

Perbedaan Skor ACT, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg, CD4⁺IFN- γ pada Pemberian Imunoterapi, Probiotik dan *Nigella Sativa*

The Difference of ACT Score, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg, CD4⁺IFN- γ with Administration of Immunotherapy, *Nigella Sativa*, Probiotic

Debby Ch Sumantri¹, Sumarno², Wisnu Barlianto³, Ery Olivianto⁴, HMS Chandra Kusuma⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis Anak Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

⁴Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Probiotik dan *Nigella sativa* memiliki efek imunomodulator dan telah banyak banyak dikaji penggunaannya dalam kombinasi dengan imunoterapi asma. Imunoterapi dapat merubah perjalanan alamiah asma yang melibatkan perubahan respon imun Th2 menjadi Th1 dengan peningkatan IFN- γ . Proses tersebut juga berhubungan dengan pembentukan Tregulator, tetapi belum jelas mekanisme mana yang lebih dominan. Penelitian dilakukan untuk mengetahui perbedaan skor ACT serta jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ pada anak asma ringan yang mendapat imunoterapi, probiotik dan *Nigella sativa*. Penelitian dilakukan dengan desain *randomized clinical trial posttest only with control* pada 32 subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dalam 4 kelompok yaitu kelompok A (imunoterapi+plasebo), kelompok B (imunoterapi+*Nigella sativa*), kelompok C (imunoterapi+probiotik), dan kelompok D (imunoterapi+*Nigella sativa*+probiotik). Perlakuan diberikan selama 56 minggu (imunoterapi fase induksi 14 minggu dan fase rumatan 42 minggu). Imunoterapi berupa ekstrak *house dust mite* diberikan subkutan, probiotik berupa *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium lactis*, dengan penilaian skoring asma menggunakan *Asthma Control Test* (ACT). Jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ diukur menggunakan *flowcytometry*. Hasil menunjukkan skor ACT kelompok C lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok A ($p=0,04$). Jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg paling tinggi pada kelompok D (15,966 \pm 9,720), sedangkan jumlah CD4⁺IFN- γ paling tinggi pada kelompok C (17,506 \pm 11,576), tetapi tidak didapatkan perbedaan bermakna pada jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ($p=0,278$) dan CD4⁺IFN- γ ($p=0,367$) antar semua kelompok. Dapat disimpulkan bahwa Imunoterapi+probiotik dapat meningkatkan skor ACT lebih baik dibandingkan imunoterapi saja. Imunoterapi, *Nigella sativa*, dan probiotik tidak memberikan perbedaan bermakna pada jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ .

Kata Kunci: *Asthma Control Test*, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, CD4⁺IFN- γ , imunoterapi, *Nigella sativa*, probiotik

ABSTRACT

Probiotic and *Nigella sativa* had immunomodulatory effect dan their combination with immunotherapy had been investigated. Immunotherapy can alter natural course of asthma that involved alteration of immunologic response Th2 to Th1 with increasing of IFN- γ , and also associated with induction of Tregulator, but which mechanism dominated this process was still unclear. The objective of this study was to investigate the difference of ACT score, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg and CD4⁺IFN- γ in mild asthmatic children with administration of immunotherapy, *Nigella sativa* and probiotic. Study design was experimental Randomized Clinical Trial Posttest Control Study. 32 samples fullfil inclusion criteria were allocated into 4 groups, group A receiving immunotherapy+placebo, group B receiving immunotherapy+*Nigella sativa*, group C receiving immunotherapy+probiotic, and group D receiving immunotherapy+*Nigella sativa*+probiotic for 56 weeks. This study used house dust mite subcutaneous immunotherapy, probiotic which contain *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*, and *Asthma Control Test* (ACT) as asthma scoring method. Local Ethic Committee had approved this study. ACT score in group C was significantly higher compare to group A ($p=0,04$). The mean number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg was higher in group D (15,966 \pm 9,720), and CD4⁺IFN- γ in group C (17,506 \pm 11,576), but there were no significant difference in the mean number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ($p=0,278$) and CD4⁺IFN- γ ($p=0,367$) in all groups. Immunotherapy+probiotic can increase ACT score better than immunotherapy alone. Administration of immunotherapy, *Nigella sativa*, and probiotic did not give any significant difference in the mean number of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg and CD4⁺IFN- γ .

Keywords: *Asthma control test*, CD4+CD25+foxp3+Treg, CD4⁺IFN- γ , immunotherapy, *Nigella sativa*, probiotic

PENDAHULUAN

Asma adalah penyakit inflamasi saluran nafas dengan karakteristik hiperresponsivitas saluran nafas, eosinofilia paru kronis, peningkatan serum IgE, produksi mukus yang berlebihan, dan remodeling saluran nafas. Semua hal tersebut akan menimbulkan gejala seperti *wheezing*, batuk, dan sesak (1,2). Lebih dari 300 juta individu menderita asma dan prevalensinya meningkat khususnya pada anak-anak (3). Prevalensi asma di Indonesia berdasarkan penelitian ISAAC menunjukkan peningkatan dari 4,2% tahun 1995 menjadi 5,4% tahun 2003 (4).

Patofisiologi asma melibatkan ketidakseimbangan T *helper* (Th)1 dan Th2 yang ditandai dengan peningkatan ekspresi Th2 dan penurunan Th1. Sel Th2 melepaskan sitokin *Interleukin* (IL)-4, IL-5, IL-9 dan IL-13, sedangkan sel Th1 memproduksi sitokin tipe 1 IL-2, *Interferon* (IFN)- γ dan *Tumor Necrotizing Factor* (TNF)- α (5). Respon imun Th1 terhadap alergen akan menginduksi terbentuknya IFN- γ yang memiliki efek antagonis IL-4 dan IL-5. Efek antagonis IL-4 menghambat pembentukan IgE oleh sel B, dan efek antagonis IL-5 menurunkan aktivitas eosinofil, sehingga secara keseluruhan menghambat perkembangan sel Th2 (6). Inhibisi efek sel Th2 seperti eosinofilia, hiperplasi sel mukus, dan hiperresponsif bronkus, juga diperantarai oleh IFN- γ (7).

Sel T regulator (Treg) berperan penting pada pemeliharaan toleransi imunologis terhadap antigen asing atau *self antigen* (8). Sel Treg dapat mengontrol respon imun pada kondisi hemostatis dengan menekan sel efektor Th1/Th2 melalui IL-10, *Transforming Growth Factor beta* (TGF-), atau keduanya (3,9). Pada asma, sel Treg akan menekan respon inflamasi Th2 dan menghambat terjadinya hipersekresi mukus saluran nafas, hipertrofi otot halus dan pembentukan kolagen (8).

Terapi farmakologi, bronkodilator, dan kortikosteroid inhalasi efektif untuk mengurangi dan mencegah gejala asma tetapi tidak dapat mencegah perkembangan penyakit. Walaupun efektif mengontrol gejala dan inflamasi, obat-obatan tersebut memiliki efek samping bila digunakan dalam waktu lama (9). Menghindari atau mengurangi paparan faktor pencetus juga membantu pengendalian asma tetapi hal ini sulit dilakukan. Berdasarkan hasil meta analisis pada pasien asma dengan pencetus alergen *house dust mite* (HDM), penghindaran alergen saja tidak dapat mengontrol asma (10,11).

Imunoterapi spesifik alergen merupakan salah satu metode dalam pengobatan asma yang dapat menurunkan respon terhadap alergen dan menciptakan toleransi (12). Imunoterapi berperan pada perubahan respon imun Th2 menjadi respon imun Th1 dengan peningkatan IFN- γ dan IL-2, berhubungan dengan Treg yang menghasilkan sitokin antiinflamasi, IL-10 dan TGF-, memodulasi interaksi sel B sehingga terjadi perubahan sistesis subtipe IgE dan IgG, serta menekan sel efektor (eosinofil, basofil, dan sel mast) dan respon inflamasinya (13-15).

Probiotik dan *Nigella sativa* sebagai imunomodulator telah banyak diteliti pada penyakit alergi termasuk asma. Efek probiotik meliputi imunomodulator dan memelihara integritas pertahanan epitel (16). Pemberian probiotik dalam pencegahan alergi ditujukan pada imunomodulasi respons imun dengan menyeimbangkan respons imun Th1 dan Th2 (17,18). *Nigella sativa* memiliki efek imunomodulator, antiinflamasi sistemik maupun lokal, sehingga dapat meredakan gejala alergi dan asma. Hal ini

berhubungan dengan efek *thymoquinone* (TQ) yang terkandung didalamnya (19,20).

Penelitian Harsono *et al* menunjukkan pemberian imunoterapi sublingual spesifik HDM disertai probiotik pada anak usia 6-18 tahun dapat menurunkan jumlah eosinofil, kadar imunoglobulin E (IgE) dan memodulasi keseimbangan sitokin Th1 dan Th2 (21). Isik *et al* pada penelitiannya menemukan bahwa pemberian *Nigella sativa* dan imunoterapi spesifik dapat mengurangi gejala rhinitis alergi dan asma sehingga dapat dipertimbangkan sebagai adjuvan pada terapi penyakit alergi (22). Penelitian oleh Yusuf dan Adisty menunjukkan pemberian kombinasi imunoterapi dengan *Nigella sativa* dan probiotik memberikan perbaikan klinis (yang dinilai dengan peningkatan skor ACT), walaupun tidak meningkatkan jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg ataupun CD4⁺IFN- γ (23). Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini ingin mengetahui adanya perbedaan skor ACT serta jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ pada anak asma ringan yang mendapat imunoterapi spesifik HDM fase rumatan, probiotik dan *Nigella sativa* (jinten hitam).

METODE

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *Randomized Clinical Trial Posttest only with Control* dengan 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok imunoterapi dan plasebo (kelompok A), imunoterapi dan *Nigella sativa* (kelompok B), imunoterapi dan probiotik (kelompok C), imunoterapi, *Nigella sativa*, dan probiotik (kelompok D) yang diberikan selama 56 minggu (imunoterapi fase induksi 14 minggu dan fase rumatan 48 minggu).

Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah pasien yang didiagnosis asma alergi yang tergolong asma *intermittent* atau *mild persistent* berdasarkan kriteria *Global Initiative for Asthma* (GINA), usia 4-14 tahun, hasil *skin prick test* alergi *house dust mite* (HDM), belum pernah mendapatkan semua jenis imunoterapi. Sebelumnya orang tua pasien telah menandatangani *informed consent*. Pasien yang menderita imunodefisiensi, penyakit autoimun atau memiliki kelainan kardiovaskular, komorbid/penyakit saluran pernafasan lain (sinusitis, pneumonia, tuberkulosis dan kelainan anatomi seperti polip hidung), memiliki riwayat alergi berat (syok anafilaksis) dan asma serangan berat yang mengancam jiwa (*life-threatening asthma*), riwayat gagal napas atau pernah diintubasi dalam 6 bulan terakhir, menggunakan obat-obatan (kortikosteroid dosis terapi, antagonis leukotrin, agonis beta inhalan, agonis beta oral, teofilin, anti kolinergik, kromolin, ketotifen) dua minggu sebelumnya dieklusi dari penelitian.

Pemberian Imunoterapi, *Nigella sativa*, dan Probiotik

Imunoterapi yang diberikan adalah imunoterapi ekstrak *House Dust Mite* (HDM) sesuai dengan Protokol pemberian imunoterapi Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang. Imunoterapi diberikan secara subkutan satu kali seminggu selama 14 minggu (selama fase *Build up*) pengenceran 1:100 dengan dosis meningkat bertahap dan dilanjutkan setiap 3 minggu selama 42 minggu atau 14 kali (selama fase rumatan) pengenceran 1:10 dengan dosis 0,1 ml. Probiotik yang digunakan adalah ProBi dari Medifarma

yang berisi 2×10^9 cfu/gr *mixed life bacteria Lactobacillus acidophilus* LA-5TM dan *Bifidobacterium lactis* Bb-12TM, premix vitamin (vitamin B₁ 0,1 mg, vitamin B₂ 0,1 mg, vitamin B₆ 0,1 mg, vitamin C 3 mg), dan selenium yeast 1 µg, dengan dosis 1 sachet per hari. *Nigella sativa* (jinten hitam) yang digunakan berupa serbuk yang dikemas dalam kapsul dan diberikan dengan dosis 15 mg/kgBB/hari, setiap kapsul berisi 150 mg *Nigella sativa* dan diberikan 1 kapsul perhari.

Skor Asthma Control Test (ACT)

Skor ACT dibedakan berdasarkan usia pasien asma, yaitu untuk anak usia 4-11 tahun yang dilakukan bersama-sama dengan orang tua dan untuk anak usia 12-17 tahun yang bisa dijawab sendiri oleh anak. Bila skor ACT ≤ 19 berarti asma tidak terkontrol dengan baik dan bila skor ACT ≥ 20 berarti asma terkontrol dengan baik.

Prosedur Penelitian

Pada tahap awal penelitian, pada seluruh subjek dilakukan anamnesa, pemeriksaan fisik, pemeriksaan penunjang (foto thoraks AP/lateral, *skin prick test*, dan dikonsultasikan ke Departemen Telinga Hidung Tenggorok (THT)). Orang tua pasien telah menyetujui untuk mengikuti penelitian setelah menerima *informed consent*. Setiap subjek penelitian diambil data demografi yang meliputi usia, jenis kelamin, berat badan, status gizi, lama sakit/keluhan berlangsung, riwayat keluarga atopi, serta kategori asma. Pengamatan tentang keluhan, gejala klinis, respon klinis penyakit, kepatuhan minum obat, penghindaran allergen, dan kategori asma pada subjek penelitian dilakukan secara rutin setiap minggu selama 14 minggu dan setiap 3 minggu selama 42 minggu. Setelah minggu ke-56, dilakukan penilaian skor ACT dan diambil sampel darah untuk pemeriksaan darah lengkap, hapusan darah, fungsi hati, fungsi ginjal, serta jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ . Sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ diambil dari isolasi PMBC yang sebelumnya telah dikultur, kemudian jumlahnya diukur dengan *flowcytometry* dan dianalisis dengan *software BD Cell Quest Pro* dengan satuan persen (%). Data yang diperoleh dianalisis melalui tahapan uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov*, uji homogenitas dengan *Lavene's test*, uji *One Way Anova*, dan *Post Hoc test*.

HASIL

Penelitian ini melibatkan 32 anak asma ringan dengan alergi HDM, berusia 4-14 tahun yang secara random terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok A yang mendapat imunoterapi + plasebo, kelompok B yang mendapat imunoterapi + *Nigella sativa*, kelompok C yang mendapat imunoterapi + probiotik, dan kelompok D yang mendapat imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik, masing-masing kelompok terdiri dari 8 subjek. Semua subjek penelitian menjalani proses imunoterapi HDM selama 56 minggu yang terdiri dari 14 minggu fase induksi dilanjutkan 42 minggu fase rumatan. *Nigella sativa* pada kelompok B dan D diberikan sejak awal fase induksi sampai 56 minggu, sedangkan probiotik pada kelompok C dan D diberikan sejak awal fase induksi sampai 24 minggu. Pada minggu ke-14, salah satu subjek penelitian dari kelompok D dikeluarkan dari penelitian karena tidak patuh mengkonsumsi *Nigella sativa*. Selama perlakuan tidak didapatkan efek samping pemberian imunoterapi, *Nigella sativa* maupun probiotik. Mayoritas sampel

penelitian berusia ≥ 5 tahun, status gizi baik dan memiliki riwayat atopi orang tua. Selain itu sebagian besar memiliki polisensitisasi terhadap allergen dan terdiagnosa sebagai asma persisten ringan (Tabel 1).

Table 1. Karakteristik dasar subjek penelitian

Karakteristik	Kelompok A (n=8)	Kelompok B (n=8)	Kelompok C (n=8)	Kelompok D (n=7)
a. Jenis Kelamin				
Laki-laki	5 (62,5%)	2 (25%)	4 (50%)	4 (57%)
Perempuan	3 (37,5%)	6 (75%)	4 (50%)	3 (43%)
b. Usia (tahun)				
< 5 tahun	1 (12,5%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)
≥ 5 tahun	7 (87,5%)	7 (87,5%)	7 (87,5%)	7 (100%)
c. Riwayat atopi orangtua				
Tidak memiliki	2 (25%)	2 (25%)	1 (12,5%)	3 (43%)
Memiliki	6 (75%)	6 (75%)	7 (87,5%)	4 (57%)
d. Hasil skin prick test				
HDM	3 (37,5%)	4 (50%)	2 (25%)	1 (14%)
HDM + food	3 (37,5%)	2 (25%)	4 (50%)	5 (72%)
HDM + pet	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
HDM + food + pet	1 (12,5%)	1 (12,5%)	2 (25%)	1 (14%)
e. Status gizi				
Gizi baik	8 (100%)	6 (75%)	7 (87,5%)	7 (100%)
Gizi kurang	0 (0%)	2 (25%)	1 (12,5%)	0 (0%)
f. Keluhan saat datang				
Batuk	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (12,5%)	2 (29%)
Sesak	1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Batuk + pilek	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14%)
Batuk + sesak	4 (50%)	6 (75%)	4 (50%)	3 (43%)
Batuk + pilek + sesak	2 (25%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	1 (14%)
g. Diagnosis				
Asma <i>intermittent</i>	4 (50%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)	1 (14%)
Asma <i>mild persistent</i>	4 (50%)	7 (87,5%)	5 (62,5%)	6 (86%)

Perbandingan rerata skor ACT antar kelompok tercantum pada Tabel 2. Skor ACT tertinggi setelah imunoterapi fase rumatan didapatkan pada kelompok perlakuan imunoterapi + probiotik ($22,62 \pm 2,066$). Didapatkan perbedaan skor ACT yang bermakna antar kelompok setelah perlakuan ($p\text{-value}=0,02 > \alpha$). Skor ACT kelompok imunoterapi + probiotik setelah fase rumatan lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok imunoterapi + plasebo ($p=0,04$). Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian imunoterapi + probiotik lebih baik dalam meningkatkan skor ACT dibandingkan pemberian imunoterapi saja.

Table 2. Perbandingan rerata skor ACT antar kelompok perlakuan setelah fase rumatan

Kelompok perlakuan	Skor ACT post rumatan	
	$\bar{x} \pm SD$	Signifikansi
Imunoterapi + plasebo	20,25 \pm 1,035	$p = 0,02$
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i>	20,62 \pm 1,598	
Imunoterapi + probiotik	22,62 \pm 2,066	
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i> + probiotik	22,29 \pm 1,704	

Perbandingan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg antar kelompok perlakuan tercantum pada Tabel 3. Tidak ada perbedaan yang bermakna rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg antar kelompok perlakuan ($p\text{-value}=0,278$). Rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg tertinggi pada kelompok yang mendapat imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik ($15,966 \pm 9,720$) dan terendah

pada kelompok imunoterapi + plasebo (8,653±6,661). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik cenderung lebih meningkatkan jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg daripada pemberian imunoterapi saja, meskipun secara statistik tidak bermakna.

Tabel 3. Perbandingan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg antar kelompok perlakuan setelah fase rumatan

Kelompok perlakuan	Jumlah sel CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg (%)	
	x ± SD	Signifikansi
Imunoterapi + plasebo	8,653±6,661	p = 0,278
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i>	10,678±6,698	
Imunoterapi + probiotik	14,561±8,897	
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i> + probiotik	15 966±9 720	

Uji *One Way Anova* menunjukkan tidak didapatkan perbedaan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg yang bermakna antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$).

Tabel 4 menunjukkan perbandingan rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ antar kelompok perlakuan. Rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ tertinggi didapatkan pada kelompok yang mendapatkan imunoterapi + probiotik (17,506±11,576) dan terendah pada kelompok imunoterapi + plasebo (10,121±4,544), tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}=0,367 > \alpha$) rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ antar kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan pemberian imunoterapi + probiotik cenderung lebih meningkatkan jumlah sel CD4⁺IFN- γ daripada pemberian imunoterapi saja, meskipun secara statistik tidak bermakna.

Tabel 4. Perbandingan rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ antar kelompok perlakuan setelah fase rumatan

Kelompok perlakuan	Jumlah sel CD4 ⁺ IFN- γ (%)	
	x ± SD	Signifikansi
Imunoterapi + plasebo	10,121±4,544	p = 0,367
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i>	10,706±9,213	
Imunoterapi + probiotik	17,506±11,576	
Imunoterapi + <i>Nigella sativa</i> + probiotik	13,477±9,633	

DISKUSI

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *Randomized Clinical Trial Posttest only with Control* yang bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian imunoterapi spesifik HDM fase rumatan disertai probiotik dan *Nigella sativa* (jinten hitam) terhadap skor ACT serta jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3 Treg dan CD4⁺IFN- γ pada anak asma ringan. Skor ACT menggambarkan perbaikan klinis asma sedangkan CD4⁺CD25⁺FoxP3 Treg dan CD4⁺IFN- γ menggambarkan adanya adanya toleransi sel T dan sitokin Th1 yang seringkali terganggu pada anak dengan asma.

Penelitian ini menunjukkan rerata skor ACT paling tinggi setelah fase rumatan pada kelompok perlakuan imunoterapi + probiotik dan didapatkan perbedaan skor ACT yang bermakna antara kelompok perlakuan, dengan

skor ACT kelompok imunoterapi + probiotik setelah fase rumatan lebih tinggi bermakna dibandingkan kelompok imunoterapi saja. Hal ini berarti pemberian imunoterapi + probiotik lebih bermanfaat dalam memperbaiki klinis anak asma ringan dibandingkan imunoterapi saja. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian oleh Irmawati yang meneliti pemberian imunoterapi dan probiotik dimana didapatkan perbaikan skor klinis pada anak asma ringan yang mendapat imunoterapi spesifik HDM secara sublingual yang dikombinasikan dengan probiotik (24). Penelitian sebelumnya oleh Miratu menunjukkan setelah pemberian imunoterapi HDM selama fase induksi 14 minggu, didapatkan skor ACT tertinggi pada kelompok yang mendapat imunoterapi dan probiotik dibandingkan kelompok imunoterapi saja, walaupun perbedaan skor ACT antar kelompok perlakuan tidak bermakna (25). Moussu *et al* dalam penelitiannya menyebutkan kombinasi *Bifidobacterium bifidum* dan *sublingual immunotherapy* (SLIT) dengan ekstrak *birch pollen* lebih baik daripada SLIT saja dalam menginduksi sel iTreg Foxp3⁺ dan menekan reaksi asma (26).

Probiotik yang dikombinasikan dengan pemberian imunoterapi dapat menstimulasi maturasi sel dendritik dan meningkatkan kadar IL-10 yang mempunyai efek anti inflamasi dan menginduksi aktivitas sel Treg sehingga dapat menekan gejala klinis reaksi alergi (27). Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan manfaat pemberian imunoterapi atau probiotik dapat memberikan perbaikan klinis asma. Lin *et al* dengan penelitian *systematic review* pada pasien anak dan dewasa dengan asma dan rhinokonjungtivitis yang mendapat imunoterapi sublingual mendapatkan perbaikan klinis yang bermakna meliputi penurunan derajat, frekuensi, dan perbaikan kualitas hidup penderita (28). Penelitian O'hehir *et al* mendapatkan perubahan yang bermakna dalam penurunan gejala rhinitis dan skor asma, serta peningkatan kualitas hidup setelah pemberian imunoterapi HDM 1 tahun (29).

Probiotik telah lama dikenal sebagai imunomodulator yang berperan pada berbagai penyakit alergi termasuk asma. Mekanisme probiotik dalam memperbaiki klinis asma diduga berhubungan dengan efek anti inflamasi dan anti alergi. Penelitian oleh Chen menyatakan dengan pemberian *Lactobacillus gasseri* selama 2 bulan pada anak asma dan rhinitis alergi didapatkan peningkatan fungsi paru, perbaikan skor gejala klinis asma dan rhinitis alergi (30). Lee dalam penelitiannya pada anak asma yang diberikan kombinasi buah, sayuran, minyak ikan, dan probiotik selama 16 minggu mendapatkan adanya peningkatan kualitas hidup, skoring asma serta penurunan penggunaan obat pada kelompok perlakuan (31). Vliagoftis dalam studi RCT penggunaan probiotik pada terapi asma dan rhinitis alergika menyimpulkan bahwa probiotik efektif menurunkan derajat keparahan penyakit pada pasien yang telah tersensitisasi (32).

Beberapa penelitian memberikan hasil berbeda yang menunjukkan bahwa pemberian probiotik pada asma tidak memberikan perbaikan klinis. Penelitian Rashmi dalam *systematic review* pada 3 studi di Australia, Finlandia dan Swedia mendapatkan bahwa pemberian probiotik pada asma tidak meningkatkan kualitas hidup maupun memberikan perbaikan klinis yang bermakna dalam hal durasi, onset dan derajat asma (33). Giovanini dan Stockert yang memberikan probiotik *Lactobacillus casei* selama 1 tahun dan *Enterococcus faecalis* selama 22

minggu tidak menunjukkan perbedaan klinis yang signifikan. Perbedaan ini bisa disebabkan perbedaan jenis dan dosis probiotik, lingkungan dan individu yang menerima probiotik (34,35).

Hasil penelitian ini menunjukkan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg setelah fase rumatan antar kelompok perlakuan tidak berbeda bermakna. Hal ini berarti pemberian imunoterapi saja atau imunoterapi dengan *Nigella sativa* dan probiotik mempunyai pengaruh yang tidak jauh berbeda terhadap jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg. Rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg paling tinggi pada kelompok perlakuan imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik sedangkan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg paling rendah pada kelompok perlakuan imunoterapi + plasebo. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik cenderung lebih meningkatkan jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg daripada pemberian imunoterapi saja. Efek ini timbul akibat kombinasi dari efek anti inflamasi, anti histamin, dan imunomodulasi dari ketiganya. Penelitian sebelumnya oleh Yusuf menunjukkan hasil yang sama. Penelitian tersebut menilai jumlah CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg pada anak asma setelah pemberian imunoterapi, imunoterapi + *Nigella sativa*, imunoterapi + probiotik, dan imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik selama fase induksi 14 minggu. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg setelah perlakuan antar kelompok dengan rerata jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg paling tinggi didapatkan pada kelompok imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik.

Adanya jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg yang tinggi pada kelompok perlakuan imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik bisa disebabkan gabungan mekanisme imunomodulasi yang dimiliki oleh masing-masing imunoterapi, probiotik maupun *Nigella sativa*. Imunoterapi akan meningkatkan produksi Treg atau peningkatan IFN- γ (14,15). Probiotik juga berperan dalam meningkatkan respon sel Treg terhadap alergen yang akan menghasilkan IL-10, meningkatkan Th1 (IFN- γ) dan menurunkan sitokin Th2 seperti IL-4, IL-5 dan IL-13 (34,38). *Nigella sativa* juga dapat meningkatkan Treg pada model mencit asma dan menurunkan sitokin Th2 (IL-4, IL-5 dan IL-13) (38,39).

Penelitian Wei *et al* menunjukkan tidak didapatkan adanya perbedaan jumlah sel CD4⁺CD25⁺foxp3⁺Treg yang bermakna antara kelompok yang mendapat imunoterapi spesifik selama 1,5-2 tahun dan kelompok asma (40). Penelitian oleh Jang *et al* menunjukkan pemberian probiotik strain *L.rhamnosus* pada tikus model asma menyebabkan supresi respon alergi dan imunomodulasi yang dimediasi oleh aktivitas sel CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg. Pada penelitian tersebut kelompok yang mendapat *L.rhamnosus* mengalami peningkatan jumlah CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg yang disertai dengan penurunan inflamasi eosinofil secara signifikan dan penurunan produksi sitokin Th2 seperti IL-4, IL-5 dan IL-13 (36). Penelitian Feleszko *et al* menunjukkan pemberian oral *Lactobacillus rhamnosus* GG atau *Bifidobacterium lactis* selama 8 minggu pada *mice* akan menekan reaksi saluran nafas asma dan hal ini berhubungan peningkatan sel T Foxp3+ di kelenjar limfe peribronkial (41). Penelitian efek *Nigella sativa* pada penyakit alergi dilakukan oleh Al-Snafi pada 122 penderita urtikaria yang menunjukkan pemberian *Nigella sativa* 400 mg, dua kali sehari, selama 6

minggu meningkatkan angka kesembuhan, menurunkan IgE dan meningkatkan toleransi penderita terhadap faktor eksasepsi. Penelitian Isik *et al* pada penderita rhinitis alergika yang menjalani imunoterapi dan diberikan *Nigella sativa* 2g/hari selama 30 hari, didapatkan potensi efek *Nigella sativa* sebagai adjuvan imunoterapi. Penelitian Alsamari juga menunjukkan hasil yang serupa yaitu minyak *Nigella sativa* efektif digunakan pada penderita rhinitis alergika (22,42,43).

Hasil penelitian ini menunjukkan rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ setelah fase rumatan antar kelompok perlakuan tidak berbeda bermakna. Hal ini berarti pemberian imunoterapi saja atau imunoterapi dengan *Nigella sativa* dan probiotik mempunyai pengaruh yang tidak jauh berbeda terhadap jumlah sel CD4⁺IFN- γ . Rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ paling tinggi pada kelompok perlakuan imunoterapi + probiotik sedangkan rerata jumlah sel CD4⁺IFN- γ paling rendah pada kelompok perlakuan imunoterapi + plasebo. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian imunoterapi + probiotik cenderung lebih meningkatkan jumlah sel CD4⁺IFN- γ daripada pemberian imunoterapi saja.

Penelitian tentang IFN- γ pada pemberian imunoterapi menunjukkan hasil yang bervariasi. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Adhitya pada anak asma ringan yang mendapat imunoterapi HDM selama 14 minggu disertai probiotik dan/atau *Nigella sativa* tidak didapatkan perbedaan bermakna jumlah sel CD4⁺IFN- γ antara kelompok yang diberi imunoterapi saja dengan kelompok yang diberi imunoterapi, probiotik dan/atau *Nigella sativa* setelah perlakuan (23). Penelitian lain oleh Harsono setelah pemberian SLIT 14 minggu pada anak asma didapatkan peningkatan IFN- γ pada semua kelompok perlakuan baik SLIT, probiotik, maupun SLIT + probiotik, tetapi peningkatan IFN- γ paling sedikit pada kelompok perlakuan probiotik. Penelitian Kim *et al* pada anak asma dengan imunoterapi HDM didapatkan adanya peningkatan CD4⁺IFN- γ setelah pemberian imunoterapi 8 minggu. Peningkatan CD4⁺IFN- γ ini bertahan sampai 1 tahun setelah pemberian imunoterapi. Hal ini menunjukkan imunoterapi memodifikasi respon imun dari Th2 bergeser ke Th1 (44). Penelitian lain yang dilakukan oleh O'Hehir *et al* dengan menggunakan imunoterapi HDM sublingual menunjukkan peningkatan produksi TGF- β dan IL-10 yang dihasilkan oleh Treg dan peningkatan IFN- γ setelah pemberian imunoterapi 12 bulan (29). Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh penelitian Pereira-Santos *et al* yang mendapatkan penurunan IFN- γ serta IL-4 setelah pemberian imunoterapi (45). Hasil penelitian yang bervariasi ini dipengaruhi oleh protokol imunoterapi yang diberikan, tipe alergen, waktu evaluasi, jenis stimulus yang diberikan untuk produksi sitokin, dan sumber sel yang digunakan (44).

Penggunaan probiotik dalam terapi penyakit alergi didasarkan pada kemampuan probiotik memodulasi *toll-like receptor* dan pengenalan antigen proteoglikan dari enterosit, yang akan mengaktifasi sel dendritik dan meningkatkan respon sel Th1, sehingga akan menurunkan respon sel Th2. Efek probiotik pada respon imun yang telah diteliti termasuk meningkatkan IFN- γ pada pasien dengan alergi susu sapi dan dermatitis atopi, hal ini berhubungan dengan pergeseran respon imun menjadi Th1. Adanya probiotik pada saluran cerna juga membantu perkembangan respon toleransi (46). Mekanisme antialergi yang didapatkan dengan pemberian probiotik

masih belum jelas, tetapi beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian probiotik diduga dapat memodulasi respons imun dengan mempengaruhi sekresi sitokin dan pembentukan T reg (47,48).

Beberapa penelitian sebelumnya tentang IFN- γ maupun probiotik pada asma menunjukkan hasil yang bervariasi. Hal ini dapat terjadi karena adanya perbedaan jenis probiotik yang diberikan, kondisi bakteri hidup atau metode pembuatan *murine* model asma (49). Efek menguntungkan dari probiotik tampaknya berhubungan dengan strain yang spesifik (50). Penelitian Nonaka *et al* pada model hewan coba alergi yang diinduksi OVA menunjukkan pemberian probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium lactis* secara signifikan meningkatkan IFN- γ dan IL-10 serta menurunkan IL-4 (51). Penelitian terbaru menunjukkan pemberian monostrain probiotik lebih baik dalam menurunkan respon alergi dibandingkan multistrain probiotik. Niers *et al* meneliti efek probiotik *Bifidobacterium bifidum* W23 dan didapatkan peningkatan sekresi IFN- γ dan IL-10 disertai penurunan sekresi IL-4. Strain ini merupakan kelompok yang baik untuk pencegahan penyakit alergi (52). Penelitian Chen pada anak asma dan rhinitis alergi yang diberi *Lactobacillus gasseri* setiap hari selama 2 bulan berturut-turut, didapatkan penurunan kadar IFN- γ , TNF- α , IL-12 dan IL-13 yang disertai perbaikan klinis dan fungsi paru. Doege *et al* dalam penelitian metanalisisnya yang melibatkan 7 penelitian *randomized double-blind placebo-controlled* yang dipublikasi selama tahun 2001-2009 menunjukkan adanya penurunan kejadian eksim atopi yang signifikan pada anak usia 2-7 tahun yang ibunya mengkonsumsi probiotik *lactobacilli* saja dibandingkan gabungan beberapa strain probiotik. Gabungan beberapa strain probiotik (walaupun mengandung *lactobacilli*) tidak

mempengaruhi terjadinya eksim atopi (53). Pemberian probiotik untuk menginduksi toleransi imunologis terhadap allergen cukup menjanjikan, tetapi diperlukan pertimbangan pemilihan strain probiotik yang tepat, waktu pemberian, pemilihan subjek, dan spesifisitas allergen (50).

Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak adanya data jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ sebelum perlakuan ataupun pada anak sehat dan anak asma tanpa perlakuan, sehingga tidak dapat dibandingkan nilainya sebelum dan setelah perlakuan untuk mengetahui adanya peningkatan atau penurunan. Selain itu adanya faktor-faktor perancu yang sulit dikendalikan seperti paparan allergen di lingkungan rumah yang tidak dapat dikontrol dan adanya hasil *skin prick test* terhadap multialergen juga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Pada penelitian ini jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ yang diukur merupakan CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ total bukan yang spesifik terhadap HDM, sehingga tidak bisa mewakili respon spesifik terhadap imunoterapi HDM. Pengukuran jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ pada penelitian ini dilakukan pada darah tepi sehingga kurang sesuai untuk menilai jumlahnya pada target organ (mukosa saluran napas).

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian imunoterapi+probiotik lebih baik dalam meningkatkan skor ACT dibandingkan pemberian imunoterapi saja. Jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan CD4⁺IFN- γ setelah pemberian imunoterapi, *Nigella sativa*, dan probiotik tidak berbeda bermakna, tetapi pemberian imunoterapi + *Nigella sativa* + probiotik lebih meningkatkan jumlah sel CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg dan pemberian imunoterapi + probiotik lebih meningkatkan CD4⁺IFN- γ , bila dibandingkan dengan pemberian imunoterapi saja.

DAFTAR PUSTAKA

- Holgate ST. *Pathogenesis of Asthma*. Clinical and Experimental Allergy. 2008; 38(6): 872–897.
- Hill V and Wood P. *Asthma Epidemiology, Pathophysiology, and Initial Evaluation*. Pediatric in Review. 2009; 30(9): 331–336.
- Mohammed EK, Asheiba ZF, and Ali MME. *Role of Circulating CD4⁺CD25⁺ High Foxp3⁺ Regulatory T-cells in Paediatric Asthma*. The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 2011; 42:73–84.
- Global Initiative for Asthma. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention Update 2011*. Cape Town: National Heart and Blood Institute; 2011; hal. 1-79.
- Barnes PJ. *Immunology of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Nature Reviews Immunology. 2008; 8(3): 183–192.
- de Azevedo MS, Innocentin S, Dorella FA, *et al*. *Immunotherapy of Allergic Diseases Using Probiotics or Recombinant Probiotics*. Journal of Applied Microbiology. 2013; 115(2): 319–333.
- Huang TJ, MacAry PA, Eynott P, *et al*. *Allergen-Specific Th1 Cells Counteract Effecrent Th2 Cell-Dependent Bronchial Hyperresponsiveness and Eosinophilic Inflammation, Partly Via IFN-G*. The Journal of Immunology. 2001; 166(1): 207–217.
- Langier S, Sade K, and Kivity S. *Regulatory T Cells In Allergic Asthma*. Israel Medical Association Journal. 2012; 14(3): 180–183.
- Fujimura T, Okamoto Y, and Taniguchi M. *Therapeutic Effects and Biomarkers in Sublingual Immunotherapy: A Review*. Journal of Allergy. 2012; 37: 9.
- Taher YA, Henricks PA, and van Oosterhout AJ. *Allergen-Specific Subcutaneous Immunotherapy in Allergic Asthma: Immunologic Mechanisms and Improvement*. Libyan Journal of Medicine. 2010; 15: 1–11.
- Oosterhout AJ and Bloksma N. *Regulatory T-Lymphocytes in Asthma*. The European Respiratory Journal. 2005; 26(5): 918–932.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, and Global Initiative for Asthma (GINA) Program. *The Global Burden of Asthma: Executive Summary of the GINA Dissemination Comitte Report*. 2004; 59(5): 469–478.
- Ozdemir C, Akdis M, and Akdis CA. *Nature of Regulatory T Cells in the Context of Allergic Disease*. Allergy, Asthma, and Clinical Immunology. 2008; 4(3): 106–110.
- Frew AJ. *Allergen Immunotherapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010; 125(2): 306–313.
- Moote W and Kim H. *Allergen-Specific Immunotherapy*. Allergy, Asthma, & Clinical Immunology. 2011; 7(1):5.
- Toh ZQ, Anzela A, Tang ML, and Licciardi PV. *Probiotic*

- Therapy as a Novel Approach for Allergic Disease*. *Frontiers in Pharmacology*. 2012; 3: 171.
17. Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, and Perdigon G. *Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007; 14(5): 485-492.
 18. Yu J, Jang SO, Kim BJ, et al. *The Effects of Lactobacillus Rhamnosus on the Prevention of Asthma in a Murine Model*. *Allergy Asthma & Immunology Research*. 2010; 2(3): 199-205.
 19. Salem ML. *Immunomodulatory and Therapeutic Properties of the Nigella Sativa L. Seed*. *International Immunopharmacology*. 2005; 5(13-14): 1749-1770.
 20. Azis AEAE, Sayed NSE, and Mahran LG. *Anti-Asthmatic and Anti-Allergic Effects of Thymoquinone on Experimentally- Induced Hypersensitivity in Experimental Animals*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 8: 109-117.
 21. Harsono A, Subrata LA, and Endaryanto A. *Immunomodulatory Effect of Probiotic & Sublingual Immunotherapy in Asthmatic Children*. *Folia Medica Indonesiana*. 2009; 45(1): 14-21.
 22. Isik H, Cevikbas A, Gurer US, et al. *Potential Adjuvant Effects of Nigella Sativa Seeds to Improve Specific Immunotherapy in Allergic Rhinitis Patients*. *Medical Principles and Practice*. 2010; 19(3): 206-211.
 23. Adhistry RA. *Pengaruh Pemberian Probiotik (Mixed Live Bacteria Lactobacillus Acidophilus La-5TM dan Bifidobacterium Lactis Bb-12TM) dan Jinten Hitam (Nigella sativa) terhadap Jumlah CD4+Ifny, CD8+ Ifny, dan Perbaikan Klinis Asma Ringan yang Mendapatkan Imunoterapi*. [Tesis]. Universitas Brawijaya, Malang. 2013.
 24. Irmawati M, Endaryanto A, and Harsono A. *Role of Sublingual Immunotherapy and Probiotics in Clinical Improvements of Childhood Asthma*. *Paediatrica Indonesiana*. 2008; 48(5): 261-268.
 25. Miratu N. *Perbaikan Klinis dan Perubahan Jumlah Sel T CD4⁺, Jumlah Sel T CD8⁺ Dan Rasio Sel T CD4⁺/CD8⁺ pada Anak Asma Ringan yang Mendapat Imunoterapi House Dust Mite, Probiotik dan Nigella Sativa*. [Tesis]. Universitas Brawijaya, Malang. 2013.
 26. Moussu H, Van Overtvelt L, Horiot S, et al. *Bifidobacterium Bifidum NCC 453 Promotes Tolerance Induction in Murine Models of Sublingual Immunotherapy*. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012; 158(1): 35-42.
 27. Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, and Gershwin ME. *Probiotics and Immunity*. *Journal of Gastroenterology*. 2009; 44(1): 26-46.
 28. Lin SY, Erekosima N, Kim JM, et al. *Sublingual Immunotherapy for the Treatment of Allergic Rhinoconjunctivitis and Asthma: A Systematic Review*. *Journal of the American Medical Association*. 2013; 309(12): 1278-1288.
 29. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, et al. *House Dust Mite Sublingual Immunotherapy the Role for Transforming Growth Faktor-b and Functional Regulatory T Cells*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009; 180(10): 936-947.
 30. 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.
 31. Lee SC, Yang YH, Chuang SY, Huang SY, and Pan WH. *Reduced Medication Use and Improved Pulmonary Function with Supplements Containing Vegetable and Fruit Concentrate, Fish Oil and Probiotics in Asthmatic School Children: A Randomised Controlled Trial*. *British Journal of Nutrition*. 2013; 110(1): 145-155.
 32. Vliagoftis H, Kouranos VD, Betsi GI, and Falagas ME. *Probiotics for the Treatment of Allergic Rhinitis and Asthma: Systematic Review of Randomized Controlled Trials*. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2008; 101(6): 570-579.
 33. Rashmi RD, Singh M, and Shafiq N. *Probiotics for Prevention or Treatment of Asthma*. *Chest*. 2010; 138(4): 1-12.
 34. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, et al. *A Randomized Prospective Double Blind Controlled Trial on Effects of Long-Term Consumption of Fermented Milk Containing Lactobacillus Casei In Pre-School Children with Allergic Asthma and/or Rhinitis*. *Pediatric Research*. 2007; 62(2): 215-220.
 35. Stockert K, Schneider B, and Porenta G. *The Effect of Acupuncture and Probiotics in Children with Asthma*. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*. 2007; 12(3): 194-196.
 36. Jang SO, Kim HJ, Kim YJ, et al. *Asthma Prevention by Lactobacillus Rhamnosus in a Mouse Model is Associated with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells*. *Allergy Asthma & Immunology Research*. 2012; 4(3): 150-156.
 37. Noverr M and Huffnagle GB. *Does the Microbiota Regulate Immune Responses Outside the Gut?* *Trends in Microbiology*. 2004; 12(12): 562-568.
 38. Barlianto W, Kusuma HMSC, Widodo A, and Suharto S. *Rude Extract of Black Seed (Nigella Sativa) Can Modulate TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Lymphocytes in Asthmatic Mouse Model*. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2012; 13: 554-560.
 39. 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.
 40. Wei W, Liu Y, Wang Y, et al. *Induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ T Cells in HDM-Allergic Asthmatic Children with or Without SIT*. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2010; 153(1): 19-26.
 41. Feleszko W, Jaworska J, Rha RD, et al. *Probiotic-Induced Suppression of Allergic Sensitization and Airway Inflammation is Associated with an Increase of T Regulatory-Dependent Mechanisms in a Murine Model of Asthma*. *Clinical & Experimental Allergy*. 2007; 37(4): 498-505.
 42. Al-Snafi AE, Al-Samarai AGM, and Al-Sabawi AM. *The Therapeutic Effect of Nigella Sativa Seed Oil in Treatment of Chronic Urticaria*. *Tikrit Journal of Pharmaceutical Science*. 2005; 1(1): 1-6.

43. Alsamarai AM, Satar MA, and Alobaidi AHA. *Evaluation of Therapeutic Efficacy of Nigella Sativa (Black Seed) for Treatment of Allergic Rhinitis*. Allergic Rhinitis. 2012; 12: 197-215.
44. Kim HB, Jin HS, Lee SY, et al. *The Effect of Rush Immunotherapy with House Dust Mite in the Production of IL-5 and IFN- γ from the Peripheral Blood T Cells of Asthmatic Children*. Journal of Korean Medical Science. 2009; 24(3): 392-397.
45. Pereira-Santos MC, Baptista AP, Melo A, et al. *Expansion of Circulatory Foxp3+CD25 Bright CD4+T Cells During Specific Venom Immunotherapy*. Clinical & Experimental Allergy. 2008; 38(2): 291-297.
46. Morais MB and Jacob CM. *The Role of Probiotics and Prebiotics in Pediatric Practice*. Jornal de Pediatria. 2006; 82(5): 189-197.
47. Check W. *Innate Immunity Depends On Toll-Like Receptors*. American Society for Microbiology News. 2004; 70(7): 317-322.
48. Endaryanto A and Harsono A. *The Different Profile of Th1, Treg and Th2 Cytokines between Asthma and Non-Asthma Allergic Child with Chronic Cough*. Kongres Nasional Ilmu Kesehatan Anak XIV. Surabaya, 2008; hal. 22-45.
49. 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.
50. Choi IS. *Immune Tolerance by Induced Regulatory T Cells in Asthma*. Allergy Asthma & Immunology Research. 2012; 4(3): 113-115.
51. Nonaka Y, Izumo T, Izumi F et al. *Antiallergic Effects of Lactobacillus Pentosus Strain SPT84 Mediated by Modulation of Th1/Th2 Immunobalance and Induction of IL-10 Production*. International Archives of Allergy and Immunology. 2008; 145(3): 249–257.
52. Niers LE, Timmermanw HM, Rijkersw GT, et al. *Identification of Strong Interleukin-10 Inducing Lactic Acid Bacteria which Down-Regulate T Helper Type 2 Cytokines*. Clinical & Experimental Allergy. 2005; 35(11): 1481–1489.
53. Doege K, Grajecki D, Zyriax BC, Detinkina E, Eulenburg C, and Buhling KJ. *Impact of Maternal Supplementation with Probiotics During Pregnancy on Atopic Eczema in Childhood—a Meta-Analysis*. The British Journal of Nutrition. 2012; 107(1): 1–6.