

**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT
(*Mus musculus*) BALB-c YANG DIINDUKSI
OVALBUMIN TERHADAP KADAR
RELATIF SEL T CD4 DAN IL-10
PADA ORGAN LIMPA**

SKRIPSI

Oleh :

**INDRA DARPA KUSUMA
155130100111011**



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

EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*) BALB-c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP KADAR RELATIF SEL T CD4 DAN IL-10 PADA ORGAN LIMPA

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

SKRIPSI

Oleh :

INDRA DARPA KUSUMA

155130100111011



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**EFEK PREVENTIF KEFIR PADA MENCIT (*Mus musculus*)
BALB-c YANG DIINDUKSI OVALBUMIN TERHADAP
KADAR RELATIF SEL T CD4 DAN IL-10
PADA ORGAN LIMPA****Oleh :****INDRA DARPA KUSUMA**

NIM. 155130100111011

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

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc

NIP. 195807111992032002

drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes.

NIP. 198201272015042001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yunowo, M.App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Indra Darpa Kusuma

NIM : 155130100111011

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Preventif Kefir Pada Mencit (*Mus musculus*) BALB-c yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Sel T CD4 Dan IL-10 Pada Organ Limpa.

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, 25 April 2019
Yang menyatakan,

(Indra Darpa Kusuma)
NIM. 155130100111011

Efek Preventif Kefir Pada Mencit (*Mus musculus*) BALB-c Yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Sel T CD4 dan IL-10 Pada Organ Limpa

ABSTRAK

Alergi adalah suatu respon tubuh yang berlebihan terhadap antigen (alergen) dan termasuk salah satu reaksi hipersensitivitas tipe 1 yang diperantarai oleh sel limfosit dengan protein terlarut sitokin. Upaya pencegahan alergi dapat dilakukan dengan pemberian kefir karena kefir mengandung bakteri asam laktat, khamir dan bioaktif peptida. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorik *post control only design* dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Mencit balb/c dibagi menjadi 5 kelompok dengan 4 ulangan. Kelompok kontrol (-) adalah mencit sehat diberikan placebo NaCl fisiologis per oral (0,5ml/ekor) pada hari ke 8-21. Kelompok kontrol (+), P1, P2 dan P3 diberikan ovalbumin dengan dosis 20 µg/ekor secara IP pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-29 per oral (60 mg/ekor). Kelompok P1, P2 dan P3 diberikan preventif kefir dengan dosis bertingkat yaitu 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 900 mg/kgBB pada hari ke 8-21. Nekropsi dilakukan pada hari ke 30 dan diambil organ limpa untuk menghitung kadar relatif sel T CD4 dan IL-10 dengan *flowcytometry*. Data hasil *flowcytometry* bersifat kuantitatif selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji Tukey pada $\alpha = 0.05$. Pada penelitian ini, pemberian kefir pada dosis 900 mg/Kg BB selama 14 hari merupakan dosis efektif dalam menurunkan kadar relatif sel T CD4 dan IL-10 pada mencit BALB-c yang diinduksi ovalbumin. Kesimpulan dalam penelitian ini adalah kefir dapat menurunkan reaksi inflamasi akibat induksi ovalbumin.

Kata kunci: Alergi, Kefir, Ovalbumin, Sel Limfosit, Sitokin

The Preventive Effect of Kefir in Mice (*Mus musculus*) BALB-c Induced by Ovalbumin Based on Relative Levels of CD4 T cells and IL-10 in Spleen.

ABSTRACT

Allergies are an excessive body response to antigens (allergens) and include type 1 hypersensitivity reactions mediated by lymphocyte cells with cytokine-soluble proteins. Efforts to prevent allergies can be done by giving kefir because kefir contains lactic acid bacteria, yeast and bioactive peptides. This research used a post control only laboratory experimental design with a completely randomized design (CRD) method. Mice BALB-c were divided into 5 groups with 4 replications. The control group (-) was healthy mice given a placebo physiological NaCl orally (0.5 mL/mice) on days 8-21. The control group (+), P1, P2 and P3 were given ovalbumin at a dose of 20 µg/mice intraperitoneal on the 15th and 22nd days and then re-induced OVA on 29th day orally (60 mg/mice). The P1, P2 and P3 groups were given preventive kefir with a multilevel dose of 300 mg/Kg BW, 600 mg/Kg BW, and 900 mg/Kg BW on days 8-21. Necropsy was performed on the 30th day and the spleen was taken to measure the relative levels of CD4 T cells and IL-10 with flow cytometry. Data on flow cytometry results are quantitative and then analyzed using the One Way ANOVA test and followed by the Tukey test at $\alpha = 0.05$. In this study, giving kefir at a dose of 900 mg/Kg BW for 14 days was an effective dose in reducing the relative levels of CD4 T cells and IL-10 in mice BALB-c induced by ovalbumin. The conclusion in this study is kefir can reduce the inflammatory reaction due to ovalbumin induction.

Keyword : Allergy, Cytokine, Kefir, Lymphocyte, Ovalbumin

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Skripsi yang berjudul “Efek Preventif Kefir Pada Mencit (*Mus musculus*) BALB-c Yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Sel T CD4 Dan IL-10 Pada Organ Limpa”. Penelitian ini merupakan topik penelitian yang diketuai oleh dosen drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes.

Selama proses penulisan dan penyusunan laporan ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yunowo, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku pembimbing 1 yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
3. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes. selaku pembimbing 2 yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, arahan, serta saran kepada penulis.
4. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet dan drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku penguji skripsi yang telah memberikan kritik dan saran kepada penulis.
5. drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan saran dan motivasi kepada penulis.
6. Keluarga penulis, Bapak Sihono dan Ibu Winarti yang selalu mendukung penulis dalam segala kondisi.

7. Kepada Ayu Mahanisa, Olfivesen Purba, Yurisa Aji P, Fakhira Rahmadiani selaku teman teman seperjuangan penelitian.
8. Kepada Pak Memed, Bu Ferida dan seluruh staf Laboratorium Farmakologi FKUB yang telah membantu selama penelitian.
9. Keluarga besar Kabinet Asique, Keluarga Mikro-Imundan angkatan DNA 2015 yang telah memberikan semangat, saran, dan informasi.
10. Kepada Fathur Ziyad Abdillah, Gerry Prima Rizky, Bayu Hendra Laksana, Dini Aprilia Wulandari, Yosep Id Ayamiseba, Paringga Kalantara Jati Mulia, dan teman kontrakan yang selalu memberikan saran dan semangat.
11. Seluruh staf dan karyawan FKH UB yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.

Penulis berharap bahwa semua kebaikan yang diberikan kepada penulis akan dibalas berlipat oleh Allah SWT. Penulis sadar bahwa proposal ini masih jauh dari kata sempurna dan harapannya bahwa laporan ini dapat memberi ilmu dan menambah wawasan bagi penulis dan pembaca sehingga menjadi pembelajaran yang bermanfaat dikemudian hari, Aamiin Ya Rabbal Alamin.

Malang, 25 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 SINGKATAN DAN LAMBANG.....	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	7
2.1 Alergi.....	7
2.1.1 Definisi	7
2.1.2 Etiologi	7
2.1.3 Patogenesis	9
2.1.4 Gejala Klinis.....	10
2.1.5 Peneguhan Diagnosa	11
2.1.6 Penanganan dan Pencegahan.....	11
2.2 Kefir.....	12
2.3 Ovalbumin	14
2.4 Sel T CD 4	15
2.5 IL-10	16
2.6 <i>Flowcytometry</i>	17
2.7 Mencit.....	18
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	23
4.2.1 Alat.....	23
4.2.2 Bahan.....	23



4.3 Sampel Penelitian	24
4.4 Rancangan Penelitian	25
4.5 Variabel Penelitian	26
4.6 Prosedur Penelitian	26
4.6.1 Persiapan Hewan Coba.....	26
4.6.2 Pembuatan Kefir.....	26
4.6.4 Pemberian Kefir Sebagai Preventif	27
4.6.5 Pembuatan Hewan Model Alergi	27
4.6.6 Pengoleksian Sampel.....	27
4.6.7 <i>Flowcytometry</i>	27
4.7 Analisa Data	28
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
5.1 Pengaruh Pemberian Preventiv Kefir Pada Mencit BALB-c akibat Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Sel T CD4	29
5.2 Pengaruh Pemberian Preventiv Kefir Pada Mencit BALB-c akibat Induksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif IL-10	35
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	39
6.1 Kesimpulan.....	39
6.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rancangan Penelitian	25



DAFTAR GAMBAR

Halaman

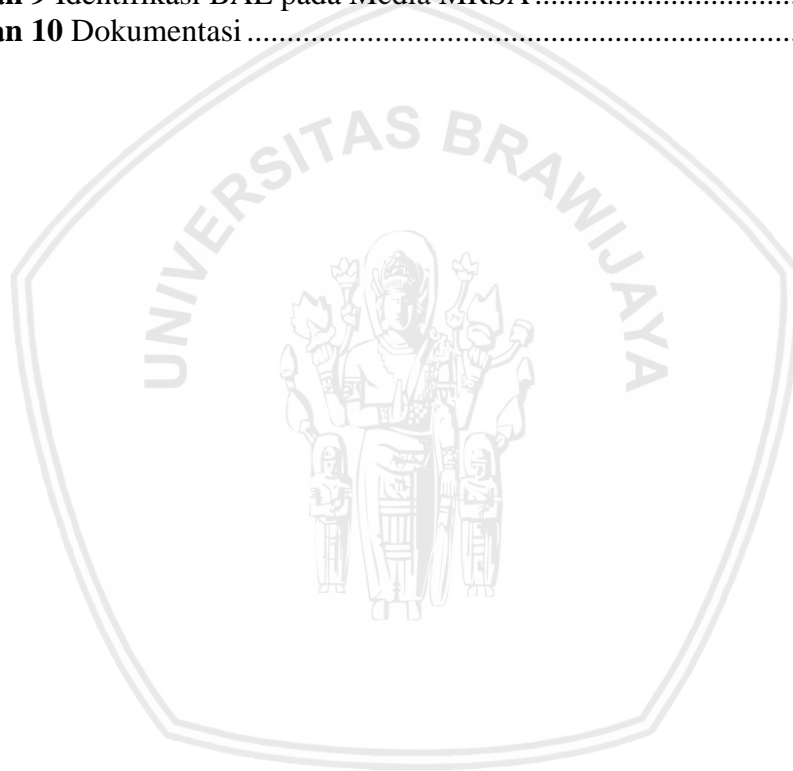
Gambar 2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	19
Gambar 5.1 Rata-rata Kadar Relatif sel T CD4.....	30
Gambar 5.2 Rata-rata Kadar Relatif IL-10.....	35



DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1 Kerangka Operasional.....	47
Lampiran 2 Perhitungan Dosis Ovalbumin.....	48
Lampiran 3 Sertifikat Laik Etik	51
Lampiran 4 Diagram Alir	52
Lampiran 5 Data kadar relatif sel T CD4 dan IL-10	54
Lampiran 6 Uji statistika kadar relatif sel T CD4	57
Lampiran 7 Uji statistika kadar relatif IL-10.....	60
Lampiran 8 Hasil Uji Proksimat Kefir	63
Lampiran 9 Identifikasi BAL pada Media MRSA	64
Lampiran 10 Dokumentasi	65



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
Al(OH) ₃	Aluminium Hidroksida
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
C	<i>Celcius</i>
CD 4	<i>Cluster of defferentiation 4</i>
CSIF	<i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
DC	<i>Dendritic Cells</i>
FA	<i>Food Allergen</i>
g	Gram
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
IFN γ	Interferon Gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
IP	Intraperitoneal
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogram
mg	Miligram
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NaCl	Natrium klorida
NHS	<i>National Health Service</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Nitrogen monoksida
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Posphat Buffer Saline</i>
PO	Per oral
pH	<i>Power of hidrogen</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
TGF β	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	<i>T helper</i>
Treg	<i>T regulatory</i>
μ g	Mikrogram
%	Persen
°	Derajat

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Semua hewan memiliki sistem kekebalan tubuh yang melindungi tubuh dari antigen terutama agen berbahaya yang bisa menimbulkan penyakit. Namun sistem kekebalan tubuh juga bisa memberikan reaksi berlebihan pada zat yang tidak berbahaya seperti makanan. Reaksi ini disebut dengan reaksi alergi (Bhowmik dkk., 2012). Reaksi hipersensitivitas adalah suatu respon antigenik yang berlebihan, yang terjadi pada individu yang sebelumnya telah mengalami suatu sensitisasi dengan antigen tertentu. Reaksi ini dibagi menjadi 4 golongan yaitu hipersensitivitas tipe 1 (reaksi anafilaktik), hipersensitivitas tipe 2 (reaksi sitotoksik), hipersensitivitas tipe 3 (reaksi kompleks imun) dan hipersensitivitas tipe 4 (reaksi tipe lambat) (Riwayati, 2015).

Antigen atau zat asing yang bisa menyebabkan reaksi alergi disebut dengan alergen. Ada berbagai jalur untuk alergen masuk ke dalam tubuh yaitu melalui saluran pernafasan (alergi hirup), alergen kontak, melalui suntikan atau sengatan, dan alergi makanan (*Food Allergy*) (Candra dkk., 2011). Kebanyakan alergen merupakan protein yang larut dalam air dengan berat molekul antara 5 kDa dan 50 kDa seperti ovalbumin (OVA) memiliki berat molekul 45 kDa (Woodfolk dkk., 2015). Selain itu partikel di udara atau disebut *environmental allergen* seperti spora jamur, bulu hewan, serbuk sari dari tanaman bisa menyebabkan alergi (Elshemy dan Abobakr, 2013). Serbuk sari dan spora jamur bisa menyebabkan *atopic dermatitis* pada anjing (Prakash dkk., 2017).

Alergi termasuk dalam reaksi hipersensitivitas tipe 1. Reaksi hipersensitivitas tipe 1 dimediasi oleh imunoglobulin E (IgE). Alergen harus memiliki kemampuan menembus penghalang fisiologis pada mukosa seperti enzim pencernaan, keasaman lambung, peristaltik, mukus pada permukaan mukosa intestine, dan *barier* imun IgA intraluminal untuk bisa menyebabkan reaksi alergi. Selanjutnya alergen akan berinteraksi dengan jaringan limfoid gastrointestinal (GALT) yang terbentuk oleh *peyer patch*, jaringan limfoid difus di lamina propria, *enterocytes*, dan limfosit intraepitelial. Respons imun dalam GALT biasanya mengarah ke respon yang di mediasi Th2 yang akan menghasilkan sitokin *Interleukin 4*, *Interleukin 5* dan *Interleukin 10*. IL-5 akan merangsang respon imun yang melibatkan sel mast dan eosinofil. Dalam reaksi tipe I, antigen disajikan oleh antigen presenting cells ke sel Th2, yang kemudian menghasilkan IL-4. Sitokin ini merangsang proliferasi sel B dan menginduksi produksi IgE. IgE yang dihasilkan mengikat sel mast dan membuat sel mast tersensitisasi. Jika alergen mencapai sel mast yang sudah tersensitisasi maka sel mast akan melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, protease, serta beberapa leukotrien dan prostaglandin (Bhagat dkk., 2017).

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. Reaksi alergi makanan diperkirakan sekitar 1%- 6% dari semua penyakit anjing dan kucing dalam praktek umum dan

10% - 20% dari semua kasus yang terlihat dalam praktek dermatologi (Friedeck, 2011).

Peneguhan diagnosa terhadap alergi yaitu melalui riwayat kesehatan pasien yang menyeluruh termasuk riwayat penyakit, gejala klinis dan pemeriksaan fisik lengkap. Selain itu juga diperlukan diagnosa penunjang seperti kerokan kulit, sampel sitologi, kultur jamur, tergantung pada temuan pemeriksaan fisik serta tanda-tanda dan sejarah klinis pasien (Vera dan Amanda, 2008).

Penanganan alergi bisa dilakukan dengan pemberian obat antihistamin dan T sel *inhibitor* yang akan mencegah terjadinya inflamasi (Bhagat dkk., 2017). Penanganan yang paling efektif adalah menghindari alergen yang bisa menimbulkan reaksi alergi serta menjauhkan hewan dari alergen. Kefir termasuk salah satu probiotik yang mengandung bakteri, khamir dan bioaktif peptida yang menguntungkan dalam intestin, salah satunya bisa mencegah alergi. Probiotik mempunyai peran yang unik dalam proses pencegahan penyakit alergi, selain menghambat pertumbuhan bakteri patogen, probiotik membangkitkan respons imun pada mukosa intestin yaitu S-IgA (*secretory IgA*) (Yuniastuti, 2014). S-IgA berfungsi sebagai barier epitel untuk mencegah adanya kontak antara alergen dengan reseptor pada intestin sehingga bisa mencegah alergi (Gutzeit dkk., 2014).

Efek imunomodulator kefir dapat menurunkan atau mengembalikan permeabilitas usus. Dengan demikian, kontak antigen dengan APC yang ada di mukosa intestin menurun, sehingga dapat mengurangi respons inflamasi (Rosa dkk., 2017). Secara sistemik kefir akan membangkitkan peranan T regulator yang

akan menyeimbangkan diferensiasi sel T CD4 menjadi Th2 dan Th1. IL-10 dapat menghambat sintesis sitokin proinflamasi, menghambat presentasi antigen oleh APC dan sentisisasi sehingga mengurangi respon alergi (Deo dkk., 2010).

Kefir mempunyai banyak efek kesehatan yang menguntungkan, penanganan terhadap alergi, oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek preventif kefir terhadap alergi berdasarkan penurunan kadar relatif sel T CD4 dan kadar relatif IL-10 pada organ limpa.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit BALB-c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif sel T CD4 pada organ limpa?
2. Apakah pemberian preventif kefir pada mencit BALB-c yang diinduksi ovalbumin dapat mempengaruhi kadar relatif IL-10 pada organ limpa?

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 laik etik dari Komisi Etik Penelitian No. – 959 KEP Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan hewan model alergi didapatkan dengan pemberian ovalbumin (Serva) dalam bentuk serbuk yang dilarutkan dalam aquades steril dan

ditambahkan adjuvant $\text{Al}(\text{OH})_3$ secara intraperitoneal dengan dosis $20\mu\text{g}$ pada hari ke 15 dan 22 serta per oral dengan dosis 60 mg pada hari ke 30.

3. Kefir dibuat dari bahan baku susu kambing yang dicampur grain kefir 5% 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-8 hingga 21, tiap hewan coba diberikan terapi secara per oral dengan dosis pemberian sebesar 300mg/KgBB, 600mg/KgBB, dan 900mg/KgBB.
5. Variabel terikat yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar relatif sel T CD4 dan IL-10 yang dihitung menggunakan metode *flowcytometry*.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian preventif kefir pada mencit BALB-c yang diinduksi Ovalbumin terhadap kadar sel T CD4 pada organ limpa.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian preventif kefir pada mencit BALB-c yang diinduksi Ovalbumin terhadap kadar IL-10 pada organ limpa.

1.5 Manfaat penelitian

Manfaat yang diperoleh dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai kajian awal untuk mengetahui pengaruh pemberian kefir terhadap alergi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alergi

2.1.1 Definisi

Reaksi alergi adalah cara tubuh menanggapi benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Ketika tubuh merasakan benda asing (antigen), sistem kekebalan tubuh akan terpicu. Sistem kekebalan tubuh biasanya melindungi tubuh dari agen berbahaya seperti bakteri dan racun. Reaksi berlebihan terhadap zat yang tidak berbahaya (alergen) disebut reaksi hipersensitif, atau reaksi alergi. Alergi merupakan respon berlebihan dari sistem kekebalan tubuh. Sistem kekebalan tubuh adalah mekanisme pertahanan tubuh terorganisasi terhadap antigen, terutama infeksi. Alergen adalah zat yang asing bagi tubuh dan dapat menyebabkan reaksi alergi (Bhowmik dkk., 2012).

Alergi adalah suatu perubahan reaksi atau respon pertahanan tubuh yang menolak zat-zat yang sebenarnya tidak berbahaya. Ada berbagai cara alergen masuk ke dalam tubuh yaitu melalui saluran pernafasan (alergi hirup), alergen kontak, melalui suntikan atau sengatan, dan alergi makanan (*Food Allergy*) (Candra dkk., 2011). Ada beberapa macam alergi yang tergantung dimana reaksi alergi terjadi seperti alergi rhinitis, asma, alergi makanan, alergi obat, alergi konjungtivitis, dan utikaria. Alergi rinitis adalah alergi yang terjadi pada mukosa nasal atau hidung. Asma adalah gangguan inflamasi kronis pada saluran pernafasan, yang menyebabkan obstruksi aliran udara pada saluran pernafasan yang reversibel baik secara spontan atau dengan pengobatan (WAO, 2011).

Alergi intestin (alergi makanan) adalah penyakit imunologi yang mungkin berdampak tinggi pada kualitas hidup pasien, dengan konsekuensi ekonomi untuk pasien dan NHS (*National Health Service*). Bahkan jika prevalensi pasti tidak diketahui, hampir 20% populasi merujuk beberapa gejala yang dapat dikaitkan dengan alergi makanan, dan kebanyakan akhirnya menghilangkan beberapa makanan dari diet sehingga mengakibatkan hilangnya keseimbangan nutrisi (Castellazzi dkk, 2013).

Istilah alergi intestin atau alergi makanan juga dikenal sebagai hipersensitivitas terhadap makanan yang mencakup reaksi imunologik terhadap makanan atau bahan pelengkap makanan. Alergi makanan merupakan suatu kondisi yang disebabkan oleh reaksi IgE terhadap bahan makanan dan merupakan jenis alergi yang mengkhawatirkan. Kejadian alergi makanan merupakan ancaman bagi masyarakat karena makanan merupakan kebutuhan pokok, tetapi makanan juga dapat membahayakan jiwa (Chandra dkk, 2011). Reaksi alergi termasuk dalam reaksi hipersensitivitas tipe 1 atau reaksi anafilaksis yang merupakan respon jaringan yang terjadi karena adanya ikatan silang antara alergen dan IgE. Mekanisme umum dari reaksi ini adalah alergen berikatan silang dengan IgE. Sel mast dan basofil mengeluarkan amina vasoaktif dan mediator kimiawi lainnya. Mediator inflamasi tersebut menimbulkan manifestasi berupa anafilaksis, urtikaria, asma bronkial atau atopik dermatitis (Riwayati, 2015).

2.1.2 Etiologi

Makanan yang bisa menyebabkan alergi biasa disebut dengan *Food Allergen* (FA). FA didefinisikan sebagai komponen-komponen khusus dari

makanan atau bahan-bahan dalam makanan (biasanya protein, tetapi kadang-kadang juga haptens kimia) yang dikenali oleh sel-sel imun spesifik dan menimbulkan reaksi imunologis tertentu, yang menghasilkan gejala-gejala khas. Beberapa alergen (paling sering dari buah dan sayuran) menyebabkan reaksi alergi terutama jika dimakan ketika mentah. Namun, sebagian besar alergen makanan masih bisa menyebabkan reaksi bahkan setelah dimasak atau telah mengalami pencernaan di lambung dan usus. Pada FA, reaksi silang terjadi ketika alergen makanan memiliki kesamaan struktural dengan alergen lain atau aeroalergen yang berbeda, yang kemudian dapat memicu gejala klinis. Reaksi silang misalnya, di antara kerang yang berbeda dan kacang yang berbeda (Boyce, 2010).

Antigen yang bisa menyebabkan alergi pada hewan kebanyakan dari bahan pakan hewan itu sendiri. Berbagai pakan hewan seperti daging sapi, pakan kaleng, jagung, susu sapi, produk susu, pakan anjing, biskuit anjing, telur, ikan, pengawet pakan, daging dari berbagai spesies termasuk daging babi, daging kambing dan kuda, gandum, kentang, tepung beras, kedelai, dan kacang merah bisa menyebabkan alergi. Sekitar 36% anjing bereaksi terhadap satu protein dan angka rata-rata alergen yang dicurigai setiap anjing adalah 2,4. Telur ayam, ayam dan kedelai menyebabkan alergi pada anjing sekitar 25%. β -laktoglobulin adalah komponen yang paling menyebabkan alergi, diikuti oleh kasein, laktalbumin, dan *bovine serum albumin*. Anjing yang alergi terhadap susu sapi tidak bisa memakan keju. Alergen tersembunyi juga bisa menjadi masalah dengan alergi makanan termasuk sejumlah minyak seperti jagung dan kedelai. Protein susu (*Sodium*

caseinate), sering ditambahkan untuk meningkatkan kualitas pengemasan dalam tuna kaleng juga dapat menyebabkan reaksi alergi (Bhagat dkk., 2017).

2.1.3 Patogenesis

Alergi termasuk dalam reaksi hipersensitivitas tipe 1 yang dimediasi IgE. Pada reaksi hipersensitivitas tipe 1, alergen spesifik memicu sel mast yang tersensitisasi IgE yang menyebabkan melepaskan mediator farmakologisnya sehingga menyebabkan proses inflamasi (Bhagat dkk., 2017).

Alergi dapat terjadi ketika alergen menginduksi respons imunologi yang abnormal, dan ini dapat terjadi karena beberapa alasan. Alergen yang memiliki kemampuan menembus penghalang mukosa fisiologis yang bisa menyebabkan alergi. Pertama alergen harus bisa menembus komponen penghalang seperti enzim pencernaan, keasaman lambung, peristaltik, mukus pada permukaan intestin, enterosit, dan IgA intraluminal. Setelah menembus penghalang mukosa, alergen akan berinteraksi dengan jaringan limfoid pada gastrointestinal (GALT). GALT terbentuk oleh *peyer patch*, jaringan limfoid difus pada lamina propria, enterosit, dan limfosit intraepitelial. Respons imun pada GALT biasanya menyebabkan respon yang dimediasi oleh sel Th2 yang akan memproduksi sitokin IL-4 dan IL-5. IL-5 akan merangsang respon imun yang melibatkan sel mast dan eosinofil. Dalam reaksi tipe I, antigen disajikan oleh APC ke sel Th2, yang kemudian menghasilkan IL-4. Sitokin ini merangsang proliferasi sel B dan menginduksi produksi IgE. IgE yang dihasilkan mengikat sel mast dan membuat sel mast tersensitisasi. Jika alergen mencapai sel mast yang sudah tersensitisasi

maka sel mast akan melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, protease, serta beberapa leukotrien dan prostaglandin (Mandigers dan German, 2010).

Mediator inflamasi yang dihasilkan oleh sel mast akan menyebabkan inflamasi berupa peningkatan permeabilitas kapiler, vasodilatasi pembuluh darah dan kontraksi otot polos pada intestine. Efek dari mediator tersebut juga menyebabkan terjadinya manifestasi klinis berupa diare (Oyoshi dkk., 2014).

2.1.4 Gejala Klinis

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 (Friedeck, 2011).

Gejala klinis yang terjadi tergantung pada jaringan yang mengalami reaksi seperti pada kulit, pernafasan, saluran pencernaan atau kombinasi. Pada saluran pencernaan bisa menyebabkan terjadinya diare. Reaksi terhadap komponen makanan yang dicerna dapat mempengaruhi banyak sistem tubuh dan dapat menghasilkan tanda-tanda yang melibatkan kulit, saluran pencernaan, saluran pernafasan dan sistem saraf pusat. Tanda-tanda dermatologis termasuk pruritus, eritema, dan sering terjadi dengan infeksi sekunder akibat *Staphylococcus*, otitis eksterna (unilateral atau bilateral), dan urtikaria. Kadang-kadang, anjing akan menjadi non-pruritus dan hanya menunjukkan seborrhea (Bhagat dkk, 2017).

2.1.5 Peneguhan Diagnosa

Diagnosa memerlukan riwayat yang menyeluruh dan pemeriksaan fisik untuk mempertimbangkan diagnosis banding yang luas, untuk memastikan kemungkinan makanan pemicu alergi, dan untuk menentukan kemungkinan patofisiologi umum, khususnya gangguan alergi yang diinduksi makanan. Sejarah harus menentukan kemungkinan makanan atau makanan penyebab, kuantitas yang tertelan, waktu reaksi, faktor pendukung (olahraga, aspirin, dan alkohol), dan konsistensi reaksi. Sejarah juga berfokus pada rincian yang mungkin berkontribusi untuk memperkirakan probabilitas sebelumnya dari reaksi alergi terhadap makanan tertentu. Sebagai contoh, penalaran menyatakan bahwa makanan yang jarang dicerna lebih mungkin mengakibatkan reaksi akut daripada yang sebelumnya ditoleransi. Untuk mendapatkan diagnosis yang akurat, harus mempertimbangkan aspek epidemiologi penyakit (misalnya, pemicu umum dan asosiasi umum) dan rincian sejarah spesifik dan kemudian mempertimbangkan pengujian yang tepat yang dapat dievaluasi dalam konteks perkiraan probabilitas sebelumnya (Sicherer dan Sampson, 2010).

2.1.6 Penanganan dan Pencegahan

Terapi utama untuk alergi makanan adalah menghindari makanan yang dapat menyebabkan alergi (alergen). Pengetahuan tentang menghindari alergen mencakup perhatian yang teliti terhadap pembacaan label, perawatan dalam memperoleh makanan dari restoran / perusahaan makanan, dan menghindari kontak silang makanan dengan alergen selama persiapan makanan, seperti

menghindari talenan, pengiris, dan mixer. Penanganan alergi makanan bisa dilakukan dengan pemberian obat antihistamin untuk menekan pelepasan histamin oleh sel mast dan sel T inhibitor yang akan mencegah terjadinya inflamasi (Bhagat dkk., 2017).

Berbagai obat dapat diberikan untuk aspek-aspek tertentu dari gangguan yang disebabkan oleh alergi makanan. Antihistamin mungkin meredakan sebagian gejala sindrom alergi oral dan gejala kulit yang dimediasi IgE. Terapi anti-inflamasi mungkin bermanfaat untuk alergi esophagitis eosinofilik atau gastroenteritis. Penting untuk diketahui bahwa pengobatan utama untuk anafilaksis yang diinduksi oleh makanan adalah dengan pemberian epinefrin secara cepat (Sicherer dan Sampson, 2010).

2.2 Kefir

Kefir merupakan salah satu jenis susu fermentasi yang dibuat dengan menggunakan starter granula kefir. Kefir memiliki kekentalan seperti krim serta memiliki rasa asam dan beralkohol. Cara pembuatannya adalah dengan fermentasi susu segar dari sapi, kambing, atau domba dengan kultur kefir (kefir grain yaitu koloni bakteri yang bersimbiotik bersama-sama dengan unsur lain membentuk jaringan padat) yang terdiri dari bakteri asam laktat dan khamir, antara lain *Streptococcus*, *Lactobacillus* sp, dan jenis khamir yang memfermentasi laktosa. Bahan baku yang digunakan adalah susu segar utuh atau susu skim. Pembuatan kefir dengan bahan skim susu dimaksudkan agar kefir yang dihasilkan rendah lemak dan dapat dikonsumsi oleh konsumen yang menghindari lemak (Safitri dan Swarastuti, 2013).

Kefir memiliki konsistensi dan penampakan seperti yoghurt dengan sedikit beraroma alkohol. Kefir tergolong sebagai pangan fungsional karena teruji secara klinis memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan dan termasuk dalam makanan probiotik karena mengandung bakteri baik yang dapat memperbaiki sistem mikroflora usus dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen di dalam usus (Julianto dkk, 2016).

Kefir adalah sistem mikroba kompleks yang tidak hanya terbukti bermanfaat secara nutrisi, tetapi juga telah terbukti menghambat sejumlah patogen yang dibawa makanan dan mikroorganisme pembusuk. Banyak produk probiotik telah diformulasikan yang mengandung sejumlah kecil bakteri berbeda. Komposisi mikrobiologi dan kimia kefir menunjukkan bahwa itu adalah probiotik yang jauh lebih kompleks. Karena ragi dan bakteri yang ada dalam starter kefir telah mengalami hubungan yang panjang, populasi mikroba yang dihasilkan menunjukkan banyak karakteristik yang serupa, membuat isolasi dan identifikasi spesies individu menjadi sulit. Strain ini tahan terhadap pH rendah dan asam empedu dan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri enteropatogen umum, yang merupakan kriteria populer yang diperlukan oleh bakteri probiotik (John, 2015).

Sifat imunomodulator dari kefir dapat dihasilkan dari aksi langsung mikrobiota atau mungkin tidak langsung, melalui berbagai senyawa bioaktif yang dihasilkan selama proses fermentasi. Bioaktif peptida, diproduksi selama fermentasi susu oleh mikrobiota yang ada di kefir, mampu mengaktifkan makrofag, meningkatkan fagositosis, menekan respon imun Th2, meningkatkan

produksi NO dan sitokin, dan menstimulasi sekresi IgA oleh limfosit B di lumen usus. Selain itu senyawa bioaktif ini mampu mempromosikan respon imun berperantara sel terhadap infeksi dan patogen intraseluler. Kefir juga dapat menurunkan atau mengembalikan permeabilitas usus yang menyebabkan kontak antigen dengan APC yang ada di lumen intestin menurun, sehingga dapat mengurangi respons inflamasi (Rosa dkk., 2017).

Umumnya, probiotik meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi usus seperti IL-10 (*Interleukin-10*) dan TGF (*Transforming Growth Factor*) - beta, dan mengurangi produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-8. Sementara itu diamati bahwa ada peningkatan kadar IgA dalam feses tikus yang diobati dengan mikroorganisme probiotik, ada penurunan yang signifikan dalam jumlah IL-23, IFN- γ , dan IL-6, dan penurunan dalam ekspresi mediator proinflamasi di nodul nodus limfa. Dalam penelitian serupa, telah ditentukan bahwa pada hari ke-7 konsumsi kefir, IL-10 meningkat pada mukosa usus hewan, dan modulasi imunitas usus memberikan kontrol homeostasis usus makrofag (Davras dkk., 2018).

2.3 Ovalbumin

OVA (ovalbumin) merupakan sekitar 58% (w /w) dari seluruh ekstrak putih telur ayam. OVA adalah bahan yang paling dominan dari lima alergen utama putih telur dan secara universal digunakan sebagai alergen utama dalam membuat hewan model yang berbeda mulai dari asma, alergi makanan dan alergi kulit. Epitop alergen OVA terutama ditentukan oleh struktur primer dan tergantung pada panjang rantai peptida tertentu. Di antara banyak protein putih

telur, OVA 323-339 dan OVA 1-10, serta OVA utuh, dilaporkan untuk mencakup epitop sel B yang dikenali oleh antibodi IgE spesifik. OVA 323-339 termasuk epitop sel T CD4⁺, yang dibatasi oleh molekul MHC kelas IA pada mencit, dan dianggap mencakup setidaknya satu epitop sel B. Selanjutnya, sel T-sel spesifik OVA dari pasien alergi telur ayam dapat mengenali OVA 323-339 yang dipresentasikan oleh HLA-DR10 (Sun dkk., 2010).

Pemberian ovalbumin 10µg dan 500 µg Al(OH)₃ sebagai adjuvant terhadap mencit BALB-c pada hari ke 7 melalui injeksi intraperitoneal, kemudian dilanjutkan pemberian ovalbumin dengan dosis 20mg/mencit secara per oral akan didapatkan adanya kenaikan produksi IgE yang merupakan tanda dari reaksi alergi (Bonnet dkk., 2016).

2.4 Sel T CD4

Sel T CD4 memainkan peran sentral dalam fungsi sistem kekebalan yaitu membantu sel B membentuk antibodi, meningkatkan dan mempertahankan respon dari sel T CD8, mengatur fungsi makrofag, mengatur respon kekebalan terhadap berbagai macam mikroorganisme patogen, dan mengatur/menekan kekebalan tubuh untuk mengontrol autoimunitas. Sel T CD4 adalah mediator penting dari memori imunologi, dan ketika jumlahnya berkurang atau fungsinya hilang, individu menjadi rentan terhadap berbagai gangguan infeksi. Sel T CD4 memainkan peran penting dalam memediasi kekebalan adaptif terhadap berbagai patogen. Sel T CD4 juga terlibat dalam autoimunitas, asma, dan respon alergi serta kekebalan tumor. Selama aktivasi T sel reseptor dalam lingkungan sitokin tertentu, sel T CD4 naif dapat berdiferensiasi menjadi salah satu dari beberapa sel

T *helper* (Th), termasuk Th1, Th2, Th17, dan Treg, sebagaimana ditentukan oleh pola produksi dan fungsi sitokinnya (Zhu dkk., 2010).

Sel T CD4 akan berdiferensiasi menjadi sel Th tergantung antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel Th2 akan terbentuk saat adanya alergi. Sel Th2 akan menghasilkan sitokin Interleukin-4 (IL-4) dan Interleukin-5 (IL-5) yang akan menyebabkan terjadinya respon alergi dalam tubuh (Zhu dan Paul, 2008).

2.5 Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin-10 (IL-10), juga dikenal sebagai *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF), adalah sitokin pleiotropik dengan fungsi imunoregulasi yang penting. IL-10 memiliki sifat anti inflamasi dan mempengaruhi aktivitas beberapa jenis sel dari sistem kekebalan tubuh. IL-10 terutama disekresikan oleh sel T yang teraktivasi, monosit, makrofag, sel dendritik, *natural killer cell* (NK) dan selB. IL-10 akan menekan produksi sitokin pro inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan sel akibat inflamasi (Verma dkk., 2016).

Sitokin Interleukin 10 (IL-10) diperlukan untuk mengatur fungsi kekebalan tubuh dengan merangsang penekanan respon imun yang meluas melalui efek pleiotropiknya. Kemampuan autokrin/parakrin dari IL-10 dengan mengikat langsung leukosit dan penahanan yang dihasilkan dari respon imun dianggap fungsi utama dari sitokin ini. Sekresi IL-10 dari sel CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulator (Treg), makrofag dan leukosit lainnya yang diikuti oleh pengikatan reseptor IL-10 pada makrofag dan sel dendritik (DC) telah dikaitkan dengan penurunan presentasi antigen dan peningkatan sel T anergi (Bijjiga dan Martino, 2013).

Kebanyakan leukosit mengeluarkan IL-10 pada tingkat tertentu. Mayoritas sekresi IL-10 berasal dari monosit dan bentuk dewasa umum setelah berdiferensiasi seperti makrofag dan sel dendritik. Beberapa granulosit spesifik dan agranulosit seperti eosinofil dan sel NK (*Natural Killer*), serta limfosit seperti sel T dan B, juga mengeluarkan IL-10 tetapi pada tingkat yang lebih rendah. Dalam kelompok tipe limfosit, sel CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulator menghasilkan jumlah IL-10 yang signifikan dan secara langsung terlibat dalam pengembangan anergi sel T dan induksi toleransi (Comi dkk., 2018).

Sitokin IL-10 menghambat aktivasi banyak jenis sel dan fungsi efektor yang terkait dengan penyakit alergi. IL-10 yang disekresi sel T secara signifikan meningkat pada individu non atopik dibandingkan dengan pasien alergi, dan sebaliknya untuk pasien alergi, sel Th2 menghasilkan sitokin IL-4 (Hawrylowicz, 2005).

2.6 Flowcytometry

Flowcytometry adalah teknologi yang mengukur secara bersamaan baik sifat optik dan fluoresensi dari sel tunggal atau partikel lain termasuk organel sel dan mikroorganisme. Teknologi ini memanfaatkan cahaya terang (biasanya dari laser) untuk secara langsung mengungkapkan berbagai aspek yaitu ukuran, perincian (internal kompleksitas sel) termasuk intensitas fluoresensi relatif sel dengan cara cahaya tersebar dengan menggabungkan probe fluoresen ke komponen sel atau partikel yang tersuspensi (Bupta dkk., 2016).

Flowcytometry telah membuat kemajuan besar dalam sitologi, hematologi, imunologi, dan mikrobiologi, di antara bidang penelitian lainnya. Penilaian

kualitatif dan kuantitatif dari patogen, fenotip respons sel dan kematian sel, serta studi fungsi metabolisme, sel-sel dan interaksi matriks ekstraseluler sel, bisa dilakukan menggunakan teknik *flowcytometry*. Hal ini menunjukkan jangkauan luas teknik *flowcytometry*, yang dapat membantu pengumpulan data di berbagai bidang (Silveira, 2015).

2.7 Mencit

Hewan bisa digunakan sebagai hewan coba apabila hewan tersebut bebas dari mikroorganisme patogen, mempunyai kemampuan dalam memberikan reaksi imunitas yang baik, kepekaan hewan terhadap sesuatu penyakit, dan performa atau performa atau anatomi tubuh hewan percobaan yang dikaitkan dengan sifat genetiknya. Sekitar 40-80% penggunaan mencit sebagai hewan model laboratorium karena siklus hidupnya yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, mudah ditangani, dan sifat anatomis dan fisiologisnya terkarakterisasi dengan baik. Mencit dapat hidup sampai umur 1-3 tahun tetapi terdapat perbedaan usia dari berbagai galur terutama berdasarkan kepekaan terhadap lingkungan dan penyakit. Tingkat kesuburan mencit sangat tinggi karena dapat menghasilkan kurang lebih satu juta keturunan dalam kurun waktu kurang lebih 1 tahun (Tolistiawaty dkk., 2014).

Mencit (*Mus musculus L.*) termasuk mamalia pengerat (rodensia) yang cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar serta sifat anatomisnya dan fisiologisnya terkarakteristik dengan baik. Adapun klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Phylum : Chordata
Sub phylum : Vertebrata
Class : Mammalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae
Genus : Mus
Species : *Mus musculus*

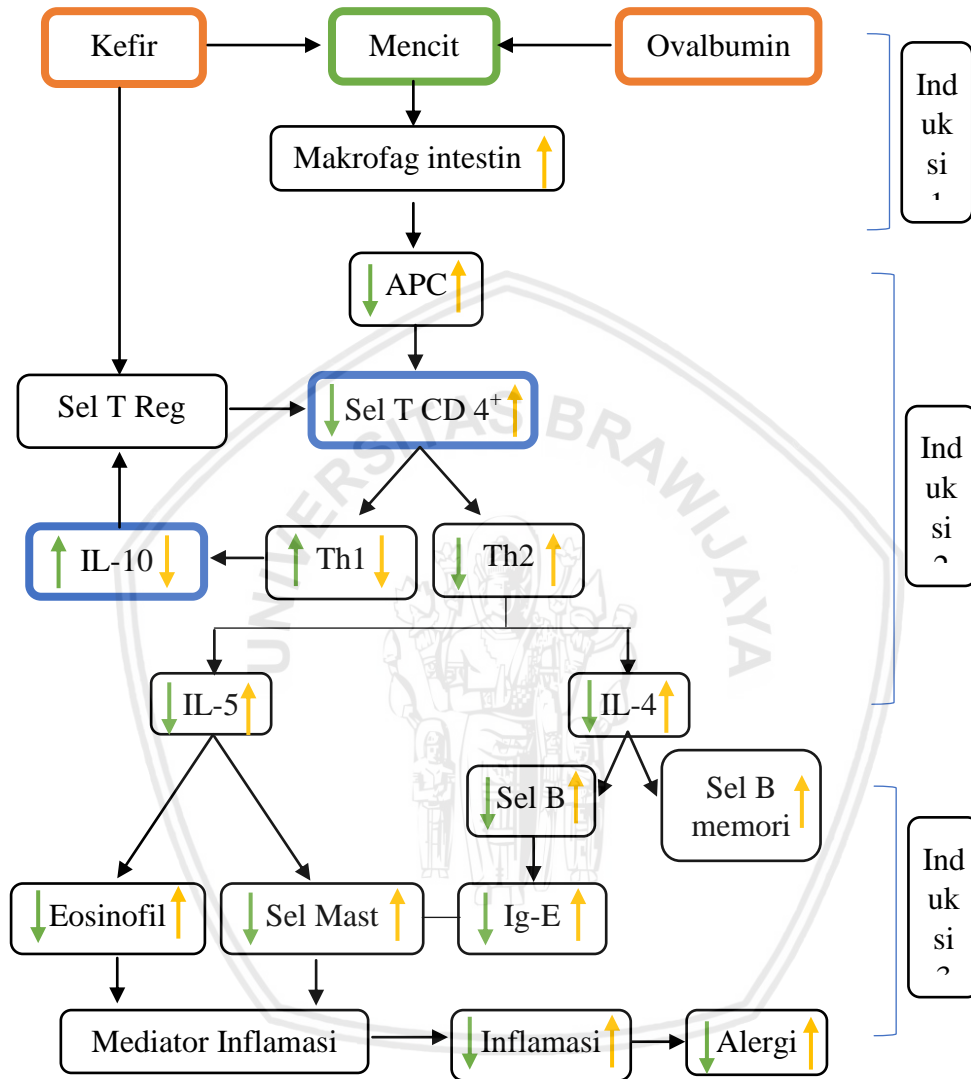
Mencit (*Mus musculus* L.) memiliki ciri-ciri berupa bentuk tubuh kecil, berwarna putih, memiliki siklus estrus teratur yaitu 4-5 hari. Kondisi ruang untuk pemeliharaan mencit (*Mus musculus* L.) harus senantiasa bersih, kering dan jauh dari kebisingan. Suhu ruang pemeliharaan juga harus dijaga kisarannya antara 18-19°C serta kelembaban udara antara 30-70% (Akbar, 2010). Adapun gambar mencit ditunjukkan oleh **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Mencit (Akbar, 2010)

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

 	: Variabel Bebas	↑↓	: Efek Kefir
 	: Variabel Tergantung	↑↓	: Efek Ovalbumin
 	: Variabel Kontrol	↓	: Proses

Pemberian preventif kefir dalam penelitian ini berfungsi untuk mencegah inflamasi yang disebabkan oleh alergen (OVA). Kandungan kefir yaitu bakteri asam laktat, yeast dan bioaktif peptida dapat menstimulasi sistem imun untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen, meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 yang akan mengaktifkan sel T reg untuk menyeimbangkan sel T CD4 untuk berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2. Efek imunomodulator kefir juga dapat menurunkan permeabilitas intestin yang menyebabkan kontak antigen dengan APC yang ada di mukosaintestin menurun, sehingga dapat mengurangi respons inflamasi. Bioaktif peptida kefir dapat menstimulasi produksi IgA oleh sel B plasma. IgA berfungsi sebagai barier epitel intestin untuk mencegah adanya kontak antara alergen dengan reseptor pada intestin sehingga bisa mencegah alergi. Selain itu, bakteri dalam kefir juga bisa menjadi sitoprotektan epitel intestine yang mencegah kerusakan epitel.

Pada penelitian ini dilakukan pemberian ovalbumin sebagai alergen yang nantinya akan menyebabkan alergi intestin pada mencit. Ovalbumin (OVA) diberikan sebanyak dua kali melalui intraperitoneal dan satu kali melalui oral. Paparan OVA pertama akan mengaktifkan respon imun non-spesifik oleh makrofag intestine. Selanjutnya paparan OVA kedua akan memicu respon imun spesifik oleh *antigen presenting cells* (APC) dalam tubuh. Paparan OVA ke tiga akan mengaktifasi sel B memori.

Antigen (OVA) akan dikenali oleh APC (sel dendritik) dan dibawa ke limfonodus untuk dipresentasikan ke sel T naif. Setelah itu sel T naif akan teraktivasi menjadi sel T CD4 yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi sel

Th1, Th2 dan sel T regulator. Sel Th1 akan memproduksi IL-10 untuk mengaktifkan sel T regulator. Sel T regulator akan menyeimbangkan diferensiasi Th1 dan Th2. Sel Th2 akan memproduksi IL-4 dan IL-5. IL-4 akan membuat sel B yang memproduksi imunoglobulin (Ig) M selanjutnya beralih untuk memproduksi IgE yang spesifik untuk respon alergi. Sedangkan IL-5 akan merangsang produksi eosinofil yang menyebabkan inflamasi. IgE akan berikatan dengan sel mast pada reseptor $Fc \epsilon$ dan berakhir fase sensitisasi. Kemudian sel mast yang telah berikatan dengan IgE akan membentuk ikatan silang dan akan mengalami degranulasi yang menyebabkan pelepasan mediator proinflamasi seperti histamin, protease, serta beberapa leukotrien dan prostaglandin. Mediator ini yang akan menyebabkan kontraksi otot polos, vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler yang menyebabkan inflamasi dan diare. Inflamasi dan diare merupakan tanda dari adanya reaksi alergi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan antara lain :

1. Pemberian preventif kefir pada hewan mencit yang diinduksi ovalbumin dapat mencegah peningkatan kadar relatif sel T CD4.
2. Pemberian preventif kefir pada hewan mencit yang diinduksi ovalbumin dapat mencegah peningkatan kadar relatif IL-10.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian 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. Kefir didapatkan dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang,
4. Uji *flowcytometry* untuk pengamatan kadar relatif sel T CD4 dan IL-10 yang dilakukan di Laboratorium Biomolekuler FMIPA Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat penelitian

Kandang tikus, *dissecting set*, *glass ware*, serta alat untuk uji *flowcytometry* seperti *yellow tip*, *blue tip*, *mortir*, *sentrifuge tube*, *flowcytometer* dan *software BD Cell Quest Pro™*.

4.2.2 Bahan penelitian

Mencit jantan *strain* Balb-c berumur 8 – 12 minggu dengan berat badan mencit antara 25-30 gram dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Kefir yang diperoleh dari Fakultas

Peternakan Universitas Brawijaya, Ovalbumin sediaan vial (Serva), $\text{Al}(\text{OH})_3$, antibodi sel T CD4 dan IL-10 *anti mice*, aquades, PBS dan pakan pellet.

4.3 Sampel Penelitian

Kriteria hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dengan berat 25-30 gram berumur 8-12 minggu. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan, sehingga banyaknya perlakuan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus $t(n-1) \geq 15$ (Montgomery *and* Kowalsky, 2011) :

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : Jumlah perlakuan

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

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

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan *post control only*. Mencit dibagi menjadi 5 kelompok dengan 4 ulangan. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
Kontrol (-)	Mencit diadaptasikan di kandang selama 7 hari selanjutnya diberikan <i>placebo</i> NaCl Fisiologis per oral (0,5 mL/ekor) pada hari ke 8-21.
Kontrol (+)	Mencit diadaptasikan di kandang selama 7 hari selanjutnya diberikan ovalbumin (OVA) dengan dosis 20 µg/ekor secara IP pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-29 melalui P.O (60 mg /ekor).
Perlakuan 1	Mencit diadaptasikan di kandang selama 7 hari selanjutnya diberikan preventif kefir pada hari ke 8-21 dengan dosis 300 mg/kgBB dan diberikan OVA dengan dosis 20 µg/ekor secara IP pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-29 melalui P.O (60 mg/ekor).
Perlakuan 2	Mencit diadaptasikan di kandang selama 7 hari selanjutnya diberikan preventif kefir pada hari ke 8-21 dengan dosis 600 mg/kgBB dan diberikan OVA dengan dosis 20 µg/ekor secara IP pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-29 melalui P.O (60 mg/ekor).
Perlakuan 3	Mencit diadaptasikan di kandang selama 7 hari selanjutnya diberikan preventif kefir pada hari ke 8-21 dengan dosis 900 mg/kgBB dan diberikan OVA dengan dosis 20 µg/ekor secara IP pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-29 melalui P.O (60 mg/ekor).

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati pada penelitian ini adalah:

Variabel bebas: Dosis Kefir dan Ovalbumin.

Variabel terikat : Persentase kadar sel relatif sel T CD4 dan IL-10.

Variabel kendali : Berat, umur, strain, pakan, dan kandang mencit.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Mus musculus* galur BALB/c jantan. Mencit diaklimatisasi selama tujuh hari sebelum digunakan untuk penelitian. Mencit diberi minum *ad libitum* dan pakan yang diberikan sebanyak 10% berat badan setiap sore. Pakan diberikan sebanyak 3 g per hari. Mencit dibagi dalam lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor mencit dalam satu kandang. Kandang mencit berbahan plastik dengan tutup kawat dan diberi alas berupa sekam padi agar kandang tidak lembab. Mencit dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.6.2 Pembuatan Kefir

Pembuatan kefir dilakukan dengan metode Chandan dkk. (2006). Toples kaca steril disiapkan, masing-masing diisi 250 mL susu kambing, dipanaskan 80 sampai 85 °C selama 30 menit, kemudian didinginkan sampai suhu kamar. Sampel susu ditambah 5 % kefir grain dan diinokulasikan. Susu yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 30,5$ °C)

selama 10 jam, sampai pH mencapai 4,2 sampai 4,6 dan disaring untuk memisahkan kefir grain (Martharini dan Indratiningsih, 2017).

4.6.3 Pemberian Kefir Sebagai Preventif

Mencit BALB/C diadaptasikan dengan lingkungan kandang selama 7 hari, kemudian diberi kefir dengan dosis 300 mg/kgBB untuk P1, 600 mg/kgBB untuk P2, dan 900 mg/kgBB untuk P3 secara oral pada hari ke 8-21 (Chen dkk., 2014).

4.6.4 Pembuatan Hewan Model Alergi Menggunakan Ovalbumin

Mencit BALB/c diinjeksi 20 µg OVA/ekor secara IP (OVA; Serva) dicampur dengan 1000 µg aluminium hidroksida (Al(OH)₃; Sigma) yang dilarutkan dalam aquades steril pada hari ke-15 dan 22 selanjutnya diinduksi kembali OVA pada hari ke-30 melalui P.O (60 mg/ekor) dicampur dengan 10 mg aluminium hidroksida (Al(OH)₃; Sigma) yang dilarutkan dalam aquades steril.

4.6.5 Pengkoleksian Sampel

Pengambilan limpa pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) BALB/c jantan dilakukan pada hari ke-30 dengan dilakukan eutanasi pada mencit dengan cara induksi ketamin 0,2 mL. Kemudian mencit diposisikan rebah dorsal. Daerah abdomen diincisi dan dikuakkan lalu dikoleksi organ limpa. Limpa yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam PBS steril.

4.6.6 Pengukuran Kadar relatif CD4 dan IL-10 menggunakan metode *flowcytometry*

Sampel yang diuji dengan *flowcytometry* adalah organ limpa. Sampel dibilas dengan menggunakan PBS sebanyak dua kali, diletakkan dalam cawan petri berisi 5 ml PBS, digerus dan dihomogenisasi serta disuspensi dengan PBS.

Sel-sel yang diperoleh dari hasil isolasi difilter dengan menggunakan *wire*, disentrifugasi 1500 rpm, pada suhu 20° C selama 5 menit. Hasil supernatan dibuang dan pelletnya direndam dalam *cytofix* dan *cytoferm* 100 µL untuk memfikasi dan permeabilisasi agar terwarnai oleh *antibody intraseluler staining* selama 20 menit untuk pengukuran kadar IL-10. Kemudian ditambahkan 50 µL *antibody intraseluler staining* (anti sel T CD4 dan anti IL-10) yang dikonjugasi dengan label PE. Data hasil *flowcytometry* dianalisis dengan *35 software* BD *cellquest Pro*TM. Program diatur sesuai dengan pewarnaan dan jenis sel yang diidentifikasi. *Gated* dilakukan berdasarkan pola ekspresi sel yang terlihat dalam layar komputer (Hefni dkk., 2013).

4.7 Analisa Data

Data hasil *flowcytometry* bersifat kuantitatif dianalisis menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji Tukey pada $\alpha = 0.05$.

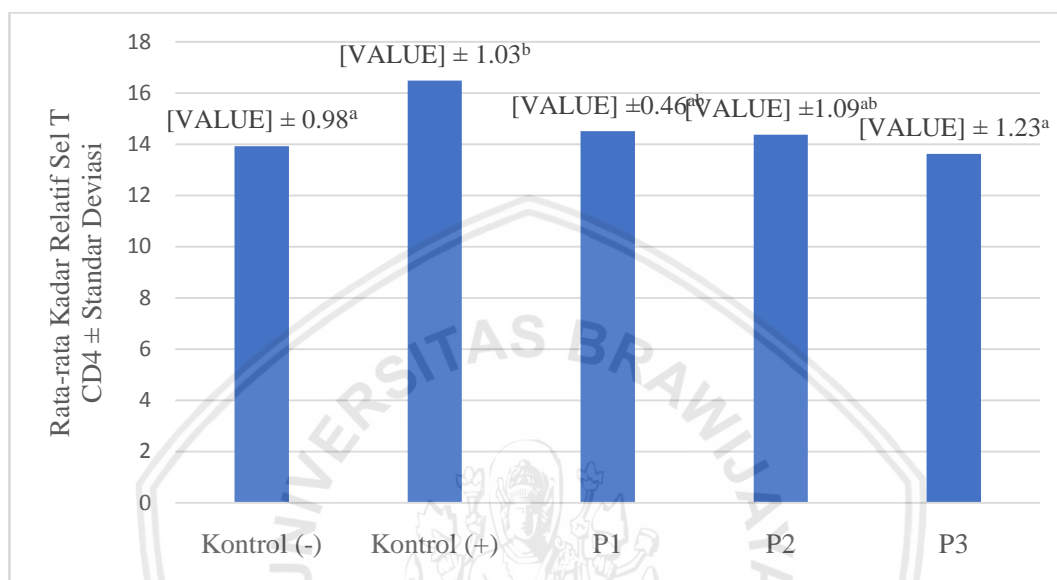
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Preventiv Kefir Pada Mencit BALB-C yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif Sel T CD4

Data kadar relatif sel T CD4 hasil uji *flowcytometry* dianalisa menggunakan SPSS 22.0 *for windows* dengan uji normalitas dan homogenitas menunjukkan distribusi data normal dan homogen (**Lampiran 6**). Selanjutnya Kadar relatif sel T CD4 dianalisa statistika menggunakan *One Way ANOVA* dan diperoleh hasil yang signifikan antar kelompok ($p < 0.05$) (**Lampiran 6**). Kemudian dilanjutkan ke uji *Tukey* dan didapatkan perbedaan yang signifikan antara kontrol negatif dan kontrol positif (**Lampiran 6**). Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar relatif IgE dan jumlah eosinofil sebagai parameter utama dari alergi yang hasilnya tidak signifikan antar semua kelompok perlakuan. Selain itu mencit juga belum menunjukkan gejala klinis seperti diare. Hal ini menunjukkan bahwa mencit yang diinduksi ovalbumin belum terjadi reaksi alergi.

Pada penelitian ini, sensitisasi menggunakan ovalbumin dengan dosis 20 μg secara intraperitoneal dilakukan 2 kali. Kemudian dilanjutkan induksi alergi dengan ovalbumin secara per oral dilakukan satu kali dengan dosis tinggi yaitu 60 mg. Hal ini berbeda dengan penelitian Bonnet dkk (2016) yang melakukan sensitisasi dengan dosis 10 μg sebanyak 2 kali secara intraperitoneal. Untuk induksi alergi menggunakan ovalbumin sebanyak 5 kali dengan dosis 20 mg.

Reaksi alergi dapat ditimbulkan akibat paparan alergen yang lebih lama dan dosis rendah. Hasil rata-rata kadar relatif sel T CD4 menggunakan metode *flowcytometry* ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



Gambar

5.1

Keterangan : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$).

Grafik

K (-) = mencit sehat

rata-rata

K (+) = mencit diinduksi ovalbumin

kadar

P1 = mencit diberi preventif kefir 300 mg/Kg BB selama 14 hari

P2 = mencit diberi preventif kefir 600 mg/Kg BB selama 14 hari

P3 = mencit diberi preventif kefir 900 mg/Kg BB selama 14 hari

relatif sel T CD4 pada masing-masing perlakuan

Pada kontrol negatif kadar relatif sel T CD4 yaitu 13.92% menunjukkan bahwa dalam tubuh yang sehat, sel T CD4 tetap ada. Sel T CD4 menjalankan berbagai fungsi mulai dari aktivasi sel sistem kekebalan tubuh bawaan, limfosit B, dan juga memainkan peran penting dalam menekan reaksi imun (Luckheeram dkk., 2012). Sel T CD4 dalam tubuh dapat berdiferensiasi menjadi 4 kelompok yaitu Th1, Th2, Th17 dan Treg, tergantung jenis antigen yang masuk kedalam tubuh (Zhu dan Paul., 2008).

Sel limfosit T dari sumsum tulang belakang akan mengalami maturasi pada timus dan berdiferensiasi menjadi sel T CD4 dan sel T CD8. Sel T CD4 yang sudah mengalami maturasi kemudian menuju organ limfoid sekunder seperti limpa, limfonodul, dan jaringan limfoid pada mukosa yang jumlahnya konstan untuk mengenali antigen. Sel T CD4 bersama dengan sel T CD8 membentuk sebagian besar limfosit T. Sel T CD4 setelah diaktifkan berfungsi sebagai sel efektor yang berperan dalam memediasi respon imun melalui sekresi sitokin spesifik (Luukheeram dkk., 2012).

Pada kelompok kontrol positif menunjukkan kadar relatif sel T CD4 tertinggi yaitu 16.49% dibandingkan dengan kontrol negatif dan perlakuan. Hal ini dikarenakan kontrol positif diberikan ovalbumin yang menyebabkan peningkatan sel T CD4 sebagai respon tubuh terhadap ovalbumin. Ovalbumin yang diinduksikan harus bisa melewati pelindung intestin untuk bisa menyebabkan alergi. Ovalbumin yang bisa melewati pelindung intestin akan diserap masuk ke pembuluh darah kemudian masuk pembuluh limfe dan dibawa menuju limpa. Limpa merupakan organ limfoid sekunder terbesar yang mengandung sekitar seperempat limfosit tubuh dan memulai respon imun terhadap antigen yang dibawa oleh darah (Cesta, 2006).

Antigen akan dipresentasikan oleh APC yaitu sel dendritik ke sel T CD4. Sel T CD4 akan mengalami peningkatan akibat diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel Th2 saat proses alergi (Wambre dkk., 2017). Dalam reaksi alergi sel Th2 akan meningkat dan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10. IL-4 akan menginduksi sel B untuk berdiferensiasi menjadi sel B plasma dan sel B memori.

Sel B plasma akan menghasilkan IgE. IL-5 akan merangsang produksi eosinofil dan sel mast. IgE akan mengikat antigen dan berikatan silang dengan eosinofil serta sel mast dan terjadi degranulasi mengeluarkan mediator inflamasi yaitu histamin. Histamin akan menyebabkan terjadinya inflamasi (Bhagat dkk., 2017). Histamin mengaktifkan H1R (Histamin 1 Reseptor) melalui Gαq/11, yang kemudian mengaktifkan fosfolipase C dan meningkatkan kadar Ca²⁺ intraseluler. Akibatnya, terjadi kontraksi otot polos dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Dengan demikian, hampir semua reaksi hipersensitivitas, termasuk gejala yang diamati pada kulit, seperti eritema, pruritus, dan edema, dapat ditimbulkan oleh aktivasi H1R (Thangam, 2018).

Pada kelompok perlakuan 1 dan 2 terjadi penurunan kadar relatif sel T CD4 jika dibandingkan dengan kontrol positif namun belum signifikan. Hal ini dikarenakan kelompok perlakuan 1 dan 2 diberikan kefir sebagai preventif alergi selama 14 hari sebelum dilakukan induksi ovalbumin. Pada kelompok perlakuan 1 dan 2 yaitu mencit yang diberikan preventif kefir dengan dosis 300 mg/Kg BB dan 600 mg/Kg BB secara per oral selama 14 hari, kadar rata-rata sel T CD4 masih tinggi yaitu sebesar 14.51% dan 14.38%. Hal ini menunjukkan bahwa dosis kefir sebanyak 300 mg/Kg BB dan 600 mg/Kg berat badan belum efektif menurunkan kadar relatif sel T CD4. Penurunan kadar relatif sel T CD4 disebabkan karena efek kefir sebagai imunoregulator yang mengatur keseimbangan respon imun antara Th1 dan Th2, sehingga sel T CD4 yang diferensiasi ke arah Th2 untuk menyebabkan reaksi inflamasi dapat ditekan. Hal

ini sesuai dengan penelitian Rosa dkk (2012), yang menyatakan bahwa kefir memiliki efek immunomodulator yang menekan reaksi alergi.

Pada kelompok perlakuan 3 yang diberi dosis 900 mg/ Kg BB menunjukkan kadar relatif rata-rata sel T CD4 sebesar 13.62% yang paling mendekati kontrol negatif. Hal ini menunjukkan dosis kefir sebesar 900 mg/Kg BB merupakan dosis terbaik dalam penelitian ini yang mampu menurunkan kadar relatif sel T CD4 mendekati kontrol negatif. Penurunan sel T CD4 akan menurunkan reaksi inflamasi yang disebabkan oleh induksi ovalbumin.

Secara fisiologis, intestin memiliki pelindung alami berupa pelindung fisik yaitu mukus dan GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissues*). Saluran pencernaan dilapisi oleh lapisan mukus, yang merupakan produk dari sel sekretori pada tunika mukosa. Lapisan mukus bertindak sebagai penghalang fisik, melindungi permukaan mukosa dari dehidrasi dan kerusakan mekanis. Lapisan mukus memiliki fungsi penting dengan permeabilitas selektif, yang dapat beradaptasi dan dapat diatur sebagai respons terhadap rangsangan ekstraseluler, seperti nutrisi, sitokin dan bakteri. Lapisan mukus melindungi jaringan mukosa terhadap patogen dengan menghambat penempelan antigen, mempertahankan konsentrasi tinggi IgA dan lisozim yang disekresikan dan bertindak sebagai pengikat radikal bebas (Tarabova dkk., 2016).

GALT merupakan jaringan limfoid yang tersusun oleh *Mesenteric Lympho Nodul* (MLN) dan *Peyer Patch* (PP), serta limfosit yang tersebar di lamina propria (LP) dan epitel intestin yang mengandung sejumlah besar IgA. Salah satu fungsi utama GALT adalah untuk membedakan antigen berbahaya dari mikroorganisme

patogen dan untuk memperoleh respons yang sesuai. Respons ini dapat dipengaruhi secara signifikan oleh mikroorganisme pada intestin (Forchielli dan Walker., 2005).

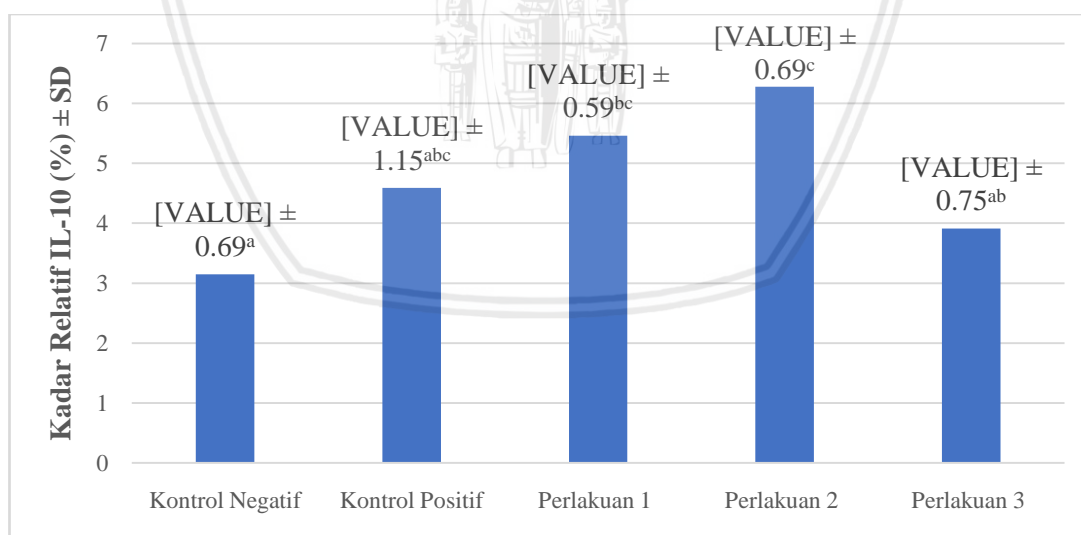
Menurut penelitian Davras dkk (2018), kefir yang diberikan selama 7 hari dapat meningkatkan produksi IgA. IgA pada mukosa dapat berfungsi untuk menetralkan antigen dan meningkatkan produksi mukus yang akan menjebak antigen dan mencegah adanya adhesi pada epitel intestin (Kim dkk., 2016). Khamir dalam kefir seperti *Saccharomyces boulardii* dapat mengurangi inflamasi pada intestin. Selain itu khamir lain seperti *Kluyveromyces marxianus* juga memiliki efek imunomodulator yang bisa menurunkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α sehingga menuju fase selanjutnya yaitu proliferasi dan dilanjutkan remodeling jaringan baru (Bourrie dkk., 2016).

Kandungan utama kefir yaitu bioaktif peptida, bakteri asam laktat dan khamir mempunyai banyak manfaat bagi tubuh seperti antiinflamasi, antialergi, antioksidan, antikanker dan antihipertensi. Kefir memiliki efek sebagai imunomodulator yang menekan adanya peningkatan respon imun saat terjadi alergi. Saat terjadi alergi, tubuh akan merespon alergen secara berlebihan dan memproduksi histamin secara berlebihan yang menyebabkan inflamasi. Sifat imunomodulator dari kefir dapat dihasilkan dari aksi mikroba, dan melalui berbagai senyawa bioaktif yang dihasilkan selama proses fermentasi. Bioaktif peptida diproduksi selama fermentasi susu oleh mikrobiota yang ada di kefir, mampu mengaktifkan makrofag untuk meningkatkan laju fagositosis, menekan

respon imun Th2, dan menstimulasi sekresi IgA oleh limfosit B di lumen intestin (Rosa dkk., 2012).

5.2 Pengaruh Pemberian Preventif Kefir Pada Mencit BALB-C yang Diinduksi Ovalbumin Terhadap Kadar Relatif IL-10

Data kadar relatif IL-10 hasil uji *flowcytometry* dianalisa menggunakan SPSS 22.0 *for windows* dengan uji normalitas dan homogenitas menunjukkan distribusi data yang normal dan homogen (**Lampiran 7**). Selanjutnya dilanjutkan uji *One Way ANOVA* diperoleh hasil nilai $p < 0.05$ yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan (**Lampiran 7**). Kemudian dilanjutkan ke uji *Tukey* dan didapatkan 3 notasi (**Lampiran 7**). Pada kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif dan perlakuan. Berikut ini adalah **Gambar 5.2** yang menunjukkan rata-rata kada relatif IL-10.



Gambar 5.2 Rata-rata Kadar Relatif IL-10

Keterangan : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$).

K (-) = mencit sehat

K (+) = mencit diinduksi ovalbumin

P1 = mencit diberi preventif kefir 300 mg/Kg BB selama 14 hari

P2 = mencit diberi preventif kefir 600 mg/Kg BB selama 14 hari

P3 = mencit diberi preventif kefir 900 mg/Kg BB selama 14 hari

IL-10 pada kontrol negatif atau mencit sehat menunjukkan kadar rata-rata paling rendah yaitu 3.15%. Dalam kondisi normal IL-10 diproduksi dalam jumlah tertentu sebagai imunoregulator untuk menjaga homeostasis tubuh. Interleukin-10 (IL-10), juga dikenal sebagai *cytokine synthesis inhibitory factor* (CSIF), adalah sitokin dengan fungsi imunoregulasi yang penting. IL-10 memiliki sifat anti inflamasi dan mempengaruhi aktivitas beberapa jenis sel dari sistem kekebalan tubuh. IL-10 terutama disekresikan oleh sel T, monosit, makrofag, sel dendritik, *natural killer cell* (NK) dan sel-B. IL-10 akan menekan produksi sitokin pro inflamasi yang dapat menyebabkan kerusakan sel akibat inflamasi (Verma dkk., 2016).

Menurut Iyer dan Cheng (2012), interleukin 10 (IL-10) adalah sitokin dengan sifat anti-inflamasi yang kuat yang memainkan peran sentral dalam membatasi respon imun tubuh terhadap patogen, sehingga mencegah kerusakan pada host dan mempertahankan homeostasis jaringan normal, selain itu defisiensi IL-10 dapat meningkatkan respon inflamasi terhadap paparan mikroba dan bisa menyebabkan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Selain itu, IL-10 yang diproduksi oleh sel Th1 akan menginduksi IFN- γ untuk mengaktifkan proses apoptosis (Trinchieri, 2007).

Pada kontrol positif menunjukkan kadar rata-rata yang meningkat jika dibandingkan dengan kontrol negatif yaitu sebesar 4.59%. Hal ini dikarenakan saat terjadi paparan alergen, secara fisiologis tubuh akan memproduksi sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10 sebagai immunosupresor untuk menekan reaksi

inflamasi. Sehingga saat adanya antigen yang masuk, IL-10 akan mengalami peningkatan untuk menekan respon imun yang berlebihan yang bisa menyebabkan kerusakan jaringan. Menurut Polukort dkk (2016), IL-10 mengalami peningkatan saat terjadi alergi intestin. IL-10 pada kondisi alergi makanan memiliki fungsi untuk menetralisasi alergen, mencegah diare akibat paparan alergen dan menurunkan jumlah sel mast.

Pada kelompok perlakuan 1 yaitu dosis kefir 300 mg/Kg BB, kadar IL-10 mengalami peningkatan yaitu sebesar 5.46% dan pada kelompok perlakuan 2 dengan dosis kefir 600 mg/Kg BB IL-10 juga meningkat yaitu sebesar 6.28%. IL-10 yang tinggi menunjukkan bahwa masih berada pada tahap awal dari penurunan inflamasi. Kefir yang diberikan masih belum mampu untuk menurunkan reaksi inflamasi akibat paparan ovalbumin sehingga kadar IL-10 masih tinggi. Kadar IL-10 yang terlalu tinggi dapat menjadi immunosupresan sehingga tubuh tidak sensitif terhadap antigen yang masuk. IL-10 yang tinggi dapat menyebabkan sel T anergi (Bijjiga dan Martino., 2013).

Pada kelompok perlakuan 3 yaitu dosis kefir 900 mg/Kg BB menunjukkan penurunan kadar relatif IL-10 mendekati kontrol negatif atau mencit sehat. Hal ini menunjukkan dosis kefir sudah mampu menurunkan kadar sitokin IL-10. Penurunan IL-10 menunjukkan bahwa mencit sudah melewati fase inflamasi jaringan menuju proliferasi dan remodeling. Menurut Huseini dkk (2011), kandungan probiotik dalam kefir dapat memperkuat sistem imun, mengurangi inflamasi, mempercepat penyembuhan luka yang diikuti akumulasi limfosit,

makrofag dan sel darah polimorfonuklear pada tempat terjadinya kerusakan jaringan.

Bakteri asam laktat dalam kefir ini bisa meningkatkan produksi sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dan menurunkan produksi sitokin pro inflamasi seperti IL-8 pada tahap proliferasi. IL-10 merangsang keseimbangan antara fungsi sel yang memproduksi sitokin proinflamasi dan sel yang memproduksi sitokin antiinflamasi (Davras dkk, 2018). Namun pada penelitian ini, kefir berfungsi untuk menurunkan kadar IL-10 agar mendekati kontrol negatif untuk menuju ke tahap proliferasi dan remodeling. IL-10 menginduksi dari fungsi sel Treg untuk menekan proliferasi sel T CD4 ke arah sel Th2 saat terjadi fase inflamasi. Kemudian kadar IL-10 akan menurun setelah fase inflamasi berakhir menuju fase proliferasi dan remodeling jaringan baru.

Pada penelitian ini, dosis kefir sebanyak 900 mg/Kg BB dapat menurunkan kadar relatif sel T CD4 dan IL-10 mendekati kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa dosis kefir 900 mg/Kg BB merupakan dosis terbaik dalam penelitian ini untuk mencegah efek dari pemberian ovalbumin. Sel T CD4 berfungsi untuk aktivasi sel sistem kekebalan tubuh bawaan, limfosit B, dan juga memainkan peran penting dalam menekan reaksi imun. Sedangkan IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang menekan terjadinya inflamasi akibat paparan ovalbumin. Menurunnya kadar IL-10 menunjukkan bahwa inflamasi sudah berakhir dan menuju fase selanjutnya yaitu proliferasi dan remodeling jaringan. Kadar relatif IL-10 mengalami penurunan mendekati kontrol negatif karena sel yang memproduksi IL-10 yaitu sel T CD4 mengalami penurunan

karena efek dari kefir sehingga reaksi inflamasi akibat induksi ovalbumin dapat ditekan.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

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 dengan dosis 300 mg/Kg BB, 600 mg/Kg BB dan 900 mg/Kg BB selama 14 dapat mencegah peningkatan kadar relatif sel TCD4 pada mencityang diinduksi ovalbumin
2. Pemberian preventif kefir dengan dosis 900 mg/Kg BB selama 14 dapat mencegah kadar relatif IL-10 pada mencityang diinduksi ovalbumin

6.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya induksi ovalbumin dilakukan lebih lama paparannya dengan dosis kecil untuk menunjukkan gejala klinis yang signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar B. 2010. Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif yang berpotensi sebagai bahan antifertilitas. Jakarta: *Adabia Press*.
- Bhagat, R., Amir. A. S., V. S. Wazir., Aditya M., and Uttarani, M. 2017. Food Allergy in Canines. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. Vol. 5 (6): 1522-1525.
- Bhowmik, D., Kumar, K. P. S., Umadevi, M. 2012. Allergy – Symptoms, Diagnosis, Treatment and Management. *The Pharma Journal*. Vol. 1 (3): 16-28.
- Bijjiga E., and Martino A. T., 2013. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. *J Clin Cell Immunol*. S1: 1-6.
- Bonnet B, James Vi, Béatrice L, Thomas V, Fabien P, Faustine B, Guillaume C, David K and Bertrand B. 2016. Low-Dose IL-2 Induces Regulatory T Cell–Mediated Control of Experimental Food Allergy. *J Immunol*. Vol. 197 (1) 188-198.
- Bourrie. B. C., Willing B. P., Cotter. P. D., 2016. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front Microbiol*. Vol 7: 647.
- Boyce, J.A., Amal A., A. Wesley B., Stacie M. J., Hugh A. S., Robert A. W., Marshall P., Susan F. C., Matthew J. F., S. Hasan A., Sami L. B., Lisa A. B., Carol B. B., Carlos A. C., Lawrence E., Glenn T. F., Jon M. H., Carol J., Monica K., Bruce D. L., Phil L., Stefano L., Kathleen M. McC., Lynda C. S., Ronald A. S., F. Estelle R. S., Stephen J. T., Barbara P. Y., and Julie M. Schwaninger., 2010. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States. *J Allergy Clin Immunol*. Vol. 126(60): 51–58.

- Candra, Y., Setiarini, A., 2011. Gambaran Sensitivitas Terhadap Alergen Makanan. *Jurnal Makara Kesehatan*. Vol. 15 (1): 44-50.
- Castellazzi, A. M., Chiara V., Silvia C., Amelia L., Alessia M., Maria C. L., Davide C., Michele M. G., Salvatore L., Mario L. R., and Gian L. M.B., 2010. Probiotics and food allergy. *Italian Journal of Pediatrics*. 39:47.
- Cesta. M. F., 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Journal Toxicologic Pathology*. Vol 34:455–465.
- Comi M., Giada A., Silvia G., 2018. Interleukin-10-Producing DC-10 Is a Unique Tool to Promote Tolerance Via Antigen-Specific T Regulatory Type 1 Cells. *Front Immunol*; 9: 682.
- Davras, F., Zeynep B. G. S., Tugba K. T., 2018. Immunological effects of Kefir produced from Kefir grains versus starter cultures when fed to mice. *Functional Foods in Health and Disease*. Vol 8(8): 367-378.
- Deo, S. S., Kejal, J. M., Amol, M. K., Pramod, V. N., 2010. Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India*. Vol. 27 (2): 66-71.
- Elshemy, A., and Abobakr, M., 2013. Allergic Reaction: Symptoms, Diagnosis, Treatment and Management. *Journal of Scientific and Innovative Research*. Vol. 2 (1): 123-144.
- Friedeck, A. 2011. Food Allergies. *Vet Tech*. Vol. 32(7):E1-E7.
- Forchielli. M. L., dan Walker. W. A., 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *British Journal of Nutrition*. Vol 93 (1): S41–S48.

- Gupta A., Deepak V., Sushama R. C. 2016. Flow cytometry: an overview in optical system and application in biological studies. *European Journal of Biological Research*. Vol. 6 (3): 186-192.
- Gutzeit, C., Magri, G., Cerrutti, A., 2014. Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev*. 260 (1): 76-85.
- Hawrylowicz C. M. 2005. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *JEM*. Vol. 202 (11): 1459-1463.
- Hefni M., Muhaimin R., dan Widodo., 2013. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Daun *Moringa oleifera* Lam Terhadap Populasi Hematopoetic Stem Cell Pada Mencit Yang Diinfeksi *Salmonella typhi*. *El Hidayah*. Vol 3 (2): 61-69.
- Huseini. H. F., Rahimzadeh. G., Fazeli. M. R., Mehrazma. M. Salehi. M., 2012. Evaluatin of Wound Healing Activities of Kefir Products. *Journal of the International Society for Burn Injuries*. Vol 38(5):719-723.
- Iyer. S. S., dan Cheng. G., 2012., Role Of Interleukin 10 Transcriptional Regulation In Inflammation And Autoimmune Disease. *J Crit Rev Immunol*. Vol 32 (1): 23-63.
- John, S. M., and Sirirat D. S., 2015. Properties and benefits of kefir. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. Vol. 37 (3): 275-282.
- Julianto, B., Evy R., Yusmarini., 2016. Karakteristik Kimiawi Dan Mikrobiologi Kefir Susu Sapi Dengan Penambahan Susu Kedelai. *Jom Faperta*. Vol. 3 (1): 1-11.
- Kim. S. H., Woonhee. J., Choi. D., Jeong. J. W. Lee. D. E., Huh. C. S., 2016. Lactic Acid Bacteria Improves Peyer's Patch Cell-Mediated Immunoglobulin A and Tight-Junction Expression in a

Destructed Gut Microbial Environment. *Journal Microbiol Biotechnol.* Vol 26 (6): 1035-1045.

Lukcheeram R.V., Zhou, R., Verma. A.D., Xia. B., 2012. CD4 T Cells: Differentiation and Functions. *J. Clinical and Developmental Immunology.* Vol. 2012 (1): 1-12.

Mandigers, P., German, A. J., 2010. Dietary hypersensitivity in cats and dogs. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* Deel 135 (19): 706-709.

Martharini D., dan I. Indratiningsih., 2017. Kualitas Mikrobiologis dan Kimiawi Kefir Susu Kambing dengan Penambahan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dan Tepung Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca*). *Agritech.* Vol. 37 (1): 22-29.

Mollazadeh. H., Cicero. A. F., Blesso. C., Pirro., Majeed ., Sahebkar., 2017. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. *Journal Crit Rev Food Sci Nutr.* Vol 59 (1): 89-101.

Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ., 2014. Food allergy: insights. into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J Allergy Clin Immunol*;133:309-17.

Polukort. S. H., Rovatti. J., Carlson. L., Thompson. C., 2016. IL-10 enhances IgE-mediated mast cell responses and is essential for the development of experimental food allergy in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* Vol 196 (12): 4865-4876.

Prakash, A. G., S. S. Ghoke., K. B. Mandal., K. S. Thorat. 2017. Clinico-Therapeutic Management of Canine Atopic Dermatitis (CAD). *Intas Polivet.* Vol. 18 (1): 117-119.

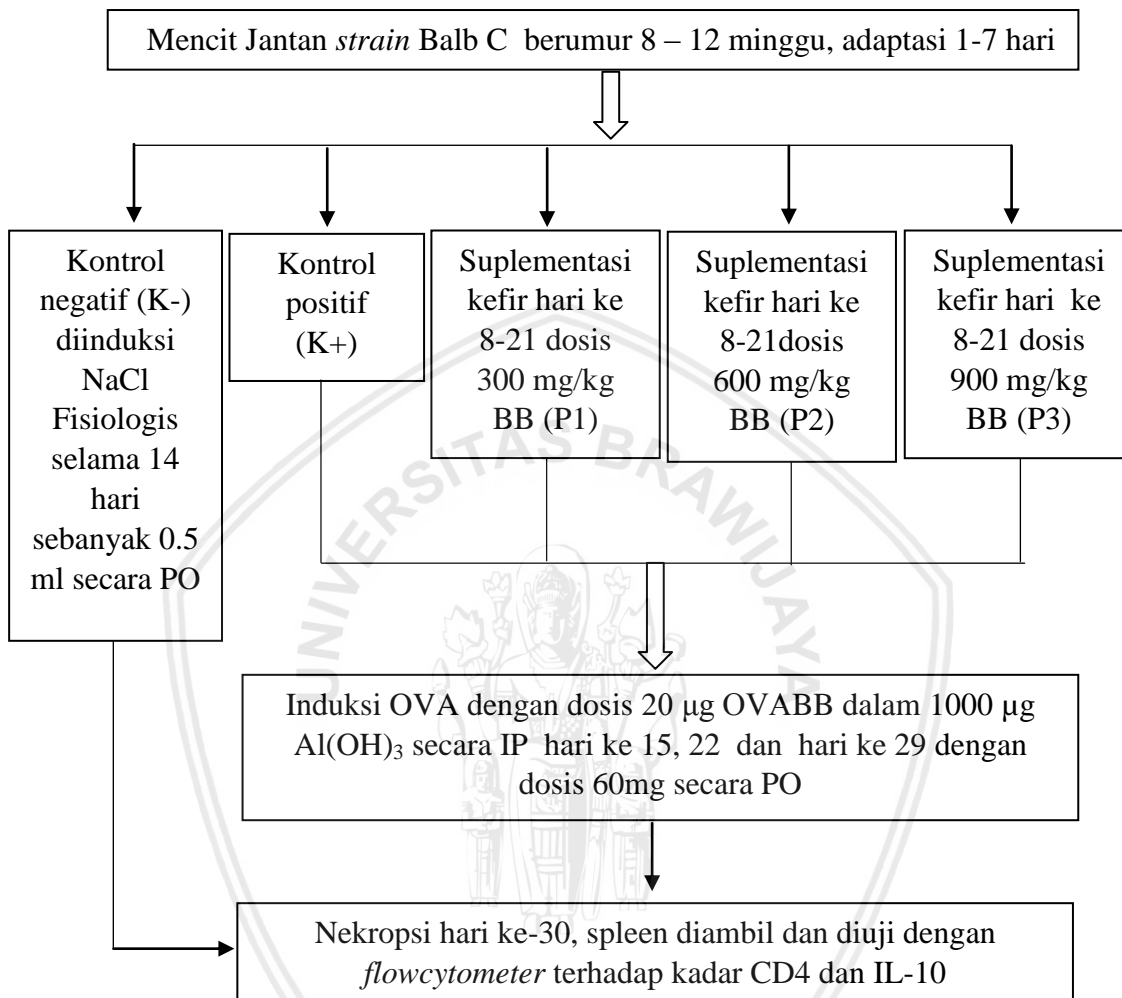
Riwayati. 2015. Reaksi Hipersensitivitas atau Alergi. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera.* Vol. 13 (26): 22-27.

- Rosa, D. D., Manoela M. S., Dias, L.M., Grzes'kowiak, Sandra A. R., Lisiane L. C., and Maria do Carmo G. P. 2017. Milkkefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*: 1-15.
- Safitri, M. F., Swarastuti, A., 2013. Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Kefir Grain. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol. 2 (2): 87-92.
- Shicerer. S. H., and Sampson, H. A., 2010. Food Allergy. *J AllergyClin Immunol*. Vol. 125 (2): S116-S125.
- Silveira F. G., 2015. Evolution of Flow Cytometry Technology. *J Microbiochem Technol*. Volume 7(4): 213-216.
- Sun, L. Z., S. Elsayed, T. B. Aasen, T. Van D., N. P. Aardal., E. Florvaag., and K. Vaali., 2010. Comparison between Ovalbumin and OvalbuminPeptide 323-339 Responses in Allergic Mice: Humoral and Cellular Aspects. *Scandinavian Journal of Immunology*. 71: 329-335.
- Tangam. E. B., Jemima. E. A., Singh. H., Baig. M. S., Khan. M., Mathias. C. B., Church. M. K., Saluja. R. 2018. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol*. Vol 9: 1873.
- Tarabova, L., Makova, Z., Piesova, E., Szaboova, R., Faixova, Z. 2016. Intestinal Mucus Layer And Mucins. *Folia Veterinaria*. Vol 60 (1): 21-25.
- Tolistyawati I., Junus W., Phetisya P. F., Oktaviani., 2014. Gambaran Kesehatan pada Mencit (*Mus musculus*) di Instalasi Hewan Coba. *Jurnal Vektor Penyakit*. Vol. 8 (1): 27 - 32.
- Trinchieri. G., 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*. Vol 204 (2): 239-243.
- Vera MS and Amanda G. 2008. Diagnosis and Management of Food Allergies in Dogs and Cats. *Veterinary Technician. Nutrition*; 29: 6.

- Verma, R., Lavanya B., Kusum S., Aafaque A K., Jayshree A., Harsha G., Srikanth P T., Mrutyunjay S., Akhilesh P., Sheetal G., T.S. Keshava P., Subramanian S., 2016. A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J. Cell Commun. Signal.* 10:61-67.
- Wambre. E., Bajzik. V., DeLong. J. H., O'Brien. K., Nguyen. Q., Speake. C., Gersuk. V. H., 2017. *J Science Translational Medicine.* Vol. 9.
- WAO. 2011. White Book on Allergy. *World Allergy Organization:* 1-209.
- Woodfolk, J.A., Scott. P. C., Alexander J. S., Elizabeth, A. E., Thomas, A. E. 2015. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses. *Allergology International.* 64: 295-303.
- Yuniastuti, A. 2014. Probiotik dalam Perspektif Kesehatan. UNNES PRESS: Semarang.
- Zhu, J., and Paul, W. E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood Journal.* Vol. 112 (5): 1557-1569.
- Zhu, J., Hidehiro Y., and William E. P., 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol;* 28: 445-489.



LAMPIRAN

Lampiran 1 : Kerangka Operasional

Lampiran 2: 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

P2 : 43 gr

P3 : 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 g = 1 ml

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

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

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

2. Ovalbumin

- a. Intraperitonal hari ke 15 dan 22 dosis 20µg/mencit ovalbumin, 1000µg/mencit Al(OH)₃. Volume intraperitonal 0,5 ml/ mencit.

Stock : 1 mg/ ml

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

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

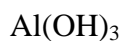
Kebutuhan volume total : 12 ekor x 0,5 ml x 2 induksi = 12 ml ~ 15 ml

Dosis : Ovalbumin

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

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

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

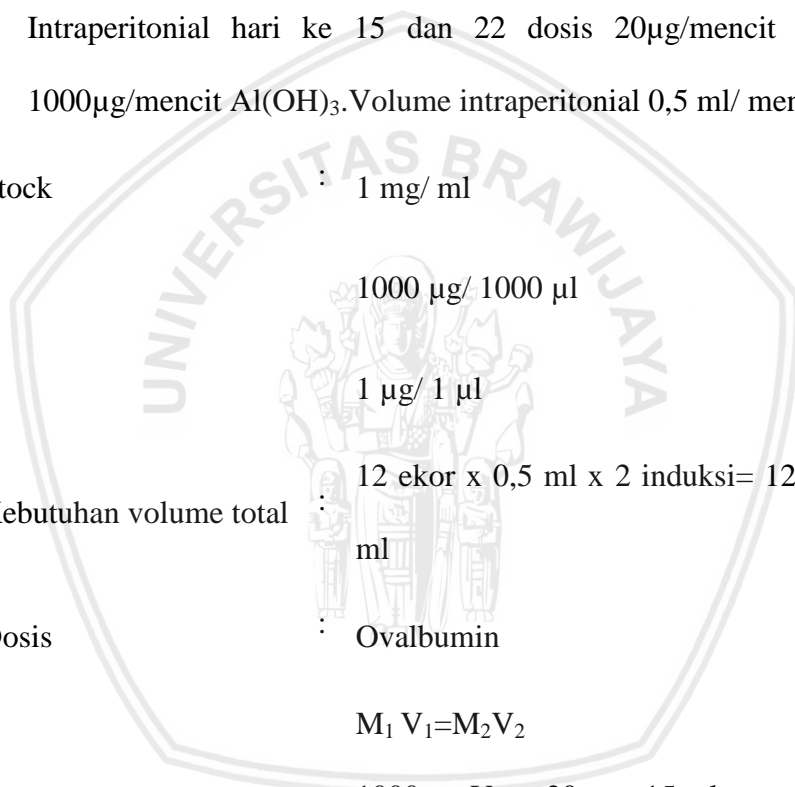


Stock 1 µg/ 1µl

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

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

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



Sediaan : 0,3 ml stock ovalbumin + 15 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$
ad aquades steril 15 ml

b. Per oral hari ke 30 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

$\text{Al}(\text{OH})_3$

= 10 mg/ekor x 12

= 120 mg

Sediaan : 720 mg ovalbumin + 120 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$
ad aquades steril 15 ml

Lampiran 3



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

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 DAHWA:**


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

PENELITI : DAHLIATUL QOSIMAH

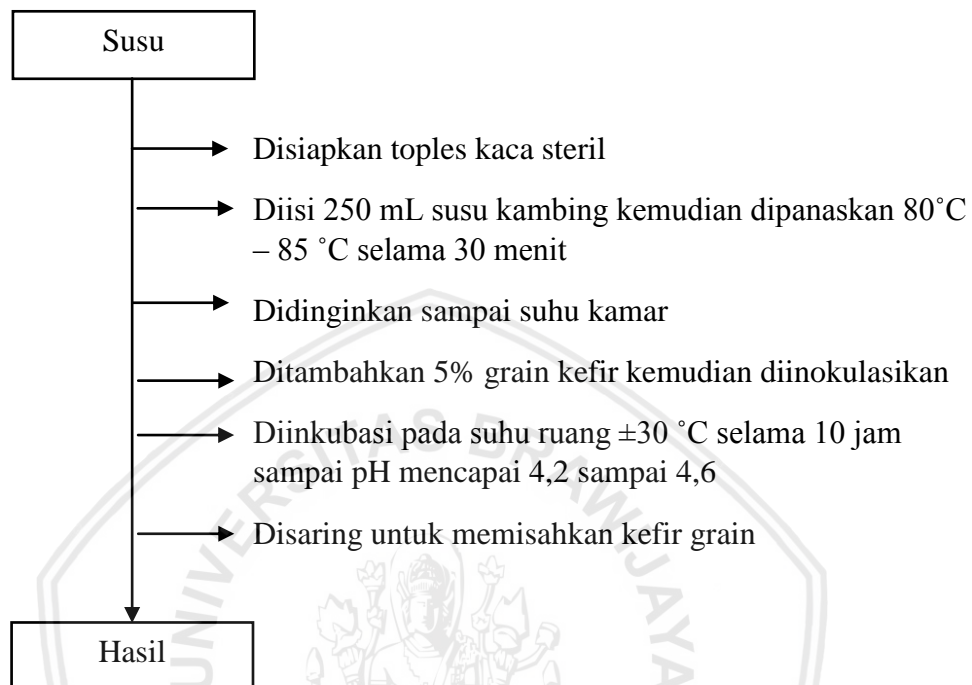
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

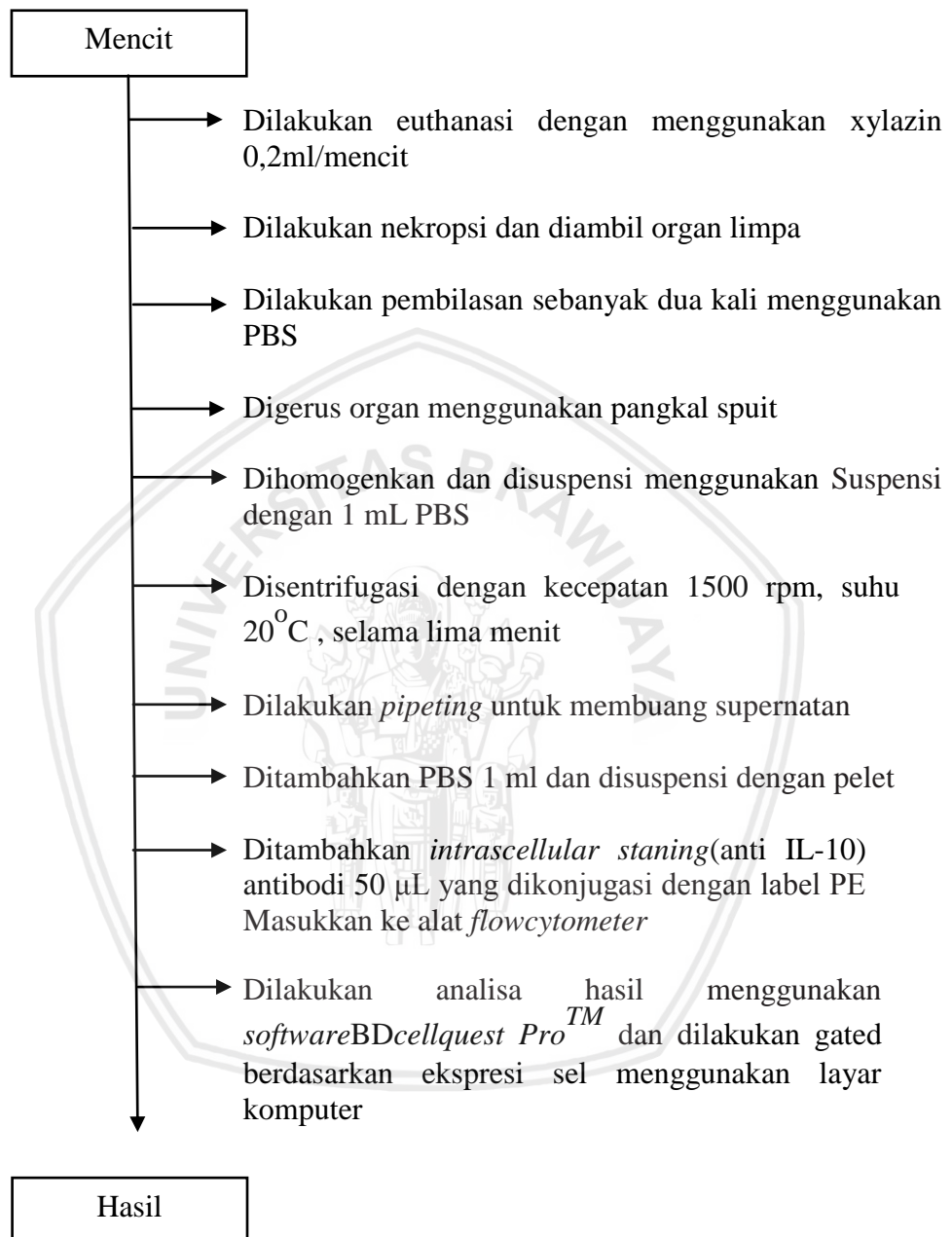
Mulang, 22 Mei 2018
Kepala Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Aulana'zm, DES.
NIP. 19500303 198802 2 001

Lampiran 4: Diagram Alir**1. Pembuatan Kefir**

2. Prosedur *Flowcytometry*

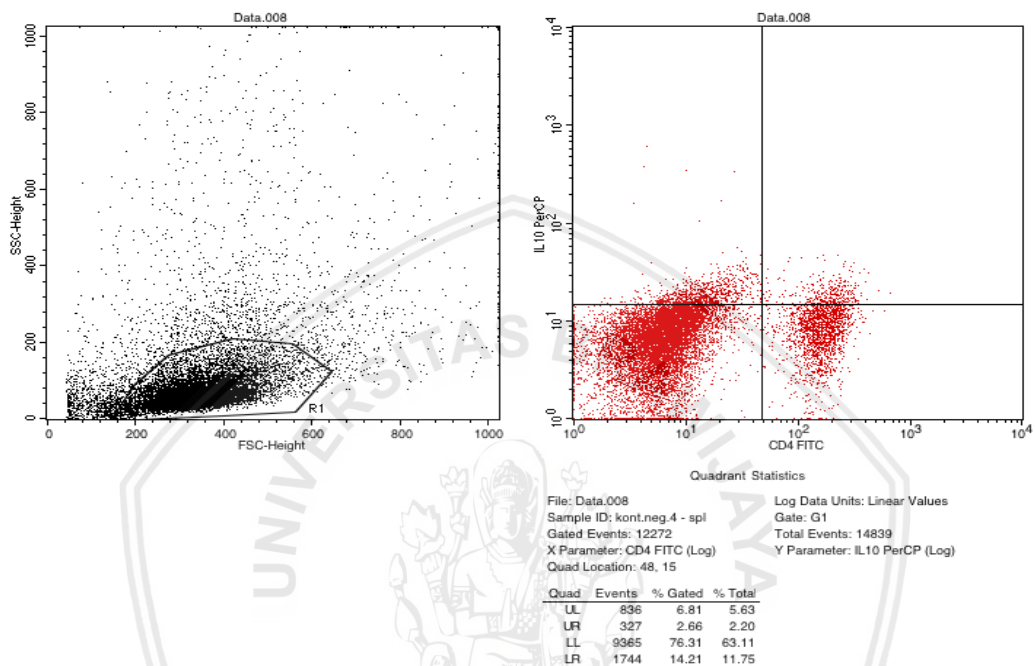


Lampiran 5. Data hasil *Flowcytometry*

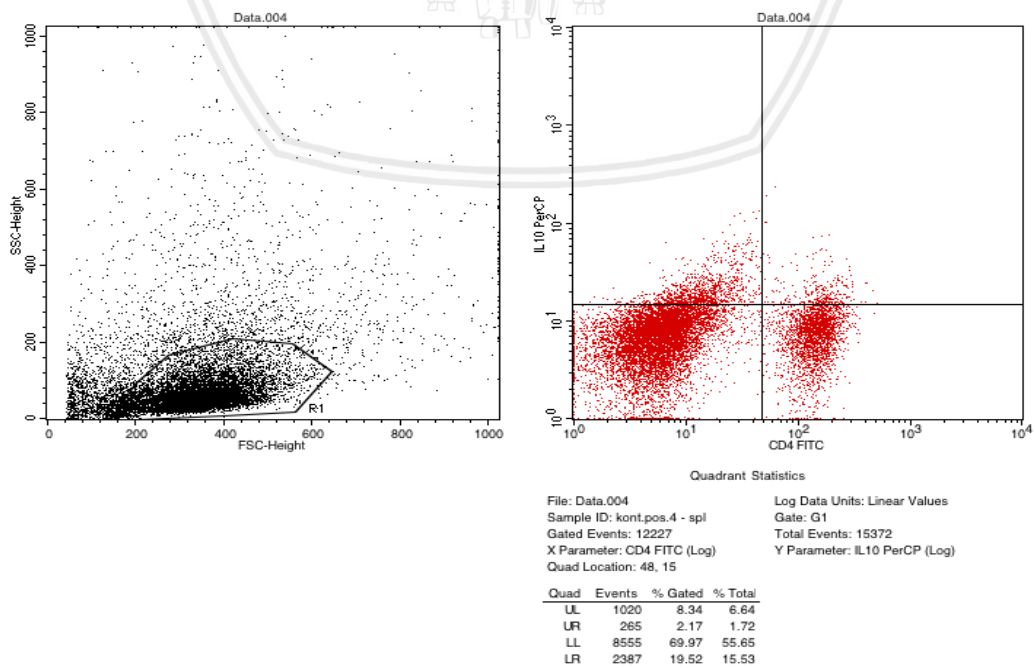
Kelompok	Kadar Relatif sel T CD 4	Rata-rata	Kadar Relatif IL-10	Rata-rata
Kontrol Negatif	12.56	13.92	3.50	3.15
	14.89		3.78	
	14.25		2.18	
	13.99		3.15	
Kontrol Positif	16.97	16.49	6.29	4.59
	17.45		4.29	
	15.05		3.73	
	16.49		4.07	
Perlakuan 1	15.32	14.51	5.68	5.46
	13.52		6.06	
	13.94		4.66	
	15.29		5.46	
Perlakuan 2	15.93	14.38	6.28	6.28
	13.48		7.14	
	14.38		5.43	
	13.74		6.28	
Perlakuan 3	14.32	13.62	3.53	3.91
	13.78		3.91	
	12.82		4.97	
	13.59		3.23	

Kadar Relatif sel T CD4 dan IL-10 Hasil Uji *Flowcytometry*

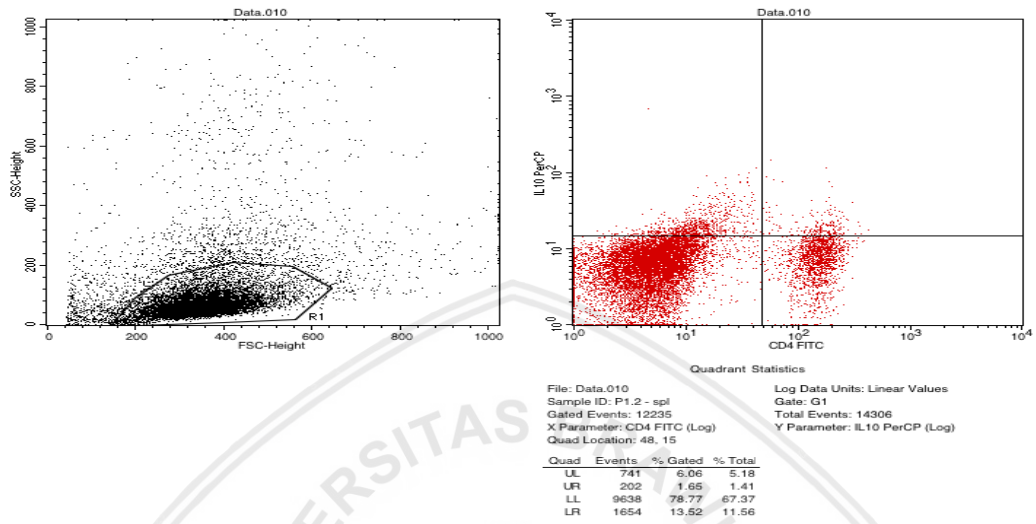
Kontrol Negatif



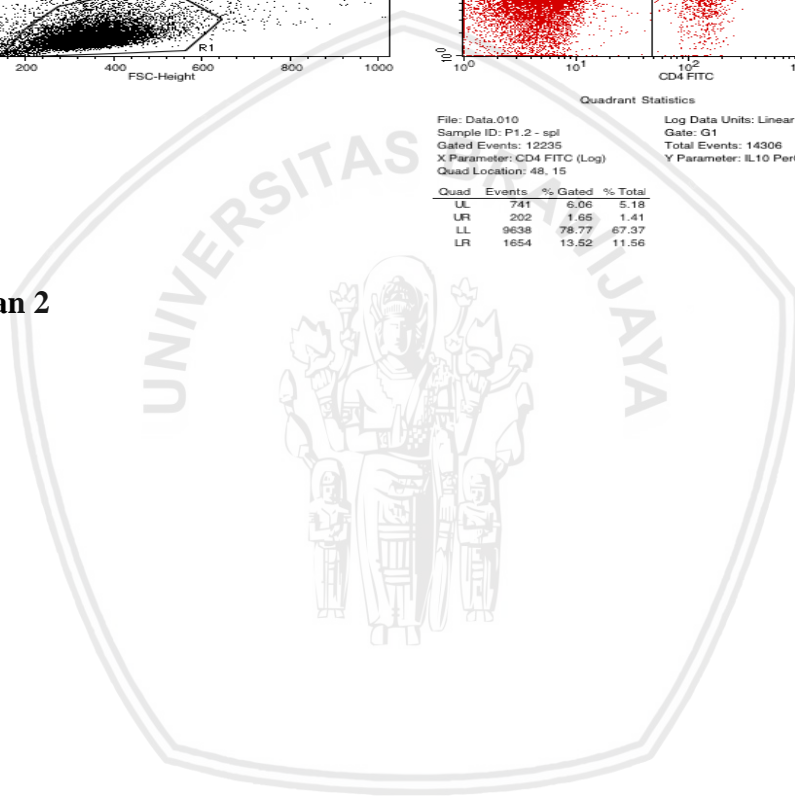
Kontrol Positif



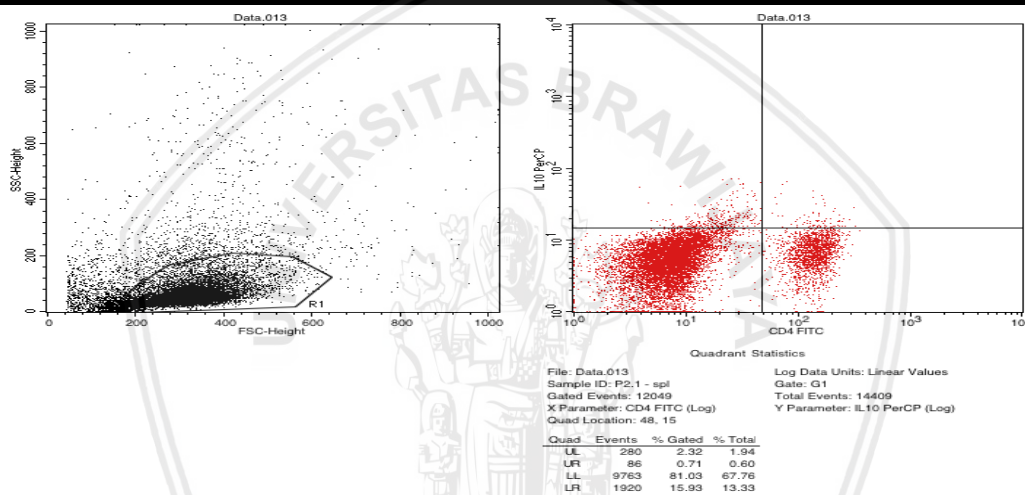
Perlakuan 1



Perlakuan 2

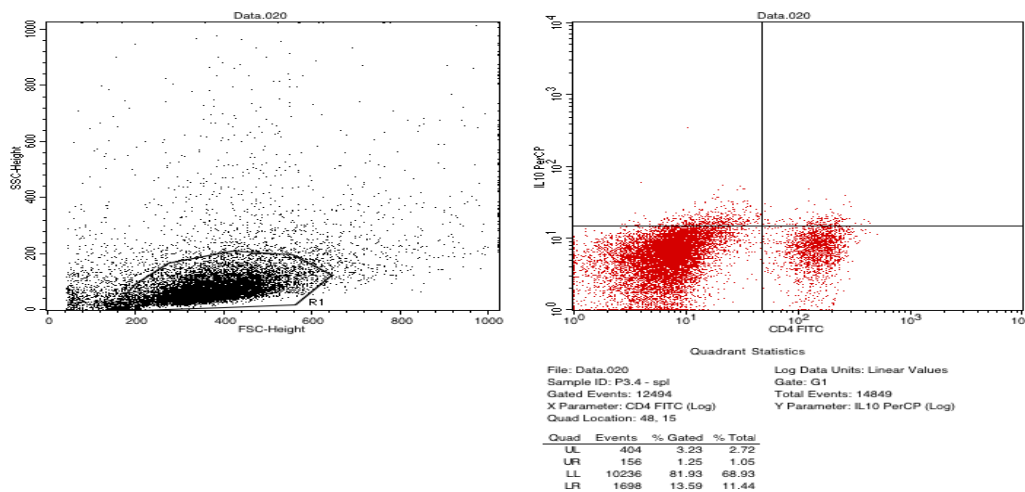


	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
K +	4	13.9225	0.98392	0.49196	12.56	14.89
K -	4	16.4900	1.03692	0.51846	15.05	17.45
P1	4	14.5175	0.92543	0.46272	13.52	15.32
P2	4	14.3825	1.09880	0.54940	13.48	15.93
P3	4	13.6275	0.62083	0.31041	12.82	14.32
Total	20	14.0560	1.32979	0.29735	12.56	17.45



Perlakuan 3

**Lampiran 6. Uji statistika kadar relatif sel T CD4
 Rata-rata Kadar Relatif Sel T CD4 dan Standar Deviasi**



Uji Normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
K +	0.931	4	0.602
K -	0.927	4	0.577
P1	0.832	4	0.172
P2	0.885	4	0.360
P3	0.976	4	0.880

Keterangan: Signifikansi > 0.05 menunjukkan data normal

Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.334	4	15	.851

Keterangan: Signifikansi > 0.05 menunjukkan data homogen

Uji One Way ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.121	4	5.030	5.599	0.006
Within Groups	13.477	15	0.989		
Total	33.599	19			

Keterangan: Signifikansi > 0.05 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan

Uji Tukey**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: CD4_

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(-)	2	-2.56750*	.67026	.012	-4.6372	-.4978
	3	-.59500	.67026	.897	-2.6647	1.4747
	4	-.46000	.67026	.956	-2.5297	1.6097

	5	.29500	.67026	.991	-1.7747	2.3647
K(+)	1	2.56750*	.67026	.012	.4978	4.6372
	3	1.97250	.67026	.065	-.0972	4.0422
	4	2.10750*	.67026	.045	.0378	4.1772
	5	2.86250*	.67026	.005	.7928	4.9322
	P1	1	.59500	.67026	.897	-1.4747
	2	-1.97250	.67026	.065	-4.0422	.0972
	4	.13500	.67026	1.000	-1.9347	2.2047
	5	.89000	.67026	.679	-1.1797	2.9597
P2	1	.46000	.67026	.956	-1.6097	2.5297
	2	-2.10750*	.67026	.045	-4.1772	-.0378
	3	-.13500	.67026	1.000	-2.2047	1.9347
	5	.75500	.67026	.790	-1.3147	2.8247
	P3	1	-.29500	.67026	.991	-2.3647
2		-2.86250*	.67026	.005	-4.9322	-.7928
3		-.89000	.67026	.679	-2.9597	1.1797
4		-.75500	.67026	.790	-2.8247	1.3147

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

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
P3	4	13.6275	
K (-)	4	13.9225	
P2	4	14.3825	
P1	4	14.5175	14.5175
K(+)	4		16.4900
Sig.		.679	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 7. Uji statistika kadar relatif IL-10

Rata-rata Kadar Relatif IL-10 dan Standar Deviasi

Uji Normalitas

Shapiro-Wilk						
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
K +	4	3.1525	.69768	.34884	2.18	3.78
K -	4	4.5950	1.15324	.57662	3.73	6.29
P1	4	5.4650	.59113	.29556	4.66	6.06
P2	4	6.2825	.69811	.34906	5.43	7.14
P3	4	3.9100	.75947	.37974	3.23	4.97
Total	20	4.6810	1.34088	.29983	2.18	7.14

	Statistic	Df	Sig.
K +	.918	4	.526
K -	.808	4	.118
P1	.952	4	.726
P2	.945	4	.683
P3	.916	4	.515

Keterangan: Signifikansi > 0.05 menunjukkan data normal

Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.573	4	15	.687

Keterangan: Signifikansi > 0.05 menunjukkan data homogen

Uji One Way ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.470	4	6.118	9.469	.001
Within Groups	9.691	15	.646		
Total	34.161	19			

Keterangan: Signifikansi < 0.05 menunjukkan ada perbedaan yang signifikan

Uji Tukey IL-10**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: il10

Tukey HSD

Perlakuan	Perlakuan	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K(-)	2	-1.44250	.56836	.134	-3.1975	.3125
	3	-2.31250*	.56836	.008	-4.0675	-.5575
	4	-3.13000*	.56836	.000	-4.8850	-1.3750
	5	-.75750	.56836	.676	-2.5125	.9975
K(+)	1	1.44250	.56836	.134	-.3125	3.1975
	3	-.87000	.56836	.560	-2.6250	.8850
	4	-1.68750	.56836	.062	-3.4425	.0675
	5	.68500	.56836	.749	-1.0700	2.4400
P1	1	2.31250*	.56836	.008	.5575	4.0675
	2	.87000	.56836	.560	-.8850	2.6250
	4	-.81750	.56836	.614	-2.5725	.9375
	5	1.55500	.56836	.095	-.2000	3.3100
P2	1	3.13000*	.56836	.000	1.3750	4.8850
	2	1.68750	.56836	.062	-.0675	3.4425
	3	.81750	.56836	.614	-.9375	2.5725
	5	2.37250*	.56836	.006	.6175	4.1275
P3	1	.75750	.56836	.676	-.9975	2.5125
	2	-.68500	.56836	.749	-2.4400	1.0700
	3	-1.55500	.56836	.095	-3.3100	.2000
	4	-2.37250*	.56836	.006	-4.1275	-.6175

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

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3

K (-)	4	3.1525		
P3	4	3.9100	3.9100	
K (+)	4	4.5950	4.5950	4.5950
P1	4		5.4650	5.4650
P2	4			6.2825
Sig.		.134	.095	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 8. Hasil Uji Proksimat Kefir

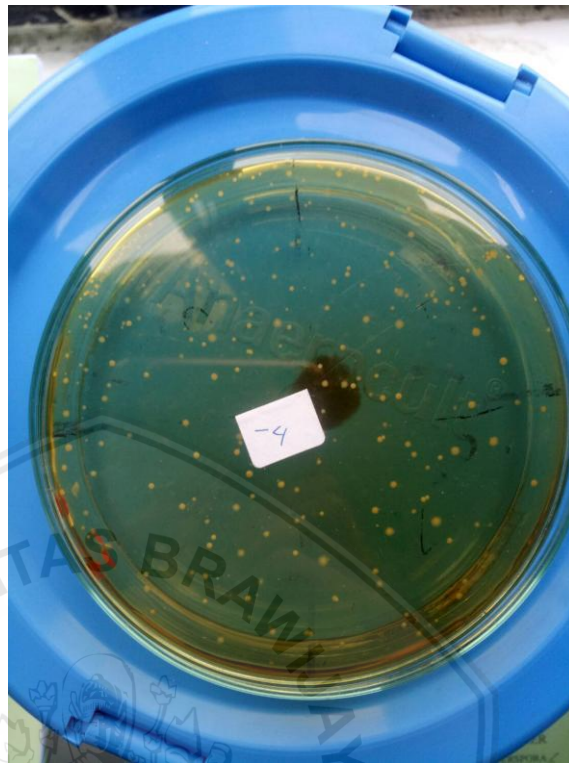
No	Nama Bahan	Jumlah	%AKG*
1.	Lemak Total	2.96 g	4.55 %



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 9. Identifikasi bakteri Asam Laktat pada media MRSA

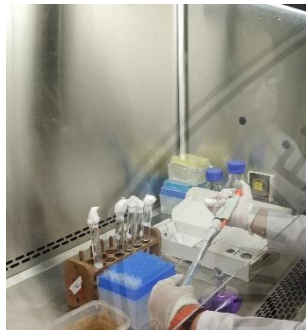


Hasil : Positif bakteri Asam Laktat
Tumbuh koloni bakteri pada media MRSA

Lampiran 10. Dokumentasi



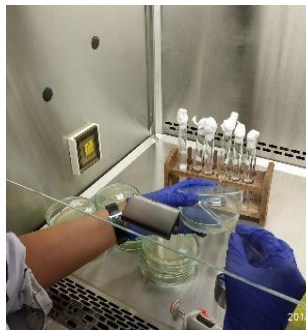
Sediaan Kefir



Persiapan Suspensi Kefir dan Ovalbumin



Proses Penimbangan Mencit



Proses Identifikasi bakteri dengan penanaman di media MRSA

Proses Induksi Preventif Kefir Peroral

Proses Induksi ovalbumin secara Intra Peritoneal



Proses Induksi ovalbumin secara per oral



Nekropsi

