

**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*)
BALB-c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP
KADAR RELATIF IFN- γ DAN CD68**

SKRIPSI

Oleh:

FAKHIRA RAHMADIANI

155130100111034



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

repository.ub.ac.id

**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*)
BALB-c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP
KADAR RELATIF IFN- γ DAN CD68**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
FAKHIRA RAHMADIANI
155130100111034



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

LEMBAR PENGESAHAN

EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB-c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF IFN- γ DAN CD68

Oleh :

FAKHIRA RAHMADIANI

NIM. 155130100111034

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 22 April 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, Ph.D

NIP. 19810504 200501 1 001

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes.

NIP. 19820127 201504 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 : Fakhira Rahmadiani

NIM : 155130100111034

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

**Efek Preventif Kefir pada Mencit (*Mus musculus*) Balb-C yang
Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif IFN- γ dan CD68**

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 termaktub 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, 1 April 2019

Yang menyatakan,

(Fakhira Rahmadiani)

NIM. 155130100111034

**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB-c
YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP
KADAR RELATIF IFN- γ DAN CD68**

ABSTRAK

Reaksi alergi merupakan kemampuan sistem imun untuk menghasilkan antibodi IgE dalam kadar tinggi terhadap alergen. Alergen yang digunakan yaitu OVA. Kefir merupakan produk susu fermentasi yang terbuat dari susu dengan menambahkan bibit kefir. Bibit kefir mengandung BAL, laktoferin dan khamir yang bermanfaat dalam bidang kesehatan yakni sebagai probiotik, dengan meningkatkan sitokin proinflamasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek preventif pemberian kefir pada mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IFN- γ dan CD68. Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan RAL yang terdiri dari kontrol positif tanpa diberikan preventif kefir dan diinduksi OVA pada hari ke 8, 15 dan 29, kontrol negatif diberi *placebo* NaCl fisiologis selama 14 hari, serta 3 kelompok perlakuan yang masing-masing diberikan preventif kefir per oral dengan dosis 300mg/kgBB, 600mg/kgBB, dan 900mg/kgBB dan diberikan OVA dengan dosis 20 μ g OVA/ekor secara IP pada hari ke-8 dan 15 dan induksi kembali OVA pada hari ke-29 secara P.O (60mg/ekor). Pengukuran kadar relatif IFN- γ dan CD68 menggunakan metode *flowcytometry* dan data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan uji Tukey dengan $\alpha = 0.05$. Hasil penelitian ini didapatkan tidak terdapat perbedaan signifikan, tetapi secara rata-rata terjadi penurunan kadar relatif. Dapat disimpulkan bahwa kefir dapat menurunkan reaksi inflamasi pada mencit yang diinduksi ovalbumin.

Kata Kunci : Alergi, Kefir, OVA, IFN- γ , CD68

**PREVENTIVE EFFECT of KEFIR IN MICE (*Mus musculus*) BALB-C
OVALBUMIN INDUCED ON RELATIVE LEVELS
OF IFN- γ AND CD68**

ABSTRACT

Allergic reactions are the ability of the immune system to produce high levels of IgE antibodies to allergens. The allergens used are OVA. Kefir is a fermented milk product made from milk by adding kefir seeds. Kefir seeds contain BAL, lactoferrin and yeast which are useful in the health field as probiotics, by increasing proinflammatory cytokines. The purpose of this study was to determine the preventive effect of giving kefir to Balb-c mice induced by ovalbumin can cause a decrease in the relative levels of IFN- γ and CD68. This study was an experimental laboratory using RAL consisting of positive controls without being given preventive kefir and OVA induced on days 8, 15 and 29, negative controls were given placebo physiological NaCl for 14 days, and 3 treatment groups each given preventive kefir orally with a dose of 300mg / kgBB, 600mg / kgBB, and 900mg / kgBB and given an OVA of 20 μ g OVA / mice IP on 8th and 15th day and re-induction of OVA on 29th day PO (60mg / mice) Measuring the relative levels of IFN- γ and CD68 using the *flowcytometry* method and data were analyzed using the One Way ANOVA test with a 95% confidence level followed by the Tukey test with $\alpha = 0.05$. the results of this study found that there were no significant differences, but on average there was a decrease in relative levels. It can be concluded that kefir can reduce the inflammatory reaction in mice induced by ovalbumin.

Key Words : Allergy, Kefir, OVA, IFN- γ , CD68

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Preventif Kefir pada Mencit (*Mus musculus*) Balb-C yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif IFN- γ dan CD68” . Penelitian ini merupakan topik penelitian yang diketuai oleh dosen drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes.

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. Edwin Widodo, S.Si, M.Sc, Ph.D selaku dosen pembimbing I yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
3. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku dosen pembimbing II yang telah menyisihkan waktu untuk membimbing penulis.
4. drh. Indah Amalia Amri, M.Si dan drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen penguji atas ilmu, dukungan serta saran dan masukan yang sangat membangun.
5. drh. Fidi Nur Aini EPD, M.Si selaku dosen pembimbing akademik atas bimbingannya dalam bidang akademik selama menjalani perkuliahan.
6. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan dan doa untuk menyelesaikan proposal penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
7. Dosen dan staff kependidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
8. Teman-teman seperjuangan skripsi Indra Darpa, Olfivesen Purba, Yurisa Noviaji, dan Ayu Mahanisa Sanjoyo yang selalu menemani disaat kritis.
9. Winona, Talitha, Patricia, Melita, Vava dan Kiki yang selama ini telah banyak bekerjasama dengan penulis dalam berbagai kondisi.
10. Keluarga besar *Classy Class*, tim MikroImun, teman-teman kos Watugong 44 dan Dom-Dom atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.

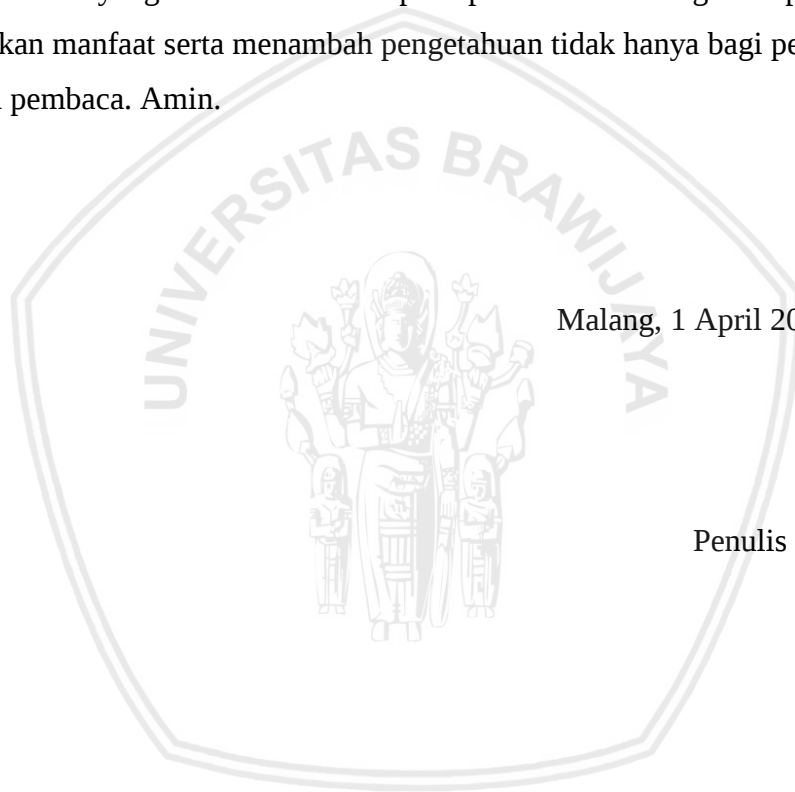
11. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan laporan ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

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, 1 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 ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
 BAB 1. PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1 Alergi	6
2.1.1 Definisi Alergi	6
2.1.2 Alergi Makanan	7
2.1.3 Patomekanisme Reaksi Alergi	9
2.1.4 Gejala Klinis Alergi	11
2.1.5 Diagnosa Alergi	11
2.3 Kefir	12
2.2 Ovalbumin	15
2.4 IFN- γ	16
2.5 Makrofag	18
2.6 CD68	20
2.7 Flowcytometry	22
2.8 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	23
 BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	 25
3.1 Kerangka Konseptual	25
3.2 Hipotesa Penelitian	28

BAB 4. METODE PENELITIAN	29
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.2 Alat dan Bahan	29
4.3 Tahapan Penelitian	30
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	30
4.3.2 Rancangan Penelitian	30
4.4 Variabel Penelitian	32
4.5 Tahapan Penelitian	32
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	32
4.5.2 Pemberian Kefir Sebagai Preventif	32
4.5.3 Pembuatan Hewan Model Alergi Intestinal Menggunakan Ovalbumin	33
4.5.4 Pemeriksaan Kadar IFN- γ dan CD68 dengan Metode <i>Flowcytometry</i>	33
4.6 Teknik Pengumpulan Data	34
4.7 Analisa Data	34
 BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	 35
5.1 Efek Preventif Kefir Susu Kambing Pada Mencit Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif IFN- γ	36
5.2 Efek Preventif Kefir Susu Kambing Pada Mencit Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif CD68	40
 BAB 6. PENUTUP	 45
6.1 Kesimpulan	45
6.2 Saran	45
 DAFTAR PUSTAKA	 46
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian.....	31
Tabel 5.1 Rata-rata Kadar Relatif IFN- γ	36
Tabel 5.2 Rata-rata Kadar Relatif CD68.....	40



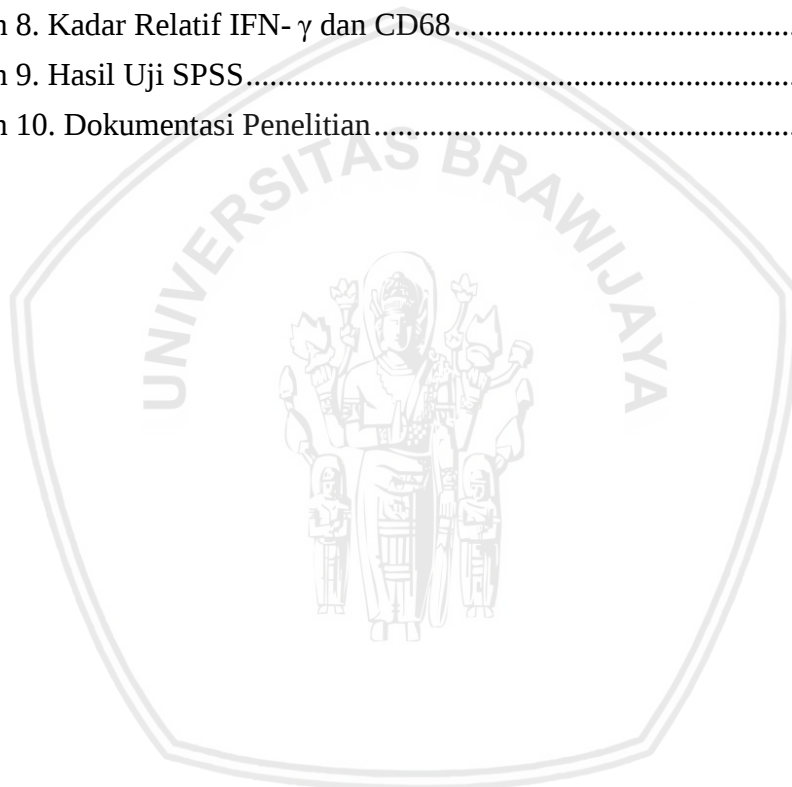
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	23
Gambar 5.1 Histogram Rata-rata dan SD Kadar Relatif IFN- γ	37
Gambar 5.2 Histogram Rata-rata dan SD Kadar Relatif CD68	42



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Laik Etik	53
Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian	54
Lampiran 3. Perhitungan Dosis.....	55
Lampiran 4 Hasil Uji Proximat Kefir.	58
Lampiran 5 Identifikasi BAL pada media MRSA.	59
Lampiran 6 Langkah Kerja Penelitian.	60
Lampiran 7. Hasil <i>flowcytometry</i>	63
Lampiran 8. Kadar Relatif IFN- γ dan CD68.....	66
Lampiran 9. Hasil Uji SPSS.....	67
Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian.....	72



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/ Singkatan	Keterangan
AL(OH) ₃	: Alumunium Hidroksida
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
MHC	: <i>Major Histocompability</i>
Th	: T helper
CAST	: <i>Cellular Antigen Stimulation Test</i>
CD68	: <i>Cluster Differentiation 68</i>
DC	: Sel dendritic
IFN- γ	: <i>Interferon-γ</i>
IgA	: Immunoglobulin A
IgE	: Immunoglobulin E
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL	: Interleukin
LPS	: Lipopolisakarida
MALT	: <i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
NK	: Natural Killer
OVA	: Ovalbumin
PRRs	: <i>specialized pattern recognition receptors</i>
SPT	: <i>Skin Prick Test</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor – α</i>
TLR	: <i>Toll-like receptors</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alergi merupakan bagian dari reaksi hipersensitivitas, yaitu respon imun yang berlebihan terhadap suatu antigen atau alergen, dikenal dengan istilah hipersensitivitas tipe I. Reaksi hipersensitivitas tipe I juga disebut sebagai hipersensitivitas cepat (*immediate hypersensitivity*) karena reaksi yang terjadi secara cepat dalam beberapa menit setelah paparan antigen, setelah itu diikuti respon lambat (*late-phase reaction*) yang terjadi selang beberapa jam, yaitu reaksi inflamasi yang disebabkan oleh adanya infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, eosinofil, dan makrofag. Alergi berhubungan dengan atopi, yaitu suatu kecenderungan genetik untuk memproduksi antibodi IgE yang tinggi sebagai respon terhadap paparan alergen, dan akan bermanifestasi klinis (Ningrum dkk, 2016).

Reaksi alergi dapat terjadi di hewan, salah satunya adalah alergi yang disebabkan oleh makanan. Kasus alergi makanan pada hewan yang paling sering terjadi yaitu alergi makanan pada kucing dan anjing. Beberapa komponen penyebab terjadinya alergi pada hewan yaitu seperti susu dan produk susu sekitar 23% dari kasus kejadian, daging sapi 8-60%, telur: 3-20%, gandum 24%, kedelai 32%, ayam 28%, jagung 25% serta asam benzoat. Alergi pada anjing dan kucing pada umumnya diawali dengan adanya ruam kemerahan di badan terutama pada bagian moncong dan biasanya pada kasus alergi makanan disertai juga dengan masalah pada pencernaan seperti nyeri pada abdomen, muntah, bahkan diare (Willemse, 2015).

Salah satu alergen yang dapat menstimulasi alergi adalah ovalbumin. Ovalbumin merupakan bagian dari protein yang ada di dalam putih telur yang mempunyai tingkat alergenitas hingga 100% tergantung pada sistem kekebalan tiap individu (Flaherty, 2012). Ovalbumin berpotensi menimbulkan reaksi alergi karena mengandung senyawa protein dengan berat molekul cukup besar serta mampu menginduksi pembentukan antibodi pada tubuh mencit (Aldi dkk, 2013). Penelitian pada mencit yang mendapatkan paparan kronik ovalbumin menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi reseptor Interleukin-4 (IL-4) yang merupakan sitokin penting dalam proses alergi. Selain itu juga terjadi peningkatan infiltrasi eosinofil pada jaringan peribronkiolus pada kelompok mencit yang terpapar ovalbumin (Barlianto dkk, 2009).

Alergi makanan yang diperantarai IgE adalah alergi sel T helper tipe 2 (Th2). Alergi dapat dibagi menjadi 2 tahap utama, yaitu, fase sensitisasi dan fase efektor. Pada umumnya, alergen merupakan protein yang diambil oleh antigen (Ag), setelah antigen masuk ke dalam saluran pencernaan, Ag akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang kemudian akan disajikan kepada sel T helper (Th) melalui *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II sebagai peptida bersifat imunogenik. Hal tersebut menyebabkan terjadinya diferensiasi sel Th naif menjadi sel efektor Th1 dan Th2 pada individu (Zubir & Sitorus, 2016).

Sel Th1 mengsekresi Interferon gamma (IFN- γ) dan Tumor Necrosis Factor-beta (TNF- β) yang berperan dalam eliminasi patogen. IFN- γ menginisiasi terbentuknya makrofag yang ditandai oleh adanya marker *Cluster of Differentiation* 68 (CD68). Sel Th2 memproduksi beberapa sitokin seperti IL-4, IL-5, IL-13 dan IL-25. Sitokin IL-4 dan IL-13 sangat penting untuk sintesis

Imunoglobulin E (IgE), Kemudian terjadi pengikatan IL-4 dan IL-13 pada reseptor masing-masing sehingga menyebabkan aktivasi faktor transkripsi. Hal ini menyebabkan sel B memproduksi antibodi IgE (Zubir& Sitorus, 2016). IgE kemudian akan berikatan dengan sel mast sehingga terjadi proses inflamasi sehingga menyebabkan reaksi alergi. Manifestasi klinis utama dari alergi makanan yang diperantarai oleh IgE biasanya terjadi dalam waktu 2 jam setelah konsumsi dan melibatkan gejala akut yang mempengaruhi kulit, saluran napas, dan saluran pencernaan dan sering menyebabkan anafilaksis parah (Zubir & Sitorus, 2016).

Kefir adalah susu fermentasi yang dihasilkan dari grain kefir. Komposisi gizi kefir bervariasi sesuai dengan komposisi susu, komposisi mikrobiologis dari grain kefir yang digunakan, waktu dan suhu fermentasi serta kondisi penyimpanan (Rosa dkk, 2017). Pada umumnya kefir terbuat dari susu kambing. Susu kambing mengandung lemak lebih tinggi yaitu 4,2% dibandingkan susu sapi, sedangkan persentase karbohidrat dan air lebih rendah (Minard, 2000). Kefir termasuk salah satu probiotik yang mengandung bakteri asam laktat (BAL) dan *yeast* menguntungkan dalam usus. BAL dalam kefir bermanfaat di bidang kesehatan yakni sebagai probiotik penghasil senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida dan berbagai antibiotik yang menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan, meningkatkan fungsi pencernaan serta penyerapan nutrisi makanan. Probiotik juga membangkitkan respons imun mukosa S-IgA. Secara sistemik membangkitkan peranan T regulator yang akan menghambat aktifitas Th2 yang berlebihan, maupun aktifitas Th1 yang berlebihan. Probiotik juga mengaktifkan respons imun non spesifik (*innate*) dan spesifik (*adapted*) (Yuniastuti, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang dapat diuraikan adalah :

1. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IFN- γ ?
2. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif CD68?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 25-30 g berumur 8-12 minggu. Perlakuan terhadap hewan coba telah memperoleh persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian No. – 959 KEP Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan hewan model *food allergy* didapatkan dengan pemberian ovalbumin secara intraperitoneal pada hari ke 8 dan 15 dengan dosis 20 μ l dan per oral pada hari ke 29 dengan dosis 60 mg.
3. Kefir dibuat dari bahan baku susu kambing yang dicampur bakteri asam laktat dan yeast yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.
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 300mg/KgBB, 600mg/KgBB, dan 900mg/KgBB.

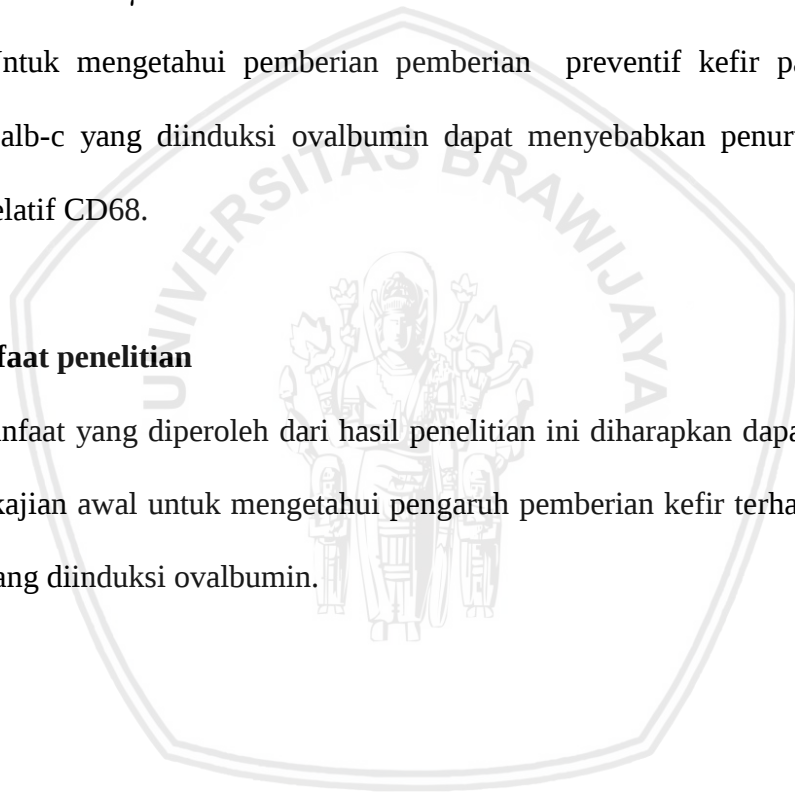
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar relatif IFN- γ dan CD68 yang dihitung menggunakan metode flowcytometry.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pemberian pemberian preventif kefir pada mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IFN- γ .
2. Untuk mengetahui pemberian pemberian preventif kefir pada mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif CD68.

1.5 Manfaat penelitian

Manfaat yang diperoleh dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai kajian awal untuk mengetahui pengaruh pemberian kefir terhadap mencit Balb-c yang diinduksi ovalbumin.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alergi

2.1.1 Definisi Alergi

Hipersensitivitas merupakan peningkatan sensitivitas terhadap antigen yang pernah terpapar sebelumnya (Baratawidjaja & Rengganis, 2010). Hipersensitivitas tipe 1 atau dikenal juga dengan istilah reaksi alergi adalah reaksi berlebihan sistem imun terhadap suatu zat yang melibatkan aktivitas Immunoglobulin E (IgE). Reaksi alergi juga melibatkan antibodi, limfosit dan sel-sel lainnya yang berfungsi sebagai pelindung yang normal pada sistem kekebalan (Hikmah, 2010). Respon imun ini menyebabkan kerusakan di jaringan yang manifestasinya sesuai dengan target organ yang terpapar (Abbas & Lichtman, 2009).

Reaksi alergi dibedakan menjadi empat kelas (tipe I – IV) berdasarkan mekanisme yang ikut serta dan lama waktu reaksi hipersensitif. Hipersensitivitas tipe I sebagai reaksi cepat atau anafilaksis sering berhubungan dengan alergi. Hipersensitivitas tipe I diinisiasi oleh IgE yang dikeluarkan dari sel mast dan basofil. Gejala dapat bervariasi dari ketidaknyamanan sampai kematian. Hipersensitivitas tipe II muncul ketika antibodi terikat pada antigen sel pasien, untuk proses fagositosis. Hal ini juga disebut hipersensitivitas sitotoksik, dan diinisiasi oleh antibodi IgG dan IgM. Pada reaksi hipersensitivitas tipe III, kompleks imun (kesatuan antigen, protein komplemen dan antibodi IgG dan IgM) ditemukan pada berbagai jaringan. Hipersensitivitas tipe IV (juga diketahui

sebagai hipersensitivitas selular) biasanya membutuhkan waktu antara dua dan tiga hari untuk berkembang. Reaksi tipe IV ikut serta dalam berbagai autoimun dan penyakit infeksi, tetapi juga dalam ikut serta dalam contact dermatitis. Reaksi tersebut di oleh sel T, monosit dan makrofag (Hikmah, 2010).

2.1.2 Alergi Makanan

Alergi makanan adalah respons abnormal terhadap makanan yang diperantarai oleh reaksi alergi imunologis. Alergi dapat didefinisikan sebagai kemampuan kekebalan sistem tubuh untuk menghasilkan kadar tinggi antibodi imunoglobulin (Ig) E terhadap alergen. Keadaan alergi makanan mengacu setiap respon imun yang merugikan yang terjadi setelah konsumsi makanan tertentu. Alergi makanan dapat bermanifestasi seperti alergi yang lain pada satu organ atau berbagai organ target pada kulit seperti urtikaria, angioedema, pada saluran napas rhinitis, asma, pada saluran cerna nyeri abdomen, muntah, pada kardiovaskuler syok anafilaktik. Secara umum patofisiologi alergi makanan dapat diperantarai IgE maupun tidak diperantarai oleh IgE (Endaryanto & Harsono, 2010)

Saluran pencernaan, yang merupakan organ imunologis terbesar dalam tubuh, terus-menerus terpapar antigen eksogen yang sangat besar termasuk bakteri komensal dan protein yang dicerna (Chehade dan Meyer, 2005). Lapisan epitel tunggal memisahkan beban antigenik ini dari limfosit, sel penyaji antigen (APC), sel stroma dan sel imun lain dalam lamina propria, yang bersama-sama terdiri dari jaringan limfoid yang berhubungan dengan mukosa (MALT). Dalam MALT,

populasi unik sel dendritik (DC) berinteraksi dengan antigen makanan, dan menentukan nasib respons adaptif yang dihasilkan, yaitu kekebalan terhadap toleransi (Coombes dan Powrie, 2008). Dalam konteks ini, toleransi imun didefinisikan sebagai penekanan antigen spesifik terhadap respon imun seluler atau humoral. Ketika paparan antigen awal dimediasi melalui saluran GI, penekan yang dimediasi sel-T yang kuat berkembang yang disebut toleransi oral (Faria dan Weiner, 2005). respons imun selanjutnya berlangsung melalui dua fase: sensitisasi alergi, dan elisitasi.

Sensitisasi alergi melibatkan priming sel T setelah aktivasi DC, dan respons T-helper-2 (Th2) yang dihasilkan ditandai dengan produksi interleukin-4 (IL-4), IL-5, dan IL-13 dari sel T CD4⁺. Respon Th2 ini mengarah pada produksi sel-B immunoglobulin E (IgE), dan IgE ini berikatan dengan reseptor afinitas tinggi pada permukaan sel mast di kulit, usus, pernapasan, dan sistem kardiovaskular, mempersenjatai mereka untuk reaktivitas setelah paparan ulang allergen (Galli, 2008). Elisitasi gejala alergi klasik terjadi dalam beberapa menit setelah paparan alergen, ketika sel mast yang terikat IgE mengenali alergen dan menjadi diaktifkan. Ketika terpapar dengan makanan (penyebab alergi) yang sama, protein akan mengikat molekul di sel mediator (sel basofil dan sel mast). Tahap elisitasi menyebabkan tubuh mengeluarkan molekul yang menyebabkan inflamasi (seperti leukotrien dan histamin). Antibodi melampirkan ke bentuk sel darah yang disebut sel mast. Sel mast dapat ditemukan di saluran pernapasan, saluran pencernaan, dan di tempat lain. Kehadiran sel mast dalam saluran pernapasan dan saluran pencernaan membuat daerah ini lebih rentan terhadap

paparan alergen. Mengikat alergen ke IgE, yang melekat pada sel mast. Hal ini menyebabkan sel mast untuk melepaskan berbagai bahan kimia ke dalam darah. Histamin, senyawa kimia utama, menyebabkan sebagian besar gejala reaksi alergi.

2.1.3 Patomekanisme Reaksi Alergi

Alergi atau hipersensitivitas tipe I adalah kegagalan kekebalan tubuh di mana tubuh menjadi hipersensitif dalam bereaksi secara imunologi terhadap zat-zat yang umumnya bersifat imunogenik (antigenik) atau dikatakan bersifat atopik. Zat yang menyebabkan hipersensitivitas tersebut disebut alergen (Zubir & Sitorus, 2016)

Alergen yang berhasil masuk tubuh akan diproses oleh APC. Setelah antigen masuk kedalam saluran pencernaan, Ag akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell*(APC) yang kemudian akan disajikan kepada sel T helper (Th) melalui *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II sebagai peptida bersifat imunogenik. Peptida alergen yang dipresentasikan oleh APC menginduksi aktivasi Limfosit T. Aktivasi Limfosit T oleh APC yang memproses alergen akan mengaktifkan Limfosit Th2 untuk memproduksi sitokin-sitokinnnya. Kontrol *specialized pattern recognition receptors* (PRRs) yaitu *Toll-like receptors* (TLR) dari sel-sel dendritik (DCs) atas respons imun innate menentukan respons imun adaptif Th1, Treg atau Th2. Limfosit Th1 memproduksi IL-2, IFN- γ dan TNF- α , sedangkan Limfosit Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, dan GM-CSF. Alergen akan mengaktifkan limfosit Th2, kemudian sel Th2 akan memproduksi sitokin proinflamasi. Sitokin IL-4 dan IL-13 sangat penting untuk

sintesis Imunoglobulin E (IgE), imunoglobulin yang merupakan kunci pokok dalam reaksi alergi fase cepat. Pengikatan IL-4 dan IL-13 pada reseptor masing-masing menyebabkan aktivasi faktor transkripsi. Hal ini menyebabkan transkripsi gen Ce IgE yang merupakan sinyal tambahan untuk sintesis IgE yang disediakan oleh ligasi antara CD40 ligan (CD40L) dan CD40 diekspresikan pada masing-masing oleh sel Th dan sel B. Produksi sitokin Th2 terutama IL-4 akan mensupresi perkembangan Th1 dan sitokin TNF- α yang dihasilkan oleh sel Th1 akan mensupresi perkembangan Th2. Interaksi antara alergen, sel mast dan IgE menghasilkan degranulasi sel mast. Degranulasi sel mast melepaskan mediator histamin. Histamin yang dilepaskan sel mast ditangkap reseptor histamin di target organ. Bila terdapat interaksi histamin dengan reseptornya pada target organ, maka reaksi akan terjadi alergi (Endaryanto & Harsono, 2010).

Reseptor H1-histamin mempunyai peran yang lebih luas dalam proses radang. Reseptor H2-histamin mempunyai peran dalam terjadinya rasa gatal dan nyeri pada kulit serta peningkatan permeabilitas dan vasodilatasi perifer, sedangkan reseptor H3-histamin meningkatkan pelepasan neurotransmitter seperti histamin, norepinephrine, asetilkolin dan 5-hidroksitriptamin. Sitokin yang dihasilkan limfosit Th2 akan berinteraksi dengan limfosit B, sehingga limfosit B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi IgE (Endaryanto & Harsono, 2010).

2.1.4 Gejala Klinis Alergi

Hipersensitivitas gastrointestinal tipe cepat disebut juga sebagai hipersensitivitas yang diperantarai IgE. Manifestasi klinis anafilaksis dapat terjadi dalam beberapa detik setelah paparan antigen, dibedakan menurut organ target yang terpapar. Reaksi gastrointestinal sering disertai manifestasi pada organ lain, seperti kulit dan paru-paru. Gejala yang paling menonjol setelah makanan dikonsumsi adalah hipotonia lambung, pilorospasme dan perubahan usus, yang menyebabkan muntah dan diare. Setelah kontak dengan antigen, mukosa gastrointestinal menjadi hiperemis dan edema. Biopsi jaringan yang diambil menunjukkan penurunan sel mast dan histamin jaringan (Olivier, 2013). Pada kulit, gejala yang muncul berupa dermatitis atopi, secara klinis berbentuk dermatitis akut eksudatif dengan predileksi daerah muka terutama pipi dan daerah ekstensor ekstremitas. Lesi yang paling menonjol pada tipe ini adalah vesikel dan papula, serta garukan yang menyebabkan krusta dan terkadang infeksi sekunder. Manifestasi pada sistem pernapasan meliputi stridor, kesulitan bernafas, sianosis dan bahkan edema paru. Mukosa respirasi dapat terjadi rhinitis alergi yang ditandai dengan nasal pruritis, rinorea, hidung tersumbat dan asma yang ditandai dengan bronkospasme, inflamasi jalan nafas kronis. Reaksi alergi sistemik dapat menyebabkan syok anafilaksis (Lavinson 2014).

2.1.5 Diagnosa Alergi

Diagnosis alergi ditegakkan berdasarkan riwayat klinis dengan melakukan anamnesis. Anamnesis diperjelas dengan pemeriksaan fisik, pemeriksaan

sensitivitas IgE, tes pada kulit atau *allergen specific serum IgE measurements* (RAST). *Skin-prick testing* (SPT) dilakukan dengan ekstrak alergen, diujikan pada kulit. Pemeriksaan darah dilakukan dengan memeriksa IgE total dan IgE spesifik (RAST). Pemeriksaan IgE total digunakan sebagai marker diagnosis alergi, tetapi memiliki kelemahan. IgE meningkat pada penyakit alergi dan juga non alergi seperti infestasi parasit, sehingga kurang spesifik. Sedangkan pemeriksaan IgE spesifik untuk mengukur IgE spesifik alergen dalam serum pasien. Adapun pemeriksaan lainnya untuk menegakkan diagnosis penyakit alergi adalah skrining antibody IgE multi-alergen, triptase sel mast, dan *Cellular antigen stimulation test* (CAST) (Lewis, 2017).

2.2 Kefir

Kefir merupakan produk susu fermentasi yang dapat dibuat dari bahan baku susu sapi, susu kambing atau susu domba dengan menambahkan bibit kefir (kefir grains). Kefir grains berbentuk granula tak beraturan seukuran biji gandum dengan diameter 2-3 mm dan berwarna keputih-putihan atau kekuningan (Wood, 1998). Kefir grains terdiri dari Bakteri Asam Laktat (BAL) dan khamir antara lain *Lactobacillus lactis* dan *Lactobacillus kefirgranum* yang berperan dalam pembentukan asam laktat, *Lactobacillus kefiranofaciens* penyebab terjadinya penggumpalan, *Leuconostoc* pembentuk diasetil dan *Candida kefir* pembentuk etanol dan CO₂ (Susilorini dan Sawitri, 2005).

Komposisi kimiawi kefir tergantung dari susu yang digunakan sebagai bahan bakunya, antara lain protein 3,91%, laktosa 2,88%, lemak 2,57% dan etanol

0,94%. Sifat fisik kefir mempunyai pH 3,77 – 4,19, dengan derajat keasaman 1% rasa asam segar yang terbentuk selama proses fermentasi BAL. Edwin (2002) menyatakan bahwa koloni yang terdapat dalam kefir grains mampu memproduksi beberapa vitamin yang sangat diperlukan tubuh seperti asam folat, asam nikotinat, asam pantotenat, biotin, vitamin B6 dan vitamin B12 serta memiliki kemampuan menurunkan kadar lemak produk susu fermentasi seperti kefir yang dihasilkan.

Bibit kefir secara spesifik memproduksi asam laktat, antibiotik dan beberapa bakterisida, yang dapat menghambat proliferasi mikroorganisme patogen dan merusak pada produk kefir. BAL dalam kefir bermanfaat di bidang kesehatan yakni sebagai probiotik penghasil senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida dan berbagai antibiotik yang menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan, meningkatkan fungsi pencernaan serta penyerapan nutrisi makanan (Bahar, 2008). Kefir memiliki kemampuan aktifitas antimutagenik dan antioksidan secara invitro, menghambat pertumbuhan tumor dan meningkatkan total IgA pada usus halus tikus uji (Liu et al. 2002; Liu et al. 2005).

Adhesi dari beberapa probiotik, khususnya BAL, ke dinding usus epitel secara langsung memodulasi aktivasi dan proliferasi DC. Probiotik mampu menstimulasi IL-10 dan IL-12 produksi oleh *myeloid DC* (mDCs), yang meningkatkan polarisasi Th1-Th2 / Treg, dan TNF- α dan IL-6 oleh DC. Beberapa BAL juga menginduksi pematangan DC melalui induksi IL-12 dan produksi TNF- α dan meningkatkan produksi IFN oleh plasmasitoid DCs (pDCs). Beberapa strain probiotik juga mampu menstimulasi monosit untuk menghasilkan sel IL-12 dan

NK untuk produksi IFN- γ . BAL berguna untuk mempromosikan polarisasi Th1 dan mencegah gangguan yang diperantarai Th2.

Selain bakteri asam laktat, terdapat zat aktif yang terkandung dalam kefir yaitu laktoferin . Laktoferin juga terlibat dalam penekanan sitokin proinflamasi dan induksi interferon α / β (IFN / β), dan mempengaruhi kemampuan makrofag untuk menyajikan antigen ke sel T CD4 + dalam resistensi adaptif (Latorre dkk, 2010). ; Siqueiros-Cendón dkk., 2014). Laktoferin dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel-sel endotel, sehingga infiltrasi leukosit di situs peradangan (Kim dkk, 2012). Laktoferin tidak hanya menstimulasi fungsi sel dendritik, tetapi juga mengaktifkan APC dan respon imun spesifik antigen (Yang dkk, 2009; Siqueiros-Cendón et al., 2014).

Pemberian Laktoferin oral merangsang sekresi IgG dan IgA di mukosa usus tikus (Sfeir dkk, 2004; Siqueiros-Cendón et al., 2014). Laktoferin mengurangi respon peradangan pada rinitis alergi, dengan menghambat aktivitas Th2, Th17 dan sel T regulator. Dapat meningkatkan respons Th1, menghambat respons Th2, dan menyebabkan keterkaitan antar-reseptor sel-T, yang kemudian terjadi penghambatan aktivasi sel-T, sehingga pelepasan mediator inflamasi, seperti IL-5 dan IL-17 berkurang, serta meredakan tingkat peradangan (Siqueiros-Cendón et al., 2014; Wang et al., 2013). Laktoferin memiliki kemampuan untuk mengikat reseptor permukaan sel serta memodulasi fungsi sel T dan sel NK (Kanwar et al., 2015; Siqueiros-Cendón et al., 2014).

2.3 Ovalbumin

Ovalbumin merupakan bagian dari protein yang ada di dalam putih telur. Sebanyak 60- 65% dari total protein yang ada di putih telur adalah ovalbumin. Fungsi biologik ovalbumin belum jelas, meskipun telah disebutkan berperan sebagai protein cadangan. Senyawa ini bersifat larut air dan banyak digunakan di dalam penelitian, tes-tes yang berhubungan dengan penyakit alergi maupun dalam bidang kedokteran lainnya. Ovalbumin digunakan untuk menstimulasi reaksi alergi dalam tes atau uji alergi. Selain itu, ovalbumin juga digunakan dalam bidang kedokteran untuk menetralkan korban-korban yang keracunan logam berat (Huntington dan Stein, 2001). Menurut Harlow dan Lane, ovalbumin merupakan protein dengan bobot 45 kDa dan dapat digunakan sebagai protein pembawa untuk konjugasi hapten dan antigen lainnya untuk membuat zat-zat tersebut lebih imunogenik untuk imunisasi.

Pada proses alergi, sensitisasi menstimulasi terbentuknya limfosit penguat yang bersirkulasi ke seluruh tubuh, yang menyebabkan sel tersebut mempunyai ingatan terhadap ovalbumin atau alergen lainnya, sehingga sensitisasi ovalbumin yang kedua menyebabkan pembentukan IgE yang lebih cepat. Immunoglobulin E yang diproduksi kemudian menempel pada reseptor FcεRI pada sel mast. Reaksi inflamasi oleh ovalbumin mengakibatkan ovalbumin tersebut segera berikatan dan membentuk jembatan antara 2 molekul IgE yang menempel pada sel mast (*crosslinking*) yang kemudian akan mengaktifasi tirosin kinase dan mengaktifkan fosfolipase C. Selanjutnya, fosfolipase C lalu menghidrolisis fosfatidil inositol (PI) menjadi inositol trifosfat (IP3) dan 1,2-diasilgliserol

(DAG). Inositol trifosfat akan menghasilkan peningkatan kadar ion kalsium intraseluler baik dari intracellular Ca^{2+} pool maupun influks Ca^{2+} , sehingga mengakibatkan degranulasi sel mast. Sedangkan 1,2- diasilgliserol mengaktifkan protein kinase C (PKC), kemudian secara sinergis juga merangsang degranulasi sel mast. Degranulasi terjadi melalui proses eksositosis, yang akhirnya melepaskan beberapa mediator (Kresno, 2001).

2.4 Interferon Gamma (IFN- γ)

Interferon (IFN) merupakan jenis protein yang tergabung ke dalam keluarga besar sitokin. Interferon dibagi ke dalam 2 jenis berdasarkan struktur, fungsi, dan stimulus yang merangsang ekspresi protein ini, yaitu: (i) IFN tipe I yang muncul saat merespon adanya infeksi virus, terbagi ke dalam beberapa kelas yaitu IFN ($-\alpha$, $-\beta$, $-\epsilon$, $-\kappa$, $-\omega$, $-\delta$, $-\tau$). (ii) IFN tipe II, yang disebut juga dengan IFN- γ , yang disekresikan oleh sel-sel yang telah mendapatkan rangsangan dari berbagai stimulus inflamasi maupun reaksi imun lainnya. Interferon- γ merupakan produk dari gen tunggal yang berasal kromosom 12 (pada manusia) dan kromosom 10 (pada mencit). IFN- γ berperan sebagai modulator sistem imun (Wahyuniati, 2017).

IFN- γ terutama dihasilkan secara endogen oleh sel limfosit T (CD4^+ dan CD8^+) dan sel Natural Killer (NK) yang telah teraktivasi akibat adanya respon terhadap stimulus antigen spesifik. IFN- γ merupakan sitokin yang menjadi tanda khas subset Th1. IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi

makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam imunitas seluler terhadap mikroba intraseluler (Wahyuniati, 2017).

Terdapat 2 jalur mekanisme produksi IFN- γ yang telah ditemukan dengan menggunakan sel T CD4⁺, yaitu: (i) *T cell receptor (TCR) mediated antigen-dependent pathway, cyclosporinesensitive*, dan (ii) *cytokine-induced, cyclosporine-insensitive pathway*. Secara eksperimental, produksi IFN- γ juga dapat diinduksi dengan menggunakan stimulus yang menyerupai aktivasi via TCR, yaitu meliputi penggunaan mitogen (seperti *concanavalin A* atau *phytohemagglutinin*), cross-linking antibodies, atau agen-agen farmakologis (seperti kombinasi *phorbol myristate acetate* dan *calcium ionophore*) (Wahyuniati, 2017).

IFN- γ telah diketahui dapat menurunkan produksi (*downregulate*) IL-4 dan IL-10 oleh sel Th2. IFN- γ juga dapat mengontrol produksi dan aktivasi sel Treg (CD4⁺ /CD25⁺ regulatory T cell). Treg berfungsi untuk menekan berbagai macam respon imun dan juga menginduksi *immune tolerance*. Dengan adanya peran tambahan ini disertai dengan peran sebagai sitokin pro-inflamasi, menunjukkan bahwa IFN- γ memiliki peran yang luas dalam meregulasi respon imun host (Teixeira dkk, 2005).

IFN- γ merupakan sitokin utama MAC dan berperan terutama dalam imunitas non spesifik dan spesifik selular. IFN- γ disebut interferon tipe II yang diproduksi oleh sel Th1 dan sel NK. IFN- γ merupakan aktivator utama makrofag. Aktifitas ini mengaktifkan makrofag untuk melawan patogen intraseluler yang invasif. IFN- γ secara langsung menginduksi sintesis enzim yang berperan pada system

pernapasan, sehingga makrofag dapat membunuh mikroba yang difagosit. IFN- γ meningkatkan reseptor untuk IgG (Fc γ RI) pada permukaan makrofag sehingga disebut MAC (Teixeira dkk, 2005).

Fungsi IFN- γ yang lain dalam mengatur respons imun yaitu :

1. IFN- γ meningkatkan diferensiasi sel CD4⁺ naif ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2 dan merangsang sel B untuk meningkatkan class switching untuk menghasilkan IgG2a dan IgG3, tetapi menghambat class switching yang menghasilkan IgG1 dan IgGE.
2. IFN- γ meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I, dan juga ekspresi MHC kelas II pada beberapa jenis sel. Dengan demikian, IFN- γ berperan penting pada fase pengenalan respons imun.
3. Mengaktivasi neutrofil.
4. Merupakan aktivator sel endotel, meningkatkan adhesi sel T CD4⁺ dan perubahan morfologik yang memudahkan ekstrasvasasi limfosit.
5. Bersama dengan IL-2, IFN- γ merupakan aktivator CTL.

Dampak akhir dari semua aktivitas tersebut adalah meningkatnya reaksi inflamasi yang penuh dengan makrofag, dan menghambat reaksi eosinofil yang bergantung pada IgE.

2.5 Makrofag

Makrofag adalah sel imun bawaan yang memainkan peran penting dalam fase awal pertahanan *host* melawan patogen, koordinasi respon imun adaptif, dan pengaturan peradangan dan perbaikan jaringan. Makrofag dapat mengubah

keadaan polarisasi mereka, yang mengarah ke respon imun yang berbeda melalui sinyal aktivasi oleh berbagai ligan dan isyarat lingkungan. Di hadapan tipe 1 sitokin seperti interferon- γ dan IL-12, makrofag diaktifkan secara klasik (M1-terpolarisasi) dan menghasilkan sitokin pro-inflamasi dan mediator beracun. Di hadapan tipe 2 sitokin IL-4 dan IL-13, makrofag yang diaktifkan secara alternatif (M2-terpolarisasi) mengekspresikan pola reseptor fagositik yang berbeda dan menghasilkan sitokin tipe 2 yang berperan dalam anti-parasit dan respon alergi, termasuk asma. Fenotipe makrofag dapat diklasifikasikan sebagai klasik- (CA-Mph; M1-Mph) atau alternatif-diaktifkan (AA-Mph; M2-Mph) (Murray, 2011).

Adanya interferon-gamma (IFN- γ) dan lipopolisakarida (LPS) atau ligan mikroba lainnya dari reseptor Toll-like (TLR) mengarah pada aktivasi makrofag klasik (Sica & Mantovani, 2012). Predominansi CA-Mph diamati pada fase pertama respon inflamasi yang disebabkan oleh infeksi dan kerusakan jaringan. Makrofag yang diaktifkan secara klasik dicirikan oleh ekspresi yang tinggi dari kelas II major histocompatibility complex (MHC) dan molekul ko-stimulasi serta aktivasi faktor nuklir kappa B (NF κ B) - jalur pensinyalan proinflamasi independen dan sekresi nitrogen oksida (NO), peralihan oksigen reaktif (ROI) dan sitokin proinflamasi, termasuk interleukin (IL) -1 β , IL-12 dan tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). CA-Mph adalah APC profesional yang efisien yang menginduksi respon tergantung Th1 dan Th17, termasuk reaksi *delayed-type hypersensitivity* (DTH) (Sia & Hänninen, 2010).

Seperti disebutkan di atas, makrofag terlibat dalam mekanisme reaksi hipersensitivitas humoral dan seluler pada berbagai fase respon imun. Sebagai

APC profesional, makrofag dapat menginduksi respon penolong CD4 + alergen spesifik serta limfosit sitotoksik T CD8 +. Setelah aktivasi proinflamasi, makrofag mengekspresikan fungsi efektor sitotoksik. Sebagai fagosit profesional yang efisien, makrofag berpartisipasi dalam pembersihan alergen, terutama di saluran pernapasan. Selain aktivitas fagositosis, makrofag alveolar memiliki kemampuan untuk menurunkan alergen melalui sekresi enzim spesifik, seperti kitinase, yang menetralkan chitin, alergen pernapasan yang kuat. Dalam kondisi fisiologis, setelah fagositosis alergen, makrofag jaringan bermigrasi ke kelenjar getah bening lokal untuk menghambat aktivasi sel dendritik, dan mencegah perkembangan respon spesifik alergen. Dalam alergi tipe 1, makrofag anafilaksis, terutama AA-Mph, dapat menekan atau meningkatkan respon imun Th2-dependen dan produksi IgE (Namizek dkk, 2013).

2.6 CD68

CD68 adalah transmembran glikoprotein tipe I dimana erat kaitannya dengan endosomal/lisosomal. CD68 memiliki struktur yang sama dengan *lysosomal-associated membrane proteins* (LAMPs) dan merupakan keluarga LAMP glikoprotein. Fungsi CD68 belum terlalu diketahui, namun lokasi preferensial pada bagian akhir endosom memiliki peran dalam transportasi peptida atau *antigen processing*. CD68 dikenal sebagai marker spesifik permukaan myeloid terutama makrofag, namun juga bisa diekspresikan oleh non-myeloid. Ekspresi CD68 dapat juga ditemukan pada granulosit seperti basofil dan neutrofil intestinal. CD68 digunakan sebagai *marker* atau penanda makrofag pada saat

terjadi inflamasi (Chistiakov, 2017). Selama infeksi bakteri, fagosit profesional tertarik ke tempat infeksi, di mana mereka merupakan lini pertama pertahanan sel inang. Fungsi mereka adalah untuk menelan dan menghancurkan patogen. Dengan demikian, bakteri harus tahan terhadap aktivitas bakterisida fagosit profesional, termasuk makrofag untuk melawan sistem kekebalan inang.

CD68 secara rutin digunakan sebagai penanda histokimia / cytochemical peradangan yang terkait dengan keterlibatan monocytes / macrophages. CD68 juga digunakan untuk mengidentifikasi sel-sel garis turunan makrofag seperti sel Kupffer, dan osteoklas. CD68 dapat digunakan dalam kombinasi dengan penanda faktor transkripsi, pSTAT1, RBP-J, dan CMAF untuk membedakan polarisasi makrofag M1 dan M2 in vivo. Studi ultrastruktural lesi aterosklerotik manusia menunjukkan bahwa CD68 sebagian besar terletak di lisosom. Berbeda dengan makrofag, CD68 tidak diekspresikan oleh sel dendritik (DC) (Chistiakov dkk, 2017).

Beberapa penelitian telah menunjukkan peningkatan regulasi ekspresi CD68 dalam makrofag sebagai respons terhadap rangsangan inflamasi seperti paparan oxLDL dan stimulasi kronis dengan lipopolisakarida bakteri (LPS) atau inflamasi sitokin interferon- γ (IFN- γ). Dalam sel mikroglial, ekspresi CD68 dirangsang oleh LPS dan IFN- γ dengan cara yang serupa dengan *Toll-like receptor 4* (TLR4). CD68 juga diregulasi dalam neutrofil inflamasi dari pasien dengan penyakit radang usus. Namun, tidak ada efek fungsional spesifik CD68 yang diselidiki pada upregulasi CD68 pada sel-sel myeloid inflamasi (Chistiakov dkk, 2017)..

2.7 Flow Cytometry

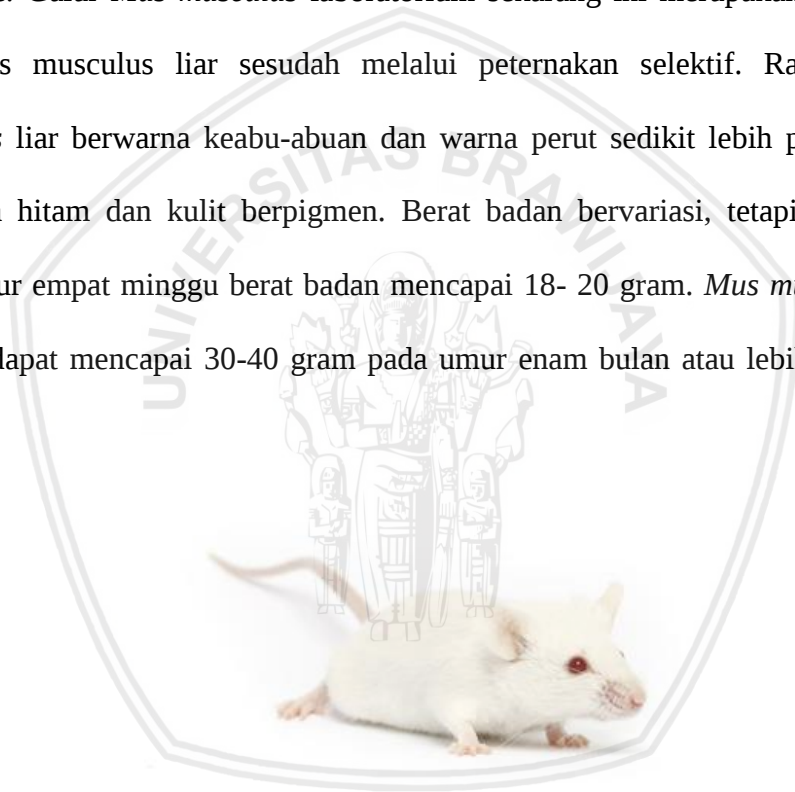
Flowcytometry merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. *Flowcytometry* dapat menganalisis suspensi partikel atau sel dengan dari ukuran 0,2-150 μm . Prinsip kerja *flow cytometry* adalah setiap sel akan dialirkan dalam sistem fluida, lalu ditembak dengan sinar laser, kemudian disebarkan oleh setiap sel. Sinar laser tersebut juga dapat mengaktivasi senyawa fluoresen yang terdapat dalam sel. Setiap sinyal sinar yang disebarkan maupun yang difluoresensikan akan diubah menjadi impuls elektrik sehingga dapat terdeteksi dan tersimpan sebagai data di dalam komputer. *Flow cytometry* dapat digunakan untuk deteksi adanya perubahan morfologi sel yang mengalami apoptosis menggunakan nuclear staining dan mampu menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis menggunakan flow cytometry Annexin V (Mutiah dkk, 2018).

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 di mana pada fase Go/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. Sel yang mengalami apoptosis (sub Go), 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).

2.8 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) merupakan hewan yang termasuk dalam famili Muridae. Galur *Mus musculus* laboratorium sekarang ini merupakan keturunan dari *Mus musculus* liar sesudah melalui peternakan selektif. Rambut *Mus musculus* liar berwarna keabu-abuan dan warna perut sedikit lebih pucat. Mata berwarna hitam dan kulit berpigmen. Berat badan bervariasi, tetapi umumnya pada umur empat minggu berat badan mencapai 18- 20 gram. *Mus musculus* liar dewasa dapat mencapai 30-40 gram pada umur enam bulan atau lebih (Muliani, 2011).



Gambar 2.1 Mencit (*Mus musculus*) (Medero, 2008).

Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Family	: Muridae

Genus : Mus

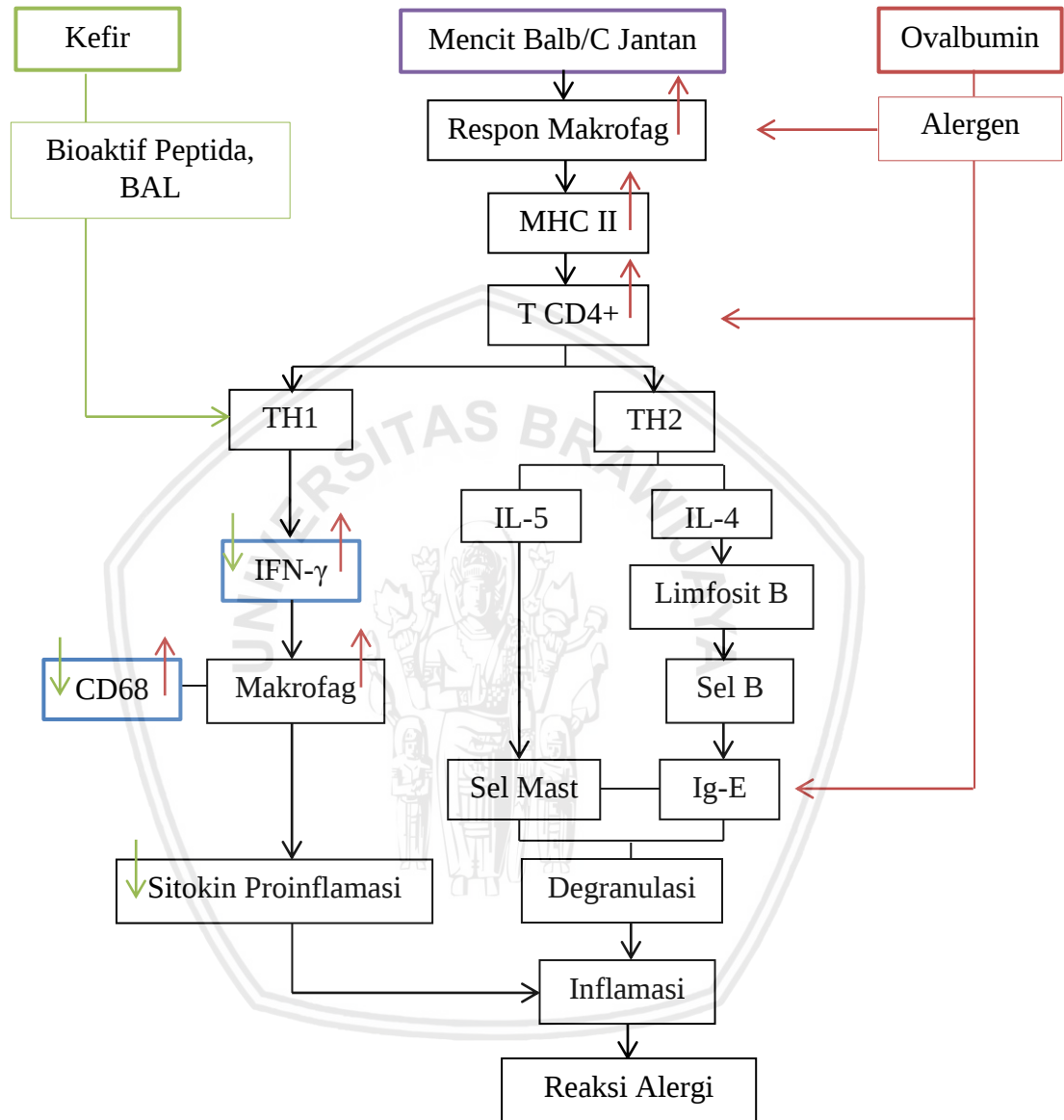
Species : *Mus musculus*

Lama hidup mencit satu sampai tiga tahun, dengan masa kebuntingan yang pendek (18-21 hari) dan masa aktifitas reproduksi yang lama (2-14 bulan) sepanjang hidupnya. Mencit mencapai dewasa pada umur 35 hari dan dikawinkan pada umur delapan minggu (jantan dan betina). Siklus reproduksi mencit bersifat poliestrus dimana siklus estrus (berahi) berlangsung sampai lima hari dan lamanya estrus 12-14 jam. Mencit jantan dewasa memiliki berat 20- 40 gram sedangkan mencit betina dewasa 18-35 gram. Hewan ini dapat hidup pada temperatur 30°C (Muliani, 2011).

Penelitian yang berkaitan dengan penyakit alergi pada studi ekperimental dapat menggunakan model hewan percobaan, seperti marmot, tikus, dan mencit. Mencit menunjukkan sejumlah kesamaan dengan manusia pada respon terhadap alergen inhalan seperti produksi antibodi IgE, eosinofilia pada inflamasi paru, hipersekresi mukus dan hiper-responsivitas saluran pernapasan. Salah satu jenis mencit yang sering digunakan adalah strain BALB/c, karena strain tersebut dapat merangsang respon imun ke arah Th2 dominan lebih baik dari strain lainnya. Respon alergi terjadi apabila individu terpapar suatu alergen atau antigen, pada hewan percobaan respon alergi dapat dicetuskan menggunakan substansi protein sebagai suatu alergen, salah satunya yaitu ovalbumin (Nials dan Udin 2008).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



- | | |
|---|--|
| Variabel kendali (tikus) | $\longrightarrow$ Patomekanisme |
| Variabel Bebas (alergen) | $\longrightarrow$ Pengaruh Pemberian Kefir |
| Variabel Bebas (kefir) | $\longrightarrow$ Pengaruh Pemberian Alergen |
| Variabel Tergantung | |

Kefir merupakan produk susu fermentasi yang dapat dibuat dari bahan baku susu sapi, susu kambing atau susu domba dengan menambahkan bibit kefir (kefir grains). Kefir mengandung bioaktif peptida yang dapat berperan sebagai immunomodulator pada reaksi inflamasi, salah satunya laktoferin. Laktoferin dapat menekan sitokin proinflamasi dan induksi interferon α / β (IFN / β), dan mempengaruhi kemampuan makrofag untuk menyajikan antigen ke sel T CD4+ dalam resistensi adaptif (Latorre dkk, 2010). Selain itu, laktoferin berperan untuk meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel-sel endotel, sehingga menyebabkan infiltrasi leukosit di situs peradangan (Kim dkk, 2012). Kefir juga mengandung bakteri asam laktat (BAL) yang dapat menurunkan kadar proinflamasi seperti IFN- γ , TNF- α , IL-12, dan IL-1 β dan sitokin Th2 seperti IL-4, IL-6, dan IL13 (Hong et al., 2011).

Induksi alergi dengan ovalbumin diberikan secara bertahap, diawali dengan proses sensitisasi dan dilanjutkan dengan provokasi alergen (*allergen challenge*). Rute dari sensitisasi mempengaruhi respon host, pada hewan yang disensitisasi secara sistemik dengan injeksi intraperitoneal, produksi IgE biasanya lebih besar dari pada yang disensitisasi melalui intranasal. Selain itu penggunaan adjuvan selama sensitisasi secara signifikan mengubah respon terhadap provokasi alergen berikutnya. Rute pemberian ovalbumin untuk provokasi alergen berikutnya mempengaruhi tipe alergi pada hewan percobaan. Pada hewan coba mencit, pemberian ovalbumin melalui inhalasi setelah sensitisasi sistemik sebelumnya dapat menstimulasi alergi di saluran pernapasan, sedangkan untuk menghasilkan hewan coba dengan model alergi makanan, pemberian ovalbumin dilakukan per oral setelah sensitisasi sistemik.

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+. Respon Th2 dimediasi oleh sel CD4+ akan mengeluarkan sitokin seperti IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 yang berperan dalam respon alergi. IL-4 berperan untuk mengatur produksi IgE dan IL-5 bertanggung jawab untuk pertumbuhan, diferensiasi, dan aktivasi eosinofil sehingga adanya peningkatan kadar eosinofil merupakan indikator respon alergi (Teixeira dkk, 2005).

Subset utama kedua dari sel T helper, yaitu Th1, melepaskan IL-2, TNF- α , dan IFN- γ , memediasi respon *delayed-type hypersensitivity* (DTH) atau reaksi hipersensitivitas tipe IV, dan menghambat respon Th2. IFN- γ merupakan sitokin Th1 yang bertanggung jawab untuk menghambat respon IgE yang dimediasi IL-4 baik secara *in vitro* dan *in vivo* serta berperan penting dalam aktivasi makrofag (Teixeira dkk, 2005). Sel CD68 berperan sebagai marker makrofag pada reaksi ini. Ekspresi CD68 dalam makrofag menandai respons terhadap rangsangan inflamasi seperti paparan oxLDL dan stimulasi kronis dengan lipopolisakarida bakteri (LPS) atau sitokin inflamasi interferon- γ (IFN- γ) (Chistiakov et al, 2016). Respon inflamasi meliputi migrasi, infiltrasi, proliferasi, dan diferensiasi sel-sel, dimana pada proses proliferasi makrofag akan melepaskan sitokin proinflamasi serta *growth factors* untuk memulai pengembangan jaringan granulasi.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian preventif kefir pada hewan model mencit alergi intestin yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif CD68.
2. Pemberian preventif kefir pada hewan model mencit alergi intestin yang diinduksi ovalbumin dapat menyebabkan penurunan kadar relatif IFN- γ .



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan 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 Universitas Brawijaya Malang.
2. Pembuatan suspensi Ovalbumin dan *adjuvant* Al(OH)₃ di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang.
3. Pembuatan Kefir di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang,
4. Uji *flowcytometry* untuk pengamatan kadar relatif CD68 dan IFN- γ yang dilakukan di Laboratorium Biomolekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Kandang mencit dari kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol minum, rak kandang, cctv, ice box, ice gel, spidol, inkubator, *dissecting set*, mortar, spuit 1 ml, spuit 3 ml, spuit 10 ml, tabung vacutainer EDTA, eppendorf tube, Falcon tube, micropipet, Timbangan digital, Vortex, serta alat untuk uji *flowcytometry* seperti cawan petri, *yellow tip*, *blue tip*, mortir, *sentrifuge* tube, vortex, *flowcytometer* dan *software BD Cell Quest ProTM*.

Mencit jantan *strain* Balb-c berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan mencit antara 30-40 gram dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Kefir yang diperoleh dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, air minum mencit, sekam padi untuk alas kandang,

Ovalbumin (Serva Cat no. 11842.02), $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Merck: CAS 21645-51-2), Aquades steril, antibodi IFN- γ dan CD68 *antimice*, aquades steril dan pakan PB-1.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan menggunakan besaran sampel sebagai berikut :

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

Keterangan :

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Sehingga setiap kelompok di buat ulangan 4 ekor. Jadi total mencit yang digunakan 20 ekor.

4.3.2 Rancangan Penelitian

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

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan Penelitian

Kelompok	Keterangan
K(-) (Kontrol Negatif)	Mencit sehat diberikan placebo NaCl Fisiologis per-oral (0,5 ml/ekor) pada hari ke 1-14.
K(+) (Kontrol Positif)	Mencit tanpa diberikan preventif kefir, diberikan Ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta adjuvant Al(OH) ₃ 1000µg secara IP pada hari ke-8 dan 15 selanjutnya diinduksi kembali OVA sebanyak 60 µg+ Adjuvant Al(OH) ₃ 10mg pada hari ke-29 secara per oral .
P1 (Perlakuan 1)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 300mg/kgBB, kemudian diberikan Ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta adjuvant Al(OH) ₃ 1000µg secara IP pada hari ke-8 dan 15 selanjutnya diinduksi kembali OVA sebanyak 60 µg+ Adjuvant Al(OH) ₃ 10mg pada hari ke-29 secara per oral .
P2 (Perlakuan 2)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 600mg/kgBB, kemudian diberikan Ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta adjuvant Al(OH) ₃ 1000µg secara IP pada hari ke-8 dan 15 selanjutnya diinduksi kembali OVA sebanyak 60 µg+ Adjuvant Al(OH) ₃ 10mg pada hari ke-29 secara per oral .
P3 (Perlakuan 3)	Mencit diberikan preventif kefir selama 14 hari pertama dengan dosis 900mg/kgBB, kemudian diberikan Ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta adjuvant Al(OH) ₃ 1000µg secara IP pada hari ke-8 dan 15 selanjutnya diinduksi kembali OVA sebanyak 60 µg+ Adjuvant Al(OH) ₃ 10mg pada hari ke-29 secara per oral.

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati pada penelitian ini adalah:

Variabel bebas : dosis pemberian Kefir dan Ovalbumin

Variabel terikat : persentase kadar relatif CD68 dan IFN- γ

Variabel kendali : berat badan, umur dan strain mencit, pakan, kandang mencit

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Mus musculus* galur BALB/c jantan. Mencit diadaptasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian (Muliani, 2011). Mencit diberi minum *ad libitum* dan pakan jenis PB-1 yang diberikan sebanyak 40gr/ekor setiap sore pukul 15.00. 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 yang digunakan dipastikan adalah mencit yang sehat yang ditandai dengan aktifitas mencit yang baik, frekuensi makan, minum, defekasi dan urinasi normal, serta bentuk feses yang normal. Mencit dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.5.2 Pemberian Kefir Sebagai Efek Preventif

Mencit BALB/C diberi kefir dengan dosis secara oral dengan dosis 300 mg/kgBB untuk P1, 600 mg/kgBB untuk P2, dan 900 mg/kgBB untuk P3. Kefir diperoleh dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang dengan

konsentrasi 5% dalam sediaan 100 mL. Pemberian dilakukan selama 14 hari berturut-turut (Wahdania, 2012). Perhitungan dosis kefir pada **Lampiran 3**.

4.5.3 Pembuatan Hewan Model Alergi Menggunakan OVA

Mencit BALB/C diinjeksi 20 µg OVA/ekor secara *intraperitoneal* (Serva Cat no. 11842.02), dicampur dengan 1000 µg alumunium hidroksida $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Merck: CAS 21645-51-2) dalam 0,5 ml *aquades* steril pada hari ke-8 dan 15, selanjutnya diinduksi kembali OVA secara per oral dengan dosis 60 mg/ ekor (Serva Cat no. 11842.02) dan 10 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Merck: CAS 21645-51-2) dalam 1 ml *aquades* steril pada hari ke-29. Perhitungan dosis induksi pada **Lampiran 3**.

Induksi ovalbumin secara *intraperitoneal* akan menyebabkan sensitisasi alergi sistemik, akibat terjadinya pergeseran respon imun ke arah ke arah Th2 dominan. (CD) 4+ sel T mengaktifkan sel B untuk menghasilkan IgE spesifik antigen. Sel-sel Th2 dan sitokin terkait, termasuk interleukin (IL) -4, IL-5 dan IL-13, merupakan sitokin yang berperan dalam produksi antibodi IgE, dan diregulasi oleh sitokin Th1 seperti IFN - γ dan IL-12. T regulatory cells (Treg) berperan penting dalam mempertahankan toleransi imun oral dan menekan sensitisasi alergi terhadap alergen makanan (Sun, 2016).

4.5.4 Pemeriksaan CD68 dan IFN- γ Dengan Metode Flowcytometry

Sampel yang diuji dengan *flowcytometry* adalah organ limpa. Sampel dibilas dengan menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak dua kali, diletakkan dalam cawan petri berisi 5 ml PBS, digerus dan dihomogenkan kemudian disuspensi dengan PBS. Sel-sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter dengan menggunakan *wire*, disentrifugasi 1500 rpm, pada suhu 20°C selama 5

menit. Selanjutnya dilakukan pipeting untuk mendapatkan homogenat, dipindahkan pada mikrosentrifuse baru dan ditambah 500 μ l lalu disentrifuse pada kecepatan 1500 rpm, suhu 20⁰C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet selanjutnya diinkubasi dengan antibodi (anti IFN- γ dan CD68). Sel yang telah diisolasi dan diperoleh, selanjutnya dianalisis Flow Cytometry (Dewi, 2013).

4.6 Teknik Pengumpulan Data

Analisis dilakukan dengan komputer dan diatur pada keadaan *acquiring* serta dilakukan setting sesuai parameter yang akan dianalisis. Kemudian sampel yang telah diberi antibodi ditambah 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet flowcytometer. Selanjutnya dipilih *acquire* dan *flowcytometer* akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh akan diolah dengan program BD cellquest ProTM (Dewi,2013).

4.7 Analisia Data

Data dianalisis menggunakan uji parametrik, *One Way ANOVA* dilanjutkan uji Tukey dengan $\alpha = 0.05$ untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan yang signifikan.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan mencit pada semua perlakuan tidak mengalami manifestasi klinis terjadinya alergi seperti diare atau muntah Menurut Olivier (2013), manifestasi klinis seperti inflamasi dapat terjadi dalam beberapa detik setelah paparan antigen, dibedakan menurut organ target yang terpapar. Gejala yang paling menonjol setelah makanan dikonsumsi adalah hipotonia lambung, pilorospasme dan perubahan usus, yang menyebabkan muntah dan diare. Setelah kontak dengan antigen, mukosa gastrointestinal menjadi hiperemis dan edema. Pada pemeriksaan kadar eosinophil dan IgE tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar semua kelompok perlakuan (**Data tidak dipublikasikan**). Menurut Stone dkk (2010), untuk mendeteksi reaksi alergi dalam tubuh dapat dilakukan pemeriksaan darah yaitu dengan memeriksa kadar IgE dan eosinophil. Prinsip umum yang digunakan dalam pengujian tersebut adalah untuk mendeteksi IgE yang akan mengikat alergen pada permukaan jaringan. Pengujian ini dipengaruhi oleh jumlah dan kualitas alergen yang terikat, tingkat pengikatan IgE non-spesifik, afinitas antibodi IgE, dan tingkat pemblokiran pengikatan IgE spesifik alergen oleh IgG spesifik alergen. Menurut Smith (2016), eosinofil pada reaksi alergi berperan pada homeostasis dan induksi sel dendritik dari sel Th2.

Bonnet dkk (2016), menginduksi sensitisasi 10µg ovalbumin secara intraperitoneal dengan 500 µg adjuvant Al(OH)₃ pada mencit sebanyak 2 kali selama 2 minggu, dilanjutkan dengan pemberian ovalbumin secara per-oral dengan dosis 20mg/mencit sebanyak 5 kali dalam rentang waktu 10 hari, dan

diperoleh kenaikan produksi IgE yang menjadi acuan dari respon hipersensitivitas. Penelitian ini menggunakan dosis ovalbumin yang lebih tinggi, namun dengan jangka waktu yang lebih singkat, yaitu pemberian ovalbumin dengan dosis 20 µg OVA/ekor serta adjuvant Al(OH)₃ 1000µg secara IP pada hari ke-8 dan 15 selanjutnya diinduksi kembali OVA sebanyak 60 µg+ Adjuvant Al(OH)₃ 10mg pada hari ke-29 secara per oral. Pemberian ovalbumin dalam dosis tersebut dalam jangka waktu yang singkat belum dapat menimbulkan reaksi alergi.

5.1 Efek Preventif Kefir Susu Kambing Pada Mencit Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Interferon γ (IFN- γ)

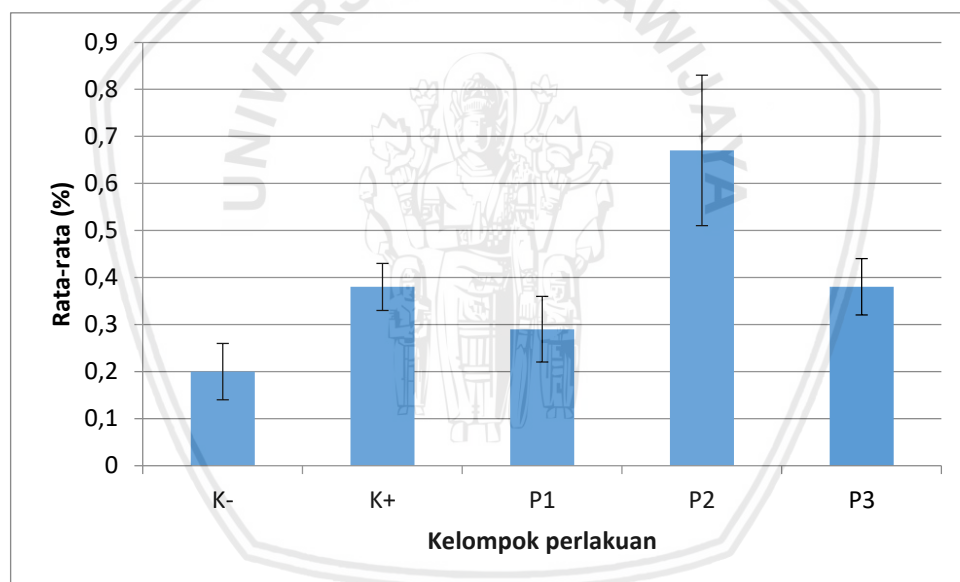
Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar relatif IFN- γ tidak berbeda nyata antar semua kelompok perlakuan. Secara rata-rata kontrol positif lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif.

Tabel 5.1 Rata-rata kadar relatif IFN- γ

Perlakuan	Rata-rata kadar Relatif IFN- γ $\pm$ SD (%)	Peningkatan Terhadap Kontrol Negatif
Kontrol Negatif	0,20 $\pm$ 0,06 ^a	-
Kontrol Positif	0,38 $\pm$ 0,05 ^a	0,9 %
Perlakuan 1	0,29 $\pm$ 0,07 ^a	0,45%
Perlakuan 2	0,67 $\pm$ 0,16 ^b	2,35%
Perlakuan 3	0,38 $\pm$ 0,06 ^a	0,9%

Respon alergi terjadi apabila individu terpapar suatu alergen atau antigen, pada hewan percobaan respon alergi dapat diinisiasi menggunakan substansi protein sebagai suatu alergen, salah satunya yaitu ovalbumin. Penelitian yang kami lakukan menggunakan yaitu mencit balb/c karena mencit strain tersebut dapat merangsang respon imun ke arah Th2 dominan lebih baik dari strain lainnya (Nials dan Udin, 2008).

Terjadi kenaikan rata-rata kadar relatif IFN- γ dibandingkan kontrol negatif pada perlakuan kontrol positif (**Gambar 5.1**). Hal tersebut disebabkan oleh pemberian OVA menyebabkan aktivasi sel fagosit yang akan menghasilkan IFN- γ . Sekresi IFN- γ pada jumlah yang besar menandakan bahwa tingginya aktivasi sel sel pro inflamasi yang berperan dalam proses inflamasi sebagai bentuk pertahanan dari antigen yang masuk kemudian merangsang sel imun untuk melakukan adhesi pada pembuluh darah dan menuju jaringan yang rusak. IFN- γ akan mengaktifkan makrofag untuk memulai proses fagositosis terhadap antigen (Teixeira, 2005).



Gambar 5.1 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi kadar relatif IFN- γ .

Keterangan :

K- : Kontrol Negatif

K+ : Tanpa pemberian preventif kefir

P1 : Preventif kefir 300mg/kgBB

P2 : Preventif kefir 600mg/kgBB

P3 : Preventif kefir 900mg/kgBB

IFN- γ yang disekresikan dalam jumlah berlebih dalam tubuh dapat menghambat proses re-epitelisasi pada usus, dengan merangsang ekspresi molekul adhesi pada permukaan sel epitel maupun endotel untuk dilanjutkan ke proses

fagositosis. Menurut Sica & Mantovani (2012), adanya interferon-gamma (IFN- γ) dan lipopolisakarida (LPS) atau ligan mikroba lainnya dari reseptor Toll-like (TLR) mengarah pada aktivasi makrofag klasik.

IFN- γ yang ditemukan pada individu dalam kondisi sehat atau normal, berperan dalam proses apoptosis, atau kematian sel yang terprogram. Kurangnya sitokin dalam menginduksi apoptosis sel-sel inflamasi, yang sering terjadi pada puncak respon inflamasi, dapat memicu resolusi inflamasi sehingga dapat dilanjutkan ke fase proliferasi dan membentuk jaringan baru (Ning Xu Lande'n dkk, 2016). IFN- γ juga telah diketahui dapat menurunkan produksi (*downregulate*) IL-4 dan IL-10 oleh sel Th2. IFN- γ juga dapat mengontrol produksi dan aktivasi sel Treg (CD4+ /CD25+ regulatory T cell). IFN- γ merupakan sitokin utama MAC dan berperan terutama dalam imunitas non spesifik dan spesifik selular. IFN- γ disebut interferon tipe II yang diproduksi oleh sel Th1 dan sel NK. IFN- γ pada kondisi normal dapat menghambat ekspresi sitokin inflamasi dan merupakan aktivator utama makrofag (Teixeira dkk, 2005).

Reaksi sel T helper yang disebabkan oleh alergen tidak terbatas hanya pada sub tipe Th2, sebagaimana sel Th1 dan T17 juga berperan dalam reaksi inflamasi. IFN- γ yang disekresikan oleh sel Th1 diperlukan untuk induksi respon Th2 yang efisien (Hyun Jo, dkk, 2016). Limfosit Th1 dan sitokin seperti IFN- γ dan IL-12 dapat menangkal dan menekan respons Th2 dari manifestasi klinik alergi. Resolusi alergi tidak terkait dengan pengurangan produksi sitokin Th2, tetapi dengan normalisasi tingkat IFN- γ (Smart dkk, 2002).

Hasil IFN- γ perlakuan P2 dan P3 sama dengan kontrol positif hingga lebih tinggi terhadap kontrol positif (**Gambar 5.1**). Hal ini disebabkan oleh

pemberian kefir pada dosis tersebut belum dapat memberikan pengaruh terhadap penurunan kadar relatif IFN- γ akibat induksi OVA. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Wisudanti (2017), yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi kefir yang diberikan, semakin tinggi IFN- γ yang diekskresikan, namun tidak berpengaruh secara signifikan.

Perlakuan 1, dimana diberikan preventif kefir sebanyak 300mg/kgBB, diperoleh hasil kadar relatif IFN γ yang paling mendekati kadar normal. Hal tersebut dikarenakan terdapat zat aktif yang terkandung dalam kefir salah satunya yaitu laktoferin. Laktoferin dapat meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada sel-sel endotel, menyebabkan infiltrasi leukosit di situs peradangan, sehingga dapat mempercepat proses inflamasi (Kim dkk, 2012). Laktoferin terlibat dalam penekanan sitokin proinflamasi dan induksi interferon α / β (IFN / β), dan mempengaruhi kemampuan makrofag untuk menyajikan antigen ke sel T CD4 + dalam resistensi adaptif (Latorre dkk, 2010). ; Siqueiros-Cendón dkk., 2014). Laktoferin bertindak sebagai anti-inflamasi yang ditunjukkan dengan penghambatan sitokin Tumor Necrosis Factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) dan interferon γ (IFN- γ) (Ebringer dkk, 2008).

Laktoferin tidak hanya menstimulasi fungsi sel dendritik, tetapi juga mengaktivasi APC dan respon imun spesifik antigen (Siqueiros-Cendón et al., 2014). Menurut Vinderola dkk (2006), kefir yang diinduksi secara per-oral pada mencit selama 2-7 hari, IFN- γ dan TNF- α meningkat pada awal induksi, namun, mereka dengan cepat menurun kembali ke tingkat kontrol pada hari ke 7 bersamaan dengan IL-1 α sementara tingkat IL-6 dan IL-10 tetap tinggi selama periode pemberian makan 7 hari.

5.2 Efek Preventif Kefir Susu Kambing Pada Mencit Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif CD68

Hasil menunjukkan tidak berbeda signifikan antara semua kelompok perlakuan terhadap kadar relatif CD68. Secara rata-rata kontrol positif lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif.

Tabel 5.2 Rata-rata kadar relatif CD68

Perlakuan	Rata-rata kadar Relatif CD68 $\pm$ SD (%)	<u>Kadar Relatif CD68 (%)</u>	
		Peningkatan terhadap Kontrol Negatif	Penurunan terhadap Kontrol Negatif
Kontrol Negatif	8,47 $\pm$ 0,46	-	-
Kontrol Positif	9,74 $\pm$ 1,3	0,14%	-
Perlakuan 1	9,2 $\pm$ 0,19	0,08%	-
Perlakuan 2	9,34 $\pm$ 0,91	0,10%	-
Perlakuan 3	7,79 $\pm$ 1,3	-	0,08%

Kenaikan kadar relatif CD68 pada kontrol positif merupakan respon makrofag yang berperan pada proses inflamasi untuk memproses antigen yang masuk, yaitu induksi ovalbumin. Menurut Murray (2011) makrofag adalah sel imun bawaan yang memainkan peran penting dalam fase awal pertahanan *host* melawan patogen, koordinasi respon imun adaptif, dan pengaturan peradangan dan perbaikan jaringan. Makrofag mempunyai peran penting untuk menghilangkan neutrofil pada jaringan, dimana hal tersebut merupakan syarat untuk melanjutkan ke fase proliferasi. Menurut N. Xu Lande'n dkk (2016) setelah terpapar sitokin proinflamasi seperti IFN- γ , monosit akan infiltrasi dan makrofag diaktifkan dan memfagosit mikroba, dan menghasilkan mediator proinflamasi,

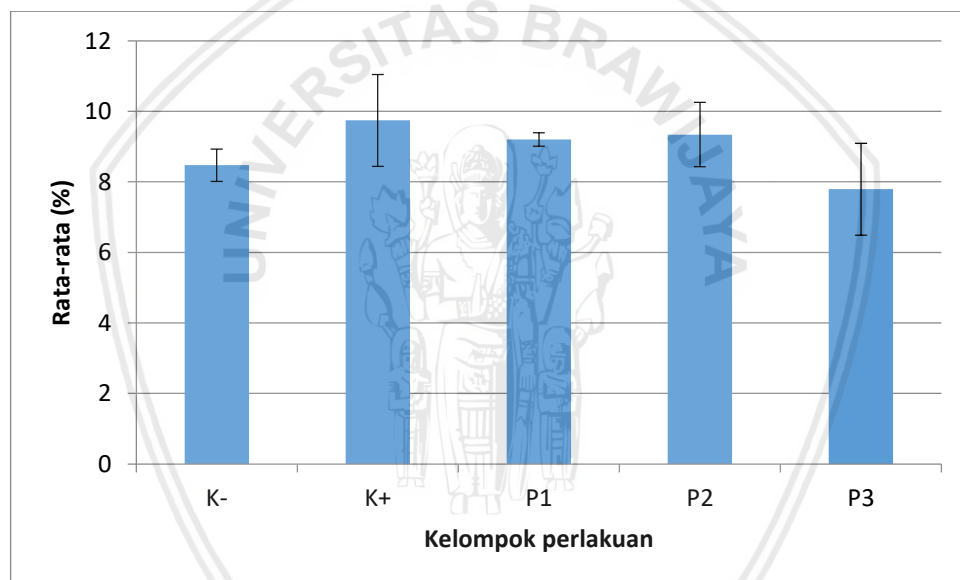
seperti IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), serta kemokin untuk merekrut leukosit tambahan.

Kadar relatif CD68 pada kontrol negatif mengalami kenaikan yang tidak signifikan dibandingkan dengan kontrol positif (**Gambar 5.2**), hal ini dikarenakan pada kondisi sehat sudah terdapat makrofag, namun dalam keadaan matur tetapi belum teraktivasi oleh antigen. Makrofag berasal dari sel prekursor dari sum-sum tulang, dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi ke dalam jaringan ikat tempat mereka menjadi matang dan inilah yang disebut makrofag. Di dalam jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak (Effendi, 2003).

Hasil dari perlakuan P1, P2, dan P3 mengalami penurunan dibandingkan dengan kontrol positif, tetapi perlakuan P1 secara rata-rata mendekati kontrol negatif (**Gambar 5.2**), hal ini dikarenakan oleh bakteri asam laktat pada kefir dapat menginduksi produksi sitokin, serta dapat mempengaruhi fungsi kekebalan sel lainnya seperti makrofag dan granulosit yang terkait dengan situs mukosa. Selain BAL, laktoferin dalam kefir berperan sebagai anti-inflamasi pada suatu jaringan. Laktoferin akan menghambat aktivasi dari monosit dan sel dendrit ketika terjadi inflamasi. Monosit yang tidak teraktivasi akan menyebabkan sitokin pro-inflamasi tidak dapat terekspresi saat terjadi proses inflamasi (Pabst dkk, 2008).

Perlakuan P2 secara rata-rata mengalami sedikit penurunan dari kontrol positif (**Tabel 5.2**). Hal tersebut merupakan respon imun tubuh yang bekerja setelah terpapar oleh ovalbumin yang diinduksi. Sehingga sel imun mengaktifkan makrofag untuk melakukan proses fagositosis. Hasil yang didapatkan pada

perlakuan P3, kadar relatif CD68 cenderung mengalami penurunan dibandingkan kontrol negatif (**Tabel 5.2**). Kondisi ini menunjukkan bahwa dosis kefir pada perlakuan P3 hanya sedikit mengaktivasi monosit menjadi makrofag, sehingga makrofag tidak terkspresikan dan menghambat aktivitas fagositosis, yang dapat memperlambat proses inflamasi ke fase proliferasi dan remodelling. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Perdigon, yang menyatakan bahwa pemberian bakteri asam laktat secara intraperitoneal dan per oral pada dosis bertingkat dapat meningkatkan aktivitas fagositosis.



Gambar 5.2 Histogram nilai *mean* dan standar deviasi kadar relatif CD68.

Keterangan :

- K-** : Kontrol Negatif
- K+** : Tanpa pemberian preventif kefir
- P1** : Preventif kefir 300mg/kgBB
- P2** : Preventif kefir 600mg/kgBB
- P3** : Preventif kefir 900mg/kgBB

Fungsi makrofag dikendalikan oleh sel T yang diaktifkan. IFN- γ dan TNF- α terlibat dalam aktivasi makrofag. Peningkatan aktivitas fagositik makrofag peritoneum, tetapi produksi IFN- γ yang rendah, dapat diamati setelah 2 hari pemberian kefir. Peningkatan aktivitas fagosit ini bisa disebabkan oleh keadaan

aktivasi alternatif makrofag yang berbeda dari aktivasi tipe Th1 klasik oleh IFN- γ , yang akan dimediasi oleh sitokin Th2 IL-4 dan IL-13 (Vinderola dkk, 2005).

Bibit kefir secara spesifik memproduksi asam laktat, antibakteri dan beberapa bakterisida, yang dapat menghambat proliferasi mikroorganisme patogen dan perusak pada produk kefir. BAL dalam kefir bermanfaat di bidang kesehatan yakni sebagai probiotik penghasil senyawa antimikroba seperti bakteriosin, hidrogen peroksida dan berbagai antibiotik yang menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan, meningkatkan fungsi pencernaan serta penyerapan nutrisi makanan (Bahar, 2008).

Menurut penelitian Davras dkk (2018), kefir yang diberikan selama 7 hari dapat meningkatkan produksi IgA pada mukosa yang berfungsi untuk menetralkan antigen dan meningkatkan produksi mukus yang akan menjebak antigen dan mencegah adanya adhesi pada epitel intestin. BAL menginduksi makrofag peritoneal untuk meningkatkan kapasitas fagositiknya (Perdigon, 2001). BAL juga memodulasi ekspresi molekul permukaan sel yang terlibat dalam penyerapan bakteri oleh leukosit. Kefir memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan tumor dan meningkatkan total IgA pada usus halus tikus uji (Liu et al. 2005). Bakteri probiotik dan mukosa usus bertindak sinergis dalam imunomodulasi. Bakteri probiotik memberikan efek menguntungkan melalui kolonisasi dan pelepasan campuran bioaktif pada epitel usus,. Kemudian memperkuat fungsi barrier melalui modulasi sel epitel usus termasuk pelepasan sitokin dan kemokin. Keadaan sistem kekebalan usus yang baik akan mempengaruhi sistem kekebalan tubuh secara keseluruhan (Hadisaputro dkk, 2012).

Kandungan yang terdapat dalam kefir selain laktoferin dan BAL, yaitu khamir seperti *Saccharomyces boulardii*, dapat mengurangi inflamasi pada intestin. Khamir lain seperti *Kluyveromyces marxianus* juga memiliki efek imunomodulator yang bisa menurunkan produksi sitokin proinflamasi sehingga mempercepat fase inflamasi menuju fase selanjutnya yaitu proliferasi dan dilanjutkan remodelling jaringan baru (Bourrie dkk., 2016).



BAB VI PENUTUP

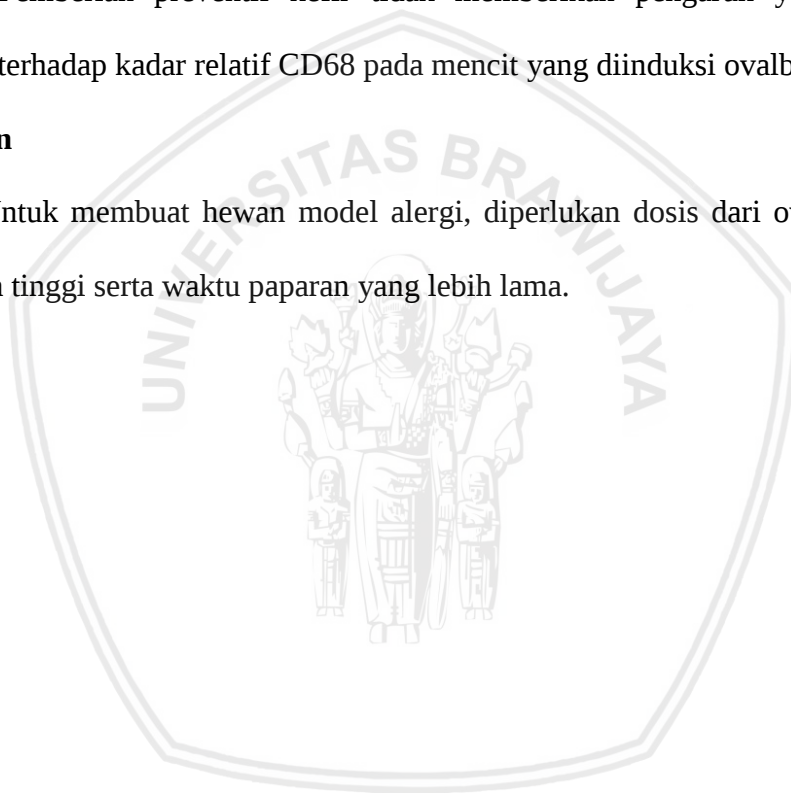
6.1 Kesimpulan

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

1. Pemberian preventif kefir tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar relatif IFN- γ pada mencit yang diinduksi ovalbumin.
2. Pemberian preventif kefir tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar relatif CD68 pada mencit yang diinduksi ovalbumin.

6.2 Saran

Untuk membuat hewan model alergi, diperlukan dosis dari ovalbumin yang lebih tinggi serta waktu paparan yang lebih lama.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas Ak, Lichtmann Ah, Pillai S. Cytokines. 2015. *In: Cellular And Molecular Immunology. 8th Ed.* Elsevier Inc.; 2015:493-5.
- Aldi Y, E Nasrul, Yanwirasti, D Handayani, dan A Bakhtiar. 2013. *Pengaruh Skopoletin Dari Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Terhadap Jumlah IgE Mencit Jantan Dengan Hipersensitivitas Tipe I.* Padang: Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Bahar, B. 2008. *Kefir. Minuman Susu Fermentasi dengan Segudang Khasiat Untuk Kesehatan.* P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Baratawidjaya Kg, Rengganis I. 2010. *Imunologi Dasar (Edisi Ke 9).* Jakarta: Fkui, 2010; P. 226
- Barlianto W, MSC Kusuma, S Karyono, K Mintaroem. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol 25, No 1 (2009), pp.1-5
- Barrientos S, O Stojadinovic, MS Golinko, H Brem, M Tomic-Canic. *Growth factors and cytokines in wound healing.* *Wound Rep Reg* (2008) 16 585–601 2008 by the Wound Healing Society
- Berin MC and L Mayer. 2008. *Immunophysiology of experimental food allergy.* *Mucosal Immunology* Vol 2 No 1: Nature Publishing Group
- Brian P. Vickery, M.D.a, Stacy Chin, M.D.b, and A. Wesley Burks, M.D. 2011. *Pathophysiology of Food Allergy.* NIH Public Access: *Pediatr Clin North Am* . 2011 April ; 58(2): 363–376.
- Bonnet B, G Churlaud, D Klatzmann, B Bellier, T Vazquez, F Pitoiset, F Brimaud, J Vigneron and B Levacher. 2018. *Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell.* *J Immunol* 2016; 197:188-198
- Bourrie BCT, BP Willing and PD Cotter. 2016. *The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir.* *Frontiers in Microbiology* Vol. 7

- Castellazzi AM, C Valsecchi, Silvia and David Caimi, A Licari, Alessia and Gian Luigi Marseglia, MC Leoni, MM Giudice, S Leonardi, ML Rosa. 2013. *Probiotics and Food Allergy*. Italian Journal Pediatrics 2013
- Cendon S, A Gallegos, Iglesias FBF, G Montoya, Salazar MJ, Rascon CQ. 2014. *Immunomodulatory effects of lactoferrin*. Acta Pharmacologica Sinica (2014) 35: 557-566
- Chehade M, Mayer L. 2005. *Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities*. J Allergy Clin Immunol. 2005; 115(1):3–12. [PubMed: 15637539] 10.
- Chistiakov DA, MC Killingsworth, VA Myasoedova, AN Orekhov and YV Bobryshev. 2016. *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. Laboratory Investigation Vol. 97 January 2017
- Conneely OM. *Anti-inflammatory Activities of Lactoferrin*. Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas
- Coombes JL, Powrie F. 2008. *Dendritic cells in intestinal immune regulation*. Nat Rev Immunol. Jun; 2008 8(6):435–446. [PubMed: 18500229] 11.
- Dewi SU, MS Djati, M Rifa'i. 2013. *Analisa Flow Cytometry pada Subpopulasi Sel T-Limfosit Bursa Fabricius Ayam Pedaging Pasca Infeksi Salmonella typhimurium dan Pemberian Pakan Tambahan Polyscias obtuse*. Jurnal Biotropika Vol. 1 No. 5
- Ebringer L, M. Ferencik, J Krajcovic. 2008. *Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products*. September 2008. Folia Microbiologica 53(5):378-394
- Edwin. 2002. *Khasiat Yoghurt Untuk Pengobatan*. Harian Pikiran Rakyat
- Endaryanto A, A Harsono. 2005. *Prospek Probiotik dalam pencegahan alergi melalui induksi aktif toleransi imunologis*. h1-12
- Elshemy A , M Abobakr. 2013. *Allergic Reaction: Symptoms, Diagnosis, Treatment and Management*. Journal Of Scientific & Innovative Research Vol 2 Issue 1 ISSN: 2230-4818

- Faria AMC, Weiner HL. 2005. *Oral tolerance*. Immunol Rev. 2005; 206(1):232–259. [PubMed: 16048553]
- Febrisiantosa A. 2013. *Karakteristik Whey Kefir Dan Aktivitas Terhadap Penghambatan Angiotensin Converting Enzyme (ACE)*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Flaherty, D. 2012. *Immunology for Pharmacy*. Elsevier
- Galli SJ, M Tsai, and AM Piliponsky. 2008. *The development of allergic inflammation*. Nature . 2008 July 24; 454(7203): 445–454
- Gould HJ, Sutton BJ. 2008. *IgE in allergy and asthma today*. Nat Rev Immunol. Mar; 2008 8(3):205–17. [PubMed: 18301424]
- Hadisaputro Suharyo , R.R.J. Djokomoeljanto , Judiono , Marsetyawan H.N.E. Soesatyo. 2012. *The Effects of Oral Plain Kefir Supplementation on Proinflammatory Cytokine Properties of the Hyperglycemia Wistar Rats Induced by Streptozotocin*. Acta Medica Indonesiana - The Indonesian Journal of Internal Medicine Vol 44 Number 2 April 2012
- Huntington, J.A.; Stein, P.E. *Structure and properties of ovalbumin*. Journal of Chromatography B 2001, 756, 189–198
- Jiang Z, L Zhu. 2016. *Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma*. Journal of Asthma and Allergy 2016;9 101–107
- Jo SH, YJ Lee, DG Kang, HS Lee, DK Kim, and MC Park. 2016. *Effects of Sohamhyoong-Tang on Ovalbumin-Induced Allergic Reaction in BALB/c Mice*. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2016, Article ID 6286020, 9 pages
- Johnston LK, KB Chien and PJ Bryce. 2014. *The Immunology of Food Allergy*. J Immunol 2014; 192:2529-2534
- Kanwar JR dan RK, K Roy, Y Patel, Zhou SF, MR dan D Singh, M Nasir, R dan A Sehgal, S Garg. 2015. *Multifunctional Iron Bound Lactoferrin and Nonmedicinal Approaches to enhance its Bioactive functions*. Molecules 2015, 20(6), 9703-9731
- Kim CW, TH Lee, KH Park, SY Choi, JY. 2012. *Kim Human lactoferrin suppresses TNF- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via*

competition with NF- κ B in endothelial cells. Elsevier FEBS Letters 586 (2012) 229–234

Koh TJ and LA DiPietro. 2013. *Inflammation and wound healing: The role of the macrophage.* NIH Public Access Expert Rev Mol Med . ; 13: e23.

Kresno SB. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.* Jakarta: Balai Penerbit FKUI.

Kumar, R.K., C.Harbet, And P.S. Foster. 2008. *The “Classical”Ovalbumin Challenge Model Of Asthma In Mice.* Curr Drug Targets 9:485-94.

Lande'n NX, D Lil, M Sta'hle. 2016. *Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing.* Cell. Mol. Life Sci. (2016) 73:3861–3885

Latorre I, XM Lacasa, J Dominguez. 2010. *IFN- γ response on T-Cell based assays in HIV-infected patients for detection of tuberculosis infection.* BMC infectious Disease: BioMed Central

Levinson W. 2014. Hypersensitivity (Allergy). In: *Review Of Medical Microbiology And Immunology.* Vol 1. 13th Ed. San Francisco: Mcgrawhill Education; 2014:1195-202. 5

Lewis T. 2017. *Diagnosing Food Allergies In Dogs And Cats—Bring Your Case To Trial An Elimination Diet Trial Is The Only Way To Diagnose A Food Allergy In A Dog Or Cat.* [Http://Veterinarymedicine.Dvm360.Com/Diagnosing-Food-Allergies-Dogs-And-Cats-Bring-Your-Case-Trial](http://Veterinarymedicine.Dvm360.Com/Diagnosing-Food-Allergies-Dogs-And-Cats-Bring-Your-Case-Trial). Diakses 21 November, 2018

Liu Yufang and Monika Pischetsrieder, *Identification and relative quantification of bioactive peptides sequentially released during simulated gastrointestinal digestion of commercial kefir*, J. Agric. Food Chem, Vol.65, pp1865-1873, Feb, 2017

Mahajan S and AA MEHTA. 2006. *Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma.* 1735-2657/06/51-1-14 Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics. Razi Institute for Drug Research (RIDR) IJPT 5:1-14, 2006

Meilandani, S. 2014. *Prolifersi Limfosit Pada Mencit Balb/C Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Ubi Jalar Ungu (Ipomoea batatas L.) Diinduksi Ovalbumin.* Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

- Minard. 2000. *Isolation Of Casein, Lactose, And Albumin From Milk*. [Http://Courses.Chem.Psu.Edu/Chem36/Web%20syn06/Exp112syn06.Pdf](http://Courses.Chem.Psu.Edu/Chem36/Web%20syn06/Exp112syn06.Pdf). Diakses 10 November, 2018.
- Muliani H. 2011. *Pertumbuhan Mencit (Mus Musculus L.) Setelah Pemberian Biji Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Buletin Anatomi dan Fisiologi Vol. XIX, No. 1, Maret 2011
- Murray, PJ and TA. Wynn. 2011. *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol. Author manuscript. Nat Rev Immunol. ; 11(11): 723–737.
- Nazimek K, W Ptak, J Marcinkiewicz, K Bryniarski. 2013. *Macrophage Function in Allergic and Autoimmune Responses*. Journal of Physical Therapy and Health Promotion Dec. 2013, Vol. 1 Iss. 1, PP. 36-45
- Nials A.T, S. Uddin. 2008. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Disease Models & Mechanisms* 2008 1: 213-220
- Ningrum TS, S Suprihati, dan YI Santosa. 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. Volume 5, Nomor 4, Oktober 2016
- Olivier CE. 2013. *Food Allergy*. Journal of Allergy & Therapy 10.4172/2155-6121.S3-004
- Özdemir Ö. 2010. *Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data*. British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology, 160: 295–304
- Pabst MJ, KM Pabst, DB Handsman, S Beranova-Giorgianni, and F Giorgianni. 2008. *Proteome of monocyte priming by lipopolysaccharide, including changes in interleukin-1beta and leukocyte elastase inhibitor*. Proteome Sci. 2008 May 20;6:13. doi: 10.1186/1477-5956-6-13
- Raphael I, S Nalawade, TN Eagar, and TG Forsthuber. 2015. *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine. 2015 July ; 74(1): 5–17.

- Seymour BWP, LJ Gershwin, and RL Coffman. 1998. *Aerosol-induced Immunoglobulin (Ig)-E Unresponsiveness to Ovalbumin Does Not Require CD8 or T Cell Receptor (TCR) T Cells or Interferon (IFN) γ in a Murine Model of Allergen Sensitization*. J. Exp. Med. The Rockefeller University Press • 0022-1007/98/03/721/11 Volume 187, Number 5, March 2, 1998 721–731
- Sia, C and A Hänninen. 2010. *Functional Alterations of Proinflammatory Monocytes by T Regulatory Cells: Implications for the Prevention and Reversal of Type 1 Diabetes*. The Review of Diabetic Studies Vol. 7 · No. 1 · 2010
- Sica A and A Mantovani. 2012. *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. The Journal of Clinical Investigation. : J Clin Invest. 2012;122(3):787–795
- Safitri MF, A Swarastuti. 2013. *Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Kefir Grain*. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro: Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan Vol.2 No.2
- Sawitri ME. 2011. *Kajian Konsentrasi Kefir Grain dan Lama Simpan Dalam Refrigerator Terhadap Kualitas Kimiawi Kefir Rendah Lemak*. JIIPB 2011 Vol 21 No 23-28
- Shaikh PZ. 2011. *Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review*. Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), Vol. 2, Issue 11: Nov.: 2011, 1247-1263 1247
- Smart JM, AS Kemp. 2002 *Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease*. Clinical & Experimental Journal.
- Smith KM, RS Rahman and LA Spencer. 2016. *Humoral Immunity Provides Resident Intestinal Eosinophils Access to Luminal Antigen via Eosinophil-Expressed Low-Affinity Fc γ Receptors*. J Immunol. 2016 November 1; 197(9): 3716–3724.
- Stone KD, C Prussin, and DD. Metcalfe. 2010. *IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils*. J Allergy Clin Immunol. 2010 February ; 125(2 Suppl 2): S73–S80.
- Sun WY., DP. Dimasi, MR. Pitman, YZ Zhuang, R Heddle, SM. Pitson, MA Grimbaldston and CS. Bonder. 2016. *Cutaneous Inflammation Topical*

Application of Fingolimod Perturbs. The Journal of Immunology. J Immunol published online 21 March 2016.

Teixeira LK, BPF Fonsec, BA Barboza, JPB Viola. 2005. *The role of interferon- γ on immune and allergic responses*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 100(Suppl. I): 137-144, 2005

Trybek G, Marcin M, Kamila S, MA Włodarczyk, O Preuss, K Grocholewicz, B Wiszniewska. 2016. *The Biological Properties Of Lactoferrin*. Central European Journal of Sport Sciences and Medicine Vol. 15, No. 3/2016: 25–35

Vinderola G, G Perdigon, J Duarte, E Farnworth, and C Matar. 2006. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. J Dairy Res. 2006 Nov;73(4):472-9. Epub 2006 Jul 7.

Wang XY, Guo Hy, Zhang W, Wen PC, Zhang H, Guo ZR, Ren FZ. 2013. *Effect of iron saturation level of lactoferrin on osteogenic activity in vitro and in vivo*. JDairy Sci. 2013 Jan; 96(1):33-9

Wahdania F, dan A Pramono. 2012. *Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi Terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus Jantan Sprague Dawley*. Journal of Nutrition College, Volume 1, Nomor 1, Tahun 2012, Halaman 224-228

Wahyuniati, Nur. 2017. *PERAN INTERFERON GAMMA PADA INFEKSI Mycobacterium tuberculosis* Jurnal Kedokteran Syiah Kuala ISSN: 1412-1026 Volume 17, Number 2, Agustus 2017 Pages: 126-132

Willemse, T. 2015. Food Allergy In Dogs And Cats. *Proceedings Of The 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference Cuvc 2015: Responsible For Lives* April 20-22, 2015, Bangkok, Thailand

Wisudanti DD. 2017. *The effect of Kefir on The Immune Response of Healthy Volunteers In Vitro*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Yuniastuti, A. 2014. *Buku Monograf Probiotik (Dalam Perspektif Kesehatan)*. Semarang : Unnes Press, Cetakan Pertama April 2014

Zubir Z, HM Sitorus. 2010. *Patofisiologi alergi makanan*. Divisi Pulmonologi dan Alergi Imunologi Fakultas Kedokteran Departemen Ilmu Penyakit Dalam RS.H.Adam Malik Medan

Lampiran 1. Laik Etik No : 959-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 959-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : EFEK PREVENTIF KEFIR PADA HEWAN MODEL
ALERGI INTESTINE MENCIT (*Mus musculus*) Balb/c
YANG DIINDUKSI OVA TERHADAP KADAR RELATIVE
Ig-E DAN JUMLAH SEL EOSINOFIL

PENELITI : DAHLIATUL QOSIMAH

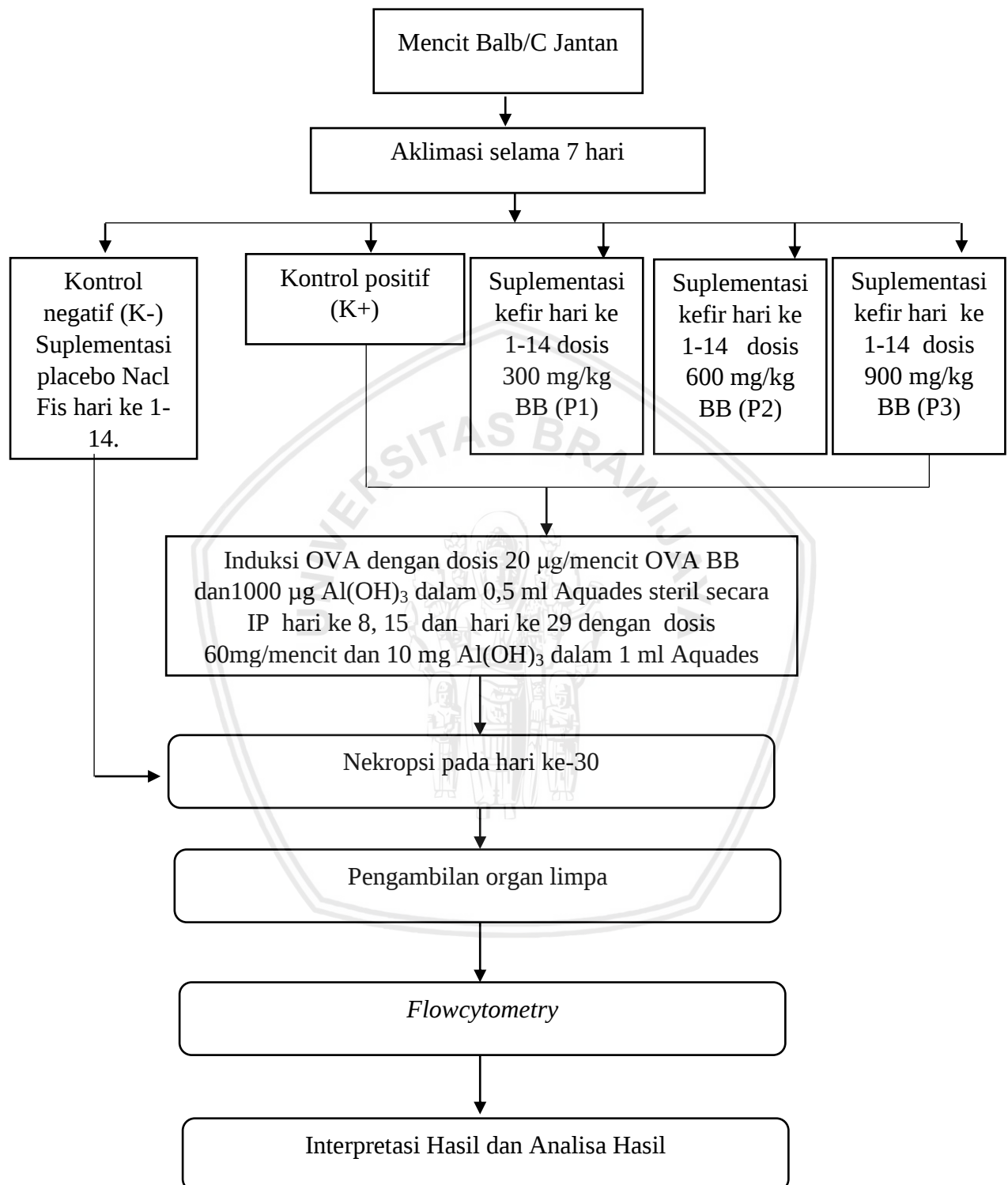
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 22 Mei 2018
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. h. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 2. Kerangka Operasional Penelitian

Lampiran 3. Perhitungan Dosis

1. Kefir

Dosis 1 (P1) : 300 mg/kgBB ad Nacl Fisiologis 0,5 ml

Dosis 2 (P2) : 600 mg/kgBB ad Nacl Fisiologis 0,5 ml

Dosis 3 (P3) : 900 mg/kgBB ad Nacl Fisiologis 0,5 ml

- Minggu 1

o Berat badan

P1 : 38 gr

P3 : 43 gr

P2 : 43 gr

o Dosis

1 g = 1 ml

$$P1 : \frac{300 \text{ mg/Kg} \times 38 \text{ g}}{1000} = 11,4 \text{ mg} = 0,0114 \text{ g} = 11,4 \mu\text{l}$$

$$P2 : \frac{600 \text{ mg/Kg} \times 43 \text{ g}}{1000} = 25,8 \text{ mg} = 0,0258 \text{ g} = 25,8 \mu\text{l}$$

$$P3 : \frac{900 \text{ mg/Kg} \times 43 \text{ g}}{1000} = 38,7 \text{ mg} = 0,0387 \text{ g} = 38,7 \mu\text{l}$$

- Minggu 2

o Berat badan

P1 : 38 gr

P2 : 42 gr

P3 : 39 gr

○ Dosis

$$1 \text{ g} = 1 \text{ ml}$$

$$P1 : \frac{300 \text{ mg/Kg} \times 38 \text{ g}}{1000} = 11,4 \text{ mg} = 0,0114 \text{ g} = 11,4 \mu\text{l}$$

$$P2 : \frac{600 \text{ mg/Kg} \times 42 \text{ g}}{1000} = 25,2 \text{ mg} = 0,0252 \text{ g} = 25,2 \mu\text{l}$$

$$P3 : \frac{900 \text{ mg/Kg} \times 39 \text{ g}}{1000} = 35,1 \text{ mg} = 0,0351 \text{ g} = 35,1 \mu\text{l}$$

2. Ovalbumin

a. Intraperitoneal hari ke 8 dan 15 dosis 20 μ g/mencit ovalbumin, 1000 μ g/mencit Al(OH)₃. Volume intraperitoneal 0,5 ml/ mencit.

Stock : 1 mg/ ml

$$1000 \mu\text{g} / 1000 \mu\text{l}$$

$$1 \mu\text{g} / 1 \mu\text{l}$$

Kebutuhan volume total : 12 ekor x 0,5 ml x 2 induksi = 12 ml ~ 15 ml

Dosis : Ovalbumin

$$M_1 \quad V_1 = M_2 \quad V_2$$

$$1000 \mu\text{g} \quad V_1 = 20 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,3 \text{ ml stock}$$



Stock 1 μ g/ 1 μ l

$$M_1 \quad V_1 = M_2 \quad V_2$$

$$1 \mu\text{g} \quad V_1 = 1000 \mu\text{g} \cdot 15 \text{ ml}$$

$$V_1 = 15.000 \mu\text{g} = 15 \text{ mg}$$

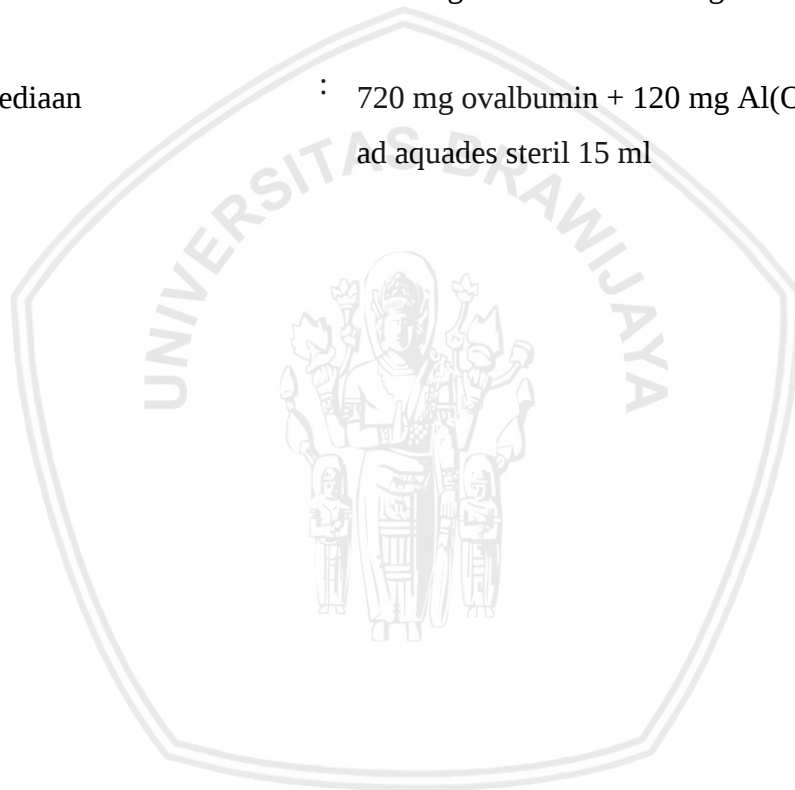
Sediaan : 0,3 ml stock ovalbumin + 15 mg Al(OH)₃
ad aquades steril 15 ml

b. Per oral hari ke 29 dosis 60 mg/ mencit ovalbumin

Kebutuhan volume total : 12 ekor x 1 ml = 12 ml ~ 15 ml

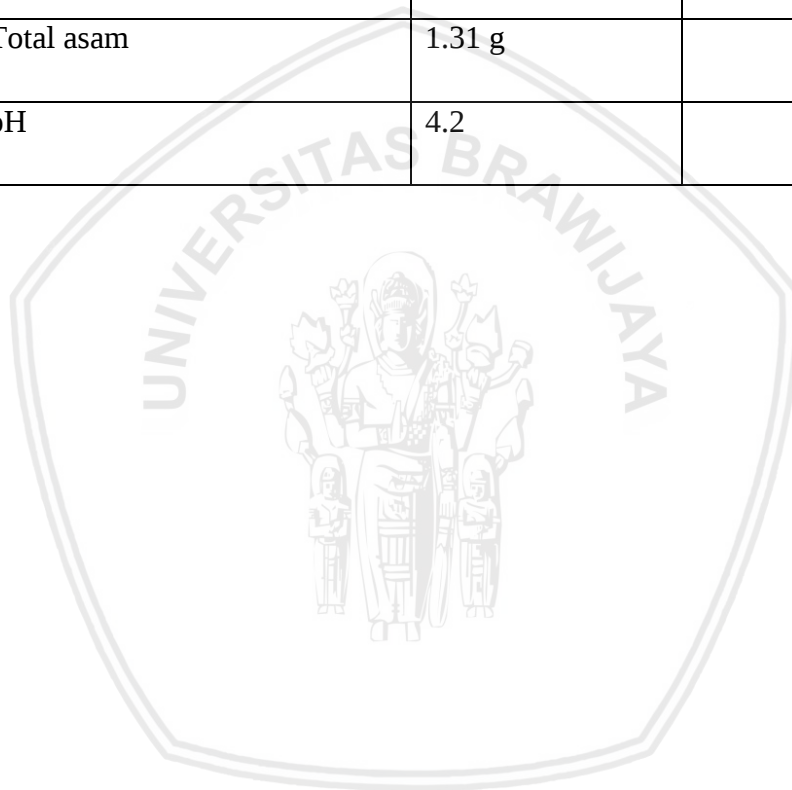
Dosis : Ovalbumin
= 60 mg/ekor x 12
= 720 mg
 Al(OH)_3
= 10 mg/ekor x 12 = 120 mg

Sediaan : 720 mg ovalbumin + 120 mg Al(OH)_3
ad aquades steril 15 ml

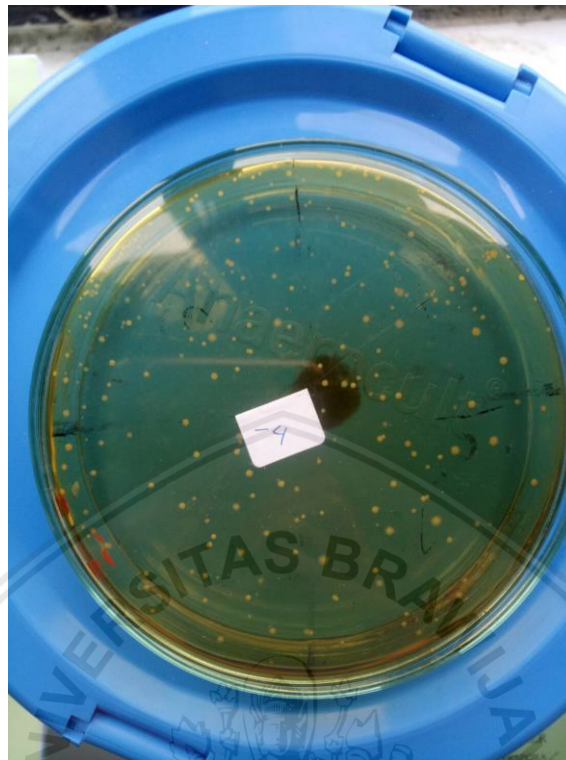


Lampiran 4. Hasil Uji Proksimat Kefir

No	Nama Bahan	Jumlah	%AKG*
1.	Lemak Total	2.96 g	4.55 %
2.	Protein	4.27 g	8.54 %
3.	Karbohidrat Total	3.56 g	1.19 %
4.	Total Gula	2.10 g	
5.	Total asam	1.31 g	
6.	pH	4.2	



Lampiran 5. Identifikasi bakteri Asam Laktat pada media MRSA

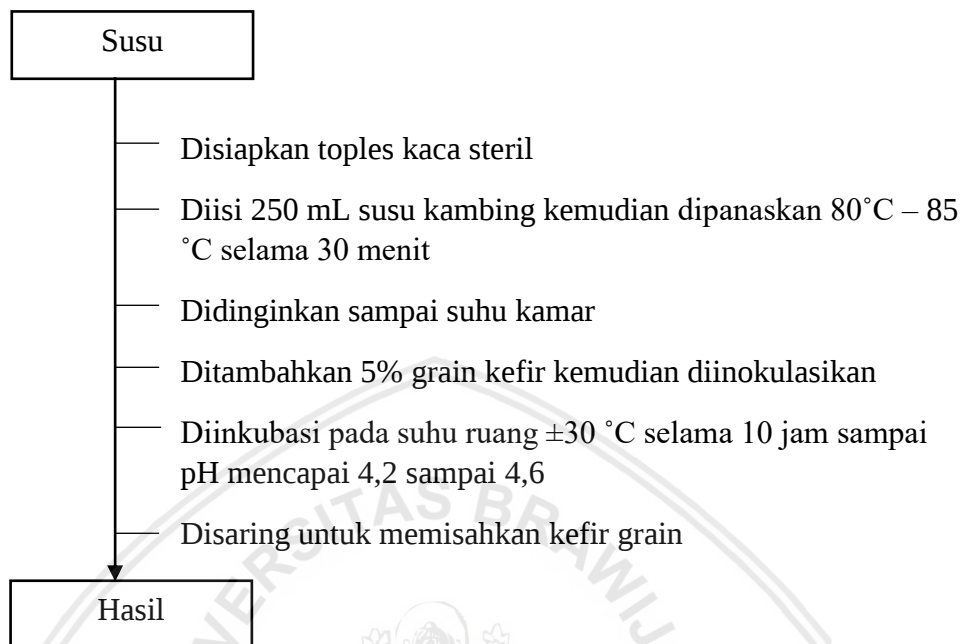


Hasil : Positif bakteri Asam Laktat

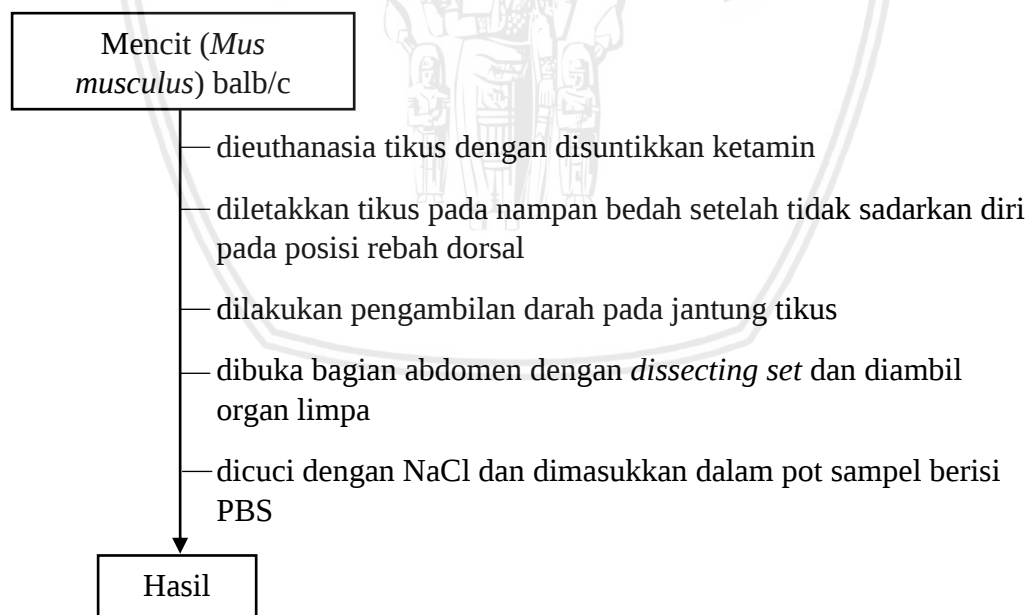
Tumbuh koloni bakteri pada media MRSA

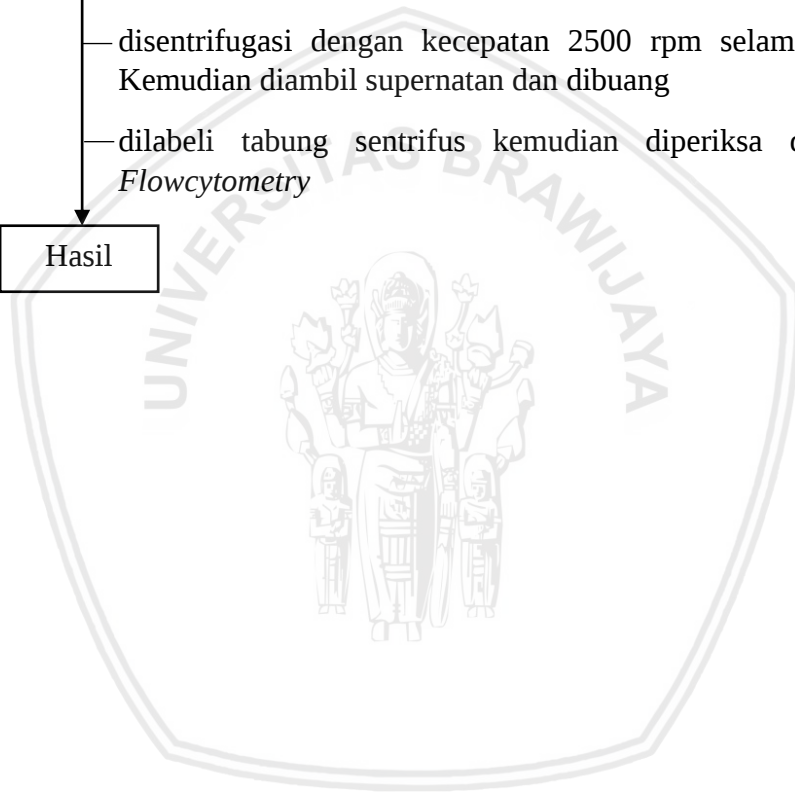
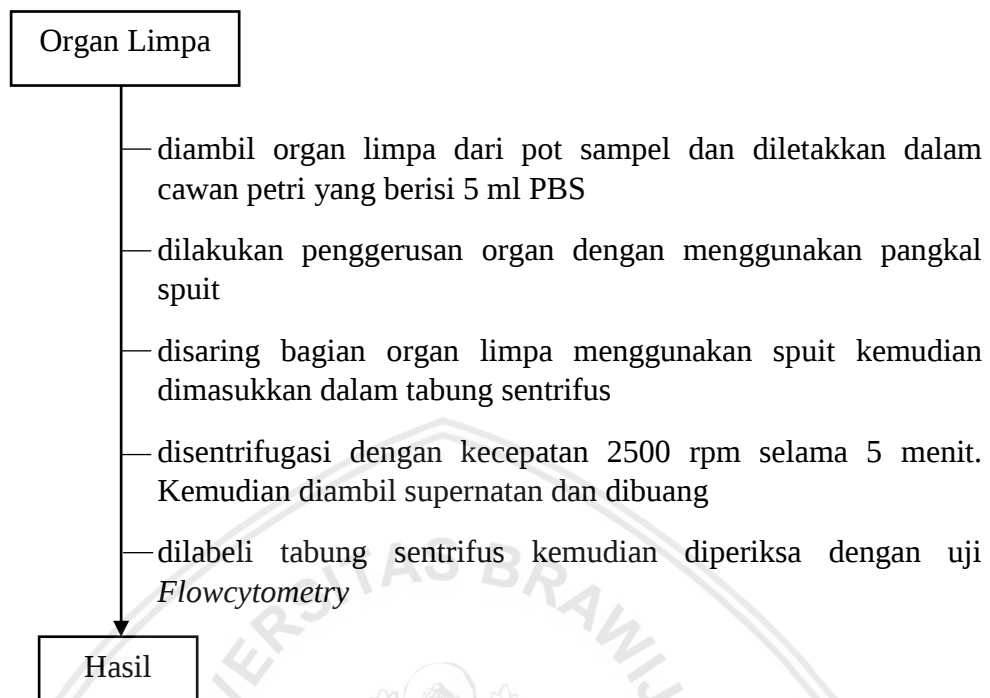
Lampiran 6. Langkah Kerja Penelitian

a. Pembuatan Kefir

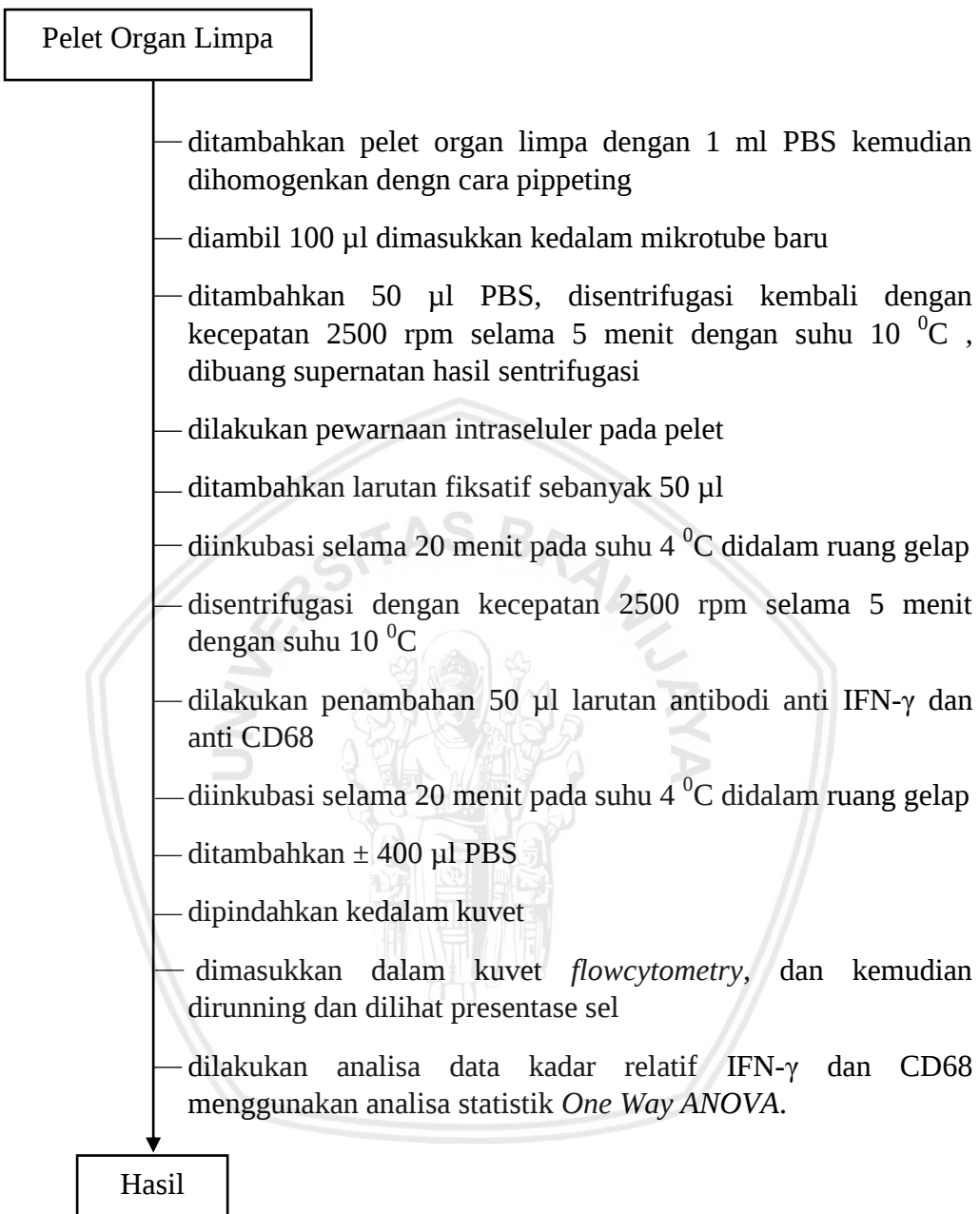


b. Pembedahan Hewan Coba



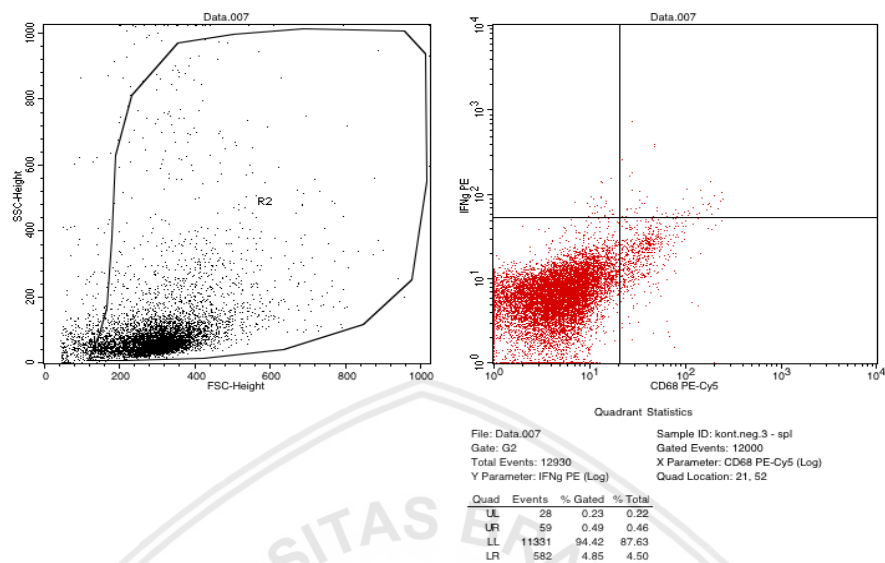
c. Preparasi Limpa untuk Pemeriksaan *Flowcytometry*

d. Pemeriksaan *Flowcytometry*

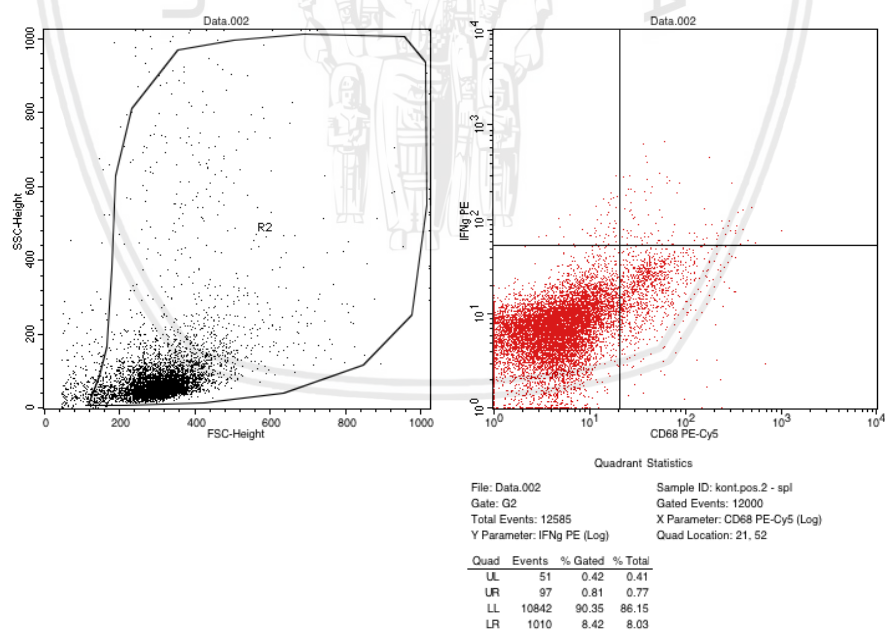


Lampiran 7. Hasil *Flowcytometry* IFN- γ dan CD68

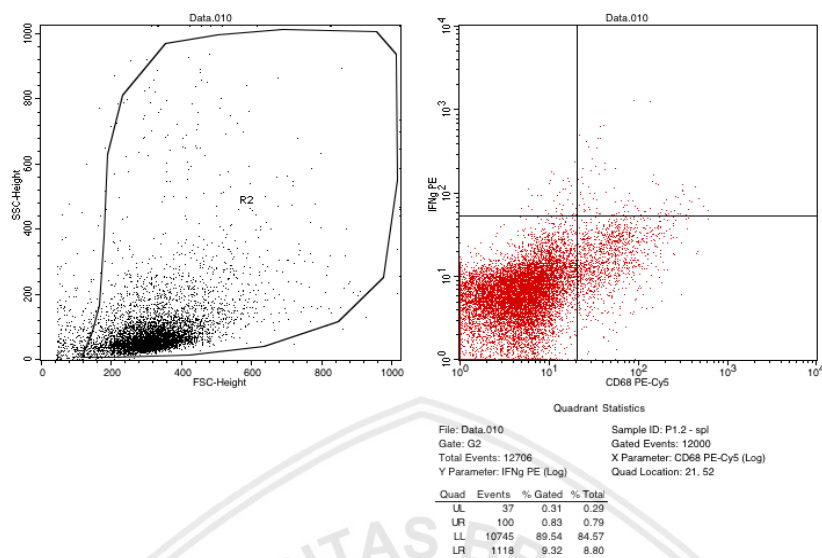
a. Control Negatif



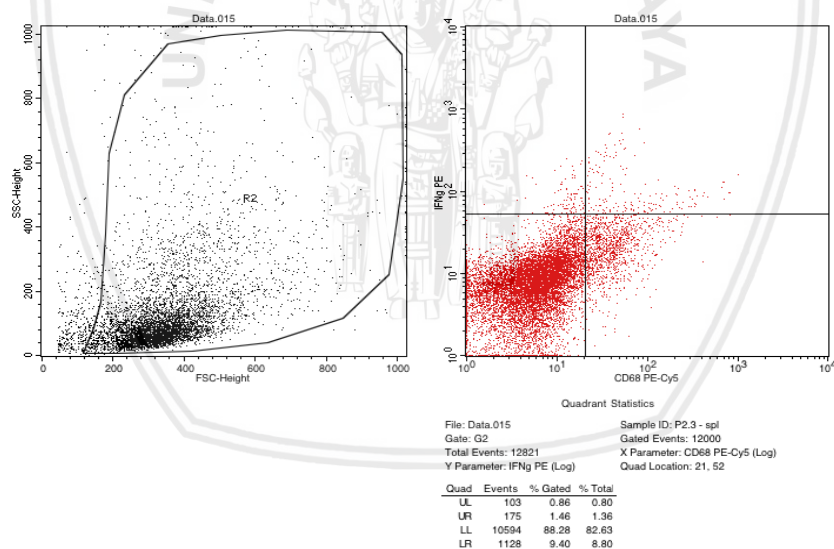
b. Control Positif



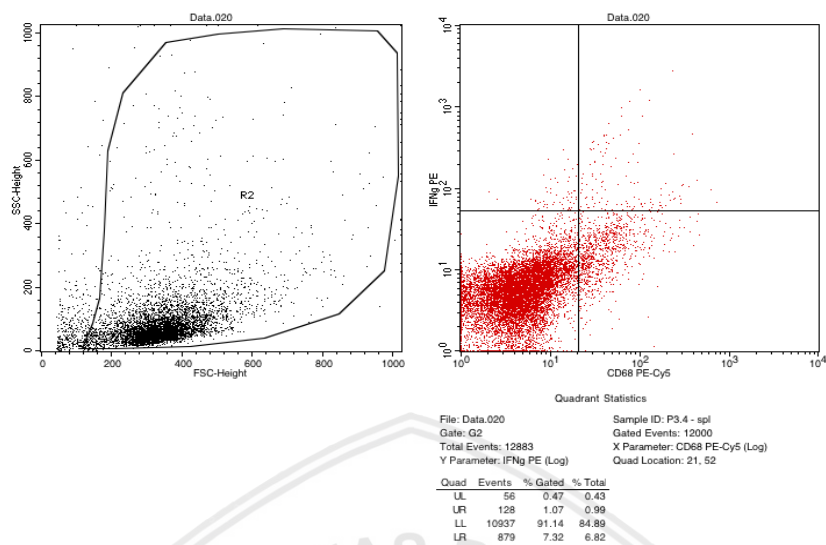
c. Perlakuan 1



d. Perlakuan 2



e. Perlakuan 3



Lampiran 8. Kadar relatif IFN- γ dan CD68

Perlakuan	IFN- γ (%)	CD68 (%)
K(-)	0,2	8,47
	0,26	9,12
	0,23	8,05
	0,11	8,25
K(+)	0,42	8,77
	0,42	9,74
	0,31	8,84
	0,38	11,62
P1	0,37	9,37
	0,31	9,32
	0,2	9,2
	0,29	8,93
P2	0,67	10,43
	0,47	9,35
	0,86	9,4
	0,7	8,19
P3	0,33	7,79
	0,38	9,65
	0,35	6,49
	0,47	7,23

Lampiran 9. Hasil Uji SPSS

A. Interferon Gamma

a. Uji Deskriptif

Descriptives

IFN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 (K-)	4	.2000	.06481	.03240	.0969	.3031	.11	.26
2 (K+)	4	.3825	.05188	.02594	.2999	.4651	.31	.42
3 (P1)	4	.2925	.07042	.03521	.1805	.4045	.20	.37
4 (P2)	4	.6750	.16010	.08005	.4202	.9298	.47	.86
5 (P3)	4	.3825	.06185	.03092	.2841	.4809	.33	.47
Total	20	.3865	.18230	.04076	.3012	.4718	.11	.86

b. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IFN
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.3865
	Std. Deviation	.18230
Most Extreme Differences	Absolute	.177
	Positive	.177
	Negative	-.103
Test Statistic		.177
Asymp. Sig. (2-tailed)		.100 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Tests of Normality

	perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IFN	1 (K-)	.250	4	.	.927	4	.577
	2 (K+)	.265	4	.	.838	4	.189

3 (P1)	.236	4	.	.971	4	.846
4 (P2)	.238	4	.	.969	4	.837
5 (P3)	.266	4	.	.893	4	.395

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IFN	Based on Mean	.937	4	15	.469
	Based on Median	.869	4	15	.505
	Based on Median and with adjusted df	.869	4	7.172	.526
	Based on trimmed mean	.937	4	15	.469

d. Uji ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.508	4	.127	15.358	.000
Within Groups	.124	15	.008		
Total	.631	19			

e. Uji BNJ (Tukey)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IFN

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.18250	.06427	.079	-.3810	.0160
	3	-.09250	.06427	.614	-.2910	.1060
	4	-.47500*	.06427	.000	-.6735	-.2765
	5	-.18250	.06427	.079	-.3810	.0160
2	1	.18250	.06427	.079	-.0160	.3810
	3	.09000	.06427	.637	-.1085	.2885
	4	-.29250*	.06427	.003	-.4910	-.0940
	5	.00000	.06427	1.000	-.1985	.1985
3	1	.09250	.06427	.614	-.1060	.2910
	2	-.09000	.06427	.637	-.2885	.1085
	4	-.38250*	.06427	.000	-.5810	-.1840

	5		-.09000	.06427	.637	-.2885	.1085
4	1		.47500*	.06427	.000	.2765	.6735
	2		.29250*	.06427	.003	.0940	.4910
	3		.38250*	.06427	.000	.1840	.5810
	5		.29250*	.06427	.003	.0940	.4910
5	1		.18250	.06427	.079	-.0160	.3810
	2		.00000	.06427	1.000	-.1985	.1985
	3		.09000	.06427	.637	-.1085	.2885
	4		-.29250*	.06427	.003	-.4910	-.0940

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

IFN

Tukey HSD^a

perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1 (K-)	4	.2000	
3 (P1)	4	.2925	
2 (K+)	4	.3825	
5 (P3)	4	.3825	
4 (P2)	4		.6750
Sig.		.079	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

B. Kadar Relatif CD68

a. Uji Deskriptif

Descriptives

CD68

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 (K-)	4	8.4725	.46450	.23225	7.7334	9.2116	8.05	9.12
2 (K+)	4	9.7425	1.32731	.66366	7.6304	11.8546	8.77	11.62
3 (P1)	4	9.2050	.19672	.09836	8.8920	9.5180	8.93	9.37
4 (P2)	4	9.3425	.91547	.45774	7.8858	10.7992	8.19	10.43
5 (P3)	4	7.7900	1.34947	.67473	5.6427	9.9373	6.49	9.65
Total	20	8.9105	1.11634	.24962	8.3880	9.4330	6.49	11.62

b. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD68
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8.9105
	Std. Deviation	1.11634
Most Extreme Differences	Absolute	.131
	Positive	.131
	Negative	-.100
Test Statistic		.131
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD68	1 (K-)	.252	4	.	.921	4	.541
	2 (K+)	.252	4	.	.841	4	.199
	3 (P1)	.240	4	.	.895	4	.407
	4 (P2)	.253	4	.	.953	4	.734
	5 (P3)	.250	4	.	.939	4	.648

a. Lilliefors Significance Correction

c. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD68	Based on Mean	1.468	4	15	.261
	Based on Median	1.188	4	15	.356
	Based on Median and with adjusted df	1.188	4	9.156	.378
	Based on trimmed mean	1.457	4	15	.264

d. Uji ANOVA

ANOVA

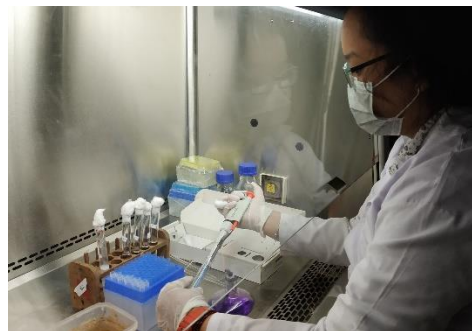
CD68

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.652	4	2.413	2.580	.080
Within Groups	14.026	15	.935		
Total	23.678	19			

Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian



Sediaan Kefir



Persiapan Suspensi Kefir dan Ovalbumin



Uji Mikrobiologis Kefir



Proses Penimbangan Mencit



Proses Induksi Preventif Kefir Peroral



Proses Induksi secara Intra Peritoneal



Proses Induksi secara per oral



Nekropsi

