

EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF *INTERLEUKIN 5* (IL-5) DAN *GRANULOCYTE RECEPTOR 1* (Gr-1)

SKRIPSI

Oleh :
OLFIVESEN PURBA
155130101111022



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF *INTERLEUKIN 5* (IL-5) DAN *GRANULOCYTE RECEPTOR 1* (Gr-1)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
OLFIVESEN PURBA
155130101111022



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c
YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF
INTERLEUKIN 5 (IL-5) DAN *GRANULOCYTE RECEPTOR 1 (Gr-1)***

Oleh :
OLFIVESEN PURBA
NIM. 155130101111022

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada Tanggal 24 April 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
sarjana kedokteran hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Drs. Agung Pramana W. M., M.Si
NIP. 19650616 199111 1 001

drh. Indah Amalia Amri, M.Si.
NIK. 201304 871208 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Olfivesen Purba

NIM : 155130101111022

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Preventif Kefir Pada Mencit (*Mus musculus*) BALB/c Yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif *Interleukin 5* (IL-5) Dan *Granulocyte Receptor 1* (Gr-1)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 24 April 2019

Yang menyatakan,

(Olfivesen Purba)

NIM. 155130101111022

EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB/c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF INTERLEUKIN 5 (IL-5) DAN GRANULOCYTE RECEPTOR 1 (Gr-1)

ABSTRAK

Kefir adalah produk hasil olahan susu fermentasi yang dibuat dari fermentasi yeast laktosa dan fermentasi yeast non laktosa. Kandungan probiotik kefir mampu menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan dan bioaktif peptida dalam kefir mampu mengaktifasi makrofag dan menekan respon imun Th2 sehingga dapat mencegah terjadinya alergi. Alergi merupakan reaksi berlebihan yang melibatkan aktivitas antibodi IgE oleh sistem imun sebagai tanggapan pada kontak tubuh dengan bahan asing tertentu yang dikenal sebagai alergen. Alergen yang digunakan dalam pembuatan hewan model alergi yaitu ovalbumin (OVA). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek preventif kefir pada mencit BALB/c yang diinduksi OVA dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IL-5 dan Gr-1. Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan *post control only* yang terdiri dari kontrol negatif yang diberi *placebo* NaCl fisiologis selama 14 hari, Kontrol positif tanpa diberikan preventif kefir, diberikan Ovalbumin dengan dosis 20 µg/ekor serta Al(OH)₃ 1000 µg IP pada hari ke 8 dan 15. Selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke 29 P.O (60 mg/ekor), dan 3 kelompok perlakuan yang masing-masing diberikan preventif kefir P.O dengan dosis 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 900 mg/kgBB dan masing-masing diberikan ovalbumin. Pengukuran kadar relatif IL-5 dan Gr-1 menggunakan metode flowcytometry, data dianalisa menggunakan uji *Oneway ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan uji *tukey* ($\alpha=0,05$). Hasil penelitian menunjukkan pemberian preventif kefir dapat menurunkan kadar relatif IL-5 dan Gr-1 ($\alpha<0,05$).

Kata Kunci : Kefir, Alergi, IL-5, Gr-1

**PREVENTIVE EFFECT of KEFIR IN MICE (*Mus musculus*) BALB/c
OVALBUMIN INDUCED ON RELATIVE LEVELS OF
*INTERLEUKIN 5 (IL-5) AND GRANULOCYTE
RECEPTOR 1 (Gr-1)***

ABSTRACT

Kefir is a fermented milk processed products made from yeast fermentation of lactose and yeast non lactose. Content of probiotic kefir is able to suppress the growth of bacteria cause diseases of the digestive tract and bioaktif peptides in kefir are capable of activating macrophages and suppress Th2 immune response so as to prevent the occurrence of allergies. An allergy is an overreaction that involves the activity of IgE antibody response by the immune system in body contact with certain foreign substances known as allergens. Allergens are used in the manufacture of animal model allergic is ovalbumin (OVA). The purpose of this research is to know the preventive effects of kefir in BALB/c mice induced OVA can cause a decrease in the relative levels of IL-5 and Gr-1. This research was an experimental laboratory using a Completely Randomized Design (RAL) and post control only a negative control consisting of a given physiological NaCl placebo for 14 days, without any positive controls were given preventive kefir, ovalbumin was given with a dose of 20 µg/mice and Al(OH)₃ 1000 µg IP on day 8 and 15. Then OVA was induced on the 29th day P.O (60 mg/mice), and 3 treatment groups were given preventive kefir P.O with dose of 300 mg/kgBB, 600 mg/mg, and 900 mg/kgBB and each was given ovalbumin. The measurement of the relative levels of IL-5 and Gr-1 using flowcytometry method, data were analyzed using the Oneway ANOVA test with a 95% level of confidence followed by the tukey test ($\alpha=0,05$). The results showed preventive kefir administration can reduce the relative levels of IL-5 and Gr-1 ($\alpha<0,05$).

Key Words : Kefir, Allergy, IL-5, Gr-1

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Preventif Kefir Pada Mencit (*Mus musculus*) BALB/c yang Diinduksi Ovalbumin terhadap Kadar Relatif *Interleukin 5* (IL-5) Dan *Granulocyte Receptor 1* (Gr-1)”.

Dalam kesempatan ini dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan proposal Skripsi yaitu

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan.
2. Dr. Drs. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku dosen pembimbing I yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
3. drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
4. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet dan drh. Ahmad Fauzi, M.Sc selaku dosen penguji atas ilmu, dukungan serta saran dan masukan yang sangat membangun.
5. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes dan Tim yang telah memberikan kesempatan untuk bergabung dalam penelitian ini serta dukungan dan saran yang membangun.
6. drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku pembimbing akademik penulis yang telah membimbing dan memberikan arahan serta saran selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan dan doa untuk menyelesaikan proposal penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
8. Dosen dan Staf kependidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.

9. Teman-teman seperjuangan skripsi Indra Darpa Kusuma, Ayu Mahanisa Sanjoyo, Yurisa Noviaji Pranoto, dan Fakhira Rahmadhiani yang selalu menemani dan memberi dukungan dalam menyelesaikan skripsi.
10. Keluarga besar KTBjoss, PMK Veteriner, PMK'15, Selowae, Mikroimun, Asique'15, serta DNA atas bantuan, cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, dan keceriaan yang telah diberikan.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan proposal ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penyusunan Skripsi ini masih banyak kekurangan, karena keterbatasan kemampuan yang dimiliki, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin.

Malang, 24 April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISITILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1	L
atar Belakang	1
1.2	R
umusan Masalah	4
1.3	B
atasan Masalah	4
1.4	T
ujuan Penelitian	5
1.5	M
manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	6
2.2 Kefir	7
2.2.1 Definisi	7
2.2.2 Manfaat Kefir	8
2.2.3 Pembuatan Kefir	10
2.3 Alergi	11
2.3.1 Definisi	11
2.3.2 Jenis-jenis Alergi	12
2.3.3 Patofisiologi Alergi	13
2.4 Ovalbumin	14
2.5 <i>Interleukin 5 (IL-5)</i>	15
2.6 <i>Granulocyte Receptor 1 (Gr-1)</i>	16
2.7 <i>Flowcytometry</i>	17
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN ..	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesa Penelitian	23

BAB 4. METODE PENELITIAN	24
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.2 Alat dan Bahan.....	24
4.2.1 Alat Penelitian	24
4.2.2 Bahan Penelitian.....	25
4.3 Sampel Penelitian.....	25
4.4 Rancangan Penelitian	26
4.5 Variabel Penelitian	27
4.6 Prosedur Penelitian.....	28
4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....	28
4.6.2 Pemberian Kefir sebagai Preventif.....	28
4.6.3 Induksi Ovalbumin pada Mencit BALB/c.....	30
4.6.4 Pengkoleksian Sampel.....	30
4.6.5 Pengukuran Kadar Relatif IL-5 dan Gr-1 dengan Metode <i>Flowcytometry</i>	31
4.7 Analisa Data	31
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1 Pengaruh Pemberian Preventif Kefir pada Mencit Induksi Ovalbumin terhadap Kadar Relatif IL-5	32
5.2 Pengaruh Pemberian Preventif Kefir pada Mencit Induksi Ovalbumin terhadap Kadar Relatif Gr-1	37
BAB 6. PENUTUP	43
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi dan Kadar Nutrisi Kefir	10
4.1 Rancangan Penelitian	26
5.1 Rata-rata Kadar Relatif IL-5	32
5.2 Rata-rata Kadar Relatif Gr-1	37



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	6



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Laik Etik	50
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian	51
Lampiran 3. Perhitungan Dosis.....	52
Lampiran 4. Hasil Uji Proksimat Kefir	55
Lampiran 5. Identifikasi Bakteri Asam Laktat pada Media MRSA.....	56
Lampiran 6. Prosedur Pembuatan Kefir dan Metode <i>Flowcytometry</i>	57
Lampiran 7. Kadar Relatif IL-5 dan Gr-1 Hasil Uji <i>Flowcytometry</i>	59
Lampiran 8. Rata-rata Kadar Relatif IL-5 dan Gr-1	69
Lampiran 9. Hasil Statistika Kadar Relatif IL-5	70
Lampiran 10. Hasil Statistika Kadar Relatif Gr-1.....	73
Lampiran 11. Dokumentasi Kegiatan	76



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

%	:	Persen
<	:	Kurang dari
AD	:	Atopik Dermatitis
Al(OH) ₃	:	Aluminium Hidroksida
APC	:	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BAL	:	Bakteri Asam Laktat
BB	:	Berat Badan
CD	:	<i>Cluster of Differentiation</i>
DNA	:	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
g	:	Gram
GM-CSF	:	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating</i>
Gr	:	<i>Granulocyte Receptor</i>
Ig	:	Immunoglobulin
IL	:	<i>Interleukin</i>
kD	:	Kilodalton
Kg	:	kilogram
mg	:	miligram
MHC	:	<i>Major Histocompatibility</i>
ml	:	Mililiter
mm	:	Milimeter
mRNA	:	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
°C	:	derajat celcius
OVA	:	Ovalbumin
PBS	:	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
RAL	:	Rancangan Acak Lengkap
rpm	:	Revolutions per minute
Th	:	T helper
TNF- α	:	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
α	:	Alfa
β	:	Beta
μ g	:	Mikrogram
MRSA	:	deMann Rogosa Sharpe Agar

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kejadian alergi dalam beberapa tahun terakhir terus meningkat yang menimbulkan masalah kesehatan. Kejadian alergi juga memiliki dampak besar pada kualitas hidup manusia dan hewan domestik. *World Allergy Organization* (WAO) menyebutkan 22% penduduk dunia menderita alergi dan terus meningkat setiap tahun. WAO juga menyatakan 100 hingga 175 orang di Amerika Serikat meninggal karena alergi setiap tahunnya (Tollefsen *et al.*, 2008). Alergi timbul karena perubahan reaksi tubuh terhadap suatu bahan yang ada dalam lingkungan. Alergi merupakan suatu reaksi berlebihan oleh sistem imun sebagai tanggapan pada kontak tubuh dengan bahan-bahan asing tertentu yang dikenal sebagai alergen. Alergen dapat berupa partikel debu, serbuk tanaman, obat atau makanan, bertindak sebagai antigen yang merangsang terjadinya respon kekebalan (Candra *et al.*, 2011).

Alergen dapat masuk kedalam tubuh melalui beberapa cara, diantaranya melalui saluran pernafasan (alergen inhalatif), alergen kontak, melalui suntikan atau sengatan, dan alergi makanan. Istilah alergi makanan juga dikenal sebagai hipersensitivitas makanan yang mencakup reaksi imunologik terhadap makanan atau bahan pelengkap makanan (Candra *et al.*, 2011). Beberapa jenis penyakit alergi yang ditimbulkan oleh makanan mempengaruhi kulit pada manusia dan hewan, salah satu yang paling umum adalah dermatitis atopik (AD) (Santoro dan Marsella, 2014).

Terjadinya reaksi alergi melibatkan adanya aktivitas antibodi IgE (Imunoglobulin E). Mekanisme alergi didominasi oleh sel mastosit (*mast cell*) yang mendapat rangsangan dari alergen yang kemudian melepaskan enzim antibodi IgE. Pelepasan IgE akan memicu degranulasi dan mengakibatkan pelepasan histamin, leukotrien dan mediator lain yang selanjutnya akan muncul alergi. Imunoglobulin E dihasilkan dalam jumlah besar ketika alergen menempel pada sel limfosit B (Kuby, 2007).

Sistem imun dalam tubuh bereaksi terhadap antigen yang mengganggu sistem tersebut. Menurut Winter *et al.* (2000), aktivitas alergi tidak diakibatkan oleh IgG, IgA, IgM atau IgD, melainkan disebabkan oleh satu kelas Imunoglobulin yang disebut IgE. Imunoglobulin ini memiliki kelebihan, yaitu dapat melekat pada sel basofil dan sel mastosit. Produksi IgE oleh sel limfosit B yang mengalami pematangan akan lebih cepat dan diproduksi dalam jumlah banyak jika sel tersebut tersensitisasi lebih dahulu. Protein putih telur atau ovalbumin digunakan sebagai zat yang mampu membuat sel limfosit B lebih sensitif.

Reaksi alergi terpacu pada saat alergen berikatan dengan IgE yang terikat di sel mast. Sel mast akan berada di permukaan tubuh dan berfungsi untuk memberikan tanda terhadap sistem imun adanya suatu infeksi lokal. Eosinofil yang berinteraksi dengan sel mast akan menyebabkan granulasi sel mast, dimana granulasi sel mast dan aktivasi Th2 menyebabkan eosinofil terakumulasi dalam jumlah besar dan siap untuk diaktifkan (Trivedi dan Lloyd, 2007). IL-5 merupakan sitokin utama yang mengaktifkan eosinofil pada respon alergi tipe

lambat setelah pajanan antigen. Kehadiran eosinofil menandakan terjadinya inflamasi alergi kronik dan menyebabkan kerusakan jaringan (Greenfeder *et al.*, 2001).

Interaksi antara flora normal, epitel usus dan sel imun memainkan peranan penting dalam pemeliharaan homeostatis usus. Penggunaan probiotik untuk memodulasi respon imun pada tingkat mukosa dan sistemik merupakan alternatif yang sangat baik dalam pencegahan dan pengobatan alergi dan gangguan motabolik. Kefir memiliki sifat yang baik bagi kesehatan, diantaranya seperti efek imunologi, antimikroba, antitumoral, dan hipokolesterolemik. Salah satu kandungan kefir yaitu *Lactobacillus kefir* memiliki peranan sebagai tindakan protektif terhadap invasi juga melawan sifat sitotoksik dari kandungan ovalbumin (Carasi *et al.*, 2014). Bakteri asam laktat dan kapang yang terdapat dalam kefir hidup bersimbiosis dan berfungsi dalam proses fermentasi asam laktat dan alkohol. Kefir juga memproduksi peptida bioaktif sebagai bahan suplemen yang memiliki peran penting dalam fungsi fisiologi dan regulatori dalam tubuh. Salah satu fungsi peptida tersebut adalah sebagai penghambat aktivitas *Angiotensin-Converting Enzyme* (ACE) yang bertanggungjawab pada proses kemunculan hipertensi (Febrisiantosa *et al.*, 2012). Bioaktif peptida juga membangkitkan peranan T regulator yang akan menghambat aktifitas Th2 atau Th1 yang berlebihan melalui stimulus *Interleukin-5* (IL-5) yang dihasilkan sel Th2, sehingga dapat mengurangi inflamasi sebagai dampak respon alergi (Castellazzi *et al.*, 2013).

Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian preventif kefir sebagai terapi alergi yang mampu menurunkan kejadian inflamasi sehingga terjadi penurunan ekspresi interleukin-5 (IL-5) dan *granulocyte receptor-1* (Gr-1).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif IL-5?
2. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif Gr-1?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dirumuskan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 30-40 g berumur 8-12 minggu. Perlakuan terhadap hewan coba telah memperoleh persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian No. -959 KEP Universitas Brawijaya.
2. Mencit BALB/c diinduksi dengan pemberian ovalbumin secara intraperitoneal dengan dosis 20 µg OVA/ekor dan *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 *aquades* steril, serta ovalbumin secara per oral dengan dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril.

3. Kefir dibuat dari bahan baku susu kambing yang dicampur bakteri asam laktat dan yeast yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
4. Terapi preventif kefir dilakukan dengan pemberian kefir selama 14 hari pada hewan coba dimulai pada hari ke-1 hingga 14, tiap hewan coba diberikan terapi secara per oral dengan dosis pemberian sebesar 300 mg/KgBB, 600 mg/KgBB, dan 900 mg/KgBB.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar relatif IL-5 dan Gr-1 yang dihitung menggunakan metode *flowcytometry*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui efek preventif pemberian kefir pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif IL-5.
2. Mengetahui efek preventif pemberian kefir pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif Gr-1.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menambah ilmu pengetahuan tentang pemanfaatan pemberian preventif kefir pada mencit (*Mus musculus*) BALB/c yang diinduksi ovalbumin terhadap kadar relatif IL-5 dan Gr-1.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus L.*) merupakan mamalia pengerat (rodensia) yang cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah besar, variasi genetiknya cukup besar dan memiliki sifat anatomi serta fisiologi yang terkarakteristik dengan baik. Mencit yang sering digunakan dalam penelitian di laboratorium adalah hasil perkawinan tikus putih “*inbreed*” maupun “*outbreed*”. Adapun klasifikasinya adalah sebagai berikut (Akbar, 2010) :

Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae
Genus	: Mus
Species	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*) (Liu dan Fan, 2018).

Mencit (*Mus musculus L.*) memiliki ciri-ciri berupa bentuk tubuh kecil, berwarna putih, memiliki siklus estrus teratur yaitu 4-5 hari. Mencit betina dewasa dengan umur 35-60 hari, memiliki berat badan 18-35 g. Lama hidupnya 1-2 tahun, dan dapat mencapai 3 tahun. Masa reproduksi mencit betina berlangsung selama 1,5 tahun dengan lama kebuntingan 19-20 hari. Jumlah anak mencit rata-rata 6-15 ekor dengan berat lahir antara 0,5-1,5 g (Liu dan Fan, 2018).

Ovalbumin sebagai protein telur dapat menjadi alergen yang cukup efektif dalam mengembangkan model mencit alergi, terutama pemilihan *strain* BALB/c dimana *strain* ini memiliki tingkat sensitivitas dalam mengaktivasi sel limfosit Th2 dominan dibandingkan *strain* lain (Cahiadewi *et al.*, 2016).

2.2 Kefir

2.3.1 Definisi

Beberapa jenis susu fermentasi yang telah dikenal masyarakat adalah yoghurt, kefir dan olahan susu lainnya. Kefir merupakan produk hasil olahan susu fermentasi yang dibuat menggunakan biji kefir (*Lactobacillus kefir*) yaitu matriks dari fermentasi yeast laktosa (*Kluyveromyces marxianus*) dan fermentasi yeast non laktosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomuces cerevisae* dan *Saccharomyces exiguus*) (Mahdiana dan Purwadi, 2015). Kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain* atau *kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri antara lain *Streptococcus sp.*, *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi khamir non patogen. Bakteri berperan

menghasilkan asam laktat dan komponen flavor, sedangkan ragi menghasilkan gas asam arang atau karbondioksida dan sedikit alkohol. Kefir merupakan produk fermentasi yang memiliki karakteristik khas yaitu campuran rasa asam, alkoholik dan karbonat yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri dan khamir (Hidayat *et al.*, 2006).

Kefir dapat dihasilkan dari susu yang utuh, susu skim, susu sapi, kambing, domba, unta atau kerbau (Rosa, *et al.*, 2017). Susu kambing lebih banyak digunakan dibandingkan dengan jenis susu lainnya, hal ini karena susu kambing memiliki banyak kelebihan jika dibandingkan dengan susu sapi, dimana susu kambing lebih cepat terdispersi dan campurannya lebih homogen serta mudah dicerna karena molekul butiran lemaknya lebih kecil yaitu 3,49 mm sedangkan susu sapi 4,55 mm dan terdiri dari asam lemak berantai pendek dan sedang, tidak mengandung β -laktoglobulin yaitu penyebab terjadinya alergi yang sering ditimbulkan oleh susu sapi. Penggunaan susu kambing juga sudah populer terutama untuk terapi kesehatan karena kandungan proteinnya yang lebih tinggi dibandingkan susu sapi, dimana terdapat 10 asam amino esensial, juga karena alasan bahwa susu kambing mengandung laktosa yang rendah yaitu sekitar 4,1% dibandingkan susu sapi 4,7%, sehingga susu kambing sesuai bagi penderita *lactose intolerance* (Sawitri, 2011).

2.3.2 Manfaat Kefir

Kefir merupakan suatu probiotik yang dapat meningkatkan berbagai kondisi kesehatan selain status gizi, beberapa diantaranya adalah efek

immunomodulator, *barrier* agen patogen, anti-neoplastik, anti-mutagenik, anti-oksidan, anti-mikrobia, serta anti-alergenik (Rodrigues *et al.*, 2005). Kandungan yang terdapat pada kefir susu kambing berupa protein, lemak, laktosa, etanol, asam laktat, kalsium, fosfor, vitamin A, E dan B kompleks yang tinggi (Aristya *et al.*, 2013). Selain kandungan bakteri baik dan ragi, kefir juga mengandung vitamin, mineral, asam amino esensial yang membantu memelihara dan memperbaiki fungsi tubuh (Julianto *et al.*, 2016).

Suplementasi kefir memiliki pengaruh terhadap aktivasi imun seluler (Th1) untuk memproduksi sitokin sehingga mengaktifkan sel *phagosit* yang berperan dalam menghambat kinerja patogen dalam saluran pencernaan serta mengaktifasi makrofag dalam memproduksi sitokin TNF- α , IL-6, IL-12, dan IL-18 dalam merangsang terjadinya respon imun (Ray dan Bhunia, 2008). Bakteri asam laktat dari kefir juga memiliki manfaat yang menguntungkan karena dapat merespon diare, *food allergies*, dan *inflammatory bowel disease* (Yamane, *et al.*, 2018). Kefir juga mengandung zat spesifik yang dapat menghambat proses inflamasi akibat alergi, yaitu bioaktif peptida yang mampu mengaktifasi makrofag, meningkatkan fagositosis, menekan respon imun Th2, meningkatkan produksi sitokin, dan menstimulasi sekresi IgG dan IgA oleh limfosit B dalam lumen usus (Rosa *et al.*, 2017). Bioaktif peptida adalah komponen pangan yang mempunyai fungsi biologis terhadap kesehatan baik menyembuhkan ataupun mencegah penyakit. Peptida atau hidrolisat protein adalah turunan protein melalui degradasi enzim proteolitik (Chalid dan Hartiningsih, 2013). Contoh bioaktif

peptida dalam kefir adalah laktoferin yang memiliki sifat antiinflamasi dan terlibat dalam proses fagositosis serta respon imun (Ferrer *et al.*, 2000).

2.3.3 Pembuatan Kefir

Proses fermentasi kefir melalui jalur fermentasi asam laktat dan alkohol. Menurut Sudono dan Usmiati (2004), susu fermentasi sebagai bahan pangan asal susu dikelompokkan menjadi dua golongan utama yaitu melalui fermentasi asam laktat seperti yoghurt dan susu fermentasi menggunakan starter bakteri asam laktat, dan melalui fermentasi asam laktat dan alkohol seperti kefir. Pada prinsipnya proses penambahan granul kefir sama dengan proses pembuatan yoghurt, dengan penambahan granul kefir 5% dan diperam selama 18-24 jam pada suhu 22°C yang akan dihasilkan produk minuman kefir dengan pH <4,65, kandungan asam laktat 0,6-0,8% dan kadar alkohol bervariasi antara 0,5-1%. Komposisi dan kadar nutrisi pada kefir terdiri atas (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Komposisi dan kadar nutrisi kefir (Sawitri, 2012).

Komposisi	Kadar
Air	89,5
Lemak	2,57
Protein	3,91
Etanol	0,94
Laktosa	2,88
pH	3,77-4,19

Pembuatan kefir diawali dengan satu liter susu yang dimasak hingga mendidih, setelah itu dibiarkan susu tersebut hingga dingin. Sejumlah biji kefir dimasukkan ke dalam susu sekitar 2-5 g/liter susu. Setelah selesai bahan disimpan

selama 10-12 jam. Untuk menghasilkan kefir yang mengandung gas dan alkohol, maka penyimpanan disimpan dalam wadah tertutup rapat (kedap udara). Setelah penyimpanan dilakukan pengadukan secukupnya, lalu biji kefir disaring dan dipisahkan dari kefir yang baru jadi. Setelah disaring, biji kefir dapat dimasukkan kedalam susu yang baru. Sebelum itu sebaiknya biji kefir ini dibilas dengan air matang yang hangat terlebih dahulu. Cara yang lebih baru untuk membuat kefir adalah dengan menggunakan bibit serbuk kefir yang berasal dari campuran kefir dan biji kefir yang diawetkan (Widodo, 2002).

2.3 Alergi

2.3.1 Definisi

Alergi adalah reaksi sistem imun yang berlebihan terhadap suatu antigen tertentu yang kemudian disebut alergen dan diperantarai oleh antibodi *immunoglobulin E* (IgE). Alergi berhubungan dengan atopi, yaitu suatu kecenderungan genetik untuk memproduksi antibodi IgE yang tinggi sebagai respon terhadap paparan alergen dan akan bermanifestasi klinis menjadi penyakit alergi (Ningrum *et al.*, 2016). Gejala yang timbul akibat alergi adalah radang, kemerahan, bengkak, gatal-gatal dan biduran. Gejala-gejala reaksi alergi yang parah atau disebut reaksi anafilaksis meliputi sesak nafas, biduran kemerah-merahan, ruam kulit yang gatal dan bengkak pada muka, tenggorokan, dan mulut. Pada kasus yang sangat parah, reaksi ini beresiko menyebabkan kematian (ME 2013).

2.3.2 Jenis-jenis Alergi

Menurut Kuby (2007) alergi dibedakan menjadi empat jenis, diantaranya :

1. Reaksi alergi tipe I; yaitu suatu tipe alergi yang diperantarai oleh IgE.

Reaksi ini terjadi ketika alergen atau antigen bereaksi dengan zat anti yang spesifik (reaginat). Adanya reaksi antara antigen dengan zat anti tersebut terjadilah proses degranulasi didalam sel yang diikuti dengan keluarnya zat farmakologik aktif, yaitu histamin, zat bereaksi lambat (*slow-reacting substance*), serotonin dan bradikinin. Zat-zat ini umumnya menyebabkan kontraksi otot polos, vasodilatasi dan meningginya permeabilitas pembuluh darah kapiler.

2. Reaksi alergi tipe II; merupakan suatu reaksi yang disebabkan karena timbulnya reaksi antara zat anti dengan antigen spesifik yang merupakan bagian dari sel jaringan tubuh atau suatu haptan yang telah terintegrasi dengan sel tersebut. aktivitas zat anti ini dibawakan oleh kelas IgG atau IgM, yang mempunyai sifat biologik tertentu yaitu mengikat sistem komplemen. Setelah terjadi reaksi antara antigen dengan zat antinya, maka aktivasi sistem komplemen dapat dimulai sehingga timbul pelekatan imun (*immune adherence*), proses opsonisasi dan akhirnya perusakan permukaan sel jaringan tubuh.

3. Reaksi alergi tipe III; merupakan suatu reaksi yang disebabkan oleh kelas IgG dan IgM, namun aktivitas zat anti yang dibawanya bukan terhadap antigen sel jaringan tubuh, melainkan terhadap antigen yang datang dari

luar tubuh. Pada reaksi ini terjadi suatu kompleks yang terdiri dari kumpulan antigen dengan zat antinya yang timbul akibat masuknya antigen asing kedalam tubuh untuk kedua kalinya dan bereaksi dengan zat anti spesifiknya. Seperti pada tipe II, maka IgG atau IgM pada tipe ini dapat pula mengaktifkan sistem komplemen, perbedaannya proses ini baru terjadi setelah kompleks antigen-zat anti itu dipresipitaskan. Akibat proses ini akan timbul peningkatan daya fagositosis dan pelepasan zat anafilatoksin yang secara tidak langsung akan meningkatkan permeabilitas dinding pembuluh darah.

4. Reaksi alergi tipe IV; dalam reaksi alergi tipe ini yang memegang peranan penting adalah sel limfosit yang telah peka secara spesifik. Bila sel limfosit berkontak dengan antigen untuk kedua kalinya maka akan timbul proses diferensiasi sel sehingga sel limfosit akan menghasilkan dan melepaskan zat yang disebut limfokim. Zat ini dapat menarik sel-sel makrofag polimornuklear dan limfosit kearah lokasi rangsangan.

2.3.3 Patofisiologi Alergi

Reaksi alergi terjadi ketika antibodi IgE terikat dengan afinitas tinggi melalui bagian Fc dengan reseptor FcεRI di sel mast. Tubuh tidak akan menunjukkan reaksi apa-apa saat alergen masuk pertama kali, hal ini dikarenakan tubuh masih membutuhkan waktu atau yang disebut masa sensitisasi. Sensitisasi merupakan proses pelapisan (*coating*) sel mastosit oleh IgE. Pelapisan ini menyebabkan sel mastosit menjadi sensitif bila terjadi paparan ulang alergen. Selama fase sensitisasi awal tidak terdapat reaksi

kerusakan pada alergen yang berlebihan. Apabila sel mastosit yang tersensitisasi oleh IgE terpapar kembali dengan antigen, sel akan teraktivasi untuk mengeluarkan mediator. Aktivitas sel mastosit terjadi sebagai hasil ikatan alergen dengan dua atau lebih antibodi IgE di sel mastosit. Setelah adanya ikatan silang, maka akan memicu sinyal biokimia yang menyebabkan degranulasi cepat, sintesis dan sekresi mediator seperti pelepasan histamin, serotonin, prostaglandin dan faktor pengaktif platelet ke dalam darah dan sekresi sitokin (Abbas *et al.*, 2015).

2.4 Ovalbumin

Ovalbumin (OVA) merupakan alergen spesifik dengan kandungan 60-65% protein putih telur dan berat 45 kDa yang dapat berperan sebagai alergen (Sicherer dan Wood, 2012). Ovalbumin apabila disuntikkan secara intraperitoneal pada hewan coba dapat meningkatkan aktivitas Th2 dominan dalam mekanisme ketidakseimbangan Th1–Th2. Kondisi Th2 dominan meningkatkan produksi IgE spesifik dan degranulasi sel mast, sehingga dilepaskan berbagai mediator inflamasi berupa IL-4, IL-13, IL-5, eosinofil dan basofil sebagai reaksi alergi (Nials dan Uddin, 2008). Sensitisasi ovalbumin selama 14 hari secara intraperitoneal menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I pada mencit BALB/c. Mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin juga menunjukkan adanya peningkatan respon inflamasi dan meningkatkan kadar IgE (Atika *et al.*, 2015).

Ovalbumin dapat diterapkan melalui metode sistemik dan lokal secara akut ataupun kronik yang dapat meningkatkan kadar IgE spesifik dan akumulasi

eosinofil. Sensitisasi ovalbumin secara akut pada hewan model alergi menggambarkan peningkatan antibodi IgE, sitokin Th2, dan akumulasi sel eosinofil secara dominan (Cahiadewi *et al.*, 2016). Pemberian Al(OH)₃ sebagai *adjuvant* dalam sensitisasi ovalbumin meningkatkan dominasi sel limfosit Th2 dalam memproduksi sel mast tersensitisasi secara bebas, sehingga dapat memicu reaksi alergi dalam waktu yang lebih singkat (Conrad dan Yildirim, 2009).

2.5 Interleukin 5 (IL-5)

Interleukin merupakan kelompok sitokin (disekresi protein) yang pertama kali ditemukan untuk diekspresikan oleh leukosit. Peran utama IL-5 dalam hal maturasi eosinofil di sumsum tulang dan pelepasannya ke darah. IL-5 pada manusia hanya bekerja pada eosinofil dan basofil yang dapat menyebabkan maturasi, pertumbuhan, aktivasi dan kemampuan hidupnya. Pasien dengan alergi memiliki peningkatan ekspresi sitokin tipe Th2 (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 dan GM-CSF) pada cairan bronchoalveolar lavage (BAL) maupun biopsi bronkus dibanding dengan pasien normal, namun tidak terdapat perbedaan dalam ekspresi sitokin Th1. Pasien dengan alergi berhubungan dengan aktivitas IL-3, IL-4, IL-5 dan GM-CSF. Gen mRNA IL-5 juga dapat ditemukan pada eosinofil dan jaringan sel mast yang teraktivasi pada pasien dermatitis alergi, rinitis alergi dan asma (Kips, 2001).

Interleukin-5 (IL-5) adalah sitokin dengan ukuran sekitar 20 kD yang diproduksi oleh sel T CD4⁺ dan sel mast yang teraktivasi. IL-5 berinteraksi dengan reseptor spesifik IL-5Rs suatu heterodimer yang mengandung IL-5R α dan

rantai $\alpha\beta$ (CD 131) yang berbagi dengan GM-CSFR dan IL-3R. Fungsi IL-5 yang paling penting adalah kemampuan untuk menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi eosinofil dan aktivasi sel eosinofil matur. IL-5 juga bersifat kemotaktif terhadap eosinofil, menyebabkan sekresi eosinofil dan meningkatkan *antibody dependent cytotoxicity*. Mekanisme lain menyebabkan akumulasi eosinofil pada kelainan alergi dengan kemampuannya meningkatkan respon kemokin dan $\alpha\beta 2$ integrin pada eosinofil, yang mengakibatkan pengikatan terhadap VCAM-1 yang diekspresikan sel endotel dan selanjutnya terjadi migrasi eosinofil melewati celah endotel (Leonard, 2003).

2.6 Granulocyte Receptor 1 (Gr-1)

Granulocyte Receptor-1 (Gr-1) atau antibodi RB6-8C5 telah digunakan secara luas untuk mendepleksi neutrofil pada mencit dan untuk menyelidiki peran sel-sel ini dalam pertahanan sel host. Gr-1 juga adalah protein yang biasa dikenal sebagai Ly-6G (21-25 kDa) atau Ly-6C (14-16 kDa) yang merupakan diferensiasi myeloid atau *glycosylphosphatidylinositol* (GPI)-linked protein yang diekspresikan pada granulosit dan makrofag dan terdiri dari antigen granulosit reseptor-1 (Gr-1). RB6-8C5 dideskripsikan sebagai pengikat antigen permukaan, *granulocyte reseptor-1* (Gr-1), yang diyakini hanya diekspresikan oleh granulosit matur. Penelitian terbaru menyatakan bahwa Ly6G (Gr-1) merupakan prekursor dari inflamasi makrofag. Gr-1 digunakan sebagai *marker* atau penanda oleh makrofag pada saat terjadinya inflamasi. Gr-1 juga dapat menginduksi inflamasi

eosinofil dengan meningkatkan infiltrasi eosinofil dan sekresi Th2 sitokin IL-5 dan IL-13 (Daley *et al.*, 2008).

Granulocyte Receptor-1 (Gr-1) dikenal sebagai *marker* spesifik dari permukaan myeloid terutama makrofag, namun dapat juga diekspresikan oleh non-myeloid. Ekspresi dari Gr-1 dapat ditemukan pada berbagai sel, diantaranya neutrofil, eosinofil, basofil, monosit dan limfosit. Gr-1 memiliki fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang sitokin lain, serta sebagai regulator dalam mengaktifasi sel neutrofil dan makrofag (Martins *et al.*, 2011). Gr-1 merupakan reseptor permukaan sel yang memberi kontribusi terhadap proses selular yang terlibat dengan respon imun secara aktif dan protektif terhadap organisme patogen (Percopo *et al.*, 2016).

2.7 Flowcytometry

Flowcytometry merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. Pada suatu populasi sel yang sejenis, misal pada sel kanker yang diberi perlakuan suatu senyawa sitotoksik, dapat dilakukan analisis terhadap fase-fase daur sel, sel apoptosis, serta sel yang mengalami poliploidi. Masing-masing jenis sel tersebut memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom dimana pada fase G₀/G₁, fase S, fase G₂/M berturut-turut memiliki 2, 3, dan 4 set kromosom. Semakin banyak jumlah set

kromosom, maka intensitas sinyal optik yang diberikan semakin kuat karena kemampuan fluoresen untuk berinterkalasi pada DNA semakin besar. Pada sel yang mengalami apoptosis (sub G0), intensitas fluoresen sangat lemah karena kromosom telah mengalami fragmentasi. Sedangkan pada sel poliploidi, intensitas yang diberikan sangat kuat karena jumlah set kromosom yang lebih dari 4 set (CCRC, 2014).

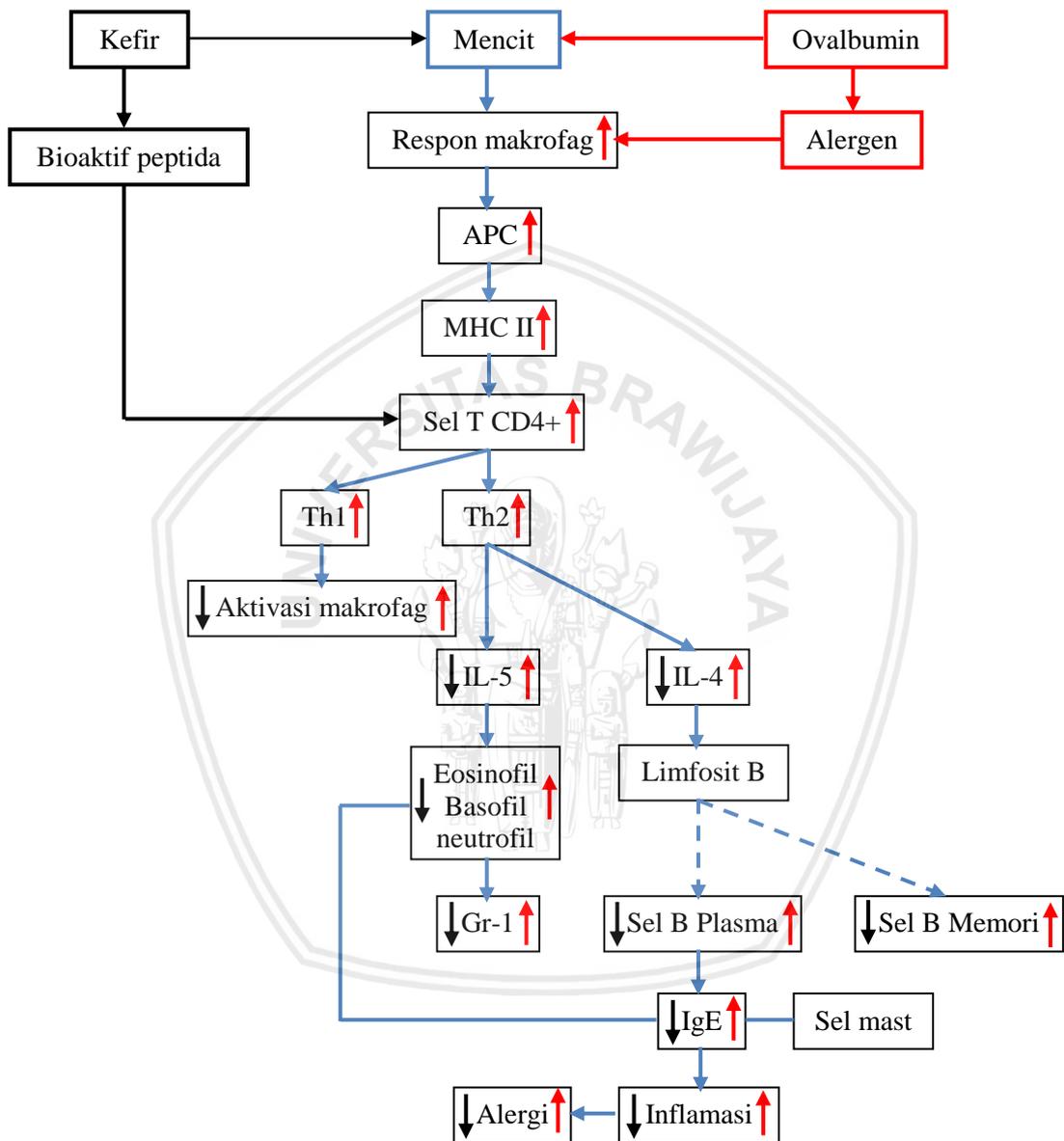
Flowcytometry adalah metode pengukuran jumlah dan sifat komponen sel dalam medium cairan bergerak. Setiap sel melewati celah satu persatu yang kemudian melalui sinar laser menimbulkan sinyal elektronik yang dicatat oleh instrumen sebagai karakteristik sel yang bersangkutan. Prinsip kerja *flowcytometry* adalah sejumlah sel disuspensikan kedalam suatu cairan konduktif. Sel-sel tersebut diberi tekanan hidrodinamik sehingga dapat melewati suatu lorong satu demi satu. Ketika sel sampai disuatu titik lorong, sel akan ditembak dengan sinar laser. Kemudian hasil tembakan sinar laser akan dibaca oleh dua macam detektor. Detektor yang pertama, letaknya sejajar dengan sumbu X terhadap sumber tembakan. Sinyal yang didapat disini akan dibaca sebagai gambaran ukuran sel yang ditembak. Detektor yang kedua, letaknya 90° terhadap sumber tembakan atau laser. Sinyal yang didapat disini akan dibaca sebagai gambaran sitosolik yang ada dalam sel, misalnya granul (McPherson dan Pincus, 2017). Komponen utama *flowcytometry* pada dasarnya adalah sistem fluida, sistem optik (eksitasi dan koleksi), jaringan elektronik (detektor), dan komputer. Sistem fluida bertanggung jawab untuk mengarahkan cairan yang mengandung partikel ke sumber cahaya terfokus. Optik eksitasi memfokuskan sumber cahaya

pada sel atau partikel, sementara optik koleksi mentransmisikan penyebaran cahaya atau fluoresen dari partikel ke jaringan elektronik. Jaringan elektronik berfungsi mendeteksi sinyal dan mengkonversi sinyal menjadi data digital yang sebanding dengan intensitas cahaya, serta komputer yang diperlukan untuk menganalisis data (Adan *et al.*, 2016).

Perkembangan teknologi mutakhir telah memungkinkan identifikasi sel dengan menggunakan instrument otomatis yang disebut *flowcytometry* dan *cell sorter*. Prinsip *flowcytometry* dan *cell sorting (fluorescence activated cell sorter, FACS)* adalah menggabungkan kemampuan alat untuk mengidentifikasi karakteristik permukaan setiap sel dengan kemampuan memisahkan sel-sel yang berada dalam suatu suspensi menurut karakteristik masing-masing secara otomatis melalui suatu celah yang ditembus oleh seberkas sinar laser. Setiap sel yang melewati berkas sinar laser menimbulkan sinyal elektrolit yang dicatat oleh instrument sebagai karakteristik sel bersangkutan. Setiap karakteristik molekul pada permukaan sel maupun yang terdapat didalam sel dapat diidentifikasi dengan menggunakan satu atau lebih probe yang sesuai. Dengan demikian, alat itu dapat mengidentifikasi setiap jenis dan aktivitas sel dan menghitung jumlah masing-masing dalam suatu populasi campuran (Watanabe, 2007).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

- Variabel Kendali (Mucic)
- Variabel Bebas (Alergen)
- Variabel Bebas (Kefir)
- Variabel Tergantung
- ↓ Patomekanisme
- ↓ Pengaruh pemberian kefir
- ↑ Pengaruh pemberian alergen

Kefir merupakan produk hasil olahan susu fermentasi yang dibuat menggunakan biji kefir (*Lactobacillus kefir*) yaitu matriks dari fermentasi yeast laktosa (*Kluyveromyces marxianus*) dan fermentasi yeast non laktosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces exigenus*) (Mahdiana dan Purwadi, 2015). Pemberian preventif kefir dalam penelitian ini berfungsi untuk mencegah terjadinya inflamasi yang timbul karena adanya alergi dalam tubuh. Menurut Rosa *et al.* (2017), sifat immunomodulator dari kefir dapat dihasilkan dari aktivitas mikrobiota melalui berbagai senyawa bioaktif yang dihasilkan selama proses fermentasi. Peptida bioaktif ini mampu mengaktifkan makrofag, meningkatkan fagositosis, menekan respon imun Th2, dan menstimulasi sekresi IgG dan IgA oleh limfosit B dilumen intestin. Senyawa bioaktif ini juga mampu mempromosikan respon imun yang dimediasi sel terhadap infeksi dan patogen intraselular. Efek immunomodulator kefir dapat dikaitkan dengan kemampuan probiotik ini untuk menurunkan permeabilitas intestin. Dengan demikian, kontak antara host dan antigen yang ada di lumen intestin menurun, yang selanjutnya dapat mengurangi respon inflamasi.

Salah satu contoh bioaktif peptida kefir yaitu lactoferin. Lactoferin berperan dalam mencegah inflamasi dengan cara menghambat dan mengikat alergen yang masuk dalam tubuh, serta menghambat produksi sitokin proinflamasi (Conneely, 2012). Pada penelitian ini dilakukan pemberian ovalbumin sebanyak tiga kali. Pemberian yang pertama berfungsi untuk mengaktifkan sistem imun non spesifik berupa respon makrofag, sedangkan untuk pemberian kedua digunakan untuk mengaktifkan sel Th2, dan pemberian ketiga dengan melalui oral akan

menginduksi sel adaptif dan membentuk sel memori. Pemaparan Ovalbumin akan memicu *antigen presenting Cells* (APC). Ovalbumin oleh APC akan didegradasi menjadi peptida-peptida untuk selanjutnya dipresentasikan ke *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II kepada sel limfosit *T helper* (Th) di dalam limfe sekunder dan sel CD4+. Pemberian ovalbumin secara oral akan meningkatkan sel limfosit CD4+ untuk mensekresikan interleukin yang akan meningkatkan derajat inflamasi pada saluran pencernaan (Kawakami dan Kitaura, 2005). Sel CD4+ mengatur respon imun terhadap protein asing dengan mensekresikan sitokin seperti interleukin dan IFN. Sel CD4+ dapat dikategorikan menjadi Th0, Th1, Th2 berdasarkan produk yang dihasilkannya.

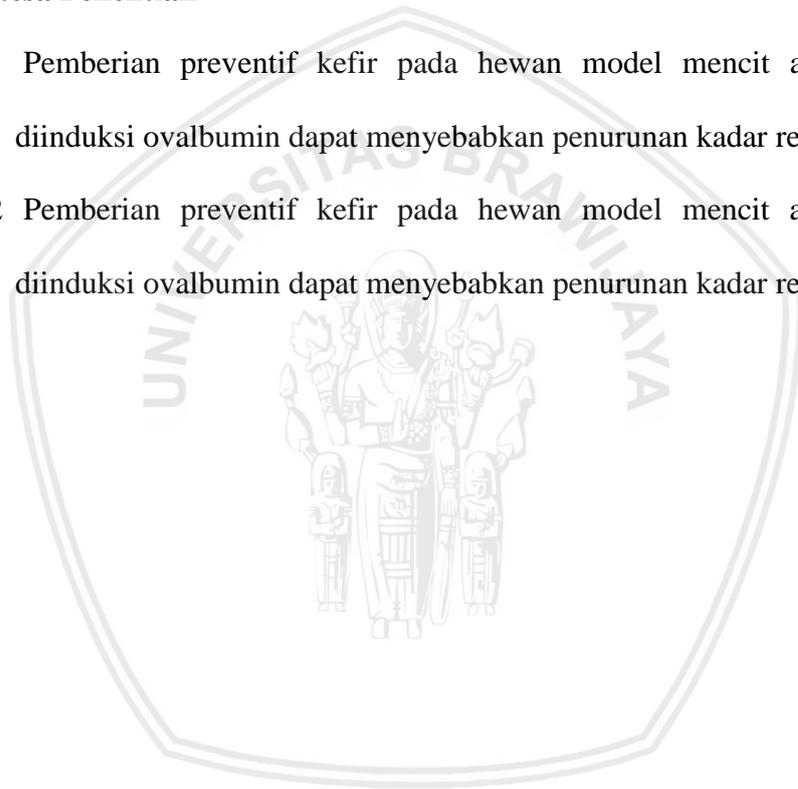
Sel Th2 mengawali terjadinya proses respon alergi tipe cepat dengan melepaskan sitokin-sitokin, terutama IL-4 dan IL-5, yang akan menginduksi produksi IgE, menstimulasi eosinofiloiesis, mengatur fungsi eosinofil dan meningkatkan pertumbuhan sel mast tipe mukosa. Sebaliknya sel Th1 utamanya dilibatkan pada hipersensitivitas tipe lambat dan menghambat proses yang dikendalikan oleh sel Th2 (Platts-Mills, 2001). Alergi ditandai oleh adanya peningkatan jumlah sel Th2 dan sitokin Th2 serta terjadinya penurunan jumlah sel Th1 dan sitokin dari Th1. Histamin memainkan peran yang sangat penting pada patogenesis alergi melalui pengaturan diferensiasi limfosit sel Th (Cookson, 2004). Efek dari histamin ini menyebabkan terjadinya vasodilatasi, hipersekresi, oedem, spasme pada otot polos (Hikmah dan Dewanti, 2010).

Paparan ulang ovalbumin melalui per oral akan menyebabkan inflamasi alergi di saluran pencernaan, dengan stimulasi IL-5 yang diproduksi Th2

meningkatkan infiltrasi eosinofil. Eosinofil merupakan sel yang banyak ditemukan di jaringan terutama saat terjadi proses inflamasi pada reaksi alergi, sehingga sel ini dapat ditemukan di jaringan pada intestinum pada mencit alergi yang diberi paparan ovalbumin melalui per oral (Ningrum *et al.*, 2016).

3.2 Hipotesa Penelitian

- 3.2.1 Pemberian preventif kefir pada hewan model mencit alergi yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IL-5.
- 3.2.2 Pemberian preventif kefir pada hewan model mencit alergi yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif Gr-1.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Perlakuan penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai November 2018 dan dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

1. Pemeliharaan hewan coba dan pemberian perlakuan hewan coba di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Pembuatan suspensi ovalbumin dan *adjuvant* Al(OH)₃ di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Pembuatan kefir dilakukan di Laboratorium Natural Probiotik Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.
4. Uji *flowcytometry* untuk pengamatan kadar relatif IL-5 dan Gr-1 yang dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, *dissecting set*, *glass ware*, serta alat untuk uji *flowcytometry* seperti *yellow tip*, *blue tip*, *mortir*, *sentrifuge tube*, *flowcytometer*, dan *software BD Cell Quest ProTM*.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, mencit jantan *strain* BALB/c berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 30-40 gram dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kefir yang diperoleh dari Laboratorium Natural Probiotik Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang, air minum mencit, sekam padi untuk alas kandang, ovalbumin (ServaCat No. 11842.02), Al(OH)₃ (Merck: CAS 21645-51-2), NaCl Fisiologis, *aquades* steril, antibodi IL-5 dan Gr-1 *anti mice*, *Phospat Buffer Saline* (PBS), dan pakan PB-1.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba dengan kriteria mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat badan 30-40 g, berumur 8-12 minggu. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga banyaknya perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus $t(n-1) \geq 15$ (Montgomery dan Kowalsky, 2011) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$= 4$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka untuk 5 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor mencit.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan *post control only*. Tiap kelompok terdiri atas beberapa kelompok perlakuan mencit. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain adalah :

No	Kelompok	Perlakuan
1	Kelompok 1 (K-)	Mencit sehat diberikan <i>placebo</i> NaCl Fisiologis per oral (0,5 ml/ekor) pada hari ke 1-14.
2	Kelompok 2 (K+)	Mencit tanpa diberikan preventif kefir diberikan ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta <i>adjuvant</i> Al(OH) ₃ 1000 µg dalam 0,5 ml <i>aquades</i> steril secara <i>intraperitoneal</i> pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali OVA (60 mg/ekor) dan 10 mg/ekor Al(OH) ₃ dalam 1 ml <i>aquades</i> steril pada hari ke-29 melalui per oral.
3	Kelompok 3 (P1)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 300 mg/KgBB dan diberikan ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta <i>adjuvant</i> Al(OH) ₃ 1000 µg dalam 0,5 ml <i>aquades</i> steril secara <i>intraperitoneal</i> pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali OVA (60 mg/ekor) dan 10 mg/ekor Al(OH) ₃ dalam 1 ml

		<i>aquades</i> steril pada hari ke-29 secara per oral.
4	Kelompok 4 (P2)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 600 mg/KgBB dan diberikan ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta <i>adjuvant</i> Al(OH) ₃ 1000 µg dalam 0,5 ml <i>aquades</i> steril secara <i>intraperitoneal</i> pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali OVA (60 mg/ekor) dan 10 mg/ekor Al(OH) ₃ dalam 1 ml <i>aquades</i> steril pada hari ke-29 melalui per oral.
5	Kelompok 5 (P3)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 900 mg/KgBB dan diberikan ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta <i>adjuvant</i> Al(OH) ₃ 1000 µg dalam 0,5 ml <i>aquades</i> steril secara <i>intraperitoneal</i> pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali OVA (60 mg/ekor) dan 10 mg/ekor Al(OH) ₃ dalam 1 ml <i>aquades</i> steril pada hari ke-29 melalui per oral.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati pada penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : dosis kefir dan ovalbumin + Al(OH)₃.
- Variabel terikat : persentase kadar sel relatif IL-5 dan Gr-1.
- Variabel kendali : BB, umur dan *strain* mencit, pakan dan kandang mencit.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari spesies *Mus musculus* galur BALB/c jantan. Mencit diadaptasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian. Menurut Tolistiawaty *et al.* (2014), mencit diberi pakan sebanyak 3-4 g/ekor/hari. Pakan yang digunakan berbentuk pelet yang bertujuan untuk mengurangi perubahan komposisi dan diperlukan untuk membuat aus gigi. Pakan juga disimpan pada suhu 15-16°C dan dihabiskan paling lama 4-6 minggu. Sedangkan air minum tersedia tanpa dibatasi dan dapat diberikan dalam botol dengan pipa yang dilengkapi “klep” peluru bulat yang terletak diujung pipa. Untuk mencegah pertumbuhan kuman, air dapat diasamkan atau diklorisasi. Mencit dibagi dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor mencit dalam satu kandang. Kandang mencit berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab. Mencit dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.2 Pemberian Kefir Sebagai Preventif

Kefir yang digunakan dalam penelitian ini terbuat dari fermentasi susu kambing. Menurut Mahdina dan Purwadi (2015), kefir merupakan produk hasil olahan susu fermentasi yang dibuat menggunakan biji kefir (*Lactobacillus kefir*) yaitu matriks dari fermentasi yeast laktosa (*Kluyveromyces marxianus*) dan fermentasi yeast non laktosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomuces cerevisae* dan *Saccharomyces exiguus*).

Kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain* atau *kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri antara lain *Streptococcus* sp., *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi khamir non patogen. Bakteri berperan menghasilkan asam laktat dan komponen flavor, sedangkan ragi menghasilkan gas asam arang atau karbondioksida dan sedikit alkohol. Kefir merupakan produk fermentasi yang memiliki karakteristik khas yaitu campuran rasa asam, alkoholik dan karbonat yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri dan khamir (Hidayat *et al.*, 2006).

Pembuatan kefir diawali dengan satu liter susu yang dimasak hingga mendidih, setelah itu dibiarkan susu tersebut hingga dingin. Sejumlah biji kefir dimasukkan kedalam susu sekitar 2-5 g/liter susu. Setelah selesai bahan disimpan selama 10-12 jam. Untuk menghasilkan kefir yang mengandung gas dan alkohol, maka penyimpanan disimpan dalam wadah tertutup rapat (kedap udara). Setelah penyimpanan dilakukan pengadukan pengadukan secukupnya, lalu biji kefir disaring dan dipisahkan dari kefir yang baru jadi. Setelah disaring, biji kefir dapat dimasukkan kedalam susu yang baru. Sebelum itu sebaiknya biji kefir ini dibilas dengan air matang yang hangat terlebih dahulu. Cara yang lebih baru untuk membuat kefir adalah dengan menggunakan bibit serbuk kefir yang berasal dari campuran kefir dan biji kefir yang diawetkan (Widodo, 2002).

Pada penelitian yang dilakukan, mencit BALB/c diberi kefir secara per oral dengan dosis 300 mg/KgBB untuk P1, 600 mg/KgBB untuk P2, dan

900 mg/KgBB untuk P3. Konsentrasi kefir 5% dalam sediaan 100 ml diperoleh dari Laboratorium Natural Probiotik Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya (**Lampiran 1**).

4.6.3 Induksi Ovalbumin pada Mencit BALB/c

Mencit BALB/c diinjeksi 20 µg OVA/ekor secara *intraperitoneal* (ServaCat No. 11842.02) dicampur dengan 1000 µg Al(OH)₃ (Aluminium Hidroksida, Merck: CAS 21645-51-2) dalam 0,5 ml *aquades* steril pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali OVA dengan dosis 60 mg/ekor (ServaCat No. 11842.02) dan 10 mg Al(OH)₃ (Merck: CAS 21645-51-2) dalam 1 ml *aquades* steril pada hari ke-29 melalui per oral (**Lampiran 1**).

Induksi ovalbumin secara *intraperitoneal* akan menyebabkan sensitisasi alergi sistemik akibat terjadinya pergeseran respon imun ke arah Th2 dominan. Sel Th2 akan menghasilkan beberapa sitokin diantaranya IL-4, IL-13, dan IL-5. Sitokin IL-4 dan IL-13 akan menstimulasi sel B untuk memproduksi IgE spesifik, yang pada individu normal akan memproduksi IgM (*isotype switching*). Paparan ulang ovalbumin melalui oral akan menyebabkan inflamasi alergi disaluran pencernaan, dengan stimulasi IL-5 yang diproduksi sel Th2 akan meningkatkan infiltrasi eosinofil (Ningrum *et al.*, 2016).

4.6.4 Pengkoleksian Sampel

Pengambilan limpa pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dilakukan pada hari ke-30 dan dilakukan euthanasi pada mencit dengan cara induksi ketamin kemudian mencit diposisikan rebah dorsal. Daerah

abdomen diincisi dan dikuakkan lalu dikoleksi organ limpa. Limpa yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam PBS steril dan segera dilakukan pengukuran kadar relatif IL-5 dan Gr-1 menggunakan metode *flowcytometry*.

4.6.5 Pengukuran Kadar IL-5 dan Gr-1 Menggunakan Metode *Flowcytometry*

Sampel yang diuji dengan *flowcytometry* adalah organ limpa. Sampel dibilas dengan menggunakan PBS sebanyak dua kali, lalu diletakkan dalam cawan petri berisi 5 ml PBS, kemudian digerus dan dihomogenisasi serta disuspensi dengan PBS. Sel-sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter dengan menggunakan *wire*, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit dan suhu 20°C. Supernatan dibuang dan bagian pellet direndam dalam cytofix dan cytoferm 100 µL selama 20 menit lalu ditambahkan 50 µL *antibody intraselular staining* (anti IL-5 dan Gr-1) yang dikonjugasi dengan label PE. Data hasil *flowcytometry* dianalisis dengan *software* BD *cellquest Pro*™. Program diatur sesuai dengan pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi. *Gated* dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat dalam layar komputer (Hefni *et al.*, 2013).

4.7 Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji parametrik, *One Way ANOVA* dilanjutkan uji Tukey dengan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan yang signifikan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Preventif Kefir pada Mencit Induksi Ovalbumin terhadap Kadar Relatif IL-5

Kadar relatif IL-5 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) antar kelompok perlakuan (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar Relatif IL-5

Perlakuan	Rata-rata Kadar Relatif IL-5 (%) \pm SD	Peningkatan terhadap Kontrol (-)	Penurunan terhadap Kontrol (+)
Kontrol (+)	2,55 \pm 0,30 ^c	69,80%	
Kontrol (-)	0,77 \pm 0,13 ^a		
Perlakuan 1	1,94 \pm 0,21 ^b		23,92%
Perlakuan 2	1,88 \pm 0,35 ^b		26,27%
Perlakuan 3	1,17 \pm 0,07 ^a		54,11%

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Pemberian preventif kefir memiliki efek terhadap kadar relatif IL-5, pada kelompok perlakuan kontrol negatif dengan pemberian berupa *placebo* NaCl Fisiologis per oral (0,5 ml/ekor) pada hari ke 1-14 menunjukkan rata-rata kadar relatif IL-5 sebesar 0,77%, nilai rata-rata produksi IL-5 pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan kadar

relatif IL-5. Kadar relatif IL-5 kelompok perlakuan kontrol positif dengan pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali ovalbumin secara per oral dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril pada hari ke-29 dan tanpa pemberian preventif kefir, menunjukkan rata-rata kadar relatif IL-5 sebesar 2,55%, dimana terjadi peningkatan sebesar 69,80% terhadap kontrol negatif. Kelompok kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol positif memiliki kadar relatif IL-5 paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lainnya (**Tabel 5.1**), hal ini dikarenakan kelompok perlakuan kontrol positif tidak diberikan preventif kefir sebagai terapi.

Kadar relatif IL-5 kelompok perlakuan 1 dengan pemberian berupa preventif kefir selama 14 hari pertama dosis 300 mg/kgBB dan kelompok perlakuan 2 yang diberikan preventif kefir dengan dosis 600 mg/kgBB serta pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, yang kemudian diinduksi kembali ovalbumin dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril secara per oral pada hari ke-29, menunjukkan adanya penurunan kadar relatif IL-5 sebesar 23,92% dan 26,27% dibandingkan kelompok kontrol positif seiring dengan peningkatan dosis. Kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan rata-rata kadar relatif IL-5 sebesar 1,94% dan 1,88%, berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol

negatif, namun kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (**Tabel 5.1**).

Kadar relatif IL-5 kelompok perlakuan 3 dengan pemberian berupa preventif kefir selama 14 hari pertama dosis 900 mg/kgBB dan pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, yang kemudian diinduksi kembali ovalbumin dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril secara per oral pada hari ke-29, menunjukkan adanya penurunan kadar relatif IL-5 sebesar 54,11% dibandingkan kelompok kontrol positif seiring dengan peningkatan dosis. Kelompok perlakuan 3 menunjukkan rata-rata kadar relatif IL-5 sebesar 1,17%, berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (**Tabel 5.1**).

Ovalbumin (OVA) adalah bahan alergen yang digunakan dalam pembuatan hewan model alergi untuk menimbulkan respon alergi pada saluran pencernaan. Ovalbumin merupakan 60-65% komponen dalam putih telur ayam, dan terdiri atas 365 asam amino dengan berat molekul 45 kDa (Huntington dan Stein, 2001). Ovalbumin merupakan alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe I. Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral, maupun intraperitoneal dapat merubah kecenderungan respon imun menjadi kearah Th2 dominan. Pemberian ovalbumin memberikan gambaran peningkatan IgE dan terjadi inflamasi yang ditandai dengan infiltrasi sel radang dan eosinofil (Ngestiningsih *et al.*, 2003).

Bonnet *et al.*, (2016) menyatakan ovalbumin dengan dosis 10 µg dan *adjuvant* 500 µg Al(OH)₃ sebagai sensitisasi terhadap mencit sebanyak 2 kali selama 2 minggu secara intraperitoneal, kemudian setelah satu minggu diinduksi kembali ovalbumin dengan dosis 20 mg/mencit secara per oral sebanyak 5 kali sudah didapatkan adanya kenaikan produksi IgE yang merupakan tanda dari adanya reaksi alergi. Hal ini berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan, dimana dosis ovalbumin yang diberikan sebesar 20 µg serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg secara intraperitoneal pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali ovalbumin dengan dosis 60 mg dan Al(OH)₃ 10 mg/ekor pada hari ke-29 belum dapat menimbulkan adanya peningkatan IgE yang ditandai dengan mencit yang diinduksi ovalbumin belum mengalami diare. Hal ini menunjukkan bahwa paparan ovalbumin yang singkat dan dosis yang tinggi tidak efektif menimbulkan alergi dibandingkan paparan ovalbumin yang lama dengan dosis yang rendah.

Pemeriksaan darah juga dilakukan untuk mengetahui kadar eosinofil pada mencit, yaitu didapatkan kelompok kontrol positif rata-rata kadar eosinofil 0,5%, kelompok kontrol negatif sebesar 1%, kelompok perlakuan 1 sebesar 0,75%, kelompok perlakuan 2 sebesar 0,5%, dan kelompok perlakuan 3 sebesar 0,25%. Eosinofil merupakan sel dominan yang direkrut pada jaringan terinflamasi berkaitan dengan reaksi alergi. Proses rekrutmen eosinofil dan pelepasan granula protein eosinofil yang memiliki sifat toksik pada jaringan terinflamasi turut dipengaruhi oleh IL-5 (Cahiadewi *et al.*, 2016). Menurut Chowdary *et al.*, (2003) kadar normal eosinofil pada mencit sebesar 0-6%, oleh karena itu penelitian ini

mencit belum mengalami alergi dimana kadar eosinofil masih dalam rentan normal.

Interleukin-5 (IL-5) merupakan aktivator pematangan dan diferensiasi eosinofil utama serta berperan dalam hubungan antara aktivasi sel T dan inflamasi eosinofil. IL-5 juga merupakan sitokin utama yang mengaktifkan eosinofil pada respon alergi tipe lambat setelah pajanan antigen. IL-5 di produksi oleh limfosit, sel mast, dan bertanggung jawab dalam pematangan serta pelepasan eosinofil di sumsum tulang. Sumber utama IL-5 adalah sel Th2, dimana IL-5 di ekspresikan ketika terjadinya proses alergi sebagai respon utama (Greenfeder *et al.*, 2001).

Kelompok perlakuan kontrol positif menunjukkan peningkatan kadar relatif IL-5 yang paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan yang lain. Hal ini dikarenakan pada kelompok perlakuan positif diberikan ovalbumin dan Al(OH)₃ sebagai adjuvant yang menyebabkan peningkatan IL-5 sebagai respon tubuh terhadap alergen dan tanpa pemberian kefir sebagai preventif. Pemberian Al(OH)₃ sebagai *adjuvant* dalam sensitisasi ovalbumin meningkatkan dominasi sel limfosit Th2 dalam memproduksi sel mast tersensitisasi secara bebas, sehingga dapat memicu reaksi alergi dalam waktu yang lebih singkat. Sensitisasi ovalbumin dengan *adjuvant* memproduksi kadar antibodi spesifik IgE-ovalbumin lebih tinggi dibandingkan dengan sensitisasi ovalbumin tanpa *adjuvant* (Cahiadewi *et al.*, 2016).

Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 terjadi penurunan kadar relatif IL-5 dibandingkan dengan kelompok perlakuan kontrol positif. Penurunan ini terjadi karena kelompok perlakuan tersebut diberikan kefir sebagai preventif alergi

dengan dosis berbeda-beda selama 14 hari pertama. Kelompok perlakuan 1 diberikan preventif kefir dengan dosis 300 mg/KgBB secara per oral, kelompok perlakuan 2 dengan dosis 600 mg/KgBB, dan kelompok perlakuan 3 dengan dosis 900 mg/KgBB. Penurunan kadar relatif IL-5 pada setiap perlakuannya disebabkan karena efek kefir sebagai probiotik yang dapat menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan (Sawitri, 2011). Kandungan kefir berupa bioaktif peptida, bakteri asam laktat dan khamir juga memiliki efek baik bagi tubuh, seperti antitumor, antifungal, antibakteri, immunomodulasi atau proteksi epitel, antiinflamasi, dan aktivitas antioksidan (Prado *et al.*, 2015).

5.2 Pengaruh Pemberian Preventif Kefir pada Mencit Induksi Ovalbumin terhadap Kadar Relatif Gr-1

Kadar relatif Gr-1 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) antar kelompok perlakuan (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Rata-rata Kadar Relatif Gr-1

Perlakuan	Rata-rata Kadar Relatif Gr-1 \pm SD	Peningkatan	Penurunan
		terhadap Kontrol (-)	terhadap Kontrol (+)
Kontrol (+)	7,92 \pm 0,68 ^c	51,51%	
Kontrol (-)	3,84 \pm 0,51 ^a		
Perlakuan 1	6,05 \pm 0,58 ^b		23,61%
Perlakuan 2	5,28 \pm 0,52 ^b		33,33%
Perlakuan 3	4,03 \pm 0,63 ^a		49,11%

Keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Efek preventif kefir terhadap kadar relatif Gr-1 pada kelompok perlakuan kontrol negatif dan pemberian berupa *placebo* NaCl Fisiologis per oral (0,5 ml/ekor) pada hari ke 1-14 menunjukkan rata-rata kadar relatif Gr-1 sebesar 3,84%, nilai rata-rata produksi Gr-1 pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan kadar relatif Gr-1. Kadar relatif Gr-1 kelompok perlakuan kontrol positif dengan pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, selanjutnya diinduksi kembali ovalbumin secara per oral dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril pada hari ke-29 dan tanpa pemberian preventif kefir, menunjukkan rata-rata kadar relatif Gr-1 sebesar 7,92%, dimana terjadi peningkatan sebesar 51,51% terhadap kontrol negatif. Kelompok kontrol positif menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif. Kelompok kontrol positif memiliki kadar relatif Gr-1 paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok lainnya (**Tabel 5.1**), hal ini dikarenakan kelompok perlakuan kontrol positif tidak diberikan preventif kefir sebagai terapi.

Kadar relatif Gr-1 kelompok perlakuan 1 dengan pemberian berupa preventif kefir selama 14 hari pertama dosis 300 mg/kgBB dan kelompok perlakuan 2 yang diberikan preventif kefir dengan dosis 600 mg/kgBB serta pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, yang kemudian diinduksi kembali ovalbumin dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril secara per oral pada hari ke-29, menunjukkan adanya penurunan

kadar relatif Gr-1 sebesar 23,61% dan 33,33% dibandingkan kelompok kontrol positif seiring dengan peningkatan dosis. Kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan rata-rata kadar relatif Gr-1 sebesar 6,05% dan 5,28%, berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif, namun kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (**Tabel 5.1**).

Kadar relatif Gr-1 kelompok perlakuan 3 dengan pemberian berupa preventif kefir selama 14 hari pertama dosis 900 mg/kgBB dan pemberian ovalbumin dosis 20 µg OVA/ekor serta *adjuvant* Al(OH)₃ 1000 µg dalam 0,5 ml *aquades* steril secara IP pada hari ke-8 dan ke-15, yang kemudian diinduksi kembali ovalbumin dosis 60 mg/ekor dan 10 mg/ekor Al(OH)₃ dalam 1 ml *aquades* steril secara per oral pada hari ke-29, menunjukkan adanya penurunan kadar relatif Gr-1 sebesar 49,11% dibandingkan kelompok kontrol positif seiring dengan peningkatan dosis. Kelompok perlakuan 3 menunjukkan rata-rata kadar relatif Gr-1 sebesar 4,03%, berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol negatif (**Tabel 5.1**).

Granulocyte Receptor-1 (Gr-1) merupakan diferensiasi myeloid atau *glycosylphosphatidylinositol* (GPI)-linked protein yang diekspresikan pada granulosit dan makrofag. Gr-1 digunakan sebagai *marker* atau penanda oleh makrofag pada saat terjadinya inflamasi. Gr-1 juga dapat menginduksi inflamasi eosinofil dengan meningkatkan infiltrasi eosinofil dan sekresi Th2 seperti IL-5 dan IL-13 (Daley *et al.*, 2008). Gr-1 atau yang biasa dikenal sebagai Ly-6G

diekspresikan pada permukaan berbagai sel-sel yang termasuk makrofag, neutrofil, sel dendritik, sel NK, dan beberapa sel T. Selain itu Gr-1 dapat memodulasi terjadinya proliferasi sel T alergen spesifik untuk berinteraksi dengan matriks ekstraselular dalam memulai respon imun inflamasi (Bronte *et al.*, 2000).

Pada kelompok perlakuan kontrol negatif menunjukkan kadar rata-rata Gr-1 terendah dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, hal ini dikarenakan pada kelompok perlakuan kontrol negatif tidak diberikan alergen berupa ovalbumin dan Al(OH)₃ sebagai *adjuvant* serta tanpa pemberian preventif kefir, atau dapat dikatakan kelompok perlakuan kontrol negatif sebagai kontrol normal. Sedangkan pada kelompok perlakuan positif, menunjukkan kadar rata-rata Gr-1 tertinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar 51,51%. Hal ini dikarenakan pengaruh pemberian ovalbumin dan *adjuvant* Al(OH)₃ sebagai alergen, dimana ovalbumin dapat meningkatkan aktivitas Th2 dominan dalam mekanisme ketidakseimbangan Th1-Th2. Kondisi Th2 dominan dapat meningkatkan produksi IgE spesifik dan degranulasi sel mast, sehingga dilepaskan berbagai mediator inflamasi sebagai reaksi alergi (Nials dan Uddin, 2008).

Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 menunjukkan penurunan rata-rata kadar relatif Gr-1 dibandingkan perlakuan kontrol positif. Hal ini dikarenakan pada tiap perlakuan diberikan kefir dengan dosis berbeda pada setiap perlakuannya sebagai preventif selama 14 hari pertama. Kelompok perlakuan 3 menunjukkan penurunan yang sangat signifikan atau mendekati kelompok perlakuan negatif atau kelompok normal. Suplementasi kefir memiliki pengaruh terhadap aktivasi imun seluler (Th1) untuk memproduksi sitokin sehingga

mengaktifkan sel *phagosit* yang berperan dalam menghambat kinerja patogen dalam saluran pencernaan serta mengaktifasi makrofag dalam memproduksi sitokin TNF- α , IL-6, IL-12, dan IL-18 dalam merangsang terjadinya respon imun (Ray dan Bhunia, 2008). Bakteri asam laktat dari kefir juga memiliki manfaat yang menguntungkan karena dapat merespon diare, *food allergies*, dan *inflammatory bowel disease* (Yamane *et al.*, 2018). Kefir juga mengandung zat spesifik yang dapat menghambat proses inflamasi akibat alergi, yaitu bioaktif peptida yang mampu mengaktifasi makrofag, meningkatkan fagositosis, menekan respon imun Th2, dan menstimulasi sekresi IgG dan IgA oleh limfosit B dalam lumen usus (Rosa *et al.*, 2017). Contoh bioaktif peptida dalam kefir adalah laktoferin yang memiliki sifat antiinflamasi dan terlibat dalam proses fagositosis serta respon imun (Ferrer *et al.*, 2000).

Respon imun yang meningkat akibat paparan antigen yang berhubungan dengan peningkatan produksi IgE diketahui dipicu oleh antigen yang spesifik terhadap sel Th2. Sintesa IgE membutuhkan sitokin yang disekresi oleh sel T CD4⁺. Sel ini dapat dibagi menjadi dua subset, yaitu sel Th1 dan sel Th2 berdasarkan fungsi dan sitokin yang diproduksi. Sel Th1 menghasilkan sitokin IL-2, IFN- γ , dan TNF- β yang berfungsi pada perkembangan respon imun seluler. Sedangkan sel Th2 mensekresi sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 yang berfungsi pada perkembangan respon imun humoral termasuk didalamnya respon alergi yang berhubungan dengan IgE (Robinson, 2000).

Alergen yang mampu menginduksi diferensiasi sel T *helper naive* (Th0) menjadi sel Th2 dipengaruhi oleh banyak faktor. Sel Th0 yang teraktivasi akan

memproduksi IL-4 yang akan mempengaruhi diferensiasi sel Th0 ke arah sel Th2. Selain IL-4, sintesa IgE juga membutuhkan adanya ikatan antara alergen dan sel B melalui *membrane-bound immunoglobulin receptor*. Sel B kemudian memproses alergen dan mempresentasikan alergen yang telah diproses berupa fragmen peptida yang berasosiasi dengan molekul MHC-II ke sel Th2. Komplek peptida – MHC-II ini akan dikenali oleh reseptor sel T pada sel Th2. Apabila teraktifasi sel T akan memberikan sinyal kepada sel B untuk memproduksi IgE. Pertama Th2 teraktifasi akan mensekresi sitokin yang berperan untuk *IgE-switching* yaitu IL-4 dan IL-13, kemudian dibutuhkan adanya kontak antara sel B dan sel T agar IgE dapat diproduksi (Ngestiningsih *et al.*, 2001).

Reaksi alergi terpacu pada saat alergen berikatan dengan IgE yang terikat di sel mast. Sel mast akan berada di permukaan tubuh dan berfungsi untuk memberikan tanda terhadap sistem imun adanya suatu infeksi lokal. Eosinofil yang berinteraksi dengan sel mast akan menyebabkan granulasi sel mast, dimana granulasi sel mast dan aktivasi Th2 menyebabkan eosinofil terakumulasi dalam jumlah besar dan siap untuk diaktifkan. Kehadiran eosinofil menandakan terjadinya inflamasi alergi kronik dan menyebabkan kerusakan jaringan (Trivedi dan Lloyd, 2007).

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pemberian kefir sebagai preventif dapat menurunkan kadar relatif IL-5 pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin.
2. Pemberian kefir sebagai preventif dapat menurunkan kadar relatif Gr-1 pada mencit BALB/c yang diinduksi ovalbumin.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dosis dan lamanya paparan ovalbumin dalam menyebabkan alergi pada mencit BALB/c.

DAFTAR PUSTAKA

- [CCRC] Cancer Chemoprevention Research Center, 2014. *Preparasi Sampel Untuk Siklus Sel dengan Metode Flowcytometry*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- [ME] Med Express. 2013. *Bebas Alergi*. Datusanantyo A, Robertus, penerjemah. Yogyakarta (ID): Penerbit Kanisius. Terjemahan dari: *Overcoming Allergies*.
- Abbas Ak, Lichtmann Ah, Pillai, S. Cytokines. 2015. In: *Cellular and Molecular Immunology*. 8th Ed. Elsevier Inc. 493-5.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. 2016. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Taylor and Francis Group.
- Akbar Budhi, 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta : Adabia Press.
- Aristya, A.L., Legowo, A.M., Al-Baarri A.N. 2013. Total Asam, Total Yeast, dan Profil Protein Kefir Susu Kambing dengan Penambahan Jenis dan Konsentrasi Gula yang Berbeda. *Jurnal Pangan dan Gizi* Vol. 04 No. 07.
- Atika, S.D.N., Andriani, D., Parisihni, K. 2015. Pengaruh Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermannii*) Terhadap Kadar IgE Mencit Balb/c. *Journal of the Indonesian Dental Association*, Vol. 64, No. 3.
- Bonnet, B., Vigneron, J., Levacher, B., Vazquez, T., Pitoiset, F., Brimaud, F., Churlaud, G., Klatzmann, D., Bellier, B. 2016. Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell-Mediated Control of Experimental Fppd Allergy. *The Journal of Immunology*, 197 : 188-198.
- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N.P, Zanovello, P. 2000. Identification of a CD11b⁺/Gr-1/CD31⁺ Myeloid Prognitor Capable of Activating or Suppressing CD8⁺ T Cells. *The American Society of Hematology*, Vol. 96, No. 12.
- Cahiadewi, A.M., Santosa, Y.I., Suprihati. 2016. Pengaruh Suplementasi Zink Terhadap Jumlah Eosinofil pada Jaringan Paru Penderita Alergi Sru di Eksperimental pada Mencit BALB/c dengan Sensitisasi Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, Vol. 5, No. 4.
- Candra, Y., Setiarini, A., Rengganis, I. 2011. Gambaran Sensitivitas terhadap Alergen Makanan. *MAKARA, KESEHATAN*, Vol. 15, No. 1, 44-50.



- Carasi, P., Recado, S.M., Jacquot, C., Romanin, D.E. 2014. Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefiri* on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Castellazzi, A., Valsecchi, C., Ciammi, S., Licari, A., Marseglia, A., Leoni, Mc., Caimmi, D., Del, G.M., Leonardi, S., La, R.M., Marseglia, G. 2013. Probiotics and Food Allergy. *Ital J Pediatr*. 2013 ; 39 : 47.
- Chalid, S.Y. dan Hartiningsih, F. 2013. Potensi Dadih Susu Kerbau Fermentasi Sebagai Antioksidan dan Antibakteri. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Chowdary, V.S., Vinaykumar, E.C., Rao, J.J., Rao, R., Babu, K.R., Rangamani. 2003. A Study on Serum IgE and Eosinophils in Respiratory Allergy Patients. *Indian J Allergy Asthma Immunol*; 17(1) : 21-24.
- Conneely, Orla M. 2012. Anti-inflammatory Activities of Lactoferin. *Author Affiliations*.
- Conrad, M.L. dan Yildirim, O.A. 2009. Comparison of Adjuvant and Adjuvant-free Murine Experimental Asthma Models. *Clin Exp Allergy*. 39 (8) : 1246-54.
- Cookson, W. 2004. The Immunogenetics of Asthma and Eczema: A New Focus on the Epithelium. *Nature Reviews Immunology* Vol. 4 No. 12 : 978-988.
- Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., Albina, J.E. 2008. Use of Ly6G-specific Monoclonal Antibody to Deplete Neutrophils in Mice. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 83.
- Febrisiantosa, A., Purwanto, B.P., Arief, I.I., Widyastuti, Y. 2013. Karakteristik Fisik, Kimia, Mikrobiologi *Whey Kefir* dan Aktivitasnya terhadap Penghambatan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). *J. Teknol. Dan Industri Pangan*. Vol. 24 No. 2.
- Ferrer, P.A.R., Baroni, A., Sambucetti, M.E., Lopez, N.E., Cernadas, J.M.C. 2000. Lactoferrin Levels in Term and Preterm Milk. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 19, No. 3, 370-373.
- Greenfeder, S., Umland, S.P., Cuss, F.M., Chapman, R.W., Egan, R.W. 2001. Th2 Cytokines and Asthma : The Role of Interleukin-5 in Allergic Eosinophilic Disease. *Respiratory Research*, Vol. 2 No. 2.
- Hefni, M., Rifa'i, M., Widodo. 2013. Aktivitas Ekstrak Daun Kelor Terhadap Respon Imun Humoral pada Mencit yang Diinfeksi *Salmonella typhi*. *Jurnal Veteriner* 14 (4) : 519-526.

- Hidayat, N., Padaga, M.C., Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Hikmah, N. dan Dewanti, I.D.A.R. 2010. Seputar Reaksi Hipersensitivitas (Alergi). *Stomatognatic (J.K.G Unej)* Vol. 7 No. 2 : 108-12.
- Huntington, J.A. dan Stein, P.E. 2001. Structure and Properties of Ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. Vol 756, No. 189-198.
- Julianto, B., Rossi, E., Yusmarini. 2016. Karakteristik Kimiawi dan Mikrobiologi Kefir Susu Sapi dengan Penambahan Susu Kedelai. *Jom Faperta* Vol. 3 No. 1.
- Kawakami, T. dan Kitaura, J. 2005. Mast Cell Survival and Activation By IgE In the Absence of Antigen: A Consideration of the Biologic Mechanisms and Relevance. *The Journal of Immunology*; 175:4167-4173.
- Kips, J.C. 2001. Cytokines in Asthma. *European Respiratory Journal*, Suppl. 34, 24s-33s.
- Kuby, J. 2007. *Immunology*. Edisi ke-5. New York : WH Freeman.
- Leonard, W.J. 2003. Type I Cytokines and Interferons and Their Receptor. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Fifth edition. Philadelphia. Lippincott William and Wilkins; p.701-35.
- Liu, E. dan Fan, J. 2018. *Fundamentals of Laboratory Animal Science*. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Mahdiana, I., Purwadi, Jaya, F. 2015. Pengaruh Kombinasi Penambahan Sari Wortel (*Daucus carota, L*) dan Tepung *Hunkwe* pada Es Krim Kefir Terhadap Kualitas Fisik dan Kimia Es Krim Kefir. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*, Vol. 10, No. 1. Hal 1-8.
- Martins, A.J., Spanton, S., Sheikh, H.I., Kim, S.O. 2011. The Anti-inflammatory Role of Granulocyte Colony-stimulating Factor in Macrophage-dendritic Cell Crosstalk After *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Exposure. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 89.
- McPherson, R. dan Pincus, M. 2017. *Henry's Clinical Diagnosis and Management By Laboratory Methods*. 23rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Montgomery, D. dan Kowalsky, S. 2011. Design and Analysis of Experiment. *John Willey an Sainc Inc*. 978-470.

- Ngestiningsih, D., Diana, N., Innawati, J. 2003. *Pengaruh Pemberian Epigallocatechin gallate (EGCG) Teh Hijau terhadap Kadar Eosinofil pada Mencit yang Disensitisasi dengan Ovalbumin*. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Nials, A.T. dan Uddin, S. 2008. Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Allergen Challenge. *Dis Model Mech.* 1 94-5) : 213-34.
- Ningrum, T.S., Suprihati, Santosa, Y.I. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap Jumlah Eosinofil di Jaringan Paru pada Penyakit Alergi : Studi Eksperimental pada Mencit BALB/c yang Diinduksi Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, Vol. 5, No. 4.
- Percopo, C.M., Brenner, T.A., Ma, M., Kraemer, L.S., Hakeem, R.M.A., Lee, J.J., Rosenberg, H.F. 2016. SiglecF⁺Gr1^{hi} Eosinophils are a Distinct Subpopulation Within the Lungs of Allergen-challenged Mice. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 100.
- Platts-Mills, Tae. 2001. The Role of Immunoglobulin E In Allergy and Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Vol. 164, No. 8.
- Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. 2015. Milk Kefir : Composition, Microbial Cultures, Biological Activities, and Related Products. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6.
- Ray, B. dan Bhunia, A. 2008. *Fundamental Food Microbiology, 4th Edition*. CRC Press, New York.
- Robinson, D.S. 2000. Th2 Cytokines in Allergic Disease. *British Medical Bulletin* Vol. 56, No. 4.
- Rodrigues, K.L., Carvalho, J.C.T., Schneedorf, J.M. 2005. Anti-inflammatory Properties of Kefir And Its Polysaccharide Extract. *Inflammopharmacology*, Vol. 13, No. 5-6, pp. 485-492.
- Rosa, D.D., Dias, M.M.S., Grzeskowiak, L.M., Reis, S.A., Conceicao, Peluzio, G.G. 2017. Milk Kefir: Nutritional, Microbiological and Health Benefits. *Nutrition Research Reviews*, page 1-15.
- Santoro, D. dan Marsella, R. 2014. *Animal Models of Allergic Disease. Vet. Sci.* 2014, 1, 192-212.
- Sawitri, M.E. 2011. Kajian Penggunaan Ekstrak Susu Kedelai Terhadap Kualitas Kefir Susu Kambing. *J. Ternak Tropika* Vol. 12, No. 1:15-21.

- Sicherer, S.H. dan Wood, R.A. 2012. Allergic Testing in Childhood: Using Allergen Specific-IgE Test. *Pediatric* 2012, 129 (1) : 193-7.
- Sudono, A. dan Usmiati, S. 2004. Pengaruh Starter Kombinasi Bakteri dan Khamir Terhadap Sifat Fisikokimia dan Sensori Kefir. *Jurnal Pascapanen*, Vol. 1, No. 1.
- Tolistiawaty, I., Widjaja, J., Sumolang, P.P.F., Octaviani. 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*, Vol. 8 No. 1, 27-32.
- Tollefsen, E., Langhammer, A., Bjermer, L., Romundstud, P., Holmen, T.L. 2008. *Allergy : a Systemic Disease? The HUNT and Young-HUNT Study, Norway. Pediatr Allergy Immunol* 19 : 730-736.
- Trivedi, S.G. dan Lloyd, C.M. 2007. Biomedicine & Disease: Review Eosinophils in the Pathogenesis of Allergic Airways Disease. *Europe PMC Funders Group* 64(10) : 1269-1289.
- Watanabe, N. 2007. Long-term Depletion of Naive T Cells In Patients Treated For Hodgkin's Disease. *Journal of Immunology*. 56(3) 34-36.
- Widodo, W. 2002. *Bioteknologi Fermentasi Susu*. Pusat Pengembangan Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Jawa Timur.
- Winter, W.E., Hardt, N.S., Fuhrman, S. 2000. Immunoglobulin E : Importance in Parasitic Infections and Hypersensitivity Responses. *J. Archieve of Pathology and Laboratory Medicine* 124 : 1382-1385.
- Yamane, T., Sakamoto, T., Nakagaki, T., Nakano, Y. 2018. Lactic Acid Bacteria From Kefir Increase Cytotoxicity of Natural Killer Cells to Tumor Cells. *Foods* 2018, 7, 48; doi: 10.3390.