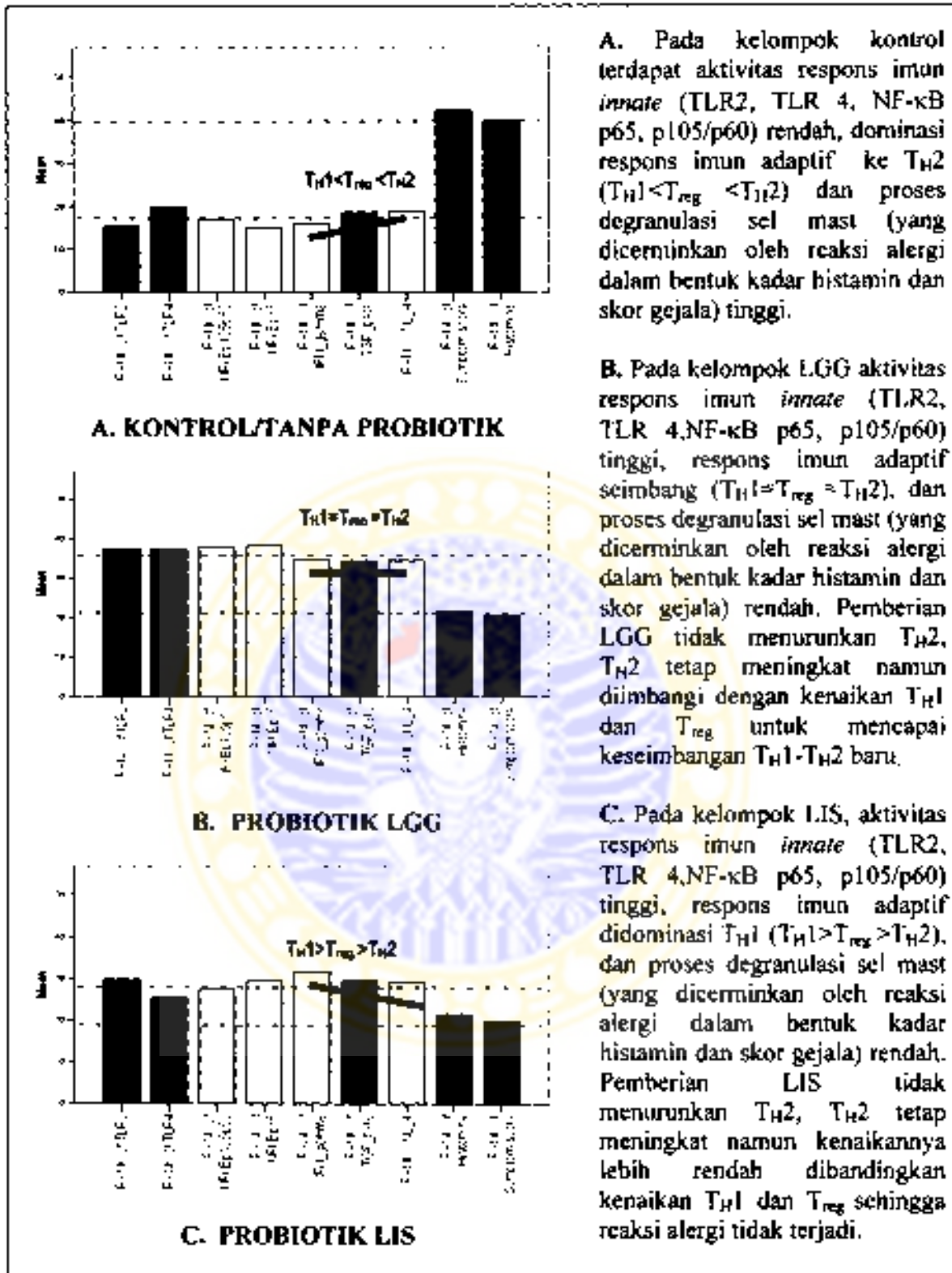
#### 5.4 Aktivasi respons imun *innate* dan adaptif oleh probiotik LGG dan LIS

Pada kelompok LGG, jumlah sel yang mengekspresikan TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ Bp65, NF- $\kappa$ Bp105/p50 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada kelompok LIS jumlah sel yang mengekspresikan TLR2, NF- $\kappa$ Bp65, NF- $\kappa$ Bp105/p50 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4 kelompok LIS tidak berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 5.2).

Pada kelompok LGG jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-5, kadar IgA serum spesifik OVA, IgA ileum spesifik OVA, dan IgE spesifik OVA lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan kadar IgG2a serum spesifik OVA dan IgE total serum tidak berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 5.2). Pada kelompok LIS, jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, kadar IgG2a serum spesifik OVA, IgA serum spesifik OVA, dan IgE spesifik OVA lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, sedangkan jumlah sel penghasil IL-5, kadar IgA ileum spesifik OVA, dan IgE total serum tidak berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol. (Tabel 5.2).

#### 5.5 Respons imun *innate*, keseimbangan respons imun adaptif dan reaksi alergi

Perbedaan imunitas setelah sensitisasi ovalbumin pada kelompok LGG bila dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah: (1). Reaksi alergi (kadar histamin dan skor gejala) yang terjadi lebih rendah; (2). Ekspresi TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 dan NF- $\kappa$ B p105/p50 lebih tinggi; (3). Aktivitas  $T_H1$  (IFN $\gamma$  dan IL-2),  $T_{reg}$  (TGF $\beta$  dan IL-10) dan  $T_H2$  (IL-4 dan IL-5) lebih tinggi; dan (3). Posisi keseimbangan  $T_H1$ - $T_{reg}$ - $T_H2$  lebih tinggi dan tidak ada dominasi  $T_H2$  (Gambar 5.8A dan 5.8B).



**Gambar 5.8** Respons imun *innate*, keseimbangan respons imun adaptif  $T_{H1}$ ,  $T_{reg}$  dan  $T_{H2}$ , serta reaksi alergi dalam rerata nilai *ranking* pada kelompok LGG, LIS dan kontrol.

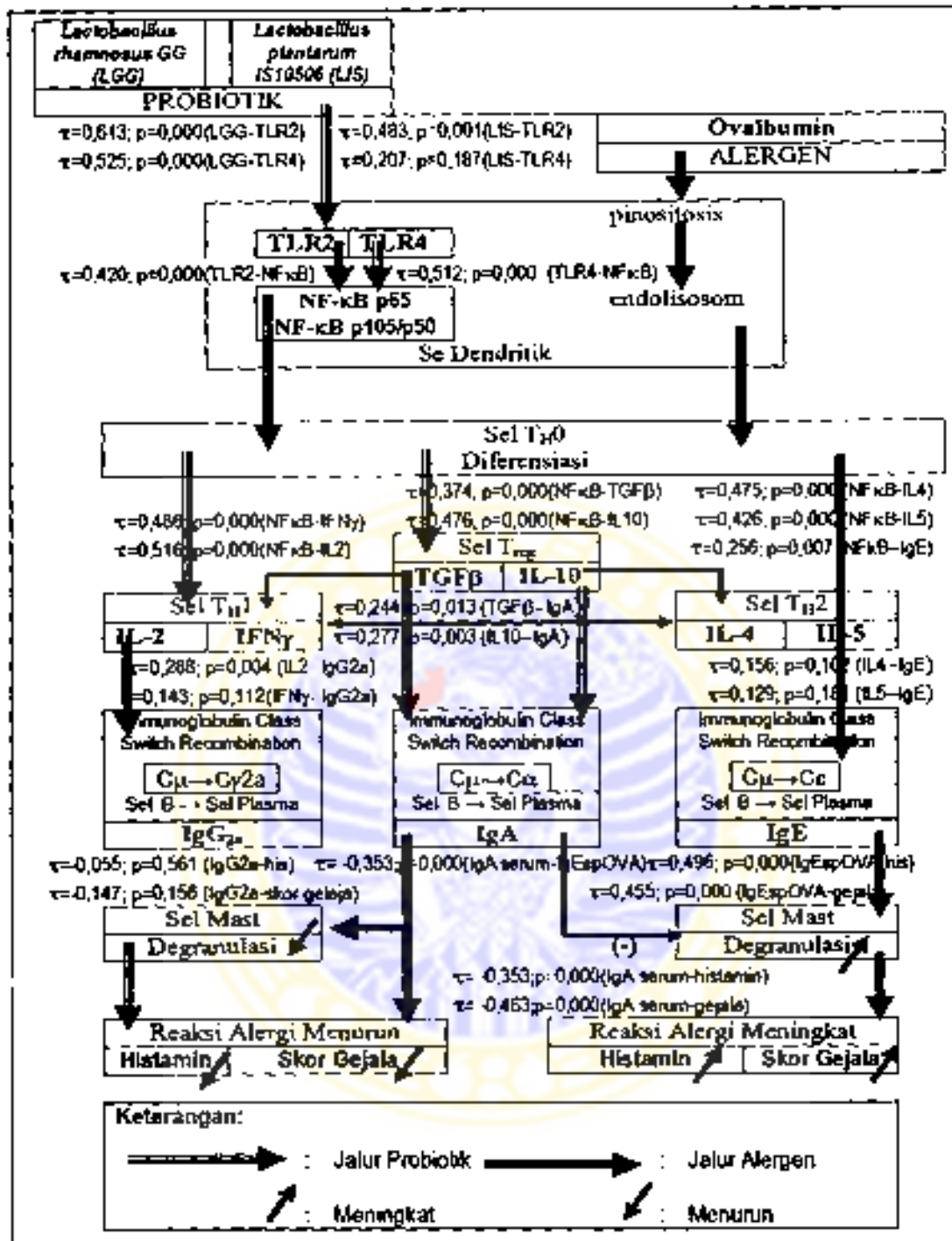
Perbedaan imunitas setelah sensitisasi ovalbumin pada kelompok LIS bila dibandingkan dengan kelompok kontrol adalah: (1). Reaksi alergi (kadar histamin dan skor gejala) yang terjadi lebih rendah; (2). Ekspresi TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 dan NF- $\kappa$ B p105/p50 lebih tinggi; (3). Aktivitas  $T_H1$  (IFN $\gamma$  dan IL-2),  $T_{reg}$  (TGF $\beta$  dan IL-10) dan  $T_H2$  (IL-4 dan IL-5) lebih tinggi; dan (3). Posisi keseimbangan  $T_H1$ - $T_{reg}$ - $T_H2$  lebih tinggi dan tidak ada dominasi  $T_H2$  (Gambar 5.8A dan Gambar 5.8C).

### 5.6 Alur hubungan respons imun *innate*, respons imun adaptif dan reaksi alergi

Alur hubungan berbagai variabel "respons imun *innate*" yang diwakili TLR2, TLR 4 dan NF $\kappa$ B; "respons imun adaptif" yang diwakili IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IgE, IgG $_2$ , dan IgA serta "reaksi alergi" yang telah diuji dengan uji Kendall Tau ( $\tau$ ) dapat dilihat pada Gambar 5.9.

Dari Gambar 5.9 dapat dilihat bahwa TLR2, TLR4, NF $\kappa$ Bp65 dan NF $\kappa$ Bp105/p50 pada respons imun *innate* yang diaktivasi oleh LGG atau LIS, memiliki hubungan bermakna dengan peningkatan respons imun adaptif  $T_H1$  yang dicerminkan oleh peningkatan IL-2 dan IFN- $\gamma$ ; peningkatan respons imun adaptif T regulator yang dicerminkan oleh peningkatan produksi IL-10 dan TGF- $\beta$ ; dan peningkatan respons imun adaptif  $T_H2$  yang dicerminkan oleh peningkatan produksi IL-4 dan IL-5.

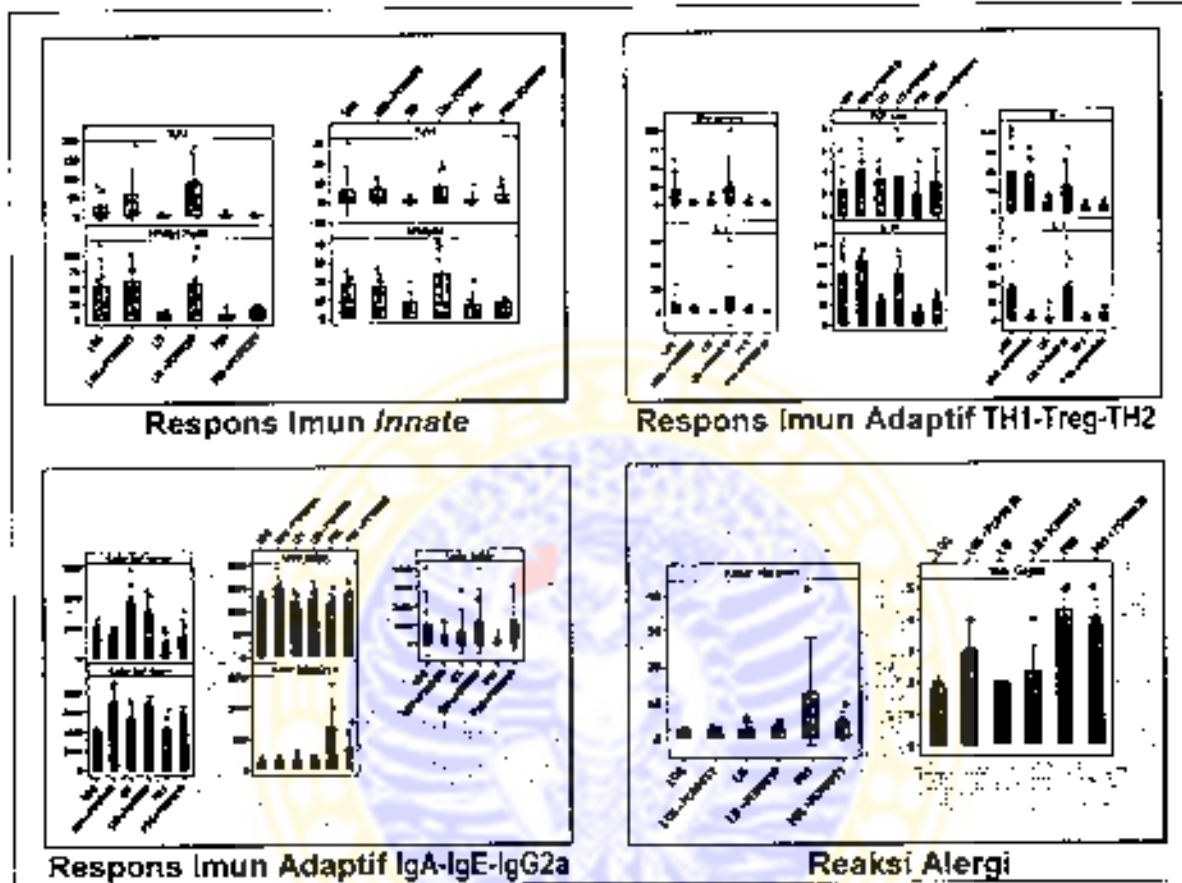
Penurunan reaksi alergi yang dicerminkan oleh penurunan histamin dan skor gejala klinis hanya mempunyai hubungan yang kuat dengan peningkatan respons imun adaptif  $T_{reg}$  sebagaimana yang dicerminkan oleh peningkatan produksi IL-10, TGF- $\beta$  dan IgA (Gambar 5.9).



**Gambar 5.9** Alur hubungan antara respons imun *innate*, *adaptive* dan reaksi alergi. Alur hubungan dari berbagai variabel ini telah diuji dengan uji Kendal Tau ( $\tau$ ). Gambar di atas menampilkan tingkat kemaknaan hubungan bersama koefisien korelasinya ( $\tau$ ), antara berbagai variabel, yaitu: "probiotik" yang diwakili oleh LGG dan LIS; "respons imun *innate*" yang diwakili TLR2, TLR4 dan NF-κB; "respons imun adaptif" yang diwakili IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IgE, IgG<sub>2a</sub> dan IgA serta "reaksi alergi" yang diwakili oleh histamin dan skor gejala.

### 5.7 Peran TLR 2 dan 4 dalam penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS

Pengaruh inhibitor TLR2 PD98059 pada aktivitas probiotik LGG dan LIS dapat dilihat pada Gambar 5.10.

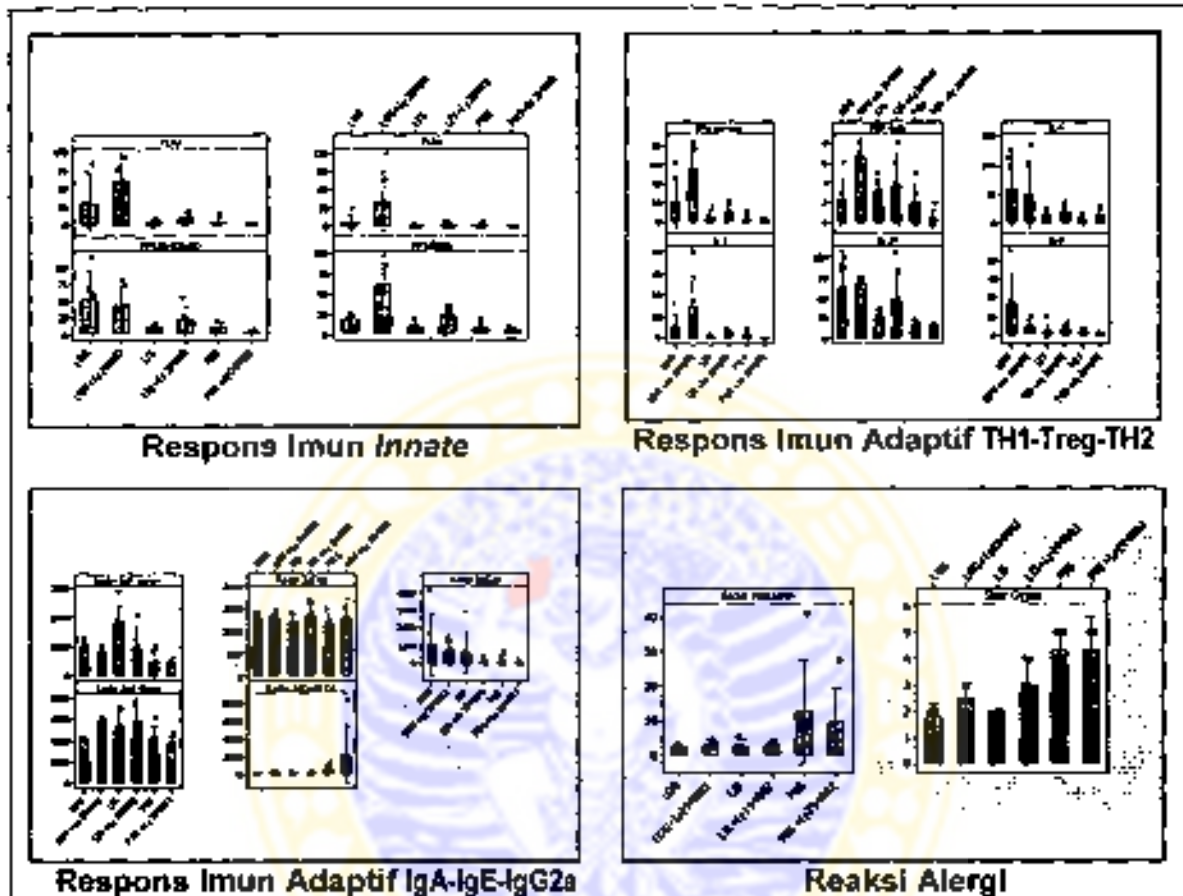


**Gambar 5.10** Pengaruh inhibitor TLR2 PD98059 pada aktivitas probiotik LGG, LIS dan kontrol. Pada kelompok LGG, inhibitor TLR2 PD98059 menurunkan jumlah sel penghasil IL-5, kadar IgA serum spesifik OVA dan meningkatkan skor gejala, sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna. Pada kelompok LIS, inhibitor TLR2 PD98059 meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan TLR2, NF-κBp105/p50, IL-10, dan IL-5, dan kadar IgG2a serum spesifik OVA sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna. Pada kelompok kontrol, inhibitor TLR2 PD98059 menurunkan IL-10 dan IgA ileum spesifik OVA, sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna.

Pada gambar tersebut dapat dianalisis beberapa fakta penting, yaitu: (1). Pada kelompok LGG – dimana reaksi alergi yang terjadi rendah – pemberian inhibitor TLR2 PD98059 meningkatkan reaksi alergi, namun tidak mengubah variabel lain (2). Pada kelompok



LIS – dimana reaksi alergi yang terjadi rendah – pemberian inhibitor TLR2 PD98059 tidak meningkatkan reaksi alergi, namun meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan TLR2, NF- $\kappa$ Bp105/p50, IL-10, dan IL-5, dan kadar IgG2a serum spesifik OVA.



**Gambar 5.11** Pengaruh inhibitor TLR4 LY294002 pada aktivitas probiotik LGG, LIS dan kontrol. Pada kelompok LGG, inhibitor TLR4 LY294002 meningkatkan ekspresi TLR4, NF- $\kappa$ Bp65, TGF- $\beta$ , kadar IgA ileum spesifik OVA, serta skor gejala, sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna. Pada kelompok LIS, inhibitor TLR4 LY294002 meningkatkan skor gejala sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna. Pada kelompok kontrol, inhibitor TLR4 LY294002 menurunkan IL-2 sedangkan variabel lain tidak berubah bermakna.

Dari fakta tersebut tampak bahwa probiotik LIS mempunyai hubungan yang lebih kuat dengan TLR2 dibandingkan dengan probiotik LGG. Inhibisi pada TLR2 pada kelompok LIS menimbulkan respons kompensasi berupa peningkatan jumlah sel yang

**Bab 6****PEMBAHASAN****6.1 Pemecahan masalah penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan untuk memecahkan masalah ketidakjelasan penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LJS. TLR2 dan 4 menjadi solusi penting pada upaya pemecahan masalah penelitian ini karena TLR2 dan 4 adalah komponen pada sistem imun *innate* yang bertugas sebagai sensor stimuli dari lingkungan. Stimuli dari lingkungan yang dikenali oleh sistem sensor TLR2 dan 4 akan ditindaklanjuti dengan seleksi, organisasi dan interpretasi agar respons terhadap stimuli tersebut dapat disesuaikan dengan kebutuhan *host* untuk tetap *survive* (Kaisho dan Akira, 2006; Hammad dan Lambrecht, 2006).

Oleh karena pemberian probiotik dan sensitisasi alergi akhir pada penelitian ini dilakukan melalui saluran cerna, maka aktivitas sensor dan respons *host* terhadap alergen harus dievaluasi pada sistem imun mukosa (*mucosal immune system*). Komponen sistem imun mukosa yang dievaluasi pada penelitian ini adalah ekspresi TLR2 dan TLR4, aktivasi NF- $\kappa$ B p65 dan p105/p50, produksi sitokin  $T_H1$ ,  $T_{reg}$ ,  $T_H2$  dan IgAspesifikOVA(mukosa usus). Sedangkan komponen sistem imun sistemik yang dievaluasi adalah produksi IgG2a, IgAspesifikOVA (sistemik), IgE total, IgE spesifik OVA dan histamin.

Yang menjadi pertanyaan adalah apakah penurunan reaksi alergi yang merupakan manifestasi imunitas sistemik dapat dijelaskan dengan suatu mekanisme yang berasal dari imunitas mukosa. Pertanyaan tersebut dapat dijawab menggunakan teori *common mucosal immune system*. Pada teori tersebut disebutkan bahwa sistem imun mukosa

Yang menarik untuk dibahas lebih mendalam adalah mengapa inhibisi pada jalur sinyal TLR2 (oleh inhibitor TLR2 PD98059) dan jalur sinyal TLR4 (oleh inhibitor TLR4 LY294002) ditanggapi oleh kelompok yang diberikan probiotik LGG dan LIS dengan peningkatan ekspresi TLR2 dan TLR4 serta NF- $\kappa$ B. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa inhibisi pada jalur sinyal TLR2 (oleh inhibitor TLR2 PD98059) dan jalur sinyal TLR4 (oleh inhibitor TLR4 LY294002) tidak mengubah kadar IL-4, IgE total dan histamin tetapi mengubah (berupa peningkatan) ekspresi TLR2, TLR4, NF $\kappa$ B, IFN $\gamma$ , IL-2, dan TGF- $\beta$ .

Fakta tersebut dapat ditafsirkan bahwa agar reaksi alergi tidak semakin parah karena sinyal TLR dihalangi, maka reaksi alergi tersebut harus dicegah dengan cara menghalangi peningkatan kadar IL-4, IgE total dan histamin melalui peningkatan ekspresi TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, IFN- $\gamma$ , IL-2, dan TGF- $\beta$ . Fakta tersebut mencerminkan kemampuan sitokin dalam proses regulasi (efek antagonisme) dan kemampuan TLR dalam proses mempertahankan homeostasis (Abbas dan Lichtman, 2003).

### 6.1.2 Peran TLR dalam komunikasi alur-lintas, interaksi dan aktivasi respons imun

Ekspresi TLR2 dan 4 yang lebih tinggi pada kelompok probiotik LGG dan LIS dibandingkan kelompok kontrol pada penelitian ini (Tabel 5.2) menunjukkan bahwa melalui TLR2 dan 4, probiotik (LGG dan LIS) dengan *host* telah berusaha mengadakan komunikasi arus lintas (*cross-talk*) dan interaksi untuk membantu *host* mengatasi keadaan bahaya yang ditimbulkan oleh gangguan homeostasis yang disebabkan ovalbumin.

Penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah fekal bakteri asam laktat pada kelompok LGG dan LIS lebih tinggi bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol

(Gambar 5.1). Kondisi ini menunjukkan bahwa probiotik LGG dan LIS tersebut telah berhasil mempertahankan viabilitasnya pada saluran cerna menciit. Komunikasi alur-lintas (*cross-talk*) antara probiotik viabel dengan *host* menghasilkan interaksi dengan sistem imun *innate* dan adaptif (Brooks *et al.*, 2004; Pasare dan Medzhitov, 2003). Interaksi tersebut berguna untuk memantau ketidaksesuaian respons *host* menghadapi alergen dan menindaklanjuti dengan modulasi respons imun menuju toleransi imunologis yang ditandai oleh penurunan reaksi alergi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa: (1). Pemberian LGG mengakibatkan modulasi respons imun *innate* berupa peningkatan ekspresi TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p105/p50, dan NF- $\kappa$ B p65; modulasi respons imun adaptif berupa peningkatan ekspresi IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IgEspOVA dan IgA; serta penurunan reaksi alergi berupa penurunan kadar histamin dan skor gejala. Pada pemberian LGG ternyata tidak terjadi modulasi respons imun adaptif yang berhubungan dengan penurunan IL-4, IL-5, IgE total, dan IgG<sub>2a</sub>; (2). Pada pemberian LIS terjadi modulasi respons imun *innate* berupa peningkatan ekspresi TLR2, NF $\kappa$ B p65; modulasi respons imun adaptif IL-2, IFN- $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-10, IgEspOVA dan IgA; penurunan reaksi alergi berupa penurunan kadar histamin dan skor gejala. Pada pemberian LIS ternyata tidak terjadi modulasi respons imun *innate* yang berhubungan dengan TLR4 dan NF $\kappa$ B p105/p50; dan tidak terjadi modulasi respons imun adaptif yang berhubungan dengan penurunan IL-4, IL-5, IgE total, IgA dan IgG<sub>2a</sub> (Tabel 5.2 dan Gambar 5.8).

Hasil tersebut menggambarkan bahwa probiotik LGG dan LIS membangun keseimbangan baru melalui regulasi sistem imun yang hasilnya dapat kita kenali dari produk yang dihasilkan oleh sel imunokompeten yang terlibat di dalamnya, misal :

sitokin. Sitokin merupakan polipeptida yang diproduksi sebagai respons menghadapi stresor dan berfungsi sebagai mediator dan regulator reaksi imunitas dan inflamasi. Berbagai sifat dari aksi sitokin yang penting dalam proses regulasi adalah kemampuannya menimbulkan efek ganda pada berbagai tipe sel yang berbeda (pleiotropisme), efek tumpang tindih (*redundancy*), efek saling memperkuat (sinergi) dan efek saling menghambat satu sama lain (antagonisme) (Abbas dan Lichtman, 2003).

Gambar 5.9 memperlihatkan hubungan yang berurutan mulai dari variabel: "probiotik"; "respons imun *innate*" (ekspresi TLR2, TLR 4 dan NF- $\kappa$ B); "respons imun adaptif" (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IgE, IgG<sub>2a</sub> dan IgA) dan "reaksi alergi" (kadar histamin dan skor gejala). Karena ada bukti mengenai terjadinya aktivasi pada sistem imun *innate* TLR-NF $\kappa$ B dan adanya efek dari aktivasi tersebut pada pola sekresi sitokin, maka fakta tersebut dapat diartikan bahwa pola komunikasi alur lintas (*cross-talk*) dan interaksi antara alergen, probiotik LGG dan LIS dengan *host* dalam mempengaruhi reaksi alergi diatur oleh TLR2 dan 4.

Dalam hal hubungan antara ekspresi TLR2 dan TLR4 dengan aktivasi NF- $\kappa$ B, reseptor yang lebih responsif terhadap probiotik adalah TLR2. Peran penting TLR2 dalam aktivasi NF- $\kappa$ B setelah pemberian peptidoglicans dan *LTA* juga dilaporkan oleh peneliti lain (Ozinsky *et al.*, 2000; Matsuguchi, 2003). Jalur sinyal TLR2 dan 4 yang terhambat pada kelompok LGG dan LIS pada penelitian ini menyebabkan peningkatan ekspresi NF- $\kappa$ B.

Mengenai jawaban atas pertanyaan "mengapa pola respons imun *innate* dan respons imun adaptif antara probiotik LGG dan LIS berbeda dalam menurunkan reaksi alergi?", berbagai laporan penelitian yang melaporkan fakta yang menyangkut perbedaan respons

imun pada spesies probiotik yang berbeda juga belum ada yang menyertakan penjelasan ilmiahnya. Kontribusi penelitian ini pada penjelasan mengenai terjadinya perbedaan pola tersebut masih terbatas pada aspek perbedaan kemampuan mereka dalam menginduksi ekspresi TLR4.

Kemampuan LGG dalam menginduksi ekspresi TLR4 menyebabkan LGG lebih kuat dalam meningkatkan respons imun baik ke arah  $T_{reg}$  maupun  $T_H2$  (Tabel 5.2 dan Gambar 5.8) apabila dibandingkan dengan LIS. Menemukan literatur yang dapat menjelaskan "mengapa pada pemberian LIS tidak terjadi modulasi respons imun *innate* yang berhubungan dengan TLR4?" sulit, karena penelitian mengenai karakterisasi komponen aktif probiotik sampai saat masih sedang berlangsung di berbagai tempat dan belum ada publikasi hasilnya (Zeuthen *et al.*, 2006; Rautava *et al.*, 2006; Horner, 2006).

Pada kelompok LGG dan LIS, respons imun  $T_H2$  (khususnya IL-4, IL-5, IgE total) dan  $T_H1$  (IFN- $\gamma$ , IL-2 dan IgG<sub>2b</sub>) tidak lebih rendah apabila dibandingkan dengan kelompok yang tidak menerima probiotik. Perbedaan spesies probiotik LGG dengan LIS tidak menyebabkan perbedaan dalam pola respons imun adaptif  $T_H2$ . Ligan TLR2 mampu menginduksi respons imun adaptif ke arah  $T_H1$  maupun  $T_H2$  secara bersamaan (Horner, 2006; Matsuguchi *et al.*, 2003).

Pada kelompok kontrol penelitian ini pemberian inhibitor TLR2 ternyata sedikit berpengaruh pada respons imun adaptif berupa kenaikan IL-10 dan kadar IgA ileum spesifik OVA (pada pemberian PD98059) dan penurunan IL-2 (pada pemberian LY294002). Pengaruh tersebut dapat difahami karena pada mencit Balb/c kelompok kontrol juga memiliki mikrobiota yang mampu mempengaruhi respons imun adaptif. Namun hal ini tidak akan berpengaruh pada kesimpulan penelitian ini, karena:

faktor transkripsi dari produksi IgA (Akbari *et al.*, 2001). IgE total tetap tinggi karena LGG dan LIS juga menginduksi peningkatan IL-4. Tetapi IgEspOVA serum tidak tinggi karena karena kadar IgAspOVA di serum dan mukosa ileum dengan pemberian LGG dan LIS juga menjadi lebih tinggi.

Pada penelitian ini pemberian probiotik LGG dan LIS menghasilkan penurunan reaksi alergi yang dicerminkan oleh penurunan kadar histamin dan penurunan skor gejala klinis. Yang menjadi pertanyaan adalah mengapa kadar histamin dan skor gejala turun, padahal IL-4 dan IgE total tidak turun? Reaksi alergi adalah suatu proses patologis yang terjadi pada sel target yang memiliki reseptor terhadap mediator yang dihasilkan oleh degranulasi sel mast, misalnya reseptor histamin H1, H2 dan H3. Reaksi alergi terjadi karena ada interaksi antara alergen, sel mast dan IgE spesifik alergen yang menghasilkan degranulasi sel mast (Prussin *et al.*, 2006; Chinen *et al.*, 2006). Pada penelitian ini, pemberian LGG dan LIS memang tidak menurunkan IL-4 dan IgE total, tetapi mampu menurunkan IgEspOVA sehingga OVA tidak meningkatkan degranulasi sel mast (Tabel 5.2 dan Gambar 5.8).

## **6.2 Konsistensi dengan hasil penelitian lain yang serupa**

### **6.2.1 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada TLR dan NF- $\kappa$ B**

Penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dengan hasil penelitian: (1). Revert dan kawan-kawan (2005) yang melaporkan bahwa Opl (*agonist* TLR2 dan 4) menyebabkan peningkatan IFN- $\gamma$  serta penurunan IL-4, IL13 dan eosinofil; (2). Patel (2005) yang menunjukkan bahwa *agonist* TLR 2 (Pam3Cys) apabila diberikan bersama

dengan OVA menyebabkan peningkatan IFN- $\gamma$ , IL-10 dan IL-12 serta penurunan IL-4, IL-5 dan IgE.

Dalam hal peran LGG dan LIS sebagai ligan *agonist* dari TLR2 dan 4, hasil penelitian ini konsisten dengan hasil penelitian dari: (1). Durand dan kawan-kawan (2004) yang menggunakan berbagai agonist TLR2 dan TLR4, dalam hal peningkatan IFN- $\gamma$ ; (2). Agrawal dan kawan-kawan - yang menggunakan LPS sebagai agonist TLR4 - (2003), dalam hal peningkatan IFN- $\gamma$ . Peningkatan ini diduga sebagai hasil modulasi sinyal ekstrascluler yang terkait *Mitogen Activated Protein Kinase* dan *c-Fos1*; (3). Mou dan kawan-kawan (2004), dalam hal peningkatkan produksi TGF- $\beta$ .

Penelitian sebelumnya yang mengeksplorasi respons imun *innate* terkait dengan pemberian probiotik *Lactobacillus* pada mencit Balb/c juga menghasilkan peningkatan ekspresi TLR2 (Galdeano dan Perdigon, 2006). Bedanya dengan penelitian ini, penelitian tersebut mengambil subyek mencit Balb/c yang tidak disensitisasi oleh alergen ovalbumin dan probiotik yang digunakan adalah *Lactobacillus casei*. Selain itu kalau pada penelitian ini kadar IgA (serum dan jaringan ileum) diamati setelah 4 minggu perlakuan, Galdeano dan kawan-kawan mengamati kadar IgA (jaringan ileum) setelah pemberian hari ke 2, 5, dan 7. Hasil yang didapatkan mereka adalah kadar IgA baru mulai meningkat secara bermakna pada hari ke 7 perlakuan dengan *Lactobacillus casei*. IgA yang ditimbulkan dikatakan merupakan hasil aktivasi respons imun *innate* karena terkait dengan peningkatan ekspresi TLR2 dan peningkatan ekspresi CD-206 (*Mannose Receptor*) dan tidak terkait (*independen*) dari aktivasi oleh T helper.

Fakta yang didapat dari penelitian yang dilaksanakan oleh Perdigon dan kawan-kawan tersebut ditambah dengan fakta baru yang dihasilkan oleh penelitian ini telah



memperjelas bagaimana kerja probiotik dalam rangka meningkatkan kemampuan surveilans yang permanen dan efektif yang melibatkan berbagai mekanisme pertahanan *innate* dan adaptif pada sistem imun mukosa saluran cerna untuk mempertahankan homeostasis menghadapi stresor yang mengancam termasuk diantaranya adalah stresor alergen.

Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa pada kondisi normal probiotik mampu mengendalikan reaksi inflamasi yang berlebihan melalui regulasi aktivasi NF- $\kappa$ B, sebagaimana yang ditunjukkan oleh kemampuan *Bifidobacteria* dalam menghambat efek proinflamasi yang disebabkan aktivasi NF- $\kappa$ B oleh LPS (Riedel *et al.*, 2006), kemampuan *Bifidobacterium breve* (Bb) dan probiotik *Streptococcus thermophilus* dalam menurunkan efek aktivasi NF- $\kappa$ B oleh agonist TLR (Me'nard, 2004), kemampuan *Lactobacillus rhamnosus* GG dalam menghambat efek proinflamasi (peningkatan TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ ) yang disebabkan aktivasi NF- $\kappa$ B oleh ETEC K888 (Roselli *et al.*, 2006), dan kemampuan *Lactobacillus rhamnosus* menghambat efek proinflamasi (peningkatan produksi TNF) yang disebabkan aktivasi NF- $\kappa$ B oleh *Escheria coli* GR-12 dan *Enterococcus faecalis* melalui aktivasi STAT3, inhibisi *c-Jun-N-terminal kinase* (JNKs) (Kim *et al.*, 2006).

### 6.2.2 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada respons imun adaptif

Hasil penelitian ini konsisten dengan hasil penelitian Bashir dan kawan-kawan (2004) dalam hal peningkatan IgE dan reaksi alergi serta penurunan IFN- $\gamma$ , namun berbeda dengan penelitian Dabbagh dan kawan-kawan (2002) maupun Eisenbarth dan kawan-kawan (2002) dalam hal penurunan IgE dan IL-4.

Bashir dan kawan-kawan (2004) menunjukkan bahwa defisiensi TLR4 pada mencit menyebabkan peningkatan IgE, reaksi anafilaktik dan penurunan IFN- $\gamma$  dalam merespons alergen Ara h 1. Pada penelitian itu juga dilaporkan bahwa pemberian antibiotik pada mencit menyebabkan peningkatan IgE dan reaksi anafilaktik serta penurunan IFN- $\gamma$  dalam merespons alergen Ara h 1 (baik pada TLR4 normal maupun tidak), karena pemberian antibiotik menurunkan jumlah mikrobiota normal saluran cerna.

Eisenbarth dan kawan-kawan (2002) melaporkan bahwa defisiensi TLR4 pada mencit menurunkan IgE namun tidak menurunkan IgG2a dalam merespons OVA. Sementara itu Dabbagh dan kawan-kawan melaporkan bahwa defisiensi TLR4 menyebabkan penurunan IgE, IL-4, IL-5 dan IFN- $\gamma$  dalam merespons OVA (Dabbagh *et al.*, 2002).

Penelitian lain yang menguji efektivitas probiotik *Lactobacillus* dalam menurunkan reaksi alergi melaporkan adanya penurunan kadar IgE spesifik dan reaksi anafilaksis (Shida *et al.*, 2001), meningkatkan sitokin Treg - IL-10 - (Pessi *et al.*, 2000) dan peningkatan sitokin T<sub>H</sub>1- IFN $\gamma$  - (Pohjavouri *et al.*, 2004), tanpa disertai oleh penurunan sitokin T<sub>H</sub>2 (Rautava *et al.*, 2005).

Konsisten dengan hasil penelitian ini, kemampuan probiotik dalam mempertahankan homeostasis telah dibuktikan pada berbagai penelitian lain, misalnya: (1). Dalam menghadapi ancaman sitokin induktor apoptosis, LGG mampu mempertahankan homeostasis saluran cerna dengan mengaktifasi molekul anti-apoptosis Akt dan protein kinase B sekaligus menginaktivasi molekul pro-apoptosis p38 pada kaskade sinyal MAPK (Yan dan Polk, 2002); (2). Dalam menghadapi reaksi inflamasi yang ditimbulkan oleh pajanan LPS, komponen LTA (*lipoteichoic acid*) dari probiotik mampu menjaga kondisi homeostasis melawan pajanan LPS yang terus menerus (Otte *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini, hambatan pada sinyal TLR2 pada kelompok mencit penerima probiotik LGG - dalam peran sebagai agonist TLR2 - menyebabkan kegagalan peningkatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  (Tabel 5.3 dan Gambar 5.10). Sebaliknya hambatan pada sinyal TLR2 pada kelompok mencit penerima probiotik LIS - dalam peran sebagai agonist TLR2 - tidak menimbulkan kegagalan dalam peningkatan IL-2 (Tabel 5.3 dan Gambar 5.9).

Komai-Koma dan kawan-kawan (2004) menunjukkan bahwa defisiensi TLR2 pada mencit yang diinduksi OVA menyebabkan peran BLP (agonist TLR2) gagal dalam peningkatan IFN- $\gamma$ , namun sedikit berhasil dalam peningkatan IL-2 dan IL-10.

### 6.2.3 Penelitian lain mengenai pengaruh probiotik pada IgA

Peningkatan kadar IgAspOVA di serum dan mukosa ileum yang terjadi pada penelitian ini mengkonfirmasi hasil penelitian Rautava dan kawan-kawan (2006) yang menunjukkan bahwa pemberian LGG maupun *Bifidobacterium lactis* bersama protein susu sapi pada bayi alergi protein susu sapi menyebabkan peningkatan IgA spesifik terhadap protein susu sapi. IgE spesifik terhadap OVA pada penelitian ini tidak meningkat karena protein OVA sudah dieksklusi terlebih dahulu oleh IgAsp OVA mukosa ileum dan sIgAspOVA lumen usus (Favre *et al.*, 2005, Finkelman *et al.*, 2005).

Penelitian lain melaporkan bahwa aktivasi TLR2 oleh probiotik *Lactobacillus casei* disertai peningkatan produksi IgA. *Lactobacillus casei* pada penelitian tersebut berfungsi sebagai ligan TLR2 dan merupakan stimulan poliklonal "innate IgA" (Galdeano dan Perdigon, 2006; Wijburg *et al.*, 2006). "Innate IgA" - merupakan istilah baru yang dikemukakan tim peneliti tersebut - disintesis tanpa melewati aktivasi Limfosit T. Konsisten dengan hasil penelitian tersebut, pada penelitian ini aktivasi TLR2 oleh

dengan hasil penurunan insiden hanya terjadi pada bayi dan anak (Kalliomaki *et al.*, 2003); (2). Respons imun, dengan hasil peningkatan sitokin  $T_{reg}$  tanpa penurunan IgE (Rautava *et al.*, 2002); (3). Gejala klinik, dengan hasil penurunan gejala tanpa perubahan produksi sitokin  $T_H1$  (IFN- $\gamma$  dan IL-2),  $T_{reg}$  (IL-10) dan  $T_H2$  (IL-4) (Rosenfeldt *et al.*, 2003); (4). Kualitas hidup, dengan hasil perbaikan kualitas hidup tanpa kemajuan klinis dan penurunan IgE (Wang *et al.*, 2004).

Keraguan pemanfaatan dalam klinik juga ditimbulkan oleh penjelasan yang beragam mengenai mekanisme perbaikan penyakit alergi oleh probiotik (Furrie, 2005), misalnya: (1). Probiotik memperbaiki reaksi alergi melalui perbaikan permeabilitas usus (Rosenfeldt *et al.*, 2004); (2). Probiotik memperbaiki reaksi alergi melalui peningkatan produksi IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  dilaporkan memediasi pergerakan alergen antar sel melalui proses endositosis, sehingga presentasi alergen oleh APC menjadi efektif dalam menginduksi toleransi (Buning, *et al.*, 2005); (3). Probiotik memperbaiki reaksi alergi dengan cara memperkuat transport antar sel melalui *tight junction* agar tidak ditembus oleh alergen sehingga reaktivitas sel imun dapat diregulasi oleh sistem imun mukosa yang telah ada (Qin *et al.*, 2005). Keberagaman penjelasan mengenai mekanisme probiotik dalam menurunkan reaksi alergi sebenarnya dapat difahami karena peran probiotik adalah membantu pemulihan homeostasis, sementara itu homeostasis sendiri merupakan hasil akhir dari suatu interaksi multifaktor yang meliputi aspek genetik, mikrobiota normal, alergen, dan proses digestif (Sampson, 2005).

### 6.3 Penemuan baru

Penelitian ini merupakan penelitian pertama yang membahas mekanisme imunopatogenesis probiotik dalam penurunan reaksi alergi secara menyeluruh mulai dari

aktivasi respons imun *innate* (TLR dan NF- $\kappa$ B), aktivasi respons imun adaptif ( $T_H1$ ,  $T_H2$  dan  $T_{reg}$ ), produksi imunoglobulin (IgG2a, IgA dan IgE) sampai pada reaksi alergi yang terjadi (histamin dan skor gejala) (Tabel 5.2). Penelitian ini dilakukan sebagai usaha untuk mendapatkan penjelasan ilmiah yang lebih komprehensif atas permasalahan imunopatogenesis yang menyebabkan keraguan klinisi dalam pemanfaatan probiotik sebagai induktor toleransi alergi.

Fakta baru penting yang dihasilkan penelitian ini adalah dalam penurunan reaksi alergi, probiotik LGG dan LIS membangun tingkat homeostasis baru yang menguntungkan *host* dalam menghadapi stresor ovalbumin (Gambar 5.8). Fakta ini menjawab misteri mengapa probiotik dalam menurunkan reaksi alergi tidak menurunkan IL-4 dan IgE total.

Penelitian ini telah menunjukkan bahwa dalam menurunkan reaksi alergi, probiotik LGG dan LIS mampu mengubah dominasi respons imun  $T_H2$  ( $T_H1 < T_{reg} < T_H2$ ) tanpa melalui penurunan tingkat respons imun  $T_H2$ . Tingkat respons imun  $T_H2$  oleh subyek alergi yang mendapat probiotik LGG dan LIS dibiarkan tetap tinggi dan tetap mengalami peningkatan. Namun peningkatan respons imun  $T_H1$  dan  $T_{reg}$  dibangun lebih tinggi, sehingga respons imun adaptif menjadi seimbang ( $T_H1 = T_{reg} = T_H2$ ) seperti yang terjadi pada pemberian probiotik LGG atau menjadi dominan ke  $T_H1$  ( $T_H1 > T_{reg} > T_H2$ ) seperti yang terjadi pada pemberian probiotik LIS (Gambar 5.8). Kondisi respons imun adaptif yang seimbang ( $T_H1 = T_{reg} = T_H2$ ) atau didominasi  $T_H1$  ( $T_H1 > T_{reg} > T_H2$ ) menyebabkan degranulasi sel mast tidak terjadi, sehingga reaksi alergi juga tidak terjadi (Finkelman, 2006; Prussin dan Metcalfe, 2006; Ruecken *et al.*, 2003).

Sumbangan baru bagi ilmu pengetahuan dari penelitian ini adalah menjelaskan mekanisme kerja probiotik LGG dan LIS 10506 dalam menurunkan reaksi alergi sebagai hasil penemuan jawaban baru bagi masalah yang sebelumnya belum diketahui jawabannya yaitu reaksi alergi yang membaik karena pemberian probiotik LGG dan LIS terjadi melalui keterlibatan TLR2 dan TLR4.

Teori baru yang ditemukan pada penelitian ini terhadap hal yang dipandang telah mapan dalam ilmu alergi (alergologi) adalah teori yang menjelaskan bahwa penurunan reaksi alergi oleh probiotik dicapai melalui peningkatan bersama  $T_H1$ ,  $T_H2$  dan Treg untuk membentuk tingkat keseimbangan  $T_H1$ - $T_H2$  baru yang lebih tinggi dari kondisi awal (kontrol). Teori lama menjelaskan bahwa penurunan reaksi alergi dicapai melalui pengembalian keseimbangan  $T_H1$ - $T_H2$  seperti pada kondisi awal (kontrol), yang berarti dengan meningkatkan  $T_H1$  dan menurunkan  $T_H2$ .

## 6.4 Implikasi hasil

### 6.4.1 Pemanfaatan hasil penelitian

Temuan yang telah dibahas di atas mempunyai implikasi dalamantisipasi terhadap efek samping yang akan terjadi pada pemberian probiotik LGG atau LIS dan pada pengembangan penatalaksanaan kasus alergi. Pengembangan penggunaan probiotik LGG dan LIS pada subyek manusia diperlukan untuk: (1). Membantu mencegah terjadinya reaksi anafilaksis dan mencegah perkembangan penyakit menjadi kronis pada subyek penderita alergi yang tak mampu menghindari paparan bahan alergenik; (2). Memperbanyak alternatif terapi melalui induksi toleransi imunologik karena probiotik ini bekerja melalui sistem imun *innate* yang bersifat non spesifik yang akan bermanfaat

untuk penderita alergi yang tidak mampu menghindari paparan alergen atau yang belum dapat mengidentifikasi alergen dengan akibat sangat tergantung pada terapi medikamentosa dan menurunkan reaksi alergi secara tanpa merekayasa status genetik individu.

#### **6.4.2 Kewaspadaan terhadap efek samping**

Dalam penggunaan sehari-hari probiotik LGG dan LIS, diperlukan kewaspadaan terhadap efek samping dan komplikasi yang mungkin timbul yaitu pada subyek yang mengalami gangguan ekspresi TLR2 dan TLR4 (mutasi TLR2, mutasi TLR4 dan sebagainya), risiko hiper-aktivasi TLR2 dan TLR4 dan masih tingginya respons imun TH2 yang tidak dapat dikendalikan probiotik ini.

#### **6.4.3 Tindak lanjut terhadap temuan**

Penelitian ini berusaha menerangkan fenomena klinik yang terjadi pada manusia melalui pemodelan pada mencit Balb/c. Relevansi penggunaan mencit Balb/c adalah sekuens genom mereka sebagian besar mirip atau homolog dengan manusia. Variabel penting yang dievaluasi pada penelitian ini semuanya homolog secara imunogenetik dengan manusia (Mestas dan Hughes, 2004). Karena kemiripan imunogenetik tersebut, maka apabila hasil penelitian ini diekstrapolasikan pada manusia paling tidak akan mempunyai manfaat praktis dalam: (1). Antisipasi efek samping dan komplikasi pemberian probiotik LGG dan LIS; (2). Pengembangan talaksana kasus alergi; dan (3). Pemberian dasar bagi pengembangan alternatif terapi alergi melalui induksi toleransi imunologis.

Pada penelitian ini telah dilihat bahwa pemberian *LY294002* dan *PD98059* *in vivo* dengan dosis rendah secara intraperitoneal dalam 28 hari tidak mempengaruhi reaksi alergi yang terjadi pada kontrol. Dengan metode penelitian ini, diharapkan senyawa *LY294002* dan *PD98059* dapat dimanfaatkan dalam uji *in vivo* untuk membuktikan apakah suatu senyawa mampu menginduksi toleransi alergi melalui TLR2 dan TLR4, karena kedua senyawa tersebut pada dosis rendah mampu mempengaruhi sinyal yang dihasilkan oleh TLR2 dan TLR4, tidak membahayakan hewan coba dan tidak mengganggu terjadinya reaksi alergi oleh ovalbumin.

Metode ini diharapkan mampu meningkatkan penemuan obat atau induktor toleransi alergenik selain probiotik LGG dan LIS, sehingga individu alergi mempunyai banyak alternatif terapi sesuai dengan situasi dan kondisi yang sedang dihadapinya dengan tanpa ketergantungan pada terapi medikamentosa.



## Bab 7

### PENUTUP

#### 7.1 Simpulan

1. Pemberian probiotik *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 (LIS) tidak menurunkan reaksi alergi melalui penurunan IL-4 dan IgE<sub>total</sub>, tetapi melalui peningkatan sitokin T<sub>H1</sub>, T<sub>reg</sub>, dan sintesis IgA<sub>spesifik</sub> yang mencegah proses degranulasi sel mast melalui penurunan IgE<sub>spesifik</sub>.
2. Melalui aktivasi TLR2 dan TLR4, probiotik LGG dan LIS meningkatkan kemampuan *host* memantau dan mencegah ketidakseimbangan respons imun akibat sensitisasi alergen dengan cara meningkatkan bersama-sama T<sub>H1</sub>, T<sub>reg</sub> dan T<sub>H2</sub> untuk membentuk tingkat keseimbangan baru T<sub>H1</sub>-T<sub>reg</sub>-T<sub>H2</sub> yang lebih tinggi tanpa menurunkan T<sub>H2</sub>.
3. Penelitian ini menghasilkan teori baru yang menjelaskan bahwa penurunan reaksi alergi oleh probiotik LGG dan LIS dicapai melalui peningkatan bersama-sama T<sub>H1</sub>, T<sub>reg</sub> dan T<sub>H2</sub> untuk membentuk keseimbangan T<sub>H1</sub>-T<sub>reg</sub>-T<sub>H2</sub> baru ke tingkat yang lebih tinggi dari kondisi awal atau kontrol tanpa melalui penurunan T<sub>H2</sub>. Berdasarkan teori lama, penurunan reaksi alergi terjadi melalui pengembalian kondisi keseimbangan yang didominasi oleh T<sub>H2</sub> ke kondisi T<sub>H1</sub> yang sejajar kembali dengan T<sub>H1</sub> awal atau kontrol, yang berarti dengan menurunkan T<sub>H2</sub>.

## 7.2 Saran

1. Perlu pengembangan penggunaan probiotik LGG dan LIS pada subyek manusia dalam upaya: (a).mencegah reaksi anafilaksis dan perkembangan penyakit menjadi kronis pada penderita alergi baik pada bayi, anak maupun orang dewasa yang tidak mampu menghindari paparan bahan alergenik; (b).memperbanyak alternatif terapi melalui induksi toleransi imunologik karena probiotik ini bekerja melalui sistem imun *innate* yang bersifat non spesifik yang akan bermanfaat untuk penderita alergi yang tidak mampu menghindari paparan alergen atau yang belum dapat mengidentifikasi alergen dengan akibat sangat tergantung pada terapi medikamentosa; (c).menurunkan reaksi alergi tanpa memanipulasi aspek genetik.
2. Perlu diwaspadai efek samping dan komplikasi yang mungkin timbul dari penggunaan probiotik LGG dan LIS pada subyek yang mengalami gangguan ekspresi TLR2 dan TLR4. Antisipasi terhadap efek samping dan komplikasi akibat gangguan ekspresi TLR2 dan TLR4 dilakukan dengan cara mendeteksi apakah individu yang akan diberi probiotik LGG dan LIS menderita imunodefisiensi, sepsis, mutasi genetik atau kelainan lainnya yang diduga atau telah terbukti berpengaruh pada gangguan ekspresi TLR2 dan TLR4.
3. Temuan dan metode penelitian ini dapat dijadikan sebagai landasan untuk eksplorasi ligan baru TLR2 dan TLR4 yang dapat berfungsi sebagai modulator toleransi imunologis alergi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Litchman AH, 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Saunders pp 275-297.
- Agarwal R, Sharma N, Chaudhry R, 2003. Effects of oral Lactobacillus GG on enteric microflora in low-birth-weight neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36:397-402.
- Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Lenis J, Van Dyke T, Pulendran B, 2003. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen Activated Protein Kinase and c-Fos1. *J Immunol*, 17: 14984-14989.
- Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT, 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2: 725-731.
- Alessi DR, 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494
- Apostolou E, Peltó L, Kirjavainen PV, Isolauri E, Salminen SJ, Gibson GR, 2001. Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization. *FEMS Immunol Med Microbiol* 200130:217-221.
- Arshad SH, 2005. Primary prevention of asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol* 116: 3-14.
- Ashcroft RE, 2004. Current epistemological problem in evidence based medicine. *J Med Ethics* 30: 131-135.
- Atherton KT, Dearman RJ, Kimber I, 2002. Protein Allergenicity in Mice. A Potential Approach for Hazard Identification. *Ann. N.Y. Acad.Sci* 964: 163-171
- Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, 1996. Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations. *Genomics* 37: 41-50.
- Bashir MEH, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C, 2004. Toll-Like Receptor 4 Signaling by Intestinal Microbes Influences Susceptibility to Food Allergy. *J Immunol* 172: 6978-87.
- Borish L, 2003. Allergic rhinitis: Systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol* 112: 1021-1031.
- Bousquet J, Hejjaoui A, Clauzel AM, Guerin B, Dhivert H, Skassa-Brociek W et al, 1988. Specific immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. II.Prediction of efficacy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2:971.
- Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang LK, 2006 Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 83:1256-1564.
- Brandtzaeg P, 2002. Current Understanding of Gastrointestinal Immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 964: 13-45.
- Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM, Kleerebezem M, 2004. Identification of Lactobacillus plantarum genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J Bacteriol* 186(17): 5721-5729.

- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Brooks G, Butel J, Morse S, 2004. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology (LANGF Basic Sci.). 23<sup>rd</sup>ed. Boston: McGraw-Hill, pp1-770.
- Brunner E, Dette H, Munk A, 1997. Box-type approximations in non parametric factorial design. *J Am Stat Assoc* 92: 1394-1502.
- Buning J, Schmitz M, Reppenning B, Ludwig D, Schmidt MA, Strobel S, Zimmer K-Ph, 2005. Interferon g mediates antigen trafficking to MHC class II positive late endosomes of enterocytes. *Eur J Immunol* 35: 831-842.
- Cataloluk O, Gogebakan B, 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS Microbiol Lett* 236(1):7-12.
- Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA, 2001. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on  $\alpha$ s1-casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy *J Allergy Clin Immunol* 107: 379-83.
- Chatelain RK, Varkila RK, Coffman RL. 1992. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J. Immunol* 148:1182.
- Chinen J, Finkelman F, Shearer WT, 2006. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 118: 489-495.
- Christensen HR, Frøkiær H, Pestka JJ, 2002. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *J Immunol*. 168: 171-178.
- Collado MC, Surono IS, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Potential probiotic characteristics of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization. *J Food Prot* (in press).
- Coon KA, Golberg J, Rogers BL, Tucker KR, 2001. Relationship between use of television during meals and children's food consumption patterns. *Pediatrics* 107: 1-9.
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP, 2005. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl Env Microbiol* 71(6): 3060-3067.
- Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Bick P, Lewis DB, 2003. Toll Like Receptor 4 is Required for Optimal Development of Th2 Immune Responses: Role of Dendritic Cells. *J Immunol* 168, 4524-4530.
- Daeron M, 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 3:635-646.
- de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vo WM. 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* 16:1018-1028.
- Dearman RJ, Stone S, Caddick HT, Basketter DA, Kimber I, 2003. Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose-response analyses. *Clin Exp Allergy* 33: 1586-1584.
- Deichmann KA, Starke B, Schlenther S, Heinzmann A, Sparlot SH, Foster J, 1999. Linkage and association studies of atopy and the chromosome 11q13 region. *J Med Genet* 36: 379-382.

- Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL, 2005. *Lactobacillus GG: Bacteriology and Clinical Applications*. *Gastroenterol Clin N Am* 34: 483-498.
- Drachenberg KJ, Heizkill M, Urban E, Woroniecki SR, 2003. Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. *Allergol Immunopathol (Madr.)* 38: 811-819.
- Durand V, Wong SYC, Tough DF, Le Bon A, 2004. Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: A role for IFN- $\alpha/\beta$ . *Immunol Cell Biology*; 82: 596-602
- Eder W, 2004. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J. Allergy. Clin. Immunol* 113:482-488.
- Eisenharth SC, 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med* 196:1645-1651.
- Favre L, Spertini F, Corthesy B, 2005. Secretory IgA Possesses Intrinsic Modulatory properties Stimulating Mucosal and Systemic Immune Responses. *J Immunol* 175: 2783-2800.
- Ferrandi C, Ji H, Rommel C, Cirillo R, 2003. The PI3K Kinase Inhibitor, Ly294002, decrease RANTES induced peritoneal recruitment of neutrophils in mice. *Cell Mol Biol Lett* 8:579-581.
- Finkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT, 2006. Molecular mechanism of anaphylaxis: Lessons from studies with murine model. *J Allergy Clin Immunol* 115: 449-457.
- Floch MH, Montrose DC, 2005. Use of Probiotics in Humans: An Analysis of the Literature. *Gastroenterol Clin N Am* 34: 547-570.
- Fox JG, Chen BG, Loew FM, 1984. *Laboratory Animal Medicine*. San Diego: Academic Press.
- Frew AJ. 2003. Immunotherapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 111:5712-9
- Frossard CP, Hauser C, Eigenmann PA, 2004. Antigen-specific secretory IgA antibodies in the gut are decreased in a mouse model of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114:377-382.
- Fukao T, Kotasu A, 2003. PI3K and negative regulation of TLR signalling. *Trends in Immunol* 24(7):358-363.
- Furrie E, 2005. Probiotic and Allergy. *Proc Nutrition Society* 64:1-5.
- Galdeano CM, Perdigon G, 2006. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clin Vaccine Immunol* 13(2): 219-226.
- Gore C, Custovic A, 2004. Can we prevent allergy? *Allergy* 59: 151-161
- Haller D, Colbus H, Ganzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP, 2001. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Sys Appl Microbiol* 24: 218-226.
- Hammad H, Lambrecht BN, 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation *J Allergy Clin Immunol* 118:331-336.
- Hanafiah KI, 2004. *Rancangan Percobaan. Teori dan Aplikasi*. Edisi ke 3. Jakarta: PT Radja Grafindo Persada, hlm 9-10.

- Hart AL, Lammers A, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ, 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53: 1602-1609.
- Hawrylowicz, O'Garra A, 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 271-283.
- Hijazi N, Abalkhail B, Seaton A, 2000. Diet and childhood asthma in a society in transition: a study in urban and rural Saudi Arabia. *Thorax* 55:775-9.
- Holt PG, Jones CA, 2000 The development of the immune system during pregnancy. *Allergy* 55: 688-697.
- Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U, 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutrition* 73(2):365S-373S.
- Homer AA, 2006. Toll-like receptor ligands and atopy: A coin with at least two sides. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1133-1144.
- Hsieh KY, Hsu CI, Lin JY, Tsai CC, Lin RH, 2003. Oral administration of an edible-mushroom- derived protein inhibit the development of food-allergic reaction in mice. *Clin Exp Allergy* 33: 1595-1602.
- Hsu LC, 2004. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 428 (6980):341-5.
- Hulley SB, Feigal D, Martin M, Cummings SR, 1988. Designing a New Study:IV.Experiments. In (Hulley SB Cummings SR eds: *Designing Clinical Research*. 1st ed) Baltimore:William & Wilkins, pp 111-127.
- Hume CW, 1972. The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory Animal 4<sup>th</sup>ed. Edinburg: Churchill Livingstone, pp 199-204.
- Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T, 2004. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell. Microbiol.* 13: 1-12.
- International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema, 1998. *ISAAC. Lancet* 351: 1225-32.
- Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S, 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30:1604-10.
- Isolauri E, Rautava S, Kalliomaki M, Kirjavainen P, Salminen S, 2002. Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2(3):263-71.
- Iwasaki A, Medzhitov R, 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5(10): 987-995.
- Johansson ML, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Bjorck I, Ahme S, 1998. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int J Food Microbiol* 42(1-2): 29-38.
- Kaisho T, Akira S, 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:976-987.
- Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E, 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869-1871.

- Kalliomäki M. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357(9262): 1076-1079.
- Karlsson H, Larsson P, Wold EW, Rudin A, 2004. Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells. *Infect Immun* 72: 2671-2678.
- JENA IS A KEY MECHANISM FOR LACTOBACILLUS FORTIFYGUS-INDUCED SUPPRESSION OF IL12 production in macrophages. *Cell Microbiol* 13: 1-13.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(4):1990-1995.
- Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew, FY, 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Nat Acad Sci. USA* 101(9): 3029-3034.
- Krauss G, 2001. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 2<sup>nd</sup>ed. Bayreuth: Weinheim Wiley-VCH, pp 216-357.
- Krech D, Crutchfield RS, Ballachey EL, 1962. *Individual in society. A Textbook of social psychology*. Tokyo: Mc Graw Hill Ltd.
- Kuroda E, Kito T, Yamashita U, 2002. Reduced Expression of STAT4 and IFN- $\gamma$  in Macrophages. *J Immunol* 168: 5477-5482.
- Kusumawati D, 2005. *Bersahabat dengan hewan coba*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hlm 5-118.
- Lali FV, 2000. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 275(10):7395-7402.
- Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas SGB, 1998. Induction of rapid T cell activation, division and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR-transgenic model. *J Immunol* 164, 2937-2946.
- Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. 1999. *Handbook of Probiotics*. New York: John Wiley & Sons.
- Lehto EM, Salminen SJ, 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GSpent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunol Med Microbiol* 18:125-32.
- Lindemann RA 1988. Bacterial activation of human natural killer cells: role of cell surface lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 56 (5): 1301-1308.
- Malbec O, 1998. Fc epsilon receptor 1-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J. Immunol*. 160: 1647-1658.
- Mansur AH, Bishop DT, Markham AF, Morton NE, Holgate ST Morrison JF, 1999. Suggestive evidence for genetic linkage between IgE phenotypes and chromosome 14q markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1796-802.
- Marsh DG, Nelly JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Erlich-Kautzky E, 1994. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentration. *Sci*. 264 : 1152-1156.

- Riedel CU, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S, 2006. Anti-inflammatory effect of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation. *World J gastroenterol* 12(23): 3729-3735.
- Roecken M, Grevers G, Burgdorf W, 2003. Allergen. In: Roecken M, Grevers G, Burgdorf W eds. *Allergic Disease* 1th ed. New York: Georg Thieme Verlag: 34-43.
- Romagnani S, 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112: 352-363.
- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri F, 2006. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cell from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutrition* 95:1174-1184.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen DS, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A, 2003. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111: 389-395.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF, 2004. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatrics* 145:612-616.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A, 2004. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111: 389-395.
- Ross PR, Morgan S, Hill C, 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future. *Int J Food Microbiol* 79(1-2): 3-16.
- Saito T, 2004 Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods *Animal Sci J* 75: 1-13
- Salminen MK, Rautelin H, Tynkynen S, 2004. *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clin Infect Dis* 38:62-69.
- Salminen MK, Tynkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Rautu P, 2002. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35(10):1155-1160.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK, 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci Tech* 10:107-110.
- Sampson HA, 2005. Food Allergy: When mucosal immunity goes wrong. *J Allergy Clin Immunol* 115: 139-141.
- Sansonetti J, 2006. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 7: 1237-1242.
- Sarwono S, 2004. *Sosiologi Kesehatan*. Gadjah ada University Press.
- Saxelin M, Elin S, Salminen S, Vapaatalo H, 1991. Dose response colonization of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. *Microbial Ecol Health Dis* 4: 209-214.
- Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG, 1991. Studies on the density, distribution and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 173: 1345-1356.



- Schultz M, Gottl C, Young RJ, Iwen P, Vanderhoof JA, 2004. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 38:293-297.
- Scott P, 1991. IFN- $\gamma$  modulates the early development of T<sub>H1</sub> and T<sub>H2</sub> responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol* 147: 3140-3149.
- Scott P, Scharton T, 1994. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Ann. NY Acad. Sci* 730: 784.
- Shah DA, Madden LV, 2004. Nonparametric Analysis of Ordinal Data in Designed Factorial Experiment. *Phytopatology* 94:33-43
- Shida K, Takahashi R, Iwadata E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, 2001. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 32: 563-570.
- Singh VP, Saluja AK, Bhagat I, van Acker GJD, Song AM, Soltoff SP, Cantley LC, Steer ML, 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulate the severity of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 108: 1387-1395.
- Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, 2003. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 21:785-789.
- Sudiana IK, 2004. *Teknologi ilmu jaringan dan imunohistokimia*. Jakarta: Sagung Seto, hlm 6-47.
- Sundaru, 2005. Apa yang perlu diketahui tentang asma. Available at <http://www.depkes.go.id/popups/articlewindow.php.id> diunduh pada tanggal 21 September 2005.
- Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H, 2002. Differential responses of mast cell Toll-Like receptor 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin. Invest* 109: 1351-1359.
- Surono IS, Hosono A, 1996. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria from dadih against mutagenic terasi. *Milchwissenschaft*. 51: 493-497.
- Surono, I.S. 2003. In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 16: 726-731.
- Takeda K, Akira S, 2004. *Seminars in Immunology* 16 : 3-9
- Takeda K, 2005. Toll-like Receptors and their Adaptor in Innate Immunity. *Curr Med Chem* 4: 3-11.
- Tamaoki J, Tagaya E, Kawatami K, Nakata J, Endo Y, Nagai A 2004. Airway mucosal Thickening Bronchial Hyperresponsiveness Induced by Inhaled  $\beta$ 2-Agonist in mice. *Chest* 126: 205-212.
- Tannock GW, 2004. A special fondness for Lactobacilli. *Appl Env Microbiol* 70(6): 3189-3194.
- Taylor RC, Richmond P, Upham JW, 2006. Toll-like receptor 2 ligand inhibit TH2 responses to mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1148-1154.
- Tiemessen MM, 2004. Cow's milk-specific Tcell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: key role for IL-10. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 932-939.

- Tripathi P, Aggarwal A, 2006. NF- $\kappa$ B transkripsion factor: a key player in the generation of immune response. *Curr Sci* 90(4): 519-531.
- Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari, Macaubas C, DeKruyff RH, 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol* 3: 715-720.
- Vesa T, Pochart P, Marteau P, 2000. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD, and *Lactococcus lactis* MG 1363 in the human gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacol Ther* 14(6): 823-828.
- Viljanen M, Kuitunen M, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Savilahti E, 2005a. Probiotic effects on faecal inflammatory markers and on faecal IgA in food allergic atopic eczema/dermatitis syndrome infants. *Pediatr Allergy Immunol* 16: 65-71.
- Viljanen M, Pohjavuori E, Haahtela T, Korpela R, Kuitunen M, Sarnesto A, Vaarala O, Savilahti E, 2005b. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 115:1254-1259.
- Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M, 2004. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 10: 1-5.
- Vlahost CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF, 1994. A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241-5248.
- von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ, 2001. Induction by a Lactic Acid Bacterium of a Population of CD41 T Cells with Low Proliferative Capacity That Produce Transforming Growth Factor  $\beta$  and Interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 695-701.
- von der Weid T, Ibnou-Zekri N, Pfeifer A, 2003. Novel probiotics for the management of allergic inflammation. *Dig Liver Dis*. 34 Suppl 2: S25-8.
- Vuurman EF, van Veggel LM, Uiterwijk MM, Leutner D, O'Hanlon JF, 1993. Seasonal allergic rhinitis and antihistamine effects on children's learning. *Ann Allergy* 115: 254-259.
- Wachholz PA., Soni NK, Till SJ, Durham SR. 2003. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol* 112:915-922.
- Wagner RD, Pierson C, Warner T, 1997. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 65: 4165-4172.
- Wahn U, Nickel R, Illi S, Lau S, Gruber C, Hamelmann E, 2004. Strategies for early prevention of allergic disorders. *Clin Exp All Rev* 4:194-199.
- Wang MF, Lin HC, Wang YY, Hsu CH, 2004. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Ped Allergy Immunol* 15:152-158.
- Warner JO, 2004. The early life origins of asthma and related allergic disorders. A focus on the way the disease evolves in early life. *Arch Dis Child* 89:97-102.
- Wijburg OLC, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen F, Brandtzaeg P, Strugnel RS, 2006. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med* 203: 21-26.
- World Health Organisation. Prevention of Allergy and Allergic Asthma. Geneva 2002.

- Yan F, Polk DB, 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 50959-50965.
- Zainuddin M, 1995. *Metodologi Penelitian*. Surabaya: Pasca Sarjana Universitas Airlangga, hlm 26-57.
- Zeuthen LH, Christensen HR, Frokier H, 2006. Lactic Acid Bacteria Inducing a weak Interleukin-2 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram Negative Bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 13: 365-375.
- Zhang G, Ghosh S, 2001. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107: 13-9.
- Zhu D, Kepley CL, Zhang M, Zhang K, Saxon A, 2002. A novel human immunoglobulin Fc gamma Fc epsilon bifunctional fusion protein inhibits Fc epsilon RI-mediated degranulation. *Nat. Med.* 8: 518-521.
- Zou W, 2003. CpG oligodeoxynucleotides modulate the osteoclastogenic activity of osteoblasts via Toll-like receptor 9. *J Biol Chem.* 278(19):16732-16740.



**Lampiran 1. Sertifikat Kelaikan Etik**



## Lampiran 2 **Prosedur Kerja Pemberian Ovalbumin, Probiotik, inhibitor TLR dan Pengamatan Gejala**

### I. **Pemberian Sensitisasi Alergen Ovalbumin per-oral (po) dan intraperitoneal (ip):**

| <b>Nama Bahan</b>          | <b>Sasaran</b>   | <b>Waktu</b>                              | <b>Pembuatan</b>  | <b>Dosis</b> |
|----------------------------|--|---|---|--------------|
| Ovalbumin (1000 mg / vial) | 54 mencit dari semua kelompok (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9) | Hari ke 4 dengan dosis 10 µg/mencit/ka    | OVA 1,00 mg ditambah $\text{Al(OH)}_3$ sampai volume 15-38 cc | 0,15 cc ip   |
|                            |  | Hari ke 20 dengan dosis 20 µg/mencit/kali | OVA 1,00 mg ditambah PBS sampai volume 5 cc                   | 0,10 cc ip   |
|                            |  | Hari ke 30 dengan dosis 50 µg/mencit/kali | OVA 3000 mg ditambah PBS sampai volume 12 cc                  | 0,2 cc po    |

### II. **Pemberian per oral (po) perlakuan probiotik :**

| <b>Nama Bahan</b>                                    | <b>Sasaran</b>                            | <b>Waktu</b>  | <b>Pembuatan</b>  | <b>Dosis</b>                             |
|--|---|---|---|--|
| 1. Probiotik LGG (0,53 x10 <sup>9</sup> CFU LGG/ mg) | 6 mencit K1<br>6 mencit K2<br>6 mencit K3 | Setiap hari, selama 28 hari (hari ke 1 sampai hari ke 28) dengan dosis 5,3 mg/mencit/hari | Probiotik LGG 106 mg ditambahkan dalam 1% skim milk steril, dicampur merata sampai volume 10 cc | 0,5 cc po (2,8x10 <sup>8</sup> CFU/hari) |
| 2. Probiotik LIS (2,67 x10 <sup>9</sup> CFU LIS/ mg) | 6 mencit K4<br>6 mencit K5<br>5 mencit K6 | Setiap hari, selama 28 hari (hari ke 1 sampai hari ke 28) dengan dosis 1,0 mg/mencit/hari | Probiotik LIS 20 mg ditambahkan dalam 1% skim milk steril, dicampur merata sampai volume 10 cc  | 0,5 cc po (2,7x10 <sup>9</sup> CFU/hari) |
| 3. Placebo (skim milk 1 %)                           | 6 mencit K7<br>6 mencit K8<br>6 mencit K9 | Setiap hari, selama 28 hari (hari ke 1 sampai hari ke 28) dengan dosis 1%:mencit/hari     | 100 µg susu skim ditambah PBS dicampur merata sampai volume 10 cc                               | 0,5 cc po                                |

### Lampiran 3 **Prosedur Kerja Pemeriksaan TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp 105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4 dan IL-5 dengan Metode Immunohistokimia**

---

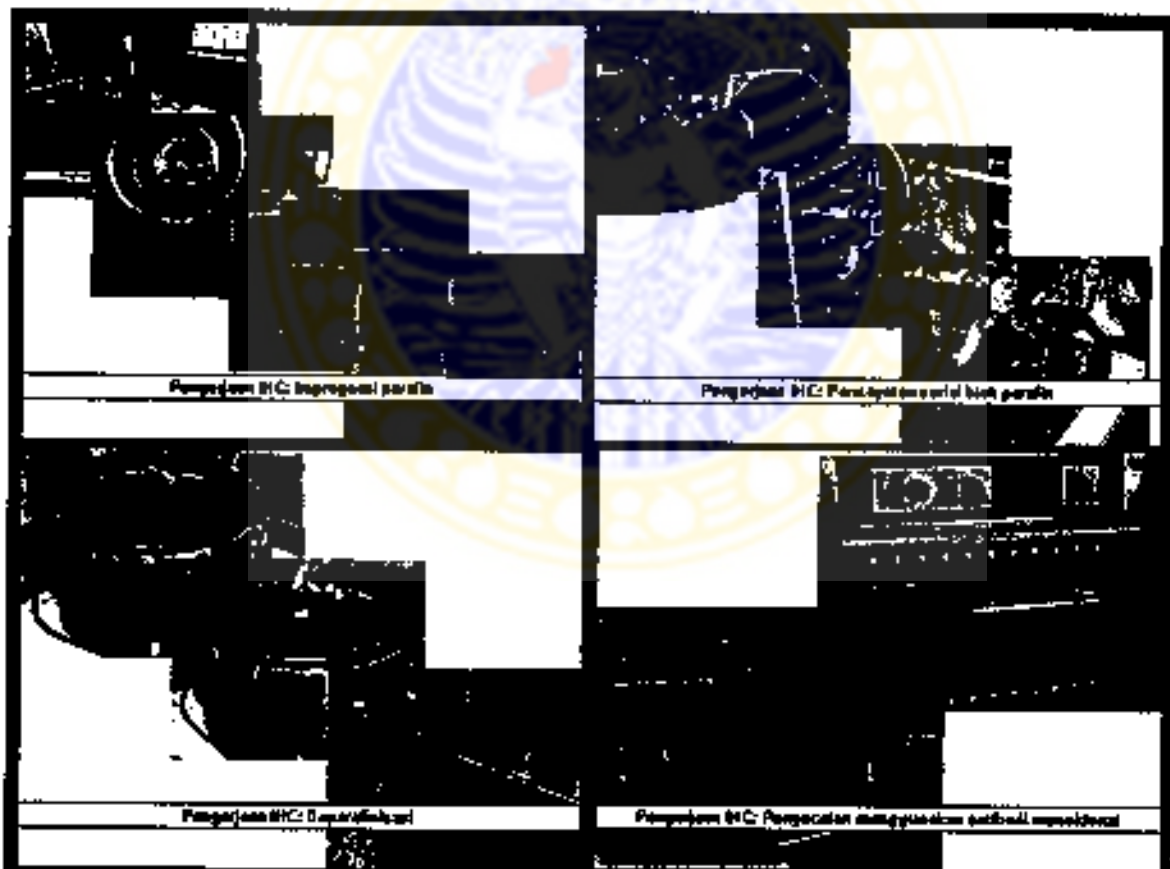
#### **I. Persiapan bahan jaringan untuk imunohistokimia**

1. Sampel jaringan ileum yang disiapkan 54 sampel.
2. Sampel diletakkan pada cawan yang mengandung *phosphate-buffered saline (PBS)*.
3. Sampel difiksasi dan didhidrasi dalam aseton pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 20 jam, dilakukan penjernihan dengan *methyl benzoate* dan *xylene*, dan selanjutnya dipenetrasi (impregnasi) dengan *paraffin*.
4. Blok *paraffin* yang telah dihasilkan disimpan pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  sambil menunggu dilakukan penyayatan jaringan.
5. Dari blok *paraffin* dilakukan penyayatan serial sebanyak 11 set, dengan ketebalan masing-masing  $100\text{-}\mu\text{m}$ .
6. Pada sediaan sayatan pertama dari masing-masing set yang telah disiapkan (11 set sayatan), dilakukan pengecatan dengan *hematoxylin-eosin (HE)*.
7. Pada sediaan sayatan kedua sampai ke sebelas dipersiapkan untuk pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti-TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp 105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-5

#### **II. Prosedur Pengecatan Immunohistokimia**

Pengecatan imunohistokimia dilakukan dengan prosedur yang biasa dipakai di Laboratorium GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yaitu:

1. Menghilangkan aktivitas peroksidase endogen dengan melakukan inkubasi sediaan sayatan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam metanol, sedangkan aktivitas biotin endogen dihilangkan dengan metode *Biotin Blocking System*.
2. Setelah menghilangkan *paraffin* dengan prosedur deparaffinasi (dengan xylol 2 x 2 menit, etanol absolut 2 x 1 menit, etanol 95 % menit 2x1menit, etanol 80 % 1 menit, etanol 70 % 1 menit, dan air mengalir 15 menit).
3. Sayatan dimasukkan dalam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % selama 30 menit. dan dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit. kemudian diberikan trypsin 0.025 % selama 6 menit pada suhu 37°C.



**Gambar L3.1 Kegiatan pemeriksaan imunohistokimia**

4. Antibodi primer TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp 105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, dan IL-5 diberikan pada masing-masing set sayatan (10 set x 54 sampel).
5. Setelah diberi antibodi primer, sediaan sayatan dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit, dan selanjutnya diberi antibodi sekunder. Antibodi sekunder yang digunakan untuk mendeteksi adalah biotinylated goat anti-polyvalent dengan inkubasi sediaan sayatan selama 30 menit.
6. Setelah diberi antibodi sekunder, sediaan sayatan dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit, dan dimasukkan ke dalam streptavidin/avidin HRP (horseradish peroxidase) selama 30 menit.
7. Setelah sediaan sayatan dicuci dengan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit, sediaan dimasukkan ke dalam substrat kromogen dan dicuci lagi dengan PBS 3 kali masing-masing selama 2 menit, dibilas dengan aquadestilata, dimasukkan ke dalam *Mayer's Hematoxylin* selama 6 menit, dicuci dengan air mengalir dan diteruskan dengan dehidrasi, *clearing* dan *mounting*.

### III. Pembacaan Hasil Pengamatan Imunohistokimia

#### 1. Uji Kesesuaian Hasil Pembacaan Imunohistokimia Antar Pengamat

Hipotesis nol ( $H_0$ ) = Tidak terdapat kesesuaian hasil antara pengamat 1 dan pengamat 2

Hipotesis alternatif ( $H_a$ ) = Terdapat kesesuaian hasil antara pengamat 1 dan pengamat 2



## Correlations

|                |                 |                         | Pengamat 1<br>TLR4 | Pengamat 2<br>TLR4 |
|----------------|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 TLR4 | Correlation Coefficient | 1.000              | .904**             |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .                  | .000               |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |
|                | Pengamat 2 TLR4 | Correlation Coefficient | .904**             | 1.000              |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               |                    |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                     |                         | Pengamat 1<br>NFkBp105 | Pengamat 2<br>NFkBp105 |
|----------------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 NFkBp105 | Correlation Coefficient | 1.000                  | .854**                 |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | .                      | .000                   |
|                |                     | N                       | 54                     | 54                     |
|                | Pengamat 2 NFkBp105 | Correlation Coefficient | .854**                 | 1.000                  |
|                |                     | Sig. (2-tailed)         | .000                   |                        |
|                |                     | N                       | 54                     | 54                     |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                    |                         | Pengamat 1<br>NFkBp65 | Pengamat 2<br>NFkBp65 |
|----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 NFkBp65 | Correlation Coefficient | 1.000                 | .984**                |
|                |                    | Sig. (2-tailed)         | .                     | .000                  |
|                |                    | N                       | 54                    | 54                    |
|                | Pengamat 2 NFkBp65 | Correlation Coefficient | .984**                | 1.000                 |
|                |                    | Sig. (2-tailed)         | .000                  |                       |
|                |                    | N                       | 54                    | 54                    |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                 |                         | Pengamat 1<br>IFNg | Pengamat 2<br>IFNg |
|----------------|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 IFNg | Correlation Coefficient | 1.000              | .823**             |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .                  | .000               |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |
|                | Pengamat 2 IFNg | Correlation Coefficient | .823**             | 1.000              |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               |                    |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                |                         | Pengamat 1<br>IL2 | Pengamat 2<br>IL2 |
|----------------|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 IL2 | Correlation Coefficient | 1.000             | .907**            |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .                 | .000              |
|                |                | N                       | 54                | 54                |
|                | Pengamat 2 IL2 | Correlation Coefficient | .907**            | 1.000             |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .000              | .                 |
|                |                | N                       | 54                | 54                |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                |                         | Pengamat 1<br>IL4 | Pengamat 2<br>IL4 |
|----------------|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 IL4 | Correlation Coefficient | 1.000             | .869**            |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .                 | .000              |
|                |                | N                       | 54                | 54                |
|                | Pengamat 2 IL4 | Correlation Coefficient | .869**            | 1.000             |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .000              | .                 |
|                |                | N                       | 54                | 54                |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                |                         | Pengamat 1<br>IL5 | Pengamat 2<br>IL5 |
|----------------|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 IL5 | Correlation Coefficient | 1.000             | .965**            |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .                 | .000              |
|                |                | N                       | 54                | 54                |
|                | Pengamat 2 IL5 | Correlation Coefficient | .965**            | 1.000             |
|                |                | Sig. (2-tailed)         | .000              | .                 |
|                |                | N                       | 54                | 54                |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## Correlations

|                |                 |                         | Pengamat 1<br>TGFb | Pengamat 2<br>TGFb |
|----------------|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 TGFb | Correlation Coefficient | 1.000              | .859**             |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .                  | .000               |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |
|                | Pengamat 2 TGFb | Correlation Coefficient | .859**             | 1.000              |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               | .                  |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

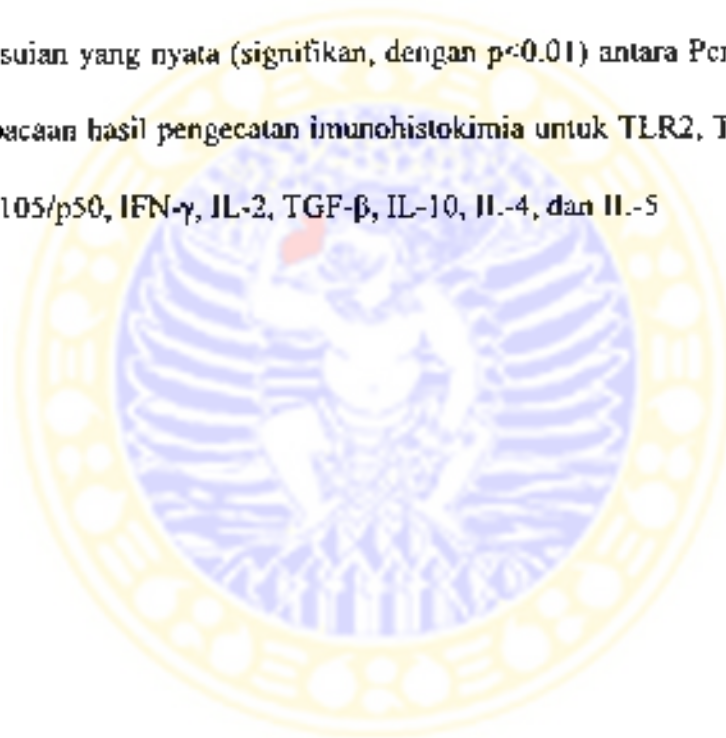
## Correlations

|                |                 |                         | Pengamat 1<br>IL10 | Pengamat 2<br>IL10 |
|----------------|-----------------|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Spearman's rho | Pengamat 1 IL10 | Correlation Coefficient | 1.000              | .967**             |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         |                    | .000               |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |
|                | Pengamat 2 IL10 | Correlation Coefficient | .967**             | 1.000              |
|                |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               |                    |
|                |                 | N                       | 54                 | 54                 |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

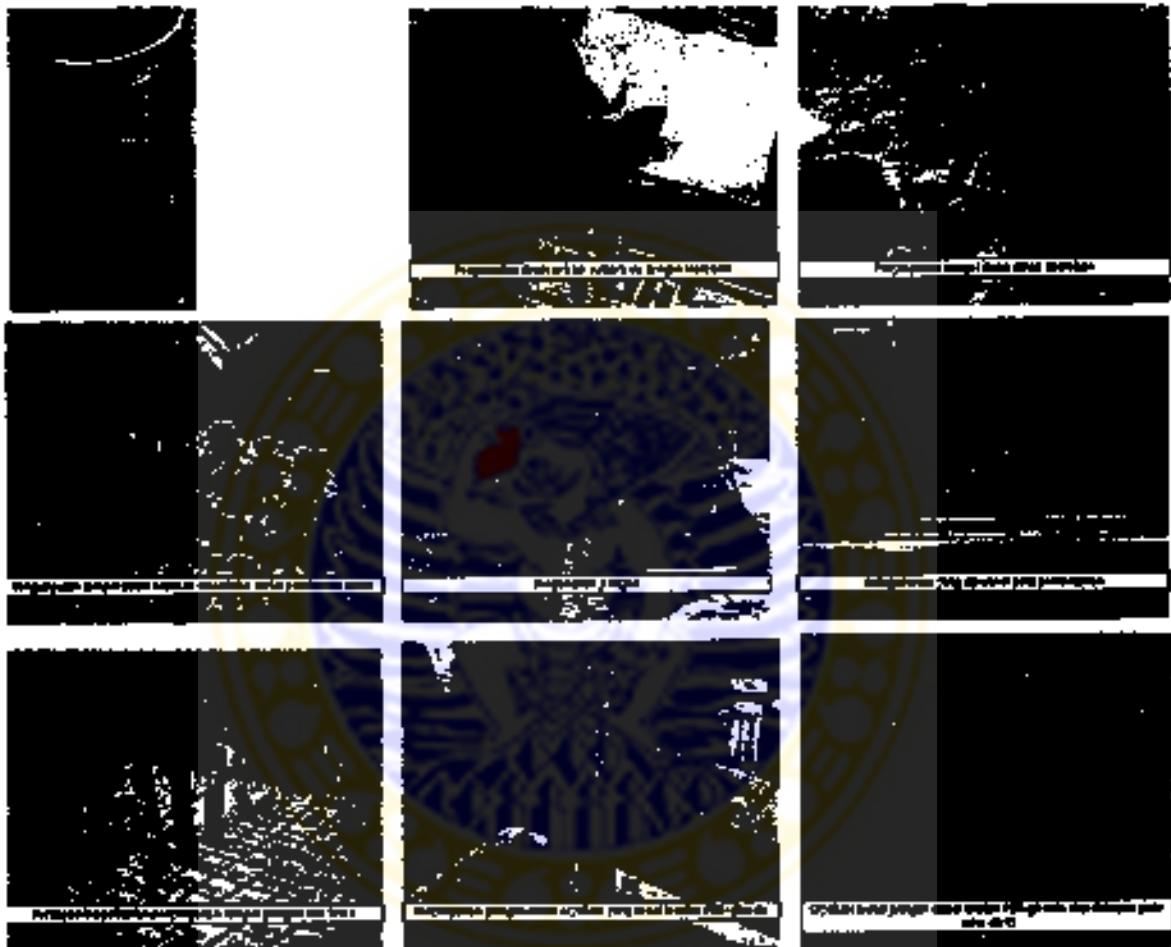
## 2. Kesimpulan :

Terdapat kesesuaian yang nyata (signifikan, dengan  $p < 0.01$ ) antara Pengamat 1 dan 2 dalam pembacaan hasil pengecatan imunohistokimia untuk TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ Bp 105/p50, IFN- $\gamma$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, dan IL-5



sampai G, sementara di baris H diisi buffer coating (buffer karbonat, pH 9,6) tanpa OVA.

2. Diinkubasi semalam ( $\pm 18$  jam) pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ .



**Gambar L4.1** Persiapan sampel (serum, plasma dan kerokan mukosa ileum) untuk pemeriksaan ELISA

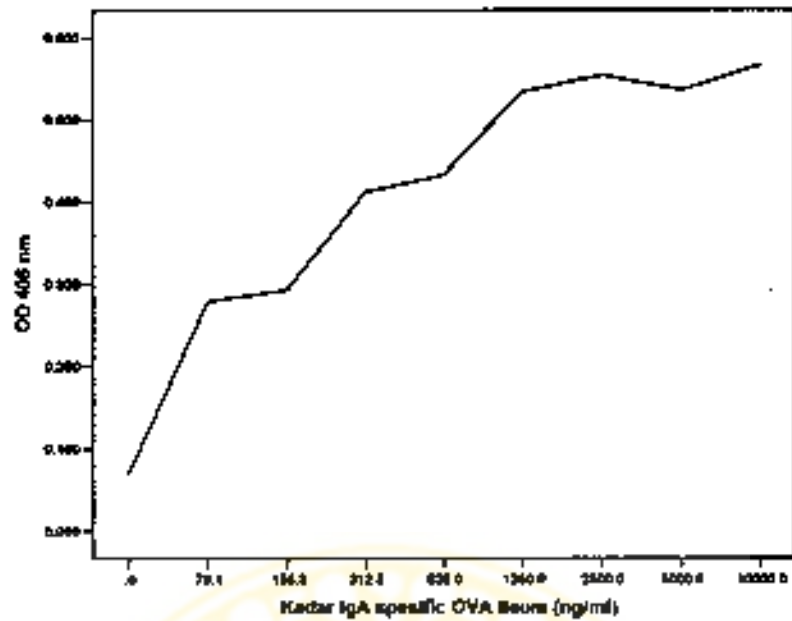
3. Ditambahkan buffer blocking (PBS-Tween-BSA, pH 7,4)  $150\ \mu\text{L}$  pada setiap sumuran.
4. Inkubasi 1 jam pada suhu kamar ( $18\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ).
5. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.

6. Antibodi anti IgE atau anti IgG2a atau anti IgA diencerkan pada 1/50, 1/100, 1/200 dengan menggunakan mikroplat lain. Antibodi pada masing-masing pengenceran dipindahkan pada baris A dan B, C dan D, E serta E dan F (duplo).
7. Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar (18-25° C).
8. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.
9. Substrat 4-NPP yang sudah dilarutkan ditambahkan 100 µL pada setiap sumuran.
10. Diinkubasi 30-90 menit pada suhu kamar (18-25° C) di ruang gelap.
11. Reaksi dihentikan dengan menambah larutan stopper NaOH 3N 50 µL pada setiap sumuran.
12. Nilai absorbansi dibaca dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.
13. Menginterpretasikan hasil OD.

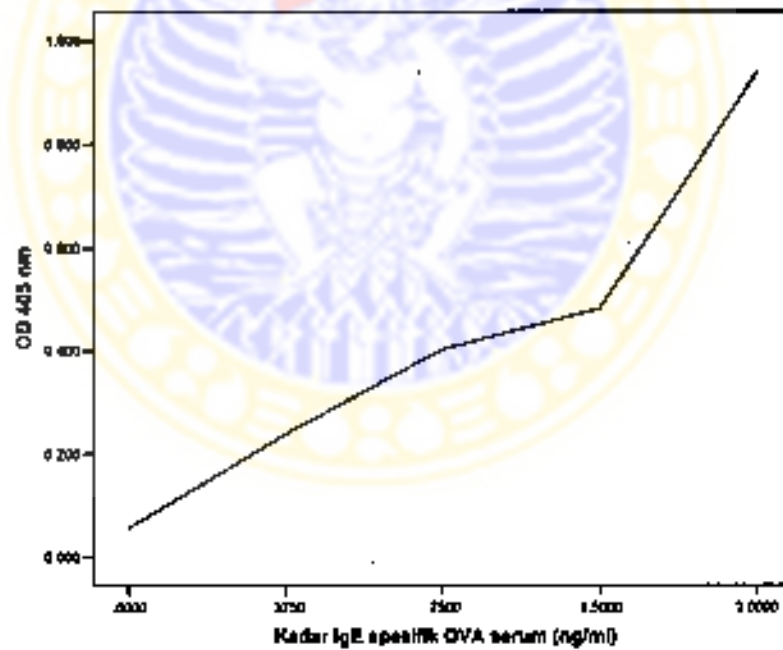
### **III. Pengukuran kadar IgE, IgG2a, IgA spesifik OVA dengan *Indirect ELISA*.**

1. Untuk mendeteksi IgE, IgG2a dan IgA, mikroplat dilapisi Ovalbumin 10 µL dengan konsentrasi yang optimal sesuai dengan hasil *checker board* (dalam hal ini yang optimal adalah 10 µg/ml) menggunakan buffer coating.
2. Diinkubasi semalam (± 18 jam) pada suhu 4°C.
3. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.
4. Ditambahkan buffer blocking (PBS-Tween-BSA, pH 7,4) 150 µL pada setiap sumuran.
5. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.

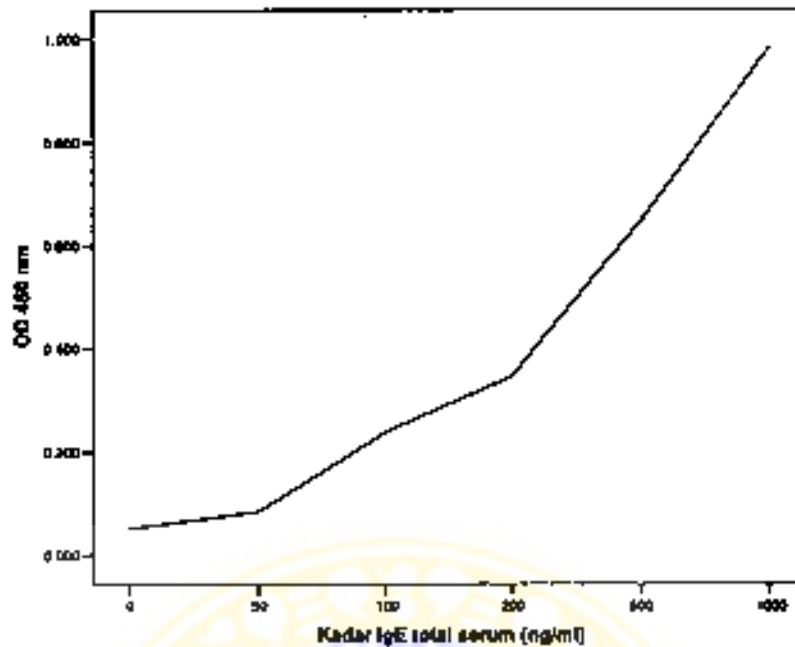
6. Masing-masing sampel (54 sampel serum atau 54 sampel kerokan mukosa ileum) untuk keperluan pemeriksaan IgE, IgG2a dan IgA spesifik OVA diencerkan 1/100 dengan tabung mikro. Juga disiapkan sampel campuran dengan pengenceran 1/100 untuk kurva baku. Sebanyak 100  $\mu$ L dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam sumuran pada kolom 1 sampai 10 (dengan duplo), sementara itu pada kolom 11 dan 12 diisi dengan sampel campuran untuk kurva baku (menggunakan *purified mouse* IgE, IgG2a kappa dan IgA kappa), PBS dan sampel serum mencit normal.
7. Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar (18-25° C).
8. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.
9. Ditambahkan antibodi dari Ig yang akan dideteksi (anti IgE, IgG2a atau IgA sesuai dengan jadwal pemeriksaan) dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/ml (sesuai dengan hasil optimal pada checker board) sebanyak 50  $\mu$ L.
10. Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar (18-25° C).
11. Ditambahkan pada setiap sumuran 100  $\mu$ L konjugat rabbit anti mouse yang dilabel enzim AP pada pengenceran 1/1000 dengan buffer blocking.
12. Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar (18-25° C).
13. Dicuci dengan NaCl-Triton 5 kali.
14. Substrat 4-NPP yang sudah dilarutkan ditambahkan 100  $\mu$ L pada setiap sumuran.
15. Diinkubasi 30-90 menit pada suhu kamar (18-25° C) di ruang gelap.
16. Reaksi dihentikan dengan menambah larutan stopper NaOH 3N 50  $\mu$ L pada setiap sumuran.
17. Nilai absorban dibaca dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.



**Gambar L4.4** Interpretasi kadar IgA spesifik OVA ileum melalui analisa regresi linier dari nilai OD 405 nm dengan nilai baku *purified mouse IgA*.



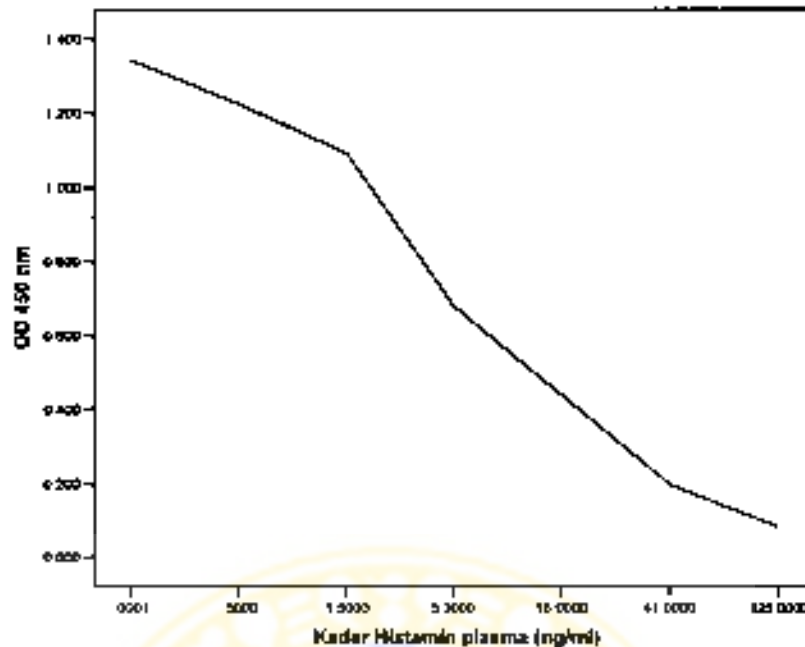
**Gambar L4.5** Interpretasi kadar IgE spesifik OVA serum melalui analisa regresi linier dari nilai OD 405 nm dengan nilai baku *purified mouse IgE*.



**Gambar L4.7 Interpretasi kadar IgE total serum melalui analisa regresi linier dari nilai OD 450 nm (Metode *Sandwich ELISA* menggunakan *IgE ELISA Kit*)**

2. Sebanyak 80  $\mu$ L dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam semua sumuran.
3. Diinkubasi 1 jam pada suhu kamar (18-25<sup>o</sup> C).
4. Dicuci dengan wash buffer 3 kali.
5. Ditambahkan pada setiap sumuran 100  $\mu$ L konjugat An-enzyme HRP pada pengenceran 1/100 dengan sampel diluent yang telah diencerkan 1/100 dengan aquadestilata.
6. Dicuci dengan wash buffer yang telah diencerkan dengan aquadestilata sebanyak 3 kali.
7. Reaksi dihentikan dengan menambah larutan stopper 100  $\mu$ L pada setiap sumuran.
8. Nilai absorbansi dibaca setelah 30 menit dengan ELISA reader menggunakan panjang gelombang 450 nm.





**Gambar L4.8 Interpretasi kadar Histamin Plasma melalui analisa regresi linier dari nilai OD 450 nm (Metode *Competitive ELISA* menggunakan *Histamin ELISA Kit*).**

3. Ke dalam semua sumuran, dimasukkan masing-masing sebanyak 50  $\mu$ L Enzyme Conjugate yang telah diencerkan 1/200 dengan aquabidestilata.
4. Ke dalam semua sumuran, dimasukkan masing-masing sebanyak 50  $\mu$ L Histamine Antiserum.
5. Diinkubasi 3 jam pada pada suhu kamar (18-25° C).
6. Dicuci dengan wash buffer yang telah diencerkan 1/20 dengan aquabidestilata sebanyak 4 kali.
7. Ke dalam semua sumuran, dimasukkan masing-masing sebanyak 200  $\mu$ L TMB Substrate Solution yang telah diencerkan 1/31 dengan TMB Substrate Buffer.
8. Diinkubasi 40 menit pada pada suhu kamar (18-25° C) dengan orbital shaker (500 RPM).

9. Reaksi dihentikan dengan menambah TMB Buffer Solution 100  $\mu$ L pada setiap sumuran.
10. Nilai absorbansi dibaca setelah 15 menit menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm.
11. Menginterpretasikan kadar Ig melalui analisa regresi linier dari nilai OD dengan nilai baku *purified mouse Ig isotype*.



## Lampiran 5 **Prosedur Kerja dan Hasil Pemeriksaan Bakteriologis MPN (*Coliform* dan *E.coli*) dan TPC (Bakteri Asam Laktat)**

---

### **I. Persiapan Sampel:**

Dari setiap mencit disiapkan 1 gram sampel fezes yang selanjutnya dilarutkan dengan PZ sampai 10 ml untuk pemeriksaan bakteriologis MPN (*Coliform* dan *E.coli*) dan TPC (Bakteri Asam Laktat).

### **II. Pemeriksaan Bakteri Coliform :**

- 1) Disiapkan 3 kelompok tabung reaksi yang berisi medium cair Mac Conkey modifikasi dan tabung Durham:
  - a) Kelompok pertama terdiri dari 5 tabung reaksi dan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi 10 ml medium ditambahkan 10 ml larutan sampel.
  - b) Kelompok kedua terdiri dari 5 tabung reaksi dan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi 5 ml medium ditambahkan 1 ml larutan sampel.
  - c) Kelompok ketiga terdiri dari 5 tabung reaksi dan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi 5 ml medium ditambahkan 0,1 ml larutan sampel
- 2) Semua tabung reaksi tersebut diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Bila tidak terdapat cukup gas (<10 %) pada tabung Durham, dinyatakan presuntif negatif, diinkubasi 24



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**  
**BAGIAN MIKROBIOLOGI VETERINER**

PSW/INTERCOM : 241

Lampiran hasil Pemeriksaan Bakteriologis MPN dan TPC  
 terhadap 27 sampel feses kucing.

| No.<br>Sampel | Kode Sampel | MPN             |                | TPC               |
|---------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------|
|               |             | <i>Coliform</i> | <i>E. coli</i> |                   |
| 1.            | G-2         | 110             | 0              | $4,0 \times 10^3$ |
| 2.            | H-3         | 95              | 0              | $3,4 \times 10^3$ |
| 3.            | I-3         | 180             | 2              | $3,0 \times 10^3$ |
| 4.            | B-1         | 280             | 4,5            | $3,2 \times 10^4$ |
| 5.            | B-2         | 2400            | 2              | $1,3 \times 10^3$ |
| 6.            | B-3         | 1600            | 0              | $8,0 \times 10^3$ |
| 7.            | C-1         | 720             | 2              | $2,0 \times 10^4$ |
| 8.            | C-2         | 1600            | 2              | $3,4 \times 10^4$ |
| 9.            | C-3         | 2400            | 6,8            | $4,6 \times 10^7$ |
| 10.           | D-1         | 280             | 11             | $9,8 \times 10^3$ |
| 11.           | D-2         | 350             | 17             | $8,7 \times 10^3$ |
| 12.           | D-3         | 920             | 17             | $9,5 \times 10^3$ |
| 13.           | E-1         | 180             | 7,8            | $3,0 \times 10^3$ |
| 14.           | E-2         | 2400            | 9,5            | $1,0 \times 10^3$ |
| 15.           | E-3         | 2400            | 2              | $1,2 \times 10^3$ |
| 16.           | F-1         | 2400            | 0              | $3,0 \times 10^3$ |
| 17.           | F-2         | 2400            | 0              | $3,1 \times 10^3$ |
| 18.           | F-3         | 920             | 0              | $3,7 \times 10^3$ |
| 19.           | G-1         | 33              | 0              | $9,8 \times 10^3$ |
| 20.           | A-1         | 280             | 2              | $3,8 \times 10^3$ |
| 21.           | G-3         | 1600            | 0              | $4,9 \times 10^6$ |
| 22.           | H-1         | 1600            | 920            | $5,9 \times 10^7$ |
| 23.           | H-2         | 1600            | 2              | $6,5 \times 10^6$ |
| 24.           | A-2         | 1600            | 0              | $3,8 \times 10^3$ |
| 25.           | I-1         | 920             | 0              | $3,9 \times 10^6$ |
| 26.           | I-2         | 2400            | 0              | $4,6 \times 10^7$ |
| 27.           | A-3         | 280             | 0              | $1,1 \times 10^0$ |

Surabaya, 22 - 06 - 2006

Pemeriksa

Drh. Ratih Ratnesari SU  
 Nip. 141 123 698

**Lampiran 6 Data Lengkap Sampel Penelitian**

| No. Sampel | Grup | Umur (minggu) | Berat (gram) | Jenis Probiotik | Jenis Inhibitor TLR | Jumlah sel yang mengekspresikan TLR2 | Jumlah sel yang mengekspresikan TLR4 | Jumlah sel penghasil NFkBp105/p50 | Jumlah sel penghasil NFkBp65 | Jumlah sel penghasil IFN-gamma | Jumlah sel penghasil IL-2 | Jumlah sel penghasil IL-4 | Jumlah sel penghasil IL-5 |
|------------|------|---------------|--------------|-----------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1          | A    | 10.0          | 17.0         | LGG             | 2                   | 13                                   | 0                                    | 16                                | 27                           | 2                              | 3                         | 9                         | 2                         |
| 2          | A    | 12.0          | 17.5         | LGG             | 2                   | 192                                  | 4                                    | 102                               | 14                           | 5                              | 7                         | 97                        | 1                         |
| 3          | A    | 11.0          | 18.2         | LGG             | 2                   | 20                                   | 8                                    | 80                                | 21                           | 4                              | 4                         | 81                        | 2                         |
| 4          | A    | 11.0          | 17.4         | LGG             | 2                   | 41                                   | 8                                    | 78                                | 20                           | 4                              | 6                         | 58                        | 4                         |
| 5          | A    | 10.0          | 18.1         | LGG             | 2                   | 43                                   | 8                                    | 76                                | 14                           | 2                              | 6                         | 82                        | 8                         |
| 6          | A    | 12.0          | 18.5         | LGG             | 2                   | 42                                   | 13                                   | 12                                | 5                            | 3                              | 3                         | 7                         | 3                         |
| 7          | B    | 10.0          | 17.6         | LGG             | 4                   | 34                                   | 13                                   | 10                                | 38                           | 77                             | 3                         | 2                         | 4                         |
| 8          | B    | 12.0          | 17.5         | LGG             | 4                   | 80                                   | 77                                   | 22                                | 33                           | 8                              | 7                         | 18                        | 4                         |
| 9          | B    | 12.0          | 18.2         | LGG             | 4                   | 0                                    | 4                                    | 81                                | 98                           | 82                             | 26                        | 136                       | 6                         |
| 10         | B    | 12.0          | 18.6         | LGG             | 4                   | 92                                   | 120                                  | 74                                | 87                           | 78                             | 81                        | 97                        | 18                        |
| 11         | B    | 11.0          | 17.0         | LGG             | 4                   | 78                                   | 15                                   | 36                                | 53                           | 45                             | 17                        | 21                        | 6                         |
| 12         | B    | 12.0          | 17.4         | LGG             | 4                   | 75                                   | 14                                   | 38                                | 54                           | 45                             | 15                        | 18                        | 7                         |

|    |   |      |      |     |   |     |    |     |    |         |    |     |    |
|----|---|------|------|-----|---|-----|----|-----|----|---------|----|-----|----|
| 13 | C | 11.0 | 17.1 | LGG | 0 | 73  | 0  | 5   | 12 | 1       | 8  | 5   | 6  |
| 14 | C | 11.0 | 17.7 | LGG | 0 | 0   | 0  | 62  | 10 | 2       | 1  | 4   | 5  |
| 15 | C | 12.0 | 18.6 | LGG | 0 | 10  | 2  | 68  | 26 | 45      | 2  | 98  | 29 |
| 16 | C | 10.0 | 17.0 | LGG | 0 | 83  | 31 | 116 | 22 | 62      | 6  | 128 | 68 |
| 17 | C | 10.0 | 18.7 | LGG | 0 | 0   | 3  | 11  | 29 | 4       | 24 | 114 | 28 |
| 18 | C | 11.0 | 17.5 | LGG | 0 | 9   | 2  | 54  | 21 | 12      | 6  | 4   | 20 |
| 19 | D | 10.0 | 17.8 | LIS | 2 | 169 | 20 | 96  | 38 | 10<br>2 | 62 | 78  | 7  |
| 20 | D | 10.0 | 18.7 | LIS | 2 | 0   | 6  | 48  | 6  | 7       | 2  | 21  | 51 |
| 21 | D | 12.0 | 17.1 | LIS | 2 | 28  | 7  | 62  | 41 | 3       | 5  | 8   | 3  |
| 22 | D | 10.0 | 17.6 | LIS | 2 | 75  | 17 | 112 | 32 | 5       | 4  | 98  | 31 |
| 23 | D | 11.0 | 17.1 | LIS | 2 | 92  | 0  | 13  | 8  | 30      | 5  | 18  | 69 |
| 24 | D | 11.0 | 17.6 | LIS | 2 | 187 | 0  | 10  | 18 | 3       | 2  | 6   | 9  |
| 25 | E | 11.0 | 17.9 | LIS | 4 | 7   | 0  | 7   | 32 | 12      | 0  | 7   | 2  |
| 26 | E | 12.0 | 18.8 | LIS | 4 | 15  | 10 | 56  | 27 | 22      | 4  | 26  | 10 |
| 27 | E | 12.0 | 17.2 | LIS | 4 | 7   | 0  | 22  | 28 | 11      | 3  | 31  | 10 |
| 28 | E | 11.0 | 17.7 | LIS | 4 | 3   | 0  | 28  | 36 | 6       | 1  | 36  | 6  |
| 29 | E | 10.0 | 18.8 | LIS | 4 | 16  | 8  | 18  | 20 | 8       | 8  | 18  | 4  |
| 30 | E | 12.0 | 17.7 | LIS | 4 | 0   | 0  | 3   | 0  | 1       | 0  | 2   | 0  |
| 31 | F | 12.0 | 18.3 | LIS | 0 | 0   | 0  | 18  | 6  | 17      | 2  | 18  | 2  |
| 32 | F | 11.0 | 18.9 | LIS | 0 | 0   | 0  | 12  | 20 | 3       | 0  | 9   | 0  |
| 33 | F | 10.0 | 17.8 | LIS | 0 | 9   | 4  | 8   | 8  | 1       | 1  | 26  | 15 |
| 34 | F | 11.0 | 18.9 | LIS | 0 | 0   | 0  | 3   | 5  | 2       | 1  | 9   | 1  |
| 35 | F | 12.0 | 17.2 | LIS | 0 | 3   | 0  | 6   | 8  | 3       | 1  | 4   | 0  |
| 36 | F | 12.0 | 17.8 | LIS | 0 | 5   | 1  | 14  | 9  | 8       | 1  | 22  | 2  |

|    |   |   |     |         |         |         |         |        |      |                        |
|----|---|---|-----|---------|---------|---------|---------|--------|------|------------------------|
| 16 | C | 3 | 120 | 584.79  | 885.83  | 4006.87 | 1100.24 | 122.47 | 3.14 | Skor 2 (ringan)        |
| 17 | C | 1 | 111 | 4953.32 | 1047.14 | 4310.31 | 1324.25 | 62.81  | 2.41 | Skor 1 (sangat ringan) |
| 18 | C | 2 | 105 | 2100.58 | 1019.21 | 4236.40 | 1191.11 | 117.59 | 2.85 | Skor 2 (ringan)        |
| 19 | D | 8 | 62  | 4848.46 | 628.28  | 7561.05 | 589.40  | 226.11 | 5.05 | Skor 2 (ringan)        |
| 20 | D | 2 | 36  | 856.21  | 2219.93 | 6841.52 | 1409.04 | 84.79  | 1.58 | Skor 2 (ringan)        |
| 21 | D | 1 | 112 | 24.02   | 1200.72 | 6910.28 | 1482.32 | 182.14 | 3.19 | Skor 2 (ringan)        |
| 22 | D | 3 | 94  | 27.88   | 1284.49 | 7561.05 | 1401.71 | 150.74 | 2.93 | Skor 2 (ringan)        |
| 23 | D | 0 | 72  | 13.81   | 1577.89 | 5977.54 | 1418.37 | 153.88 | 1.81 | Skor 2 (ringan)        |
| 24 | D | 7 | 82  | 2874.06 | 2038.43 | 5959.64 | 1288.66 | 100.49 | 1.93 | Skor 4 (berat)         |
| 25 | E | 4 | 52  | 247.82  | 153.58  | 3695.11 | 1423.69 | 34.54  | 2.55 | Skor 2 (ringan)        |
| 26 | E | 2 | 30  | 66.27   | 153.58  | 7791.32 | 1745.06 | 266.93 | 3.75 | Skor 4 (berat)         |
| 27 | E | 6 | 128 | 16.78   | 991.29  | 7561.05 | 1397.53 | 207.26 | 2.35 | Skor 2 (ringan)        |
| 28 | E | 0 | 98  | 1.59    | 2094.27 | 3938.79 | 1617.35 | 125.62 | 2.06 | Skor 4 (berat)         |
| 29 | E | 8 | 32  | 478.78  | 1096.78 | 5430.11 | 1310.87 | 121.78 | 3.06 | Skor 3 (sedang)        |
| 30 | E | 2 | 18  | 203.89  | 1284.49 | 7337.58 | 895.06  | 43.97  | 3.91 | Skor 3 (sedang)        |
| 31 | F | 3 | 31  | .46     | 1954.65 | 3769.75 | 1356.70 | 213.55 | 2.74 | Skor 2 (ringan)        |
| 32 | F | 2 | 46  | 1.87    | 1507.88 | 7120.73 | 1201.78 | 119.33 | 1.06 | Skor 2 (ringan)        |
| 33 | F | 5 | 36  | 2.01    | 2931.98 | 4678.65 | 1104.42 | 282.63 | 2.14 | Skor 2 (ringan)        |
| 34 | F | 4 | 42  | 3493.31 | 1507.88 | 3807.64 | 1091.65 | 94.21  | 5.80 | Skor 2 (ringan)        |
| 35 | F | 3 | 23  | 807.18  | 1723.51 | 5344.34 | 1054.53 | 158.41 | 2.83 | Skor 2 (ringan)        |
| 36 | F | 3 | 32  | 249.78  | 1452.03 | 7049.87 | 1431.02 | 94.21  | 2.54 | Skor 2 (ringan)        |
| 37 | G | 1 | 31  | 3747.52 | 1047.14 | 6573.26 | 1614.21 | .00    | .00  | Skor 3 (sedang)        |
| 38 | G | 3 | 42  | .84     | 111.69  | 5317.53 | 1141.06 | 577.83 | 4.54 | Skor 4 (berat)         |
| 39 | G | 4 | 51  | 3660.80 | 642.24  | 5805.04 | 1370.31 | 270.07 | 2.83 | Skor 4 (berat)         |

|              |          |           |           |           |           |           |           |           |           |                 |
|--------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| 40           | G        | 0         | 28        | .76       | 181.50    | 6573.26   | 1657.13   | 229.25    | 5.03      | Skor 5 (fatal)  |
| 41           | G        | 6         | 32        | 1.93      | 1521.64   | 5317.63   | 1088.72   | 213.55    | 4.57      | Skor 3 (sedang) |
| 42           | G        | 4         | 27        | 1300.10   | 739.98    | 5374.70   | 1444.63   | 788.69    | 9.26      | Skor 4 (berat)  |
| 43           | H        | 0         | 8         | 234.64    | 418.85    | 3838.46   | 1342.39   | 1791.41   | 9.66      | Skor 4 (berat)  |
| 44           | H        | 2         | 18        | 13.27     | 642.24    | 4788.39   | 1748.20   | 2198.26   | 4.37      | Skor 2 (ringan) |
| 45           | H        | 0         | 22        | 8.12      | 404.89    | 3151.91   | 1011.26   | 549.57    | 2.45      | Skor 5 (fatal)  |
| 46           | H        | 0         | 22        | 9.79      | 349.05    | 3849.76   | 1528.37   | 379.99    | 7.27      | Skor 5 (fatal)  |
| 47           | H        | 0         | 18        | 12.47     | 321.12    | 3803.83   | 994.51    | 430.23    | 6.58      | Skor 5 (fatal)  |
| 48           | H        | 0         | 20        | .99       | 432.82    | 3092.58   | 1235.27   | 8645.46   | 27.97     | Skor 5 (fatal)  |
| 49           | I        | 2         | 26        | 782.52    | 97.73     | 5221.49   | 1498.02   | 982.94    | 10.08     | Skor 5 (fatal)  |
| 50           | I        | 3         | 18        | 10.10     | 823.75    | 2918.32   | 1112.80   | 401.97    | 8.48      | Skor 4 (berat)  |
| 51           | I        | 0         | 8         | 44.51     | 502.63    | 3728.51   | 857.87    | 1391.19   | 41.52     | Skor 6 (fatal)  |
| 52           | I        | 5         | 20        | 2.27      | 13.96     | 4170.38   | 1200.73   | 295.20    | 2.96      | Skor 4 (berat)  |
| 53           | I        | 2         | 28        | 2.58      | 1019.21   | 4353.63   | 1089.88   | 549.57    | 3.58      | Skor 4 (berat)  |
| 54           | I        | 0         | 20        | 172.84    | 480.74    | 4180.25   | 1273.07   | 488.52    | 10.01     | Skor 4 (berat)  |
| <b>Total</b> | <b>N</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b> | <b>54</b>       |



## Lampiran 7 Hasil Analisis Statistik

### Uji alur hubungan antara berbagai variabel pada kerangka konseptual

Uji alur hubungan dari berbagai variabel yaitu: "probiotik" yang diwakili oleh *Lactobacillus rhamnosus GG* dan *Lactobacillus plantarum IS*; "respons imun innate" yang diwakili TLR2, TLR 4 dan NF- $\kappa$ B; "respon imun adaptif" yang diwakili IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5 IgE, IgG<sub>2a</sub> dan IgA serta "reaksi alergi" yang diwakili oleh histamin dan skor gejala (menggunakan Uji Korclasi Kendall Tau).

#### I. Hubungan pemberian LGG dengan reaksi alergi

Correlations

|                                     |                                     |                         | Jenis Probiotik | Kadar Histamin serum (ng/ml) | Skor Gejala Setelah Sensitisasi III |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Kendall's tau_b                     | Jenis Probiotik                     | Correlation Coefficient | 1.000           | -.503**                      | -.669**                             |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .               | .000                         | .000                                |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)        | Kadar Histamin serum (ng/ml)        | Correlation Coefficient | -.503**         | 1.000                        | .435**                              |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .000            | .                            | .001                                |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III | Skor Gejala Setelah Sensitisasi III | Correlation Coefficient | -.669**         | .435**                       | 1.000                               |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .000            | .001                         | .                                   |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

#### II. Hubungan pemberian LIS dengan reaksi alergi

Correlations

|                                     |                                     |                         | Jenis Probiotik | Kadar Histamin serum (ng/ml) | Skor Gejala Setelah Sensitisasi III |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------------|
| Kendall's tau_b                     | Jenis Probiotik                     | Correlation Coefficient | 1.000           | -.468**                      | -.678**                             |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .               | .001                         | .000                                |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |
| Kadar Histamin serum (ng/ml)        | Kadar Histamin serum (ng/ml)        | Correlation Coefficient | -.468**         | 1.000                        | .419**                              |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .001            | .                            | .001                                |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |
| Skor Gejala Setelah Sensitisasi III | Skor Gejala Setelah Sensitisasi III | Correlation Coefficient | -.678**         | .419**                       | 1.000                               |
|                                     |                                     | Sig. (2-tailed)         | .000            | .001                         | .                                   |
|                                     |                                     | N                       | 36              | 36                           | 36                                  |

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### III. Hubungan pemberian LGG dengan ekspresi TLR2 dan TLR4

Correlations

|   |                 |                         | Jenis<br>Probiotik | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR2 | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR4 |
|---|-----------------|-------------------------|--------------------|---|---|
| Kendali's tau_b                         | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | 1.000              | .813**  | .525**  |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         |                    | .000  | .000  |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR2 | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | .813**             | 1.000   | .651**  |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               |   | .000  |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR4 | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | .525**             | .651**  | 1.000   |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         | .000               | .000  |   |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### IV. Hubungan pemberian LIS dengan ekspresi TLR2 dan TLR4

Correlations

|   |                 |                         | Jenis<br>Probiotik | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR2 | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR4 |
|---|-----------------|-------------------------|--------------------|---|---|
| Kendali's tau_b                         | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | 1.000              | .483**  | .207  |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         |                    | .001  | .167  |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR2 | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | .483**             | 1.000   | .500**  |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         | .001               |   | .000  |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR4 | Jenis Probiotik | Correlation Coefficient | .207               | .500**  | 1.000   |
|   |                 | Sig. (2-tailed)         | .167               | .000  |   |
|   |                 | N                       | 36                 | 36  | 36  |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### V. Hubungan antara penghambat TLR2 dan 4 dengan ekspresi imunitas *innate*

Correlations

|   |                                   |                         | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR2 | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR4 | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR2 | Jumlah sel<br>yang<br>mengekspre-<br>sikan TLR4 | Jumlah sel<br>penghamb<br>MIF/IL12p70 | Jumlah sel<br>penghamb<br>MIF/IL12p70 |
|---|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Kendali's tau_b                         | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR2 | Correlation Coefficient | 1.000                             | -.500**                           | .263*   | .201  | .302*                                 | .634                                  |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         |                                   | .000                              | .028  | .101  | .008                                  | .288                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |
| Menggunakan<br>penghambat<br>TLR4       | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR2 | Correlation Coefficient | -.500**                           | 1.000                             | -.043   | .024  | -.128                                 | .179                                  |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         | .000                              |                                   | .319  | .844  | .267                                  | .121                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR2 | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR2 | Correlation Coefficient | .263*                             | -.043                             | 1.000   | .851**  | .411*                                 | .420*                                 |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         | .028                              | .319                              |   | .000  | .000                                  | .000                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |
| Jumlah sel yang<br>mengekspresikan TLR4 | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR4 | Correlation Coefficient | .201                              | .024                              | .851**  | 1.000   | .512**                                | .411*                                 |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         | .101                              | .844                              | .000  |   | .000                                  | .000                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |
| Jumlah sel penghamb<br>MIF/IL12p70      | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR2 | Correlation Coefficient | .302*                             | -.128                             | .411*   | .512**  | 1.000                                 | .512**                                |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         | .008                              | .267                              | .000  | .000  |                                       | .000                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |
| Jumlah sel penghamb<br>MIF/IL12p70      | Menggunakan<br>penghambat<br>TLR4 | Correlation Coefficient | .634                              | .179                              | .420*   | .411*   | .512**                                | 1.000                                 |
|   |                                   | Sig. (2-tailed)         | .000                              | .121                              | .000  | .000  |                                       | .000                                  |
|   |                                   | N                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                                    | 34                                    |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**VI. Hubungan antara ekspresi imunitas *innate* dengan respon imun adaptif T<sub>H1</sub>**

Correlations

|               |   |   | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4 | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Jumlah sel penghasil IL-2 |
|---------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---|---|---------------------------|
| Kontrol Day 0 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2           | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | 1.000                             | .528**                            | .411**                                      | .420**                                      | .318**                    |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                        |
|               | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4           | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .528**                            | 1.000                             | .512**                                      | .411**                                      | .448**                    |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .411**                            | .512**                            | 1.000                                       | .512**                                      | .468**                    |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .420**                            | .411**                            | .512**                                      | 1.000                                       | .448**                    |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IL-2                   | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .318**                            | .448**                            | .468**                                      | .448**                                      | 1.000                     |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34  | 34                        |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**VII. Hubungan antara ekspresi imunitas *innate* dengan respon imun adaptif T<sub>H2</sub>**

Correlations

|               |                                    |   | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4 | Jumlah sel penghasil IL-4 (CD45RO) | Jumlah sel penghasil IL-4 | Jumlah sel penghasil IL-6 |
|---------------|------------------------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Kontrol Day 0 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2  | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | 1.000                             | .434**                            | .411**                             | .434**                    | .360**                    |
|               |                                    | N                                       | 34                                | 34                                | 34                                 | 34                        | 34                        |
|               | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4  | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .434**                            | 1.000                             | .512**                             | .481**                    | .400**                    |
|               |                                    | N                                       | 34                                | 34                                | 34                                 | 34                        | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IL-4 (CD45RO) | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .411**                            | .512**                            | 1.000                              | .512**                    | .428**                    |
|               |                                    | N                                       | 34                                | 34                                | 34                                 | 34                        | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IL-4          | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .434**                            | .481**                            | .512**                             | 1.000                     | .371**                    |
|               |                                    | N                                       | 34                                | 34                                | 34                                 | 34                        | 34                        |
|               | Jumlah sel penghasil IL-6          | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .360**                            | .400**                            | .428**                             | .371**                    | 1.000                     |
|               |                                    | N                                       | 34                                | 34                                | 34                                 | 34                        | 34                        |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**VIII. Hubungan antara ekspresi imunitas *innate* dengan respon imun adaptif T<sub>reg</sub>**

Correlations

|               |   |   | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4 | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Jumlah sel penghasil TGF- $\beta$ (CD45RO) | Jumlah sel penghasil TGF- $\beta$ (CD45RO) |
|---------------|---|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---|--|--|
| Kontrol Day 0 | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR2           | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | 1.000                             | .528**                            | .411**                                      | .420**                                     | .318**                                     |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34   | 34   |
|               | Jumlah sel yang mengaktifkan TLR4           | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .528**                            | 1.000                             | .512**                                      | .411**                                     | .448**                                     |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34   | 34   |
|               | Jumlah sel penghasil IFN- $\gamma$ (CD45RO) | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .411**                            | .512**                            | 1.000                                       | .512**                                     | .468**                                     |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34   | 34   |
|               | Jumlah sel penghasil TGF- $\beta$ (CD45RO)  | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .420**                            | .411**                            | .512**                                      | 1.000                                      | .448**                                     |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34   | 34   |
|               | Jumlah sel penghasil IL-10                  | Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) | .318**                            | .448**                            | .468**                                      | .448**                                     | 1.000                                      |
|               |   | N                                       | 34                                | 34                                | 34  | 34   | 34   |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

IX. Hubungan sitokin  $T_{H1}$  -  $T_{H2}$  - Treg

Correlations

|                                  |   |   | Jumlah sel<br>penghasil<br>IFN-gamma | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-2 | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-4 | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-5 | Jumlah sel<br>penghasil<br>TGF-beta | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-10 |
|----------------------------------|---|---|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Kendall's tau_b                  | Jumlah sel penghasil<br>IFN-gamma               | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54                    | .488**<br>000<br>54             | .416*<br>000<br>54              | .362*<br>000<br>54              | .284*<br>005<br>54                  | .097*<br>009<br>54               |
|                                  | Jumlah sel penghasil<br>IL-2                    | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .488**<br>000<br>54                  | 1.000<br>000<br>54              | .408**<br>000<br>54             | .400**<br>000<br>54             | .338**<br>001<br>54                 | .420**<br>000<br>54              |
|                                  | Jumlah sel penghasil<br>IL-4                    | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .416*<br>000<br>54                   | .408**<br>000<br>54             | 1.000<br>000<br>54              | .321**<br>001<br>54             | .205*<br>000<br>54                  | .391**<br>000<br>54              |
| Jumlah sel penghasil<br>IL-5     | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .362*<br>000<br>54                              | .400**<br>000<br>54                  | .321**<br>001<br>54             | 1.000<br>000<br>54              | .090<br>378<br>54               | .319**<br>000<br>54                 |                                  |
| Jumlah sel penghasil<br>TGF-beta | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .284*<br>005<br>54                              | .338**<br>001<br>54                  | .205*<br>000<br>54              | .090<br>378<br>54               | 1.000<br>000<br>54              | .331**<br>000<br>54                 |                                  |
| Jumlah sel penghasil<br>IL-10    | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .097*<br>000<br>54                              | .420**<br>000<br>54                  | .391**<br>000<br>54             | .319**<br>000<br>54             | .331**<br>000<br>54             | 1.000<br>000<br>54                  |                                  |

\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

X. Hubungan antara sitokin  $T_{H1}$  dengan IgG2a

Correlations

|                 |   |   | Jumlah sel<br>penghasil<br>IFN-gamma | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-2 | Kadar IgG2a<br>serum<br>spesifik OVA<br>(ng/ml) |
|-----------------|---|---|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| Kendall's tau_b | Jumlah sel penghasil<br>IFN-gamma         | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54                    | .468**<br>000<br>54             | .153<br>.112<br>54                              |
|                 | Jumlah sel penghasil<br>IL-2              | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .468**<br>000<br>54                  | 1.000<br>000<br>54              | .288**<br>004<br>54                             |
|                 | Kadar IgG2a serum<br>spesifik OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .153<br>172<br>54                    | .288**<br>004<br>54             | 1.000<br>000<br>54                              |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

XI. Hubungan antara sitokin  $T_{H2}$  dengan IgE

Correlations

|                                   |   |   | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-4 | Jumlah sel<br>penghasil<br>IL-5 | Kadar IgE<br>total serum<br>(ng/ml) | Kadar IgE<br>spesifik OVA<br>(ng/ml) |
|-----------------------------------|---|---|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Kendall's tau_b                   | Jumlah sel<br>penghasil IL-4                    | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54               | .321**<br>001<br>54             | .156<br>102<br>54                   | -.118<br>223<br>54                   |
|                                   | Jumlah sel<br>penghasil IL-5                    | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .321**<br>001<br>54             | 1.000<br>000<br>54              | .129<br>184<br>54                   | -.155<br>109<br>54                   |
|                                   | Kadar IgE total<br>serum (ng/ml)                | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .156<br>.102<br>54              | .129<br>184<br>54               | 1.000<br>000<br>54                  | -.118<br>241<br>54                   |
| Kadar IgE spesifik<br>OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | -.118<br>223<br>54                              | -.155<br>109<br>54              | -.118<br>241<br>54              | 1.000<br>000<br>54                  |                                      |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## XII. Hubungan antara sitokin T<sub>reg</sub> dengan IgA

Correlations

|   |   |   | Jumlah sel penghasil TGF-beta | Jumlah sel penghasil IL-10 | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar IgA mukosa serum spesifik OVA (ng/ml) |
|---|---|---|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---|
| Kendala's_uu_b                              | Jumlah sel penghasil TGF-beta                   | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54             | .331**<br>.001<br>54       | .083<br>.402<br>54                   | .244*<br>013<br>54                          |
|   | Jumlah sel penghasil IL-10                      | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .331**<br>.001<br>54          | 1.000<br>.001<br>54        | .175<br>.064<br>54                   | .277**<br>003<br>54                         |
|   | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)            | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .083<br>.402<br>54            | .175<br>.064<br>54         | 1.000<br>1.000<br>54                 | .087<br>474<br>54                           |
| Kadar IgA mukosa serum spesifik OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .244*<br>013<br>54                              | .277**<br>003<br>54           | .087<br>474<br>54          | 1.000<br>1.000<br>54                 |   |

\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## XIII. Hubungan antara IgG2a dan IgA spesifik dengan IgE spesifik dan IgE total

Correlations

|                |   |   | Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar IgA mukosa serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar IgE total serum (ng/ml) | Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml) |
|----------------|---|---|--|--------------------------------------|---|-------------------------------|--------------------------------|
| Kendala's_uu_b | Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml)      | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54                      | .068<br>.935<br>54                   | .185*<br>.049<br>54                         | .017<br>.052<br>54            | -.240*<br>010<br>54            |
|                | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)        | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .068<br>.935<br>54                     | 1.000<br>54<br>54                    | .067<br>.474<br>54                          | -.072<br>.442<br>54           | -.345**<br>000<br>54           |
|                | Kadar IgA mukosa serum spesifik OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .185*<br>.049<br>54                    | .067<br>.474<br>54                   | 1.000<br>54<br>54                           | .262**<br>.005<br>54          | -.191**<br>042<br>54           |
|                | Kadar IgE total serum (ng/ml)               | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | .017<br>.859<br>54                     | -.072<br>.442<br>54                  | .262**<br>.005<br>54                        | 1.000<br>54<br>54             | -.110<br>.241<br>54            |
|                | Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)              | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | -.240*<br>.010<br>54                   | -.345**<br>.000<br>54                | -.191**<br>.042<br>54                       | -.110<br>.241<br>54           | 1.000<br>54<br>54              |

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

\*\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## XIV. Hubungan antara IgG2a dengan reaksi alergi (histamin dan skor gejala)

Correlations

|                |  |   | Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar Histamin serum (ng/ml) | Skor Gejala Setelah Sensitasi III |
|----------------|--|---|--|------------------------------|-----------------------------------|
| Kendala's_uu_b | Kadar IgG2a serum spesifik OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | 1.000<br>54<br>54                      | -.055<br>.561<br>54          | -.147<br>.158<br>54               |
|                | Kadar Histamin serum (ng/ml)           | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | -.055<br>.561<br>54                    | 1.000<br>54<br>54            | .350**<br>001<br>54               |
|                | Skor Gejala Setelah Sensitasi III      | Correlation Coefficient<br>Sig. (2-tailed)<br>N | -.147<br>.158<br>54                    | .350**<br>001<br>54          | 1.000<br>54<br>54                 |

\*. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### XV. Hubungan antara IgE dengan reaksi alergi (histamin dan skor gejala)

Correlations

|                 |                                   |                         | Kadar IgE total serum (ng/ml) | Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml) | Kadar Histamin serum (ng/ml) | Skor Gejala Setelah Sensitasi III |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Kendall's tau_b | Kadar IgE total serum (ng/ml)     | Correlation Coefficient | 1.000                         | -.110                          | -.159                        | -.025                             |
|                 |                                   | Sig. (2-tailed)         |                               | .241                           | .089                         | .812                              |
|                 |                                   | N                       | 54                            | 54                             | 54                           | 54                                |
|                 | Kadar IgE spesifik OVA (ng/ml)    | Correlation Coefficient | -.110                         | 1.000                          | .496**                       | .405**                            |
|                 |                                   | Sig. (2-tailed)         | .241                          |                                | .000                         | .000                              |
|                 |                                   | N                       | 54                            | 54                             | 54                           | 54                                |
|                 | Kadar Histamin serum (ng/ml)      | Correlation Coefficient | -.159                         | .496**                         | 1.000                        | .355**                            |
|                 |                                   | Sig. (2-tailed)         | .089                          | .000                           |                              | .001                              |
|                 |                                   | N                       | 54                            | 54                             | 54                           | 54                                |
|                 | Skor Gejala Setelah Sensitasi III | Correlation Coefficient | -.025                         | .405**                         | .355**                       | 1.000                             |
|                 |                                   | Sig. (2-tailed)         | .812                          | .000                           | .001                         |                                   |
|                 |                                   | N                       | 54                            | 54                             | 54                           | 54                                |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### XVI. Hubungan antara IgA dengan reaksi alergi (histamin dan skor gejala)

Correlations

|                 |   |                         | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar IgA mukosa ileum spesifik OVA (ng/ml) | Kadar Histamin serum (ng/ml) | Skor Gejala Setelah Sensitasi III |
|-----------------|---|-------------------------|--------------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------------|
| Kendall's tau_b | Kadar IgA serum spesifik OVA (ng/ml)        | Correlation Coefficient | 1.000                                | .087  | -.355**                      | -.483**                           |
|                 |   | Sig. (2-tailed)         |                                      | .474  | .000                         | .000                              |
|                 |   | N                       | 54                                   | 54  | 54                           | 54                                |
|                 | Kadar IgA mukosa ileum spesifik OVA (ng/ml) | Correlation Coefficient | .087                                 | 1.000                                       | -.153                        | -.111                             |
|                 |   | Sig. (2-tailed)         | .474                                 |   | .102                         | .288                              |
|                 |   | N                       | 54                                   | 54  | 54                           | 54                                |
|                 | Kadar Histamin serum (ng/ml)                | Correlation Coefficient | -.355**                              | -.153                                       | 1.000                        | .355**                            |
|                 |   | Sig. (2-tailed)         | .000                                 | .102  |                              | .001                              |
|                 |   | N                       | 54                                   | 54  | 54                           | 54                                |
|                 | Skor Gejala Setelah Sensitasi III           | Correlation Coefficient | -.483**                              | -.111                                       | .355**                       | 1.000                             |
|                 |   | Sig. (2-tailed)         | .000                                 | .288  | .001                         |                                   |
|                 |   | N                       | 54                                   | 54  | 54                           | 54                                |

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

### Uji Efek Interaksi Probiotik dengan Inhibitor TLR

Uji efek interaksi antara variabel "probiotik" dengan variabel "inhibitor TLR". [menggunakan ANOVA-Type Statistic (ATS) untuk *Non Parametric Factorial Design* (Shah dan Madden, 2004; Brunner *et al.*, 1997)]

Multivariate Tests <sup>a</sup>

| Effect          |                    | Value  | F                    | Hypothesis df | Error df | Sig. |
|-----------------|--------------------|--------|----------------------|---------------|----------|------|
| Intercept       | Pillai's Trace     | .990   | 163.723 <sup>a</sup> | 17.000        | 29.000   | .000 |
|                 | Wilks' Lambda      | .010   | 163.723 <sup>a</sup> | 17.000        | 29.000   | .000 |
|                 | Hotelling's Trace  | 95.975 | 163.723 <sup>a</sup> | 17.000        | 29.000   | .000 |
|                 | Roy's Largest Root | 95.975 | 163.723 <sup>a</sup> | 17.000        | 29.000   | .000 |
| Probiotik       | Pillai's Trace     | 1.507  | 5.359                | 34.000        | 60.000   | .000 |
|                 | Wilks' Lambda      | .036   | 7.302 <sup>a</sup>   | 34.000        | 58.000   | .000 |
|                 | Hotelling's Trace  | 11.736 | 9.665                | 34.000        | 56.000   | .000 |
|                 | Roy's Largest Root | 10.260 | 18.106 <sup>b</sup>  | 17.000        | 30.000   | .000 |
| TLR             | Pillai's Trace     | 1.127  | 2.279                | 34.000        | 60.000   | .003 |
|                 | Wilks' Lambda      | .175   | 2.375 <sup>a</sup>   | 34.000        | 58.000   | .002 |
|                 | Hotelling's Trace  | 2.595  | 2.487                | 34.000        | 56.000   | .001 |
|                 | Roy's Largest Root | 2.216  | 3.910 <sup>b</sup>   | 17.000        | 30.000   | .001 |
| Probiotik * TLR | Pillai's Trace     | 2.066  | 2.010                | 68.000        | 128.000  | .000 |
|                 | Wilks' Lambda      | .039   | 2.184                | 68.000        | 116.123  | .000 |
|                 | Hotelling's Trace  | 5.999  | 2.428                | 68.000        | 110.000  | .000 |
|                 | Roy's Largest Root | 3.711  | 6.985 <sup>b</sup>   | 17.000        | 32.000   | .000 |

<sup>a</sup> Exact statistic

<sup>b</sup> The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level

<sup>c</sup> Design: Intercept+Probiotik+TLR+Probiotik \* TLR

Tests of Between-Subjects Effects (Probiotik)

| Source                | Dependent Variable  | Type III Sum of Squares | df       | Mean Square | F      | Sig. |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|----------|-------------|--------|------|
| Probiotik             | RANK of TLR2        | 4525.750                | 2        | 2262.875    | 18.202 | .000 |
|                       | RANK of TLR4        | 2870.333                | 2        | 1435.167    | 10.189 | .000 |
|                       | RANK of NFkBp105p50 | 3875.083                | 2        | 1937.542    | 13.335 | .000 |
|                       | RANK of NFkBp65     | 5010.861                | 2        | 2505.431    | 21.682 | .000 |
|                       | RANK of IFN_gamma   | 3689.361                | 2        | 1844.681    | 12.051 | .000 |
|                       | RANK of IL_2        | 7070.528                | 2        | 3535.264    | 41.812 | .000 |
|                       | RANK of IL_4        | 2258.083                | 2        | 1129.042    | 5.086  | .010 |
|                       | RANK of IL_5        | 1764.583                | 2        | 882.292     | 6.192  | .004 |
|                       | RANK of TGF_beta    | 2353.361                | 2        | 1176.681    | 7.061  | .002 |
|                       | RANK of IL_10       | 5912.028                | 2        | 2956.014    | 23.517 | .000 |
|                       | RANK of IgG2aSpOVA  | 888.444                 | 2        | 444.222     | 1.748  | .186 |
|                       | RANK of IgA5SpOVA   | 5124.361                | 2        | 2562.181    | 19.055 | .000 |
|                       | RANK of IgA1SpOVA   | 1984.111                | 2        | 992.056     | 6.377  | .004 |
|                       | RANK of IgEtotal    | 420.111                 | 2        | 210.056     | .879   | .422 |
|                       | RANK of IgE5pOVA    | 5844.083                | 2        | 2922.042    | 22.741 | .000 |
|                       | RANK of Histamine   | 4015.083                | 2        | 2007.542    | 10.817 | .000 |
| RANK of Symptom score | 5788.528            | 2                       | 2894.264 | 30.409      | .000   |      |

Tests of Between-Subjects Effects (Inhibitor TLR)

| Source                | Dependent Variable  | Type III Sum of Squares | df      | Mean Square | F      | Sig. |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------|--------|------|
| iTLR                  | RANK of TLR2        | 1302.194                | 2       | 651.097     | 5.237  | .009 |
|                       | RANK of TLR4        | 878.583                 | 2       | 439.292     | 3.113  | .054 |
|                       | RANK of NFkBp105p50 | 1766.778                | 2       | 883.389     | 6.080  | .005 |
|                       | RANK of NFkBp65     | 972.028                 | 2       | 486.014     | 4.208  | .021 |
|                       | RANK of IFN_gamma   | 815.028                 | 2       | 407.514     | 2.882  | .081 |
|                       | RANK of IL_2        | 48.000                  | 2       | 24.000      | .284   | .754 |
|                       | RANK of IL_4        | 561.694                 | 2       | 280.847     | 1.285  | .292 |
|                       | RANK of IL_5        | 526.961                 | 2       | 263.481     | 1.847  | .169 |
|                       | RANK of TGF_beta    | 300.583                 | 2       | 150.292     | .902   | .413 |
|                       | RANK of IL_10       | 1362.333                | 2       | 681.167     | 5.419  | .008 |
|                       | RANK of IgG2aSpOVA  | 272.444                 | 2       | 136.222     | .536   | .589 |
|                       | RANK of IgA5pOVA    | 1129.333                | 2       | 564.667     | 4.199  | .021 |
|                       | RANK of IgA1SpOVA   | 3270.111                | 2       | 1635.056    | 10.510 | .000 |
|                       | RANK of IgEtotal    | 1598.778                | 2       | 799.389     | 3.344  | .044 |
|                       | RANK of IgEspOVA    | 650.333                 | 2       | 325.167     | 2.531  | .091 |
|                       | RANK of Histamine   | 297.583                 | 2       | 148.792     | .802   | .455 |
| RANK of Symptom score | 586.750             | 2                       | 293.375 | 3.082       | .056   |      |

Tests of Between-Subjects Effects (Probiotik\*inhibitor TLR)

| Source                | Dependent Variable  | Type III Sum of Squares | df      | Mean Square | F     | Sig. |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|---------|-------------|-------|------|
| Probiotik * iTLR      | RANK of TLR2        | 920.558                 | 4       | 230.139     | 1.851 | .136 |
|                       | RANK of TLR4        | 1370.417                | 4       | 342.604     | 2.427 | .062 |
|                       | RANK of NFkBp105p50 | 903.639                 | 4       | 225.910     | 1.555 | .203 |
|                       | RANK of NFkBp65     | 1906.611                | 4       | 476.653     | 4.125 | .006 |
|                       | RANK of IFN_gamma   | 1608.361                | 4       | 402.090     | 2.627 | .047 |
|                       | RANK of IL_2        | 1758.839                | 4       | 439.660     | 5.200 | .002 |
|                       | RANK of IL_4        | 284.889                 | 4       | 71.222      | .298  | .878 |
|                       | RANK of IL_5        | 4250.558                | 4       | 1062.639    | 7.458 | .000 |
|                       | RANK of TGF_beta    | 2677.222                | 4       | 669.306     | 4.016 | .007 |
|                       | RANK of IL_10       | 171.889                 | 4       | 42.972      | .342  | .848 |
|                       | RANK of IgG2aSpOVA  | 522.444                 | 4       | 130.611     | .514  | .726 |
|                       | RANK of IgA5pOVA    | 808.472                 | 4       | 202.118     | 1.503 | .217 |
|                       | RANK of IgA1SpOVA   | 859.444                 | 4       | 214.861     | 1.381 | .258 |
|                       | RANK of IgEtotal    | 339.778                 | 4       | 84.944      | .355  | .839 |
|                       | RANK of IgEspOVA    | 838.917                 | 4       | 209.729     | 1.632 | .183 |
|                       | RANK of Histamine   | 453.083                 | 4       | 113.271     | .810  | .657 |
| RANK of Symptom score | 1039.222            | 4                       | 259.806 | 2.730       | .041  |      |

a R Squared = .547 (Adjusted R Squared = .468)

b R Squared = .446 (Adjusted R Squared = .348)

c R Squared = .500 (Adjusted R Squared = .411)

d R Squared = .603 (Adjusted R Squared = .532)

e R Squared = .470 (Adjusted R Squared = .376)

f R Squared = .700 (Adjusted R Squared = .647)

g R Squared = .236 (Adjusted R Squared = .100)

h R Squared = .505 (Adjusted R Squared = .417)

i R Squared = .416 (Adjusted R Squared = .312)

j R Squared = .568 (Adjusted R Squared = .492)

k R Squared = .128 (Adjusted R Squared = -.027)

l R Squared = .539 (Adjusted R Squared = .457)

m R Squared = .466 (Adjusted R Squared = .371)

n R Squared = .180 (Adjusted R Squared = .034)

o R Squared = .559 (Adjusted R Squared = .481)

p R Squared = .363 (Adjusted R Squared = .250)

q R Squared = .634 (Adjusted R Squared = .589)