

Efek Pemberian Probiotik, *Nigella Sativa*, Imunoterapi terhadap CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-4⁺ dan Skoring Asma

Effect of Probiotic, Nigella Sativa and Immunotherapy to CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺ IL-4⁺ Expression, and Asthma Scoring

Ratna Kartini

Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Sel CD4⁺IL-4⁺ berperan dalam inflamasi asma. Peran pro-inflamasi CD8⁺ dalam asma dikaitkan dengan subset Tc2 yang menghasilkan IL-4⁺. Imunoterapi merupakan tatalaksana asma yang bermanfaat dan imunomodulator dipertimbangkan untuk meningkatkan efektivitasnya. Sejauh ini belum ada penelitian yang mengkaji pemberian jangka panjang imunoterapi, probiotik dan *Nigella sativa* terhadap modulasi respon imun, khususnya CD4⁺IL4⁺, CD8⁺IL4⁺ dan skoring asma. Desain penelitian berupa eksperimental *randomized clinical trial* (RCT), *post test control study* untuk CD4⁺IL4⁺ dan CD8⁺IL4⁺ dan *pre-post control study* untuk skoring asma. Subjek dibagi 4 kelompok, imunoterapi+plasebo, imunoterapi+*Nigella sativa*, imunoterapi+probiotik, imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik, dengan perlakuan selama 56 minggu. Imunoterapi yang digunakan adalah imunoterapi *house dust mite* (HDM) subkutan. Probiotik yang diberikan ProBi (Medifarma) berisi 2×10^9 *colony forming unit*(cfu)/gram *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium lactis*. Skoring asma dinilai dengan skor *Asthma Control Test* (ACT), bila skor ≥ 19 menunjukkan asma terkontrol. Jumlah CD4⁺IL4⁺ dan CD8⁺IL4⁺ diukur dengan *flowcytometry*. Hasil penelitian menunjukkan jumlah CD4⁺IL4⁺ dan CD8⁺IL4⁺ tidak berbeda bermakna antar kelompok. Jumlah CD4⁺IL4⁺ terendah dan jumlah CD8⁺IL4⁺ tertinggi terdapat pada kelompok imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik. Skoring asma meningkat bermakna setelah perlakuan pada kelompok imunoterapi+*Nigella sativa* ($p=0,002$), imunoterapi+probiotik ($p=0,000$), dan imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik ($p=0,000$). Kelompok imunoterapi+probiotik memiliki skoring asma lebih tinggi dibandingkan imunoterapi ($p=0,04$). Dapat disimpulkan pemberian imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik menurunkan jumlah CD4⁺IL4⁺ lebih rendah dan meningkatkan jumlah CD8⁺IL4⁺ lebih tinggi meskipun tidak bermakna dibandingkan imunoterapi saja. Pemberian kombinasi imunoterapi+probiotik meningkatkan skoring asma lebih baik dibandingkan imunoterapi saja.

Kata Kunci: CD4⁺IL4⁺, CD8⁺IL4⁺, imunoterapi, *Nigella sativa*, probiotik, skoring asma

ABSTRACT

CD4⁺IL-4⁺ cells play a role in asthmatic inflammation. The role of pro-inflammatory CD8⁺ in asthma is associated with Tc2 subset that produces IL-4⁺. Immunotherapy is a useful asthma treatment and immunomodulatory is considered to improve its effectiveness. So far, there has been no study evaluating the long-term administration of immunotherapy, probiotics, and *Nigella sativa* on the modulation of immune responses, particularly CD4⁺IL4⁺, CD8⁺IL4⁺, and asthma scoring. The research design was experimental randomized clinical trials (RCTs), post-test control study for CD4⁺IL4⁺, CD8⁺IL4⁺, and pre-post control study for scoring asthma. Subjects were divided into 4 groups, i.e. immunotherapy+placebo, immunotherapy+*Nigella sativa*, immunotherapy+probiotics, immunotherapy+*Nigella sativa*+probiotics, with treatment over 56 weeks. Immunotherapy used was house dust mite (HDM) subcutaneous immunotherapy. Probiotics given were ProBi (Medifarma) containing 2×10^9 colony forming units (cfu)/g *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. Asthma scoring was assessed with *Asthma Control Test* (ACT) score, in which skor ≥ 19 indicates controlled asthma. The number of CD4⁺IL4⁺ and CD8⁺IL4⁺ was measured using *flowcytometry*. The results show the number of CD4⁺IL4⁺ and CD8⁺IL4⁺ do not differ significantly between groups. The lowest CD4⁺IL4⁺ and the highest CD8⁺IL4⁺ expression are found in immunotherapy+*Nigella sativa*+probiotic group. Asthma scoring increases significantly after treatment in immunotherapy+*Nigella sativa* ($p=0,002$), immunotherapy+probiotic ($p=0,000$), and immunotherapy+*Nigella sativa*+probiotic ($p=0,000$). Immunotherapy+probiotic group has higher asthma scoring than immunotherapy ($p=0,04$). It can be concluded that administration of immunotherapy + *Nigella sativa* + probiotics decrease the number of CD4⁺IL4⁺ lower and increase the number of CD8⁺IL4⁺ although insignificantly higher than immunotherapy alone. Giving combination of immunotherapy+probiotics improve asthma scoring better than immunotherapy alone.

Keywords: Asthma scoring, CD4⁺IL4⁺, CD8⁺IL4⁺, immunotherapy, *Nigella sativa*, probiotics

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 2, Agustus 2014; Korespondensi: Ratna Kartini. Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto No. 2 Malang Tel. (0341) 366242 Email: ratnakartini211004@gmail.com

PENDAHULUAN

Asma adalah penyakit inflamasi kronis jalan nafas yang melibatkan berbagai macam sel, yang menimbulkan episode mengi berulang, sesak nafas, rasa dada tertekan serta batuk terutama pada malam dan dini hari. Sebanyak 300 juta penduduk dunia, menderita asma dengan angka kematian diperkirakan 250.000 pasien pertahun (1). Data tersebut menunjukkan asma masih menjadi masalah kesehatan yang perlu mendapat perhatian serius.

Dalam patogenesis asma, aktivasi sel T CD4⁺ dengan dominasi *T helper 2* (Th2) akan menginduksi proses inflamasi, dengan salah satu sitokin yang terlibat adalah *interleukin-4* (IL-4) (2). *Interleukin-4* berperan dalam diferensiasi sel T CD4⁺ *naive* menjadi sel Th2, *switching* limfosit-B untuk memproduksi *immunoglobulin* (Ig)E serta meningkatkan produksi eosinofil (3). Terdapat dua pandangan mengenai peran sel T CD8⁺, yaitu sel T CD8⁺ menekan terjadinya asma dengan jalan memproduksi *interferon-γ* (IFN-γ) serta menstimulasi diferensiasi sel T CD4⁺ *naive* menjadi subset Th1. Peran lain dari sel T CD8⁺ adalah menstimulasi proses inflamasi asma dengan jalan memproduksi sitokin yang sama dengan Th2 melalui subset *T cytotoxic* (Tc2) (4).

Imunomodulator adalah berbagai macam agen atau intervensi imunologis yang dapat merubah respon imun dengan jalan menekan sel T atau sel B, menginduksi deviasi respon imun, toleransi atau memodifikasi jalur inflamasi (5). Agen imunomodulator tersebut menjadi target pengembangan terapi pada asma (6). Imunoterapi merupakan salah satu imunomodulator yang dapat menciptakan toleransi (7,8). Pemberian imunoterapi jangka panjang dikatakan bermanfaat untuk terapi asma dan rhinitis alergika. Efek imunoterapi yang terjadi berupa deviasi imunologi, anergi spesifik limfosit T serta induksi limfosit Tregulator (Treg) (9). Untuk meningkatkan efektivitas imunoterapi, imunomodulator lain dapat diberikan. Probiotik merupakan suplementasi oral yang mengandung mikroorganisme hidup, dapat mengubah mikroflora *host* dan memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan (10). Studi Falezko *et al* pada mencit model asma menunjukkan pemberian probiotik *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* pada mencit dapat menghambat sensitisasi alergi dengan penurunan produksi IgE dan eosinofil paru serta produksi sitokin Th2 (IL-4, IL-5 dan IL-13) (11).

Selain probiotik, *Nigella sativa* juga berpotensi sebagai imunomodulator dan memiliki efek anti inflamasi (12). Barlianto *et al* menyatakan bahwa pemberian *Nigella sativa* menurunkan jumlah sel limfosit T CD4⁺ dan meningkatkan jumlah sel limfosit T CD4⁺FoxP3⁺ pada paru model mencit asma (13). Studi pemberian probiotik dan *Nigella sativa* pada anak asma yang mendapat imunoterapi HDM fase *build up* selama 14 minggu, didapatkan peningkatan skor ACT pada semua kelompok perlakuan, akan tetapi tidak didapatkan penurunan jumlah CD4⁺IL4⁺ yang bermakna (14). Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji manfaat pemberian kombinasi imunoterapi fase rumatan, probiotik dan *Nigella sativa* pada modulasi respon imun anak asma dibandingkan imunoterapi fase rumatan saja. Efek yang diukur meliputi jumlah CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-4⁺ darah serta perbaikan skoring asma.

METODE

Penelitian dilakukan dengan desain eksperimental

randomized clinical trial (RCT), *post control study* untuk CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-4⁺ dan *pre-post control study* untuk skor ACT. Subjek penelitian merupakan pasien rawat jalan klinik Aleri dan Imunologi Rumah Sakit Saiful Anwar Malang periode November 2012-Februari 2014 yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi penelitian ini yaitu anak yang didiagnosa asma berdasarkan pedoman nasional anak asma (PNAAs) untuk anak usia ≥ 5 tahun dan indeks prediksi asma (IPA) untuk anak <5 tahun, dan tergolong dalam derajat asma *intermittent* atau persisten ringan berdasarkan kriteria *global initiative for asthma* (GINA). Subjek ditetapkan berusia usia 4-14 tahun, alergi terhadap HDM berdasarkan hasil *skin prick test*, belum pernah mendapat imunoterapi. Pasien dan orang tua bersedia secara sukarela mengikuti penelitian dan menandatangani *informed consent*.

Kriteria eksklusi yang digunakan adalah pasien asma disertai komorbid antara lain sinusitis, otitis media, tuberkulosis, pneumonia, polip hidung, gastro-esofageal refluk, atau kelainan anatomi yang lain. Pasien yang menderita immunodefisiensi, penyakit autoimun, atau memiliki kelainan kardiovaskular, memiliki riwayat alergi yang berat antara lain syok anafilaksis dan asma serangan berat yang mengancam nyawa tidak dimasukkan sebagai subjek. Kriteria eksklusi lain adalah pasien yang memerlukan kortikosteroid dosis medium, antagonis leukotriene, teofillin, anti kolinergik, kromolin dan ketotifen untuk mengontrol asma, mengkonsumsi Vitamin D3 dosis tinggi lebih dari 2000 IU/hari selama penelitian, mengkonsumsi *angiotensin converting enzyme* (ACE) *inhibitor* dan *β blocker*, memiliki riwayat gagal nafas dan dilakukan intubasi dalam 6 bulan terakhir.

Subjek penelitian berjumlah 32 orang anak asma (4-14 tahun), baik asma *intermittent* maupun persisten ringan, yang diambil secara *consecutive sampling*. Secara acak subjek dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok imunoterapi+plasebo, imunoterapi+Nigella sativa, kelompok imunoterapi+probiotik dan imunoterapi+Nigella sativa+probiotik. Perlakuan diberikan selama 56 minggu. Skoring asma dinilai pada minggu ke 0, 14 dan 56. Jumlah CD4⁺IL-4, CD8⁺IL-4 diukur pada minggu ke 56.

Pada minggu ke 14, satu sampel dari kelompok imunoterapi+Nigella sativa+probiotik dinyatakan *drop out* karena pasien tidak patuh dalam mengkonsumsi *Nigella sativa*. Selama masa pengamatan dan perlakuan tidak didapatkan sampel yang sakit atau menderita efek samping imunoterapi (Lampiran). Studi ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Lampiran).

Definisi asma pada studi ini adalah asma alergi yang tergolong dalam asma *intermittent* dan asma persisten ringan sesuai dengan klasifikasi GINA. Asma intermiten yaitu asma dengan gejala ≤ 2 hari/minggu, gangguan tidur ≤ 2x/bulan, tidak ada keterbatasan aktivitas, penggunaan obat ≤ 2 hari/minggu dan *forced expiratory volume in 1 second* (FEV1) >80%. Asma persisten ringan yaitu asma dengan gejala >2 hari/minggu tapi tidak setiap hari, gangguan tidur 3-4x/bulan, keterbatasan aktivitas minimal, penggunaan obat >2 hari/minggu dan *forced expiratory volume in 1 second* (FEV1) >80% (1).

Imunoterapi adalah pemberian berulang alergen pada pasien dengan penyakit yang dimediasi IgE, bertujuan memberikan perlindungan terhadap gejala reaksi

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik	Imunoterapi+ plasebo (n=8)	Imunoterapi+Nigella sativa (n=8)	Imunoterapi+ probiotik (n=8)	Imunoterapi+Nigella sativa+probiotik (n=7)
a. Jenis Kelamin				
Laki-laki	5 (5/8)	2 (2/8)	4 (4/8)	4(4/7)
Perempuan	3 (3/8)	6 (6/8)	4 (4/8)	3 (3/7)
b. Usia (tahun)				
<5 tahun	1 (1/8)	1 (1/8)	1 (1/8)	0 (0/8)
≥ 5 tahun	7 (7/8)	7 (7/8)	7 (7/8)	7 (7/8)
c. Riwayat atopi orangtua				
tidak memiliki	2 (2/8)	2 (2/8)	1 (1/8)	3 (3/8)
memiliki	6 (6/8)	6 (6/8)	7 (7/8)	4 (4/8)
d. Hasil <i>skin prick test</i>				
HDM	3 (3/8)	4 (4/8)	2 (2/8)	1 (1/8)
HDM + <i>food</i>	3 (3/8)	2 (2/8)	4 (4/8)	5 (5/8)
HDM + <i>pet</i>	1 (1/8)	1 (1/8)	0 (0/8)	0 (0/8)
HDM + <i>food</i> + <i>pet</i>	1 (1/8)	1 (1/8)	2 (2/8)	1 (1/8)
e. Status gizi				
gizi baik	8 (8/8)	6 (6/8)	7 (7/8)	7 (7/8)
gizi kurang	0 (0/8)	2 (2/8)	1 (1/8)	0 (0/8)
f. Diagnosis				
asma <i>intermitten</i>	4 (4/8)	1 (1/8)	3 (3/8)	1 (1/8)
asma <i>mild persistent</i>	4 (4/8)	7 (7/8)	5 (5/8)	6 (6/8)

inflamasi alergi (7). Imunoterapi yang digunakan adalah imunoterapi ekstrak HDM yang diberikan subkutan dengan dosis dan frekuensi sesuai protokol imunoterapi RSSA Malang, yaitu pemberian setiap 1 minggu selama 14 minggu dengan dosis meningkat bertahap (fase *build up*), pemberian setiap 3 minggu selama 42 minggu atau 14 kali dengan dosis 0,1 ml konsentrasi 1:100 (fase rumatan).

Probiotik yang digunakan adalah ProBi (Medifarma), berisi 2×10^9 cfu/gr bacteria *Lactobacillus acidophilus* LA-5™ dan *Bifidobacterium lactis* Bb-12™, mix vitamin (vitamin B₁ 0,1 mg, vitamin B₂ 0,1 mg, vitamin B₆ 0,1 mg, vitamin C 3 mg), dan selenium yeast 1µg, dengan dosis 1 *sachet* per hari. *Nigella sativa* yang digunakan berupa serbuk dalam kapsul dan diberikan dengan dosis 15 mg/kgBB/hari. Setiap kapsul berisi 150 mg *Nigella sativa*.

Jumlah CD4⁺IL-4⁺ dan jumlah CD8⁺IL-4⁺ dihitung setelah minggu ke 56, diambil dari *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) yang telah dikultur dan diukur dengan tehnik *flowcytometry* serta dianalisis *software* BD Cell Quest Pro dengan satuan persen (%). Skoring asma dinilai pada minggu ke 0, 14 dan 56, dengan menggunakan skor ACT. Skor ACT ≥ 19 diartikan asma terkontrol, sedangkan skor <19 diartikan asma tidak terkontrol.

Data yang diperoleh dianalisis dalam beberapa tahapan uji yaitu uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov*, uji varians dengan *Levene's test*, uji *One Way ANOVA* untuk membandingkan jumlah CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-4⁺ dan skor ACT antar kelompok perlakuan, dan *Post Hoc Tests* untuk mengetahui perbedaan jumlah CD4⁺IL-4⁺, CD8⁺IL-4⁺ dan skor ACT yang bermakna.

HASIL

Penelitian ini melibatkan 32 anak asma berusia 4-14 tahun dan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok imunoterapi+plasebo, kelompok imunoterapi+Nigella sativa, kelompok imunoterapi+probiotik serta kelompok imunoterapi+Nigella sativa+probiotik. Masing-masing kelompok terdiri dari 8 sampel, yang menerima perlakuan

selama 56 minggu. Mayoritas sampel penelitian berusia ≥ 5 tahun, status gizi baik dan memiliki riwayat atopi orangtua. Selain itu sebagian besar memiliki polisensitisasi terhadap alergen dan terdiagnosa sebagai asma persisten ringan.

Perbandingan jumlah CD4⁺IL-4⁺ dan CD8⁺IL-4⁺ antar kelompok tercantum dalam Tabel 2. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak didapatkan perbedaan bermakna rerata jumlah CD4⁺IL-4⁺ ($p=0,81$) dan jumlah CD8⁺IL-4⁺ ($p=0,968$) antar kelompok. Jumlah CD4⁺IL-4⁺ terendah dan jumlah CD8⁺IL-4⁺ tertinggi ada pada kelompok imunoterapi+Nigella sativa+probiotik dibandingkan kelompok lain meskipun secara statistik tidak bermakna.

Tabel 2. Perbandingan rerata jumlah CD4⁺IL-4⁺ dan CD8⁺IL-4⁺ (%)

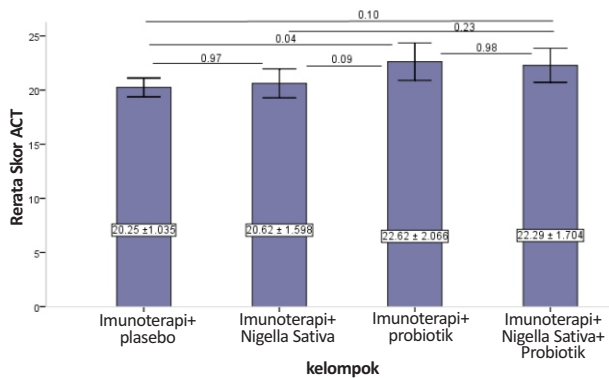
Kelompok Pengamatan	CD4 ⁺ IL-4 ⁺ Rerata ± SD	Bermakna	CD8 ⁺ IL-4 ⁺ Rerata ± SD	Bermakna
Imunoterapi + plasebo	19,95±8,247		6,96±6,972	
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i>	17,03±9,249		7,27±6,279	$p=0,968$
Imunoterapi + Probiotik	18,32±14,585	$p=0,81$	6,33±6,828	
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i> +Probiotik	14,74±8,411		8,12±7,994	

Dari hasil uji perbandingan skor ACT sebelum fase *build up*, setelah fase *build up* dan setelah fase rumatan didapatkan perbedaan yang bermakna, baik pada kelompok imunoterapi + plasebo ($p=0,000$), imunoterapi + *Nigella sativa* ($p=0,002$), imunoterapi + probiotik ($p=0,000$) dan imunoterapi+probiotik+Nigella sativa ($p=0,000$) (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan dapat memperbaiki klinis asma dengan meningkatkan skor

ACT. Peningkatan skor ACT bermakna didapatkan antara sebelum *fase build up* dan setelah *fase build up* imunoterapi serta sebelum *fase build up* dan setelah fase rumatan imunoterapi. Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan dapat memperbaiki klinis asma pada fase *build up* dan perbaikan klinis tersebut ditingkatkan dan dipertahankan selama fase rumatan.

Tabel 3. Perbandingan skor ACT

	Sebelum Fase <i>build up</i> Rerata ± SD	Setelah Fase <i>build up</i> Rerata ± SD	Setelah Fase Rumatan Rerata ± SD	Bermakna
Imunoterapi + plasebo	16,5±1,414	18,75±1,16 5	20,25±1035	$p=0,000$
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i>	14,38±4,307	18,62±2669	20,62±1,598	$p=0,002$
Imunoterapi + Probiotik	15,75±2,121	20,62±3,62 3	22,62±2,066	$p=0,000$
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i> + Probiotik	15,86±1,464	20,14±1,95 2	22,29±1,704	$p=0,000$



Gambar 1. Histogram skor ACT setelah rumatan antar kelompok

Meskipun didapatkan peningkatan skor ACT yang bermakna setelah perlakuan pada masing-masing kelompok, akan tetapi skor ACT setelah fase rumatan imunoterapi paling tinggi bermakna didapatkan pada kelompok imunoterapi+probiotik dibandingkan kelompok imunoterapi+plasebo ($p=0,04$) (Gambar 1). Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian kombinasi imunoterapi dan probiotik pada anak asma mampu memperbaiki skoring asma lebih baik dibandingkan dengan pemberian imunoterapi saja, yang dinilai dengan peningkatan skor ACT yang lebih besar.

DISKUSI

Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya efek positif pemberian imunomodulator, baik probiotik maupun *Nigella sativa* pada anak asma yang mendapat imunoterapi HDM. Penelitian sebelumnya, telah menganalisa efek pemberian probiotik dan *Nigella sativa* pada anak asma yang mendapat imunoterapi fase *build up* selama 14 minggu. Efek pemberian imunomodulator pada fase rumatan belum pernah diteliti. Efek positif yang dinilai adalah jumlah $CD4^+IL-4^+$, jumlah $CD8^+IL-4^+$ yang lebih rendah serta peningkatan perbaikan klinis asma

yang dinilai dengan skor ACT.

Imunoterapi adalah pemberian berulang alergen spesifik secara bertahap yang bekerja dengan jalan menstimulasi sel Treg yang akan menginduksi terbentuknya IgG4 dan menekan IgE serta menekan sel T efektor termasuk Th2, sehingga produksi IL4, IL5 menurun (15). Dua studi mengenai imunoterapi pada anak asma selama 14 minggu menunjukkan penurunan $CD4^+IL-4^+$ darah perifer yang tidak bermakna, akan tetapi didapatkan perbaikan klinis (14,16).

Studi pada hewan coba, membuktikan pemberian *Nigella sativa* menurunkan kadar OVA-specific IgE dan IgG₁ serta kadar IL-4, IL-5, dan IL-13 cairan lavase bronkoalveolar dan darah mencit model asma (17,18). Studi pada mencit asma yang mendapatkan *Nigella sativa* menunjukkan penurunan $CD4^+$ dan peningkatan $CD4^+FoxP3^+$ (13). Pada studi ini, didapatkan jumlah sel $CD4^+IL4^+$ yang lebih rendah pada pemberian imunoterapi+*Nigella sativa* dibandingkan imunoterapi saja meskipun tidak berbeda bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa *Nigella sativa* memiliki manfaat sebagai imunomodulator.

Pada penelitian ini didapatkan rerata jumlah $CD4^+IL-4^+$ yang tidak berbeda bermakna pada pemberian imunoterapi+probiotik dibandingkan imunoterapi saja. Hasil yang sama didapatkan dari studi yang dilakukan oleh Harsono *et al* yang membuktikan pada anak asma yang mendapat SLIT, imunoterapi+probiotik (*Lactobacillus GG*) maupun probiotik saja selama 14 minggu, didapatkan perbaikan klinis asma, akan tetapi kadar IL-4, IL-5 setelah perlakuan antar kelompok tidak berbeda (16). Pada prinsipnya, probiotik dikatakan dapat mempertahankan keseimbangan antara Th1/Th2 pada penyakit alergi. Penurunan kadar sitokin Th2 yaitu IL-4 dan IL-5 didapatkan pada pasien dengan alergi HDM yang memperoleh suplementasi probiotik *L. plantarum* NCIMB8826, *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus casei* ATCC393, *Lactobacillus GG* (19). Dalam suatu studi meta analisis, pemberian probiotik pada pasien alergi dapat memperbaiki gejala meskipun tidak diikuti dengan perbaikan parameter imunologis seperti kadar IgE serta rasio Th1/Th2 (20). Meskipun tidak didapatkan perbedaan yang bermakna jumlah $CD4^+IL-4^+$ antar kelompok perlakuan akan tetapi tampak bahwa jumlah $CD4^+IL-4^+$ kelompok imunoterapi + probiotik lebih rendah dibandingkan imunoterapi saja. Hasil ini menunjukkan bahwa probiotik memiliki peran sebagai imunomodulator.

Studi mengenai probiotik pada penyakit alergi, baik itu asma, rhinitis alergika dan dermatitis atopi, menunjukkan hasil bervariasi. Beberapa hal ini yang dapat mempengaruhi kerja probiotik, yaitu perbedaan strain probiotik yang digunakan, dosis probiotik yang digunakan, permulaan waktu dan durasi pemberian, bakteri hidup atau mati (21). Pada studi ini digunakan multi strain *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium lactis*. Kedua strain tersebut banyak dipergunakan dalam studi mengenai alergi. Penggunaan monostrain dan multistrain masih menjadi kontroversi. Multistrain dikatakan lebih efektif karena dapat bekerja di banyak titik tangkap (22). Studi terbaru oleh Douge *et al.*, (2012) menunjukkan penggunaan monostrain lebih baik dibandingkan multistrain. Pemberian multistrain menyebabkan efek saling menekan kerja dari masing-masing sehingga penggunaannya tidak efektif (23).

Pada studi ini, jumlah $CD4^+IL-4^+$ terendah ada pada

kelompok kombinasi imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik, meskipun secara statistik tidak bermakna. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik memiliki kecenderungan lebih baik dalam menurunkan jumlah CD4⁺IL-4⁺ pada anak asma. Studi sebelumnya oleh Sugiono *et al* menunjukkan hasil yang sama. Studi tersebut menilai jumlah CD4⁺IL-4⁺ pada anak asma setelah pemberian imunoterapi, imunoterapi+*Nigella sativa*, imunoterapi+probiotik, dan imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik selama 14 minggu. Hasil studi menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah CD4⁺IL-4⁺ setelah perlakuan antar kelompok, dengan rerata jumlah CD4⁺IL-4⁺ terendah ada pada kelompok imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik. Fueyo *et al.*, (2014), melakukan studi untuk mengetahui kadar CD4⁺IL-4⁺ darah pasien asma yang mendapat imunoterapi. Pada satu tahun pertama imunoterapi, kadar CD4⁺IL-4⁺ darah 68% sama dengan kadar CD4⁺IL-4⁺ sebelum imunoterapi, sebanyak 34% CD4⁺IL-4⁺ masih lebih tinggi dibandingkan sebelum imunoterapi. Penurunan bermakna kadar CD4⁺IL-4⁺ baru didapatkan setelah 2 tahun imunoterapi (24). Pengamatan pada studi ini dilakukan selama fase rumatan 56 minggu dengan hasil yang sama dengan pengamatan pada studi sebelumnya yang dilakukan selama 14 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa diperlukan durasi imunoterapi yang lebih panjang untuk mendapatkan efek modulasi imun dari CD4⁺IL-4⁺.

Perbedaan rerata jumlah CD8⁺IL4⁺ sesudah perlakuan tidak bermakna, baik pada pemberian imunoterapi+plasebo, imunoterapi+*Nigella sativa*, imunoterapi+probiotik serta imunoterapi+ *Nigella sativa*+probiotik. Ada 2 pandangan mengenai peran sel T CD8⁺ pada asma, yaitu sel T CD8⁺ dapat menekan terjadinya asma dan sebaliknya sel T CD8⁺ berkontribusi terhadap proses inflamasi asma. Sel TCD8⁺ dapat menekan terjadinya asma dengan jalan memproduksi IFN- γ dan menghambat *switching* sel B membentuk IgE. Disisi lain peran sel T CD8⁺ dalam proses inflamasi asma dikarenakan sel T CD8⁺ melalui subset Tc2 dapat memproduksi sitokin yang sama dengan Th2 (4).

Studi Miratu menunjukkan terdapat peningkatan sel T CD8⁺ pada pemberian imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik dibandingkan imunoterapi+plasebo, imunoterapi+*Nigella sativa* serta imunoterapi+probiotik. Rasio sel T CD4⁺/CD8⁺ menurun tidak bermakna pada semua kelompok perlakuan (25). Pemberian *Nigella sativa* dan imunoterapi pada pasien rhinitis alergi HDM meningkatkan sel T CD8⁺ dibandingkan pemberian imunoterapi saja (26). Hasil studi ini menunjukkan bahwa dalam patogenesis asma, sel T CD4⁺ lebih berperan dibandingkan sel T CD8⁺ dalam proses inflamasi pada asma

Salah satu skoring asma yang digunakan dalam menilai klinis asma adalah skor ACT. Skor ACT \leq 19, artinya klinis asma tidak terkontrol, sedangkan skor $>$ 19 artinya klinis asma terkontrol baik (27). Pada kelompok imunoterapi didapatkan perbedaan bermakna rerata skor ACT sebelum fase *build up* dan setelah fase *build up* imunoterapi serta sebelum fase *build up* dan setelah fase rumatan imunoterapi. Hasil ini sesuai dengan studi-studi sebelumnya, bahwa imunoterapi efektif menurunkan penggunaan obat-obatan asma, menurunkan hiperresponsif bronkus dan memperbaiki skor gejala asma (28). Imunoterapi memperbaiki gejala asma dengan

jalan menginduksi aktivitas Treg sehingga terjadi stimulasi IgE, pengeluaran mediator-mediator inflamasi, produksi mukus serta hiperreaktivitas bronkus terhambat. Selain itu imunoterapi meningkatkan antibodi *blocking* IgG (15,29). Efek terapi imunoterapi, meningkat bersamaan dengan lamanya pengobatan. Perbaikan yang nyata biasanya baru tampak setelah terapi diberikan 6 bulan atau lebih (30). Imunoterapi yang diberikan minimal 3 tahun, akan memberikan efek protektif jangka panjang (31). Hasil studi ini menunjukkan bahwa imunoterapi dapat memperbaiki klinis asma pada fase *build up* dan ditingkatkan serta dipertahankan pada fase rumatan

Pada kelompok imunoterapi+*Nigella sativa*, didapatkan peningkatan skor ACT yang bermakna antara sebelum fase *build up* dan setelah fase *build up* serta sebelum fase *build up* dan setelah fase rumatan. Hal ini berarti bahwa pemberian imunoterapi+*Nigella sativa* pada anak asma bermanfaat secara klinis, memperbaiki gejala asma. Rerata skor ACT setelah pemberian imunoterapi+*Nigella sativa* bernilai \geq 19, menunjukkan klinis asma yang terkontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya. Pemberian ekstrak *Nigella sativa* dapat menurunkan keluhan klinis pasien alergi, menurunkan gejala asma, frekuensi kekambuhan, mengi dan tes fungsi paru (32). Studi yang dilakukan oleh Barlianto *et al*, pada mencit asma menunjukkan bahwa pemberian *Nigella sativa* dapat menurunkan jumlah sel limfosit T CD4⁺, meningkatkan jumlah sel limfosit T CD4⁺FoxP3⁺, menghambat *airway remodelling*, dan memodulasi respon imun (13). Perbaikan klinis pada studi ini dapat disebabkan oleh efek *Nigella sativa* sebagai anti inflamasi, anti histamin dan imunomodulator pada asma.1

Pada studi ini, pemberian imunoterapi+probiotik pada anak asma bermanfaat secara klinis memperbaiki gejala asma, dengan perbaikan klinis terbesar tampak pada peningkatan skor ACT sebelum fase *build up* dan setelah fase *build up* serta sebelum fase *build up* dan setelah fase rumatan. Hasil studi yang sama ditemukan oleh Harsono *et al* yang membuktikan perbaikan FEV1 setelah 14 minggu pemberian baik imunoterapi, probiotik maupun keduanya (16). Pemberian *L. acidophilus*, *B. bifidum* dan *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* pada anak asma ringan sampai sedang, dapat memperbaiki fungsi paru, mengurangi episode eksaserbasi asma serta penggunaan bronkodilator (33). Pemberian probiotik *Lactobacillus gasseri* selama 2 bulan pada anak asma dan rhinitis alergika, meningkatkan fungsi paru serta menurunkan skor gejala klinis (34). Perbaikan klinis asma dengan pemberian probiotik dihubungkan dengan kemampuannya sebagai antiinflamasi dan imunomodulator.

Pada kelompok pemberian imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik didapatkan perbedaan yang bermakna rerata skor ACT. Peningkatan skor ACT terbesar didapatkan pada saat sebelum fase *build up* dan setelah fase *build up* serta sebelum fase *build up* dan setelah fase rumatan. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemberian kombinasi imunoterapi, *Nigella sativa* dan probiotik bermanfaat terhadap perbaikan klinis anak asma. Efek ini timbul akibat kombinasi dari efek anti inflamasi, anti histamin, dan imunomodulasi dari ketiganya

Hasil uji statistik penilaian skor ACT setelah fase rumatan didapatkan perbedaan yang bermakna antara keempat kelompok perlakuan. Skor ACT pada pemberian imunoterapi dan probiotik lebih tinggi bermakna dibandingkan imunoterapi saja. Hal ini menunjukkan

bahwa pemberian imunoterapi+probiotik memiliki manfaat yang lebih baik dalam memperbaiki klinis anak asma dibandingkan imunoterapi saja.

Bakteri probiotik *Lactobacillus acidophilus* serta *Bifidobacterium lactis* diketahui meningkatkan fungsi dan jumlah sel T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (35). Peningkatan sel Treg dapat mensupresi sel T efektor, diantaranya Th1, Th2, Tc1 dan Tc2. Penekanan Tc2 dan Th2 akan menimbulkan penekanan produksi IL-4, diikuti penurunan produksi IgE oleh sel B sehingga pelepasan mediator inflamasi oleh sel mast dapat dihambat. Sel Treg juga dapat secara langsung menghambat aktivasi sel mast dan pelepasan mediator inflamasi oleh sel mast (15). Mekanisme tersebut akan menghambat terjadinya bronkokonstriksi, hiperreaktivitas jalan nafas dan sekresi mukus sehingga terjadi perbaikan klinis yang ditunjukkan dengan peningkatan skoring asma anak.

Pada studi ini tidak diketahui data jumlah sel CD4⁺IL4⁺ dan CD8⁺IL4⁺ pada anak sehat atau anak asma yang tidak mendapat imunoterapi sehingga tidak bisa diketahui apakah jumlah sel CD4⁺IL4⁺ dan CD8⁺IL4⁺ masih dalam rentang normal, meningkat atau lebih rendah. Tidak diketahuinya data jumlah CD4⁺IL4⁺ dan jumlah CD8⁺IL4⁺ sebelum perlakuan menyebabkan tidak dapat dilakukan

perbandingan jumlah CD4⁺IL4⁺ dan jumlah CD8⁺IL4⁺ setelah perlakuan. Adanya hasil *skin prick test* yang positif terhadap alergen selain HDM dapat menjadi faktor perancu yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

Studi Cho *et al* membuktikan bahwa CD4⁺IL-4⁺ darah perifer anak asma tidak berbeda dengan anak sehat (36). Hasil yang sebaliknya didapatkan dengan menggunakan sputum jalan nafas (37). Hal ini menunjukkan bahwa spesimen yang diperiksa dapat mempengaruhi hasil penelitian dalam mengetahui kadar CD4⁺IL-4⁺. Pada penelitian ini pengambilan sampel untuk pengukuran jumlah CD4⁺IL4⁺ dan jumlah CD8⁺IL4⁺ dilakukan pada darah tepi sehingga kurang sesuai untuk menilai produksi IL-4 pada target organ (mukosa saluran napas). Faktor lingkungan rumah yang sulit untuk dikontrol peneliti juga dapat menjadi perancu hasil penelitian.

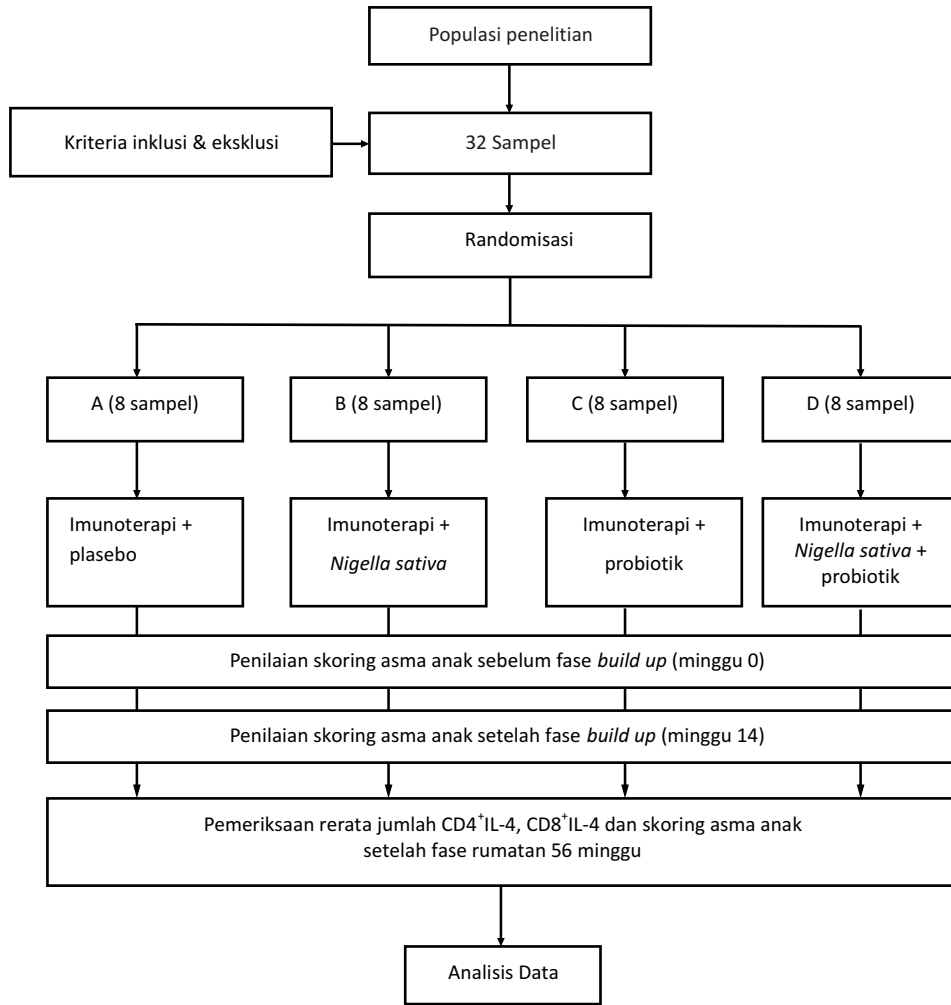
Dapat disimpulkan pemberian imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik menurunkan jumlah CD4⁺IL4⁺ lebih rendah dan meningkatkan jumlah CD8⁺IL4⁺ lebih tinggi meskipun secara statistik tidak bermakna bila dibandingkan imunoterapi saja. Pemberian kombinasi imunoterapi+probiotik bermanfaat memperbaiki klinis asma dengan meningkatkan skoring asma lebih besar dibandingkan imunoterapi saja.

DAFTAR PUSTAKA

1. Global Initiative for Asthma. *Global Asthma Strategy of Management and Prevention Update 2011*. Cape Town: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2011; p. 1-79.
2. Agrawal DK and Shao Z. *Pathogenesis of Allergic Airway Inflammation*. Current Allergy and Asthma Reports. 2010; 10(1): 39-48.
3. Abbas AK and Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th Edition. Boston: Saunders; 2005: p. 60-65.
4. Betts RJ and Kemeny DM. *CD8⁺ T Cells in Asthma: Friend or Foe?* Pharmacology and Therapeutic. 2009; 121(2): 123-131
5. Cox L, Nelson H, Lockey R, *et al*. *Allergen Immunotherapy: A Practice Parameter Third Update*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 127(1 Suppl): S1-55.
6. Lloyd CM and Hawrylowicz CM. *Regulatory T Cells in Asthma*. Immunity. 2009; 31(3): 438-449.
7. Till SJ, Francis JN, Nouri-aria K, and Durham SR. *Mechanisms of Immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2004; 113(6): 1025-1034.
8. Nelson HS. *Multiallergen Immunotherapy for Allergic Rhinitis and Asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2009; 123(4): 763-769.
9. Calderón MA, Casale TB, Togias A, Bousquet J, Durham SR, and Demoly P. *Allergen-Specific Immunotherapy for Respiratory Allergies: from Meta-Analysis to Registration and Beyond*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2011; 127(1): 30-38.
10. Thomas DW and Greer FR. *Clinical Report Probiotics and Prebiotics in Pediatric*. Paediatrics. 2010; 126(6): 1217-1231.
11. Falezko WJJ, Rha RD, Steinhausen S, *et al*. *Probiotic Induced Suppression of Allergic Sensitization and Airway Inflammation is Associated with Increase of T Regulatory Dependent Mechanism in Murine Model of Asthma*. Clinical and Experimental Allergy. 2007; 37(4): 498-505.
12. Kalus U, Pruss A, Bystron J, *et al*. *Effect of Nigella sativa (Black Seed) on Subjective Feeling in Patients with Allergic Disease*. Phytotherapy Research. 2003; 17(10): 1209-1214.
13. Barlianto W, Kusuma CHMS, Widodo A, and Sudiarto S. *Crude Extract of Black Seed (Nigella sativa) can Modulate TCD4⁺ and CD8⁺ Lymphocytes in Asthmatic Mouse Model*. Paediatric Respiratory Research. 2012; 13(Suppl1): S54-S55.
14. Sugiono LT, Nurdiana, Olivianto E, Barlianto W, and Kusuma HMSC. *The Effect of House Dust Mite Immunotherapy, Probiotic and Nigella sativa in the Number of CD4⁺IL-4⁺ Cell, Total IgE level and Asthma Control Test (ACT) Score*. Journal of Dental and Medical Sciences. 2013; 7(3): 32-39.
15. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, and Akdis CA. *Mechanisms of Allergen-specific Immunotherapy*. Clinical and Translational Allergy. 2012; 2: 1-8.
16. Harsono A, Subrata LA, and Endaryanto A. *Immunomodulatory Effect of Probiotic and Sublingual Immunotherapy in Asthmatic Children*. Folia Medica Indonesiana. 2009; 45(1): 14-21.
17. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, and Dreskin SC. *Anti-Inflammatory Effect of Thymoquinone in a Mouse Model of Allergic Lung Inflammation*. International Immunopharmacology. 2006; 6(7): 1135-1142.
18. Shahzad M, Yang X, Raza Asim MB, *et al*. *Black Seed Oil Ameliorates Allergic Airway Inflammation by*

- Inhibiting T-cell Proliferation in Rats*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. 2009; 22(1): 37-43.
19. Pochard P, Gosset P, Grangette C, et al. *Lactic Acid Bacteria Inhibit TH2 Cytokine Production by Mononuclear Cells from Allergic Patients*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2002; 110(4): 617-623.
 20. Das RR, Naik SS, and Singh M. *Probiotics as Additives on Therapy in Allergic Airway Diseases: A Systematic Review of Benefit and Risks*. BioMed Research International. 2013; 2013: 10.
 21. Holvoet S, Zuercher AW, Julien-Javaux F, Perrot M, and Mercenier A. *Characterization of Candidate Anti-Allergic Probiotic Strains in a Model of Th2-Skewed Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*. International Archives of Allergy and Immunology. 2013; 161(2): 142–154.
 22. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, and Beynen A. *Monostrain, Multistain, and Multispecies Probiotics: A Comparison of Functionality and Efficacy*. International Journal of Food Microbiology. 2004; 96(3): 219-233.
 23. Douge K, Grajecki D, Zyriax BC, Detinkina E, Eulenburg C, and Buhling KJ. *Meta-analysis Impact of Maternal Supplementation with Probiotics during Pregnancy on Atopic Eczema in Childhood*. British Journal of Nutrition. 2012; 107: 1-6.
 24. Suárez-Fueyo A, Ramos T, Galán A, et al. *Grass Tablet Sublingual Immunotherapy Downregulates the Th2 Cytokine Response Followed by Regulatory T-cell Generation*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2014; 133(1): 130-138.
 25. Miratu N. *Perbaikan Klinis serta Perubahan Jumlah Sel T CD4⁺ sel T CD8⁺ dan Rasio Sel T CD4⁺ dan Sel T CD8⁺ pada Anak Asma Ringan yang Mendapat Imunoterapi House Dust Mite, Probiotik dan Nigella sativa*. [Tesis]. Universitas Brawijaya, Malang. 2013.
 26. Işık H, Cevikbaş A, Gürer US, et al. *Potential Adjuvant Effects of Nigella sativa Seeds to Improve Specific Immunotherapy in Allergic Rhinitis Patients*. Medical Principle and Practice. 2010; 19(3): 206-211.
 27. Shi Y, Tatavoosian A, Aledia A, George S, and Galant P. *Cut Points for Asthma Control Tests in Mexican Children in Orange County California*. Annals of Allergy, Asthma and Immunology. 2012; 109(1): 108-113.
 28. Lin SY, Erekosima N, Suarez-Cuervo C, et al. *Allergen Specific Immunotherapy for the Treatment Allergic Rhinoconjunctivitis and/or Asthma: Comparative Effectiveness Review*. Rockville, Maryland: Agency for Healthcare Research and Quality; 2013.
 29. Taher YA, Henricks PAJ, and van Oosterhout AJM. *Allergen-Specific Subcutaneous Immunotherapy in Allergic Asthma: Immunologic Mechanisms and Improvement*. Libyan Journal of Medicine. 2010; 5(Suppl).
 30. Akib A, Munasir Z, dan Kurniati N. *Buku Ajar Alergi Immunologi Anak*. Edisi 2. Jakarta: Balai Penerbit IDAI; 2008; hal. 252-265.
 31. Leung DYM, Sampson H, and Geha R. *Pediatric Allergy: Principles and Practice*. 2nd edition. Philadelphia: 2010; hal. 688.
 32. Boskabady MH, Javan H, Sajady M, and Rakhshandeh H. *The Possible Prophylactic Effect of Nigella Sativa Seed Extract in Asthmatic Patients*. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2007; 21(5): 559-566.
 33. Gutkowski P, Madalinski K, Grek M, Dmenska H, Syczewska M, and Michalkiewicz J. *Effect of Orally Administered Probiotic Strains Lactobacillus and Bifidobacterium in Children with Atopic Asthma*. Central European Journal of Immunology. 2010; 35 (4): 233-238.
 34. Chen YS, Jan RL, Lin YL, Chen HH, and Wang JY. *Randomized Placebo Controlled Trial of Lactobacillus on Asthmatic Children with Allergic Rhinitis*. Pediatric Pulmonology. 2010; 45(11): 1111–1120.
 35. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, Sanctis GTD, Hausding M, and Erpenbeck VJ. *The IL-6R α Chain Controls Lung CD4⁺CD25⁺Treg Development and Function during Allergic Airway Inflammation In Vivo*. The Journal of Clinical Investigation. 2005; 115: 313-325.
 36. Cho SH, Stanciu LA, Beqishivili T, Bates PJ, Holgate ST, and Johnston SL. *Peripheral Blood CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Type 1 and Type 2 Cytokine Production in Atopic Asthmatic and Normal Subjects*. Clinical and Experimental Allergy. 2002; 32(3): 427-433.
 37. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, and Johnston SL. *Increased Interleukin-4, Interleukin-5 and Interferon- γ in Airway CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in Atopic Asthma*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2005; 171(3): 224–230.

Lampiran



Alur Penelitian