

PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK
Lactobacillus plantarum IS-10506 TERHADAP RESPON IMUN
ANAK USIA DI BAWAH DUA TAHUN

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master Biomedik

PRATIWI DYAH KUSUMO
0806419592



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA BIOMEDIK
JAKARTA
DESEMBER 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Pratiwi Dyah Kusumo

NPM : 0806419592

Tanda Tangan :



Tanggal : 28 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Pratiwi Dyah Kusumo
NPM : 0806419592
Program Studi : Pasca Sarjana Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh suplementasi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap respon imun anak usia di bawah dua tahun

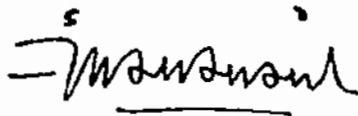
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Pasca Sarjana Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr.Budiman Bela, SpMK (K) (.....)
Pembimbing II : DR. Ingrid S Surono, MSc (.....)
Penguji I : dr.Alida R Harahap, SpPK (K),Ph.D (.....)
Penguji II : Dr.dr. Ani Retno Prijanti, MS. (.....)
Penguji III : Adriansjah, S.Si., MS., PhD (.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 28 Desember 2010

Ketua Program Magister
Ilmu Biomedik FK UI



(Dr.rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Master Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) dr Budiman Bela, SpMK(K) dan DR Ingrid S Surono, MSc, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini,
- (2) DR Heri Wibowo dan dr Alida Harahap, SpPK selaku ketua kekhususan imunologi yang telah membimbing saya selama masa perkuliahan dan pengujian statistik,
- (3) Dr.rer.physiol.dr Septelia Inawati Wanandi selaku ketua KPS Program Biomedik FK UI yang mendukung kelancaran proses perkuliahan,
- (4) Seluruh jajaran staf pengajar program pasca sarjana Biomedik yang telah mengajar dan membimbing selama masa perkuliahan,
- (5) Bapak Jeki, Bapak Dani, Ibu Ella yang dengan senang hati melayani administrasi selama masa perkuliahan,
- (6) Seluruh jajaran staf Bagian Biologi FK UKI, Dekanat FK UKI dan Rektorat UKI atas dukungan moril dan dana selama perkuliahan,
- (7) Dr Zakiudin Munazir, SpA selaku pembimbing lapangan dalam proyek penelitian yang saya kerjakan,
- (8) Seluruh jajaran Puskesmas Pusat Larangan, Cileduk Tangerang Banten yang telah mendukung saya dalam merekrut responden dalam penelitian,
- (9) Seluruh paramedik Laboratorium Nidea Cileduk Tangerang Banten, yang telah membantu saya dalam proses pengambilan sample,
- (10) Seluruh responden dan orang tua responden yang telah bersedia terlibat dalam penelitian,

- (11) Staf dan laboran IHVCB UI dan FKH IPB yang mendukung saya dalam pengujian sample,
- (12) Staf Seameo Tropmed RCCN UI yang telah membantu memfasilitasi penyimpanan sample dalam penelitian ini,
- (13) Bapak Heru (Kimia Farma Bandung) dan Amanda Ariella,S.Si. (PT Ultra Jaya) yang telah membantu dalam proses mikroenkapsulasi,
- (14) Ika Prawahyu dra.,MBiomed (PPOM Depkes Jakarta) yang telah menyediakan fasilitas dalam penimbangan kapsul.
- (15) Suami dan kedua anaku Yosua dan Petra, Orangtua dan keluarga besar saya yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral termasuk juga penjaga anak yang setia menolong dan;
- (12) Tidak terlupakan sahabat dan teman perkuliahan yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan perkuliahan di program pasca sarjana Biomedik.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 28 Desember 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Pratiwi Dyah Kusumo
NPM : 0806419592
Program Studi : Program Pasca Sarjana Biomedik
Kekhususan : Immunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Pengaruh suplementasi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap respon imun anak usia di bawah dua tahun

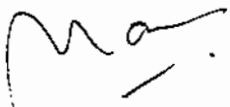
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media / formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tesis saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 28 Desember 2010

Yang menyatakan


(Pratiwi Dyah Kusumo)

ABSTRAK

Pengaruh suplementasi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap respon imun anak usia di bawah dua tahun

Diare masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang serius terutama di negara berkembang, sebagai kontributor malnutrisi dan penyebab morbiditas serta mortalitas anak usia bawah lima tahun. Penggunaan antibiotika tidak efektif bahkan biasanya menyebabkan efek samping yang merugikan. Penelitian ini akan menggali manfaat bakteri *indigenous Lactobacillus plantarum* IS-10506 isolasi dari dadih, susu fermentasi spontan asal Sumatra Barat. Penelitian ini dirancang sebagai *pre post randomized double-blind placebo clinical trial*. Dua puluh anak usia 1-2 tahun diberikan suplementasi dan dibagi atas dua perlakuan yaitu probiotik dan placebo. Dilaksanakan di Larangan, Cileduk, Tangerang Banten. Subyek diberikan suplementasi selama 90 hari dan setiap 30 hari dilakukan pemeriksaan fisik oleh seorang dokter umum. Terdapat kenaikan persentase subyek yang mengalami kenaikan sIgA, TGF- β 1 dan penurunan TNF- α namun uji statistic chi square tidak menunjukkan signifikansi dan juga tidak ditemukan korelasi antara titer sIgA, TGF- β 1, TNF- α . Di sisi lain suplementasi probiotik tidak cukup signifikan untuk dapat menekan insiden diare. Kecilnya jumlah sample sangat mempengaruhi kesimpulan statistik yang didapat.

Kata kunci : *Lactobacillus plantarum* IS 10506, sIgA, TGF- β 1, TNF- α

ABSTRACT

Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation on children younger than two year immune response

Diarrheal disease remains a serious public health problem in developing world, is well known as a significant contributor to malnutrition and one of the major causes of the annual morbidity and mortality among under-five children in the developing world. The use of antibiotics had not been effective and often followed by serious side effect. We investigated the benefit of *indigenous bacteria Lactobacillus plantarum* IS-10506 isolated from dadih, spontaneous fermented milk from West Sumatra. This study was designed as *pre post randomized double-blind placebo clinical trial*. Twenty children 1 – 2 years old were supplemented and divided into 2 treatment, probiotic and placebo groups. This in Larangan, Cileduk, Tangerang Banten province were recruited and involved in this study. They were supplemented for 90 days and every 30 days physically clinical examination by physician. There are an enhancement of presentation subyek who get a increasement titer of sIgA dan TGF- β 1 and suppression of TNF- α but not significant and there are no correlation significant between titer sIgA, TGF- β 1 and TNF- α . Supplementation probiotik is not enough to suppress the diarrhea insidens lower than placebo. Very little sample quantity influences the statistic conclusion.

Key word : *Lactobacillus plantarum* IS-10506, TGF- β 1, TNF- α .

DAFTAR ISI

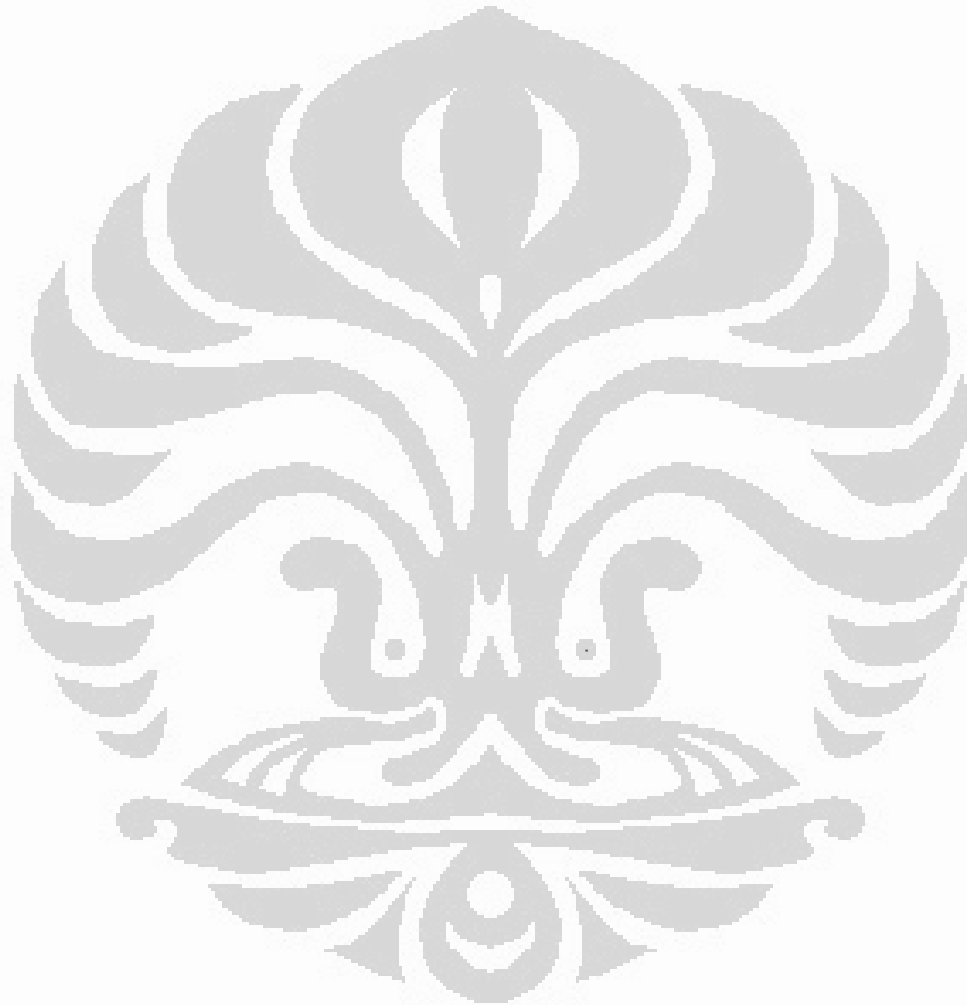
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Kerangka konsep	4
1.6 Manfaat penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Probiotik dan peranannya dalam sistem imunitas	6
2.2 <i>lactobacillus plantarum</i> IS-10506	10
2.3 Pola perkembangan sistem imunitas anak baduta	14
2.4 Sistem imunitas mukosal	19
2.5 Insiden diare dan probiotik	27
3. METODE PENELITIAN	28
4. HASIL.....	41
5. PEMBAHASAN	47
6. KESIMPULAN DAN SARAN	55
DAFTAR REFERENSI	56
ARTIKEL MAJALAH KEDOKTERAN FK UI	
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

	halaman
1. Susu fermentasi tradisional di Asia	11
2. Komposisi Air Susu Ibu	18
3. Pengaruh pemberian bakteri asam laktat terhadap ekspresi sitokin Pada lamina propia usus halus	27
4. Data lengkap responden kelompok A (placebo)	
5. Data lengkap responden kelompok B (probiotik)	
6. Data pemeriksaan fisik kelompok A dan data berat dan tinggi badan	
7. Data pemeriksaan fisik kelompok B dan data berat dan tinggi badan	
8. Data kejadian diare	
9. Data hasil uji Elisa sIgA	
10. Data hasil uji Elisa TGF- β 1	
11. Data hasil uji Elisa TNF- α	

DAFTAR LAMPIRAN

1. Rancangan Plate Elisa dan Kurva standard Elisa
2. Hasil uji Chi-Square sIgA, TGF- β 1, TNF- α , Insiden Diare
3. Hasil uji korelasi IgA , TGF- β 1 dan TNF- α
4. Inform concent
5. Lembar Informasi penelitian untuk subyek




DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Manfaat positif bakteri probiotik bagi kesehatan	6
2. <i>Lactobacillus plantarum</i> dan <i>Bifidobacterium sp.</i>	7
3. Mekanisme pelepasan komponen bioaktif	9
4. Bioyoghurt, proses pembuatan dadih di potongan bambu.....	12
5. Integritas imunitas mukosal antara ibu dan anak.....	15
6. Persentasi sel limfosit T CD4+ dan CD8+.....	16
7. Lapisan mukus permukaan mukosa intestin.....	19
8. Struktur anatomi microfold cell.....	20
9. Skema stimulasi mikroba dan output reaksi selular.....	21
10. Skema mekanisme sistem adaptif sistem mukosa.....	22
11. Mekanisme respon imun spesifik.....	23
12. Mekanisme pengikatan rantai J dan komponen sekretory.....	23
13. Interaksi sel epitel dengan limfosit pada mukosa.....	24
14. Perkembangan Th1 dan Th2 pada anak.....	25
15. Model regulasi homeostasis aktivasi sel epitel.....	26
16. Persentase kenaikan berat dan tinggi badan	42
17. Insiden diare selama tiga bulan	42
18. Variasi pemberian suplementasi	43
19. Persentase subyek yang mengalami kenaikan sIgA.....	44
20. Persentase subyek yang mengalami kenaikan TGF- β 1.....	45
21. Persentase subyek yang mengalami penurunan TNF- α	45

DAFTAR SINGKATAN



APC	: Antigen Presenting Cell
FDC	: Follicular Dendritic Cells
FPRs	: Formylated Peptide Receptors
GALT	: Gut Associated Lymphoid Tissue
GIT	: Gut Intestinal Tissue
GRAS	: Generally Recognize As Safe
HEV	: High Endothelial Venules
IELs	: Intestinal Epithelial Lymphoid
IFN- γ	: Inter Feron Gamma
IgAIC	: Immunoglobulin A Immune Complex
MAMPs	: Microbial Associated Molecular Pattern
MALT	: Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MLN	: Mesenteric Lymph Nodes
NOD	: Nucleotide Binding Oligomerization Domain
LAB	: Lactic Acid Bacteria
slgA	: Secretory Immunoglobulin A
TGF- β 1	: Tumor Growth Factor β 1
Th	: T helper
TLR	: Toll Like Receptor
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor - α

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Keseimbangan ekosistem mikrobiota usus perlu diperhatikan mengingat melalui usus, makanan dicerna dan diserap, sehingga pola asupan makanan yang baik akan mempengaruhi sistem imun tubuh baik mukosal (lokal) maupun sistemik. Mikrobiota usus yang menguntungkan ekosistem usus dikenal sebagai bakteri baik, yaitu bakteri probiotik. Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah cukup akan memberikan keuntungan kesehatan pada inangnya.¹

Probiotik memiliki manfaat kesehatan pada saluran pencernaan di antaranya menjaga keseimbangan mikrobiota, meningkatkan daya kekebalan, mencegah intoleransi, antimutagenik dan menurunkan kolesterol. Pada sistem imun mukosal, probiotik berperan dalam proteksi terhadap infeksi rotavirus pada penyakit diare, meningkatkan sekresi *sIgA*, meningkatkan transport antigen pada Peyer patches, meningkatkan perbaikan usus karena diare dan pemberian antibiotika selama terapi diare.^{1,2} Walaupun sudah banyak penelitian yang membuktikan manfaat probiotik terhadap diare, namun probiotik belum direkomendasikan secara rutin dalam tatalaksana diare terkini. WHO masih mensyaratkan bukti berbasis komunitas, yang masih jarang dilakukan. Hal tersebut dilatarbelakangi dengan masih tingginya insiden penyakit saluran pencernaan khususnya pada anak usia bawah lima tahun di Indonesia. Oleh karenanya merupakan suatu tantangan untuk melakukan penelitian probiotik di komunitas khususnya pada populasi orang Indonesia. Probiotik juga terbukti tidak menimbulkan efek samping yang merugikan, pada penanganan diare yang masih menggunakan terapi antibiotika, pemanfaatan probiotik berpotensi menekan pemberian antibiotik berlebihan yang dapat mengakibatkan resistensi bakteri patogen yang mengganggu keseimbangan mikrobiota alami, meningkatkan sepsis, infeksi rumah sakit dan resistensi anak balita terhadap antibiotik yang berbahaya bagi kesehatan anak balita. Hal tersebut dimungkinkan karena probiotik memiliki kemampuan eliminasi bakteri patogen dan menjaga keseimbangan mikrobiota normal dalam saluran pencernaan.^{3,4,5}

Walaupun *strain* probiotik komersial yang berasal dari negara-negara maju telah tersedia, pemanfaatan biodiversitas perlu dikembangkan secara optimal khususnya bagi anak-anak. Hal tersebut ditunjang dengan kebijakan Direktorat Standardisasi Pangan Khusus BPOM DEPKES yang saat ini sedang menyusun peraturan untuk pangan probiotik. Peraturan tersebut mengharuskan semua probiotik yang beredar dilakukan uji pada orang Indonesia apabila menyatakan klaim kesehatan.

Salah satu potensi probiotik asal Indonesia yang perlu dikembangkan bakteri *indigenous* asal dadih. Dadih adalah produk susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat dalam tabung bambu, menyerupai yogurt, berasal dari susu kerbau yang difermentasi spontan, secara tradisional tanpa proses pemanasan.¹ Beberapa *strain* bakteri asam laktat isolat Indonesia asal dadih terbukti secara *in vitro* dan *in vivo* bersifat aman, memiliki daya antimutagenik, memiliki daya hambat terhadap adesi patogen, toleran terhadap asam dan garam empedu serta bersifat anti bakteri patogen, mengikat *toxin* sianobakteri, dan meningkatkan respon imun humoral^{1,6} Salah satu bakteri asam laktat isolat dari dadih adalah *Lactobacillus plantarum* IS-10506. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 merupakan isolat Indonesia asal dadih yang telah dibuktikan melalui beberapa penelitian memiliki potensi stimulasi respon imun, antimutagenik, antimikrobial dan lain sebagainya. Oleh karenanya berpotensi sebagai probiotik yang tepat untuk orang Indonesia, mengingat prevalensi infeksi bakteri usus patogen yang relatif masih tinggi di Indonesia.

Berdasarkan hasil riset terdahulu dan bukti-bukti ilmiah yang telah didapat, maka perlu dikaji fungsi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 pada anak Indonesia usia 1-2 tahun yaitu perannya dalam meningkatkan respon imun, khususnya respon imun *humoral* dengan parameter *sIgA*, dan juga respon imun selular. Pembuktian mengenai hal ini dapat dijadikan landasan untuk memanfaatkan probiotik lokal (*Lactobacillus plantarum* IS-10506) yang telah terbukti cocok untuk masyarakat Indonesia dalam meningkatkan kesehatan masyarakat. Dengan memanfaatkan probiotik lokal (*Lactobacillus plantarum* IS-10506) yang memang terbukti cocok untuk orang Indonesia, dapat mengurangi ketergantungan pada probiotik komersial impor.

1.2 RUMUSAN MASALAH

1. Masih kurangnya penelitian berbasis komunitas yang membuktikan bahwa *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terbukti dan teruji secara klinis bermanfaat bagi kesehatan anak Indonesia.
2. Perlunya uji untuk mengetahui respon imun *humoral* (*sIgA*) dan respon imun selular yang menunjang produksi *sIgA* terhadap suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 pada anak Indonesia usia 1-2 tahun.

1.3 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum:

Mengetahui peranan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 isolat dadih dalam meningkatkan respon imun *humoral* dengan parameter *sIgA* fekal dan respon imun selular dengan parameter *TGFβ-1* dan *TNF-α* khususnya pada Anak Indonesia usia 1-2 tahun.

Tujuan Khusus:

1. Menilai pengaruh suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap konsentrasi *sIgA* fekal sebagai indikator respon imun *humoral*
2. Menilai pengaruh suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap konsentrasi *TGFβ-1* sebagai indikator respon imun selular.
3. Menilai pengaruh suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terhadap konsentrasi *TNF-α* sebagai indikator respon imun selular
4. Menilai suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan korelasinya dengan terhadap *sIgA*, *TGF-β1* dan *TNF-α*
5. Menilai suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan korelasinya dengan terhadap insidens diare

1.4 HIPOTESIS

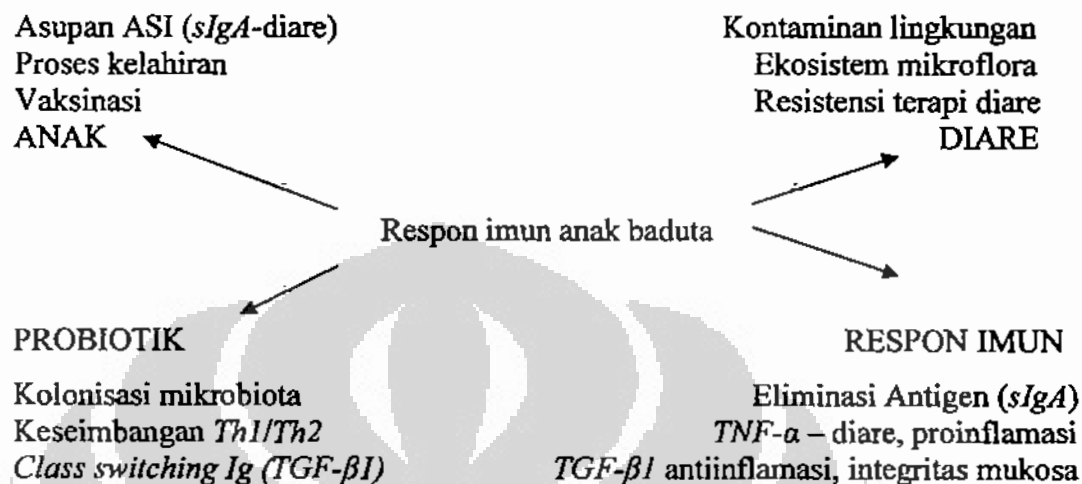
Berdasarkan perumusan masalah dan tujuan penelitian di atas, maka dirumuskan hipotesis untuk melihat perubahan konsentrasi respon imun dengan memakai indikator perubahan persentasi responden sebagai berikut :

- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 meningkatkan konsentrasi *sIgA*
- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 meningkatkan konsentrasi *TGF-β1*
- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 menurunkan persentasi konsentrasi *TNF-α*
- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 mengekspresikan korelasi positif antara konsentrasi *sIgA* dan *TGF-β1*
- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 mengekspresikan korelasi negatif antara konsentrasi *TGF-β1* dan *TNF-α*
- H₁: Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 menurunkan insiden diare

1.5 KERANGKA KONSEP

Sekitar 33% penyakit pada anak usia di bawah lima tahun disebabkan karena paparan lingkungan khususnya pada masa *prenatal* dan awal perkembangan *postnatal* (WHO 2006) selain itu perkembangan respon imun anak usia bawah dua tahun belum berkembang dengan baik. Pada awal proses perkembangan anak terjadi proses kolonisasi mikrobiota alami.⁷ Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang diberikan dalam jumlah yang adekuat (10^6 - 10^8 cfu/ml) dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya, salah satunya kemampuan kolonisasi.⁸ Dadih, adalah susu fermentasi tradisional asal Sumatra Barat Indonesia yang dipercayai memiliki manfaat yang menguntungkan bagi kesehatan manusia. Salah satu isolate asal dadih adalah *Lactobacillus plantarum* IS-10506.⁹ Peranan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 sebagai *imunomodulator* stimulasi produksi *sIgA* (respon imun *humoral*) dan sitokin antiinflamasi *TGF-β1* dan sitokin proinflamasi *TNF-α*. Secara teoritis, kemampuan kolonisasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 memungkinkan stimulasi respon imun adaptif dimana peningkatan ekspresi *TGF-β1* akan memicu ekspresi *immunoglobulin* secara umum dan menekan ekspresi *TNF-α*. Dengan adanya peningkatan ekspresi *immunoglobulin* secara umum yang mampu mengeliminasi bakteri patogen, diharapkan keseimbangan mikrobiota alami akan

tercapai dan kecenderungan diare pada anak kelompok probiotik akan semakin menurun¹⁰



1.6 Manfaat penelitian

Manfaat akademis penelitian ini ialah:

Dengan menyelesaikan penelitian ini diharapkan:

1. Mengetahui ekspresi respon imun *sIgA*, *TGF-1* dan *TNF α* dari suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506
2. Memberikan gambaran pola kerja probiotik pada anak baduta

Manfaat klinis penelitian ini ialah:

1. Dengan mengetahui manfaat suplementasi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 maka penanganan terapi diare dapat dikembangkan.
2. Dengan mengetahui manfaat suplementasi probiotik dapat menekan insiden diare pada anak baduta

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

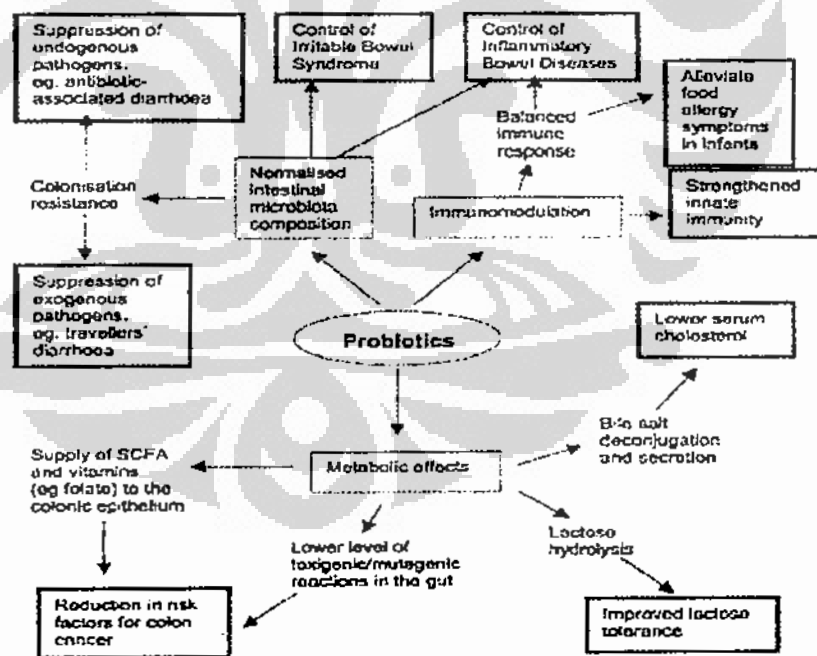
II.1 Probiotik dan peranannya dalam sistem imunitas

II. 1.1 Pengertian probiotik dan manfaat bagi kesehatan

Pengertian **Probiotik** menurut FAO/WHO adalah mikroorganisme hidup yang diberikan dalam jumlah yang adekuat (10^6 - 10^8 cfu/ml) untuk memberikan manfaat kesehatan pada inangnya.^{8,11} *Strain* spesifik bakteri asam laktat dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* banyak dipakai sebagai probiotik untuk produk makanan fungsional. Beberapa kriteria yang digunakan untuk menetapkan *strain* bakteri digolongkan ke dalam probiotik adalah :

1. Keamanan penggunaan probiotik terhadap pengguna
2. Toleransi terhadap kondisi gastrointestinal (pH, asam lambung)
3. Kemampuan adesi mukosa gastrointestinal berkorelasi dengan kolonisasi
4. Kemampuan untuk berkompetisi dengan patogen (*competitive exclusion*)

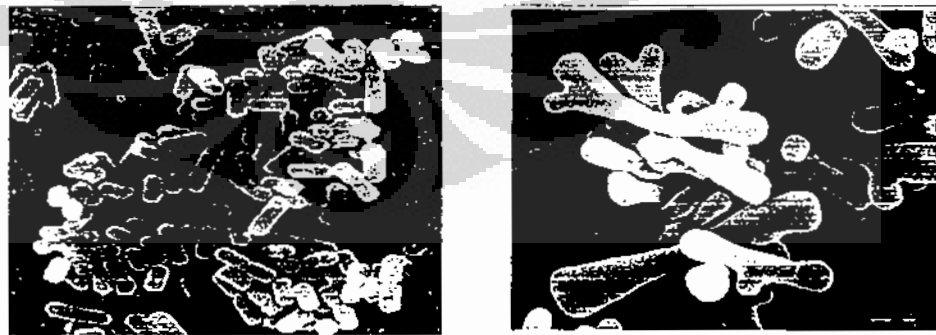
Manfaat probiotik bagi kesehatan dapat digambarkan pada gambar di bawah ini :



Gambar 2.1 Manfaat positif bakteri probiotik bagi kesehatan¹²

II. 1.2. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (*Lactic Acid Bacteria / LAB*) dan *Bifidobacteria* termasuk dalam kelompok bakteri 'baik' bagi manusia, dan umumnya termasuk dalam status GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Bakteri asam laktat pertama ditemukan pada isolasi susu yang tengik, beberapa bakteri asam laktat dapat ditemukan juga pada saluran pencernaan manusia dan hewan. Sedangkan isolasi pertama kali *Bifidobacterium sp.* ditemukan pada saluran usus bayi yang mengonsumsi ASI. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, tidak membentuk spora, tidak mempunyai *cytochrome*, *aerotoleran*, *anaerobik* hingga mikroaerofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks seperti asam-asam amino, vitamin (B₁, B₆, B₁₂ dan biotin), purine, pyrimidin. Secara umum niasin dan asam pantothemat esensial bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat memerlukan nutrisi yang sangat kompleks, oleh karena itu umumnya habitatnya kaya akan nutrisi seperti berbagai jenis makanan (susu, daging, minuman dan sayuran) seperti usus dan vagina dari mamalia.¹² Pada mulanya, bakteri asam laktat terdiri dari 4 genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*, namun dalam perkembangannya beberapa genus baru masuk dalam kelompok bakteri asam laktat.¹² *Lactobacillus plantarum* dan *Bifidobacterium sp.* telah lama dikenal sebagai probiotik¹³. *Lactobacillus plantarum* adalah organisme mesofilik yang memiliki kemampuan hidup pada kisaran suhu optimum 20⁰-35⁰C.¹⁴ Di bawah ini adalah gambaran morfologi bakteri *Lactobacillus plantarum* dan *Bifidobacterium sp.*



Gambar 2.2 *Lactobacillus plantarum* dan *Bifidobacterium sp.*^{15,16}

II. 1.3. Mikroenkapsulasi probiotik

Perkembangan produk makanan mengandung komponen *bioactive* yang berperan untuk meningkatkan kesehatan atau mencegah penyakit semakin meningkat akhir-akhir ini. Komponen *bioactive* makanan dapat dibedakan atas molekul *bioactive* dan molekul sel hidup (probiotik). Dalam proses distribusi makanan tersebut, seringkali viabilitas dari komponen *bioactive* tersebut menjadi menurun, oleh karenanya dibutuhkan suatu metode pengemasan komponen *bioactive* yang disebut mikroenkapsulasi dengan dasar pertimbangan :

1. Ketahanan probiotik dalam produk tradisional yang rendah
2. Bakteri probiotik menunjukkan viabilitas yang rendah setelah proses pengeringan
3. Proses enkapsulasi meningkatkan viabilitas dan fungsi penting lainnya.
4. Target pelepasan probiotik dapat dikontrol dengan baik. Agar dapat menimbulkan efek imunologis yang diharapkan maka probiotik diharapkan dapat mencapai *Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT)*

Penemuan metode enkapsulasi dapat meningkatkan viabilitas, menjamin fungsi komponen *bioactive* tetap terjaga dan juga menjamin tercapainya target pelepasan komponen pada tempat yang tepat di dalam bagian usus¹⁷

Mikroenkapsulasi dapat meningkatkan viabilitas mikroorganisme probiotik yang berukuran sangat kecil (1-5 μm) dengan proteksi terhadap faktor lingkungan antara lain tingginya nilai keasaman, pH yang rendah, oksigenasi, agen racun yang terbentuk karena proses pemanasan, Enzim pencernaan, *hydrogen peroxide* dan proses pengeringan. Simulasi percobaan Lee dan Heo pada tahun 2000 dengan menggunakan lambung buatan pH 1,5 membuktikan bahwa mikroenkapsulasi dengan selubung kalsium alginat dapat mempertahankan probiotik melewati kondisi pH yang rendah pada saluran pencernaan. Di sisi lain sebuah pembuktian simulasi lambung buatan pH 1,5 menunjukkan bahwa probiotik yang tidak dikemas dalam mikroenkapsulasi mengalami penurunan viabilitas yang drastis, viabilitas *Bifidobacterium infantile* 1.23×10^9 menjadi <10 cfu/ml setelah 30 menit, suatu nilai yang sangat jauh bila dibandingkan dengan persyaratan bahwa probiotik dapat berperan dengan optimal pada viabilitas $> 10^7$ cell per gram atau per mililiter produk^{17,18,19}

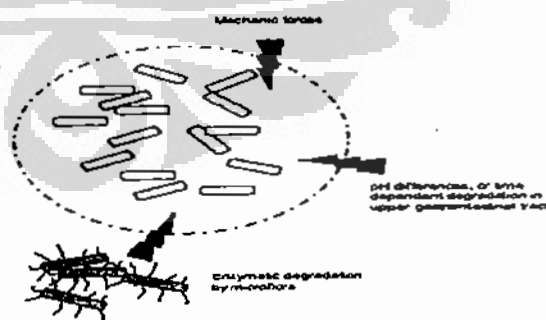
Kapsul dalam proses mikroenkapsulasi harus memiliki kemampuan untuk menjaga integritas molekul selama melewati saluran pencernaan hingga mencapai target yang diharapkan, dimana kapsul akan dirusak dan bakteri probiotik dilepaskan. Diameter dari kapsul atau selubung yang membungkus komponen *bioaktif* juga menentukan peningkatan viabilitas probiotik. Reduksi dari ukuran kapsul akan mengurangi nilai proteksi dari enkapsulasi.^{18,19}

Materi yang banyak dipakai untuk menyalut probiotik dalam enkapsulasi adalah alginat karena bersifat non toksik dan mudah untuk didapatkan walaupun alginat juga memiliki kelemahan ketidakstabilan struktur. Kombinasi antara alginat dengan tepung akan menghasilkan sinergi yang baik dalam membentuk formasi gel.

Faktor yang berperan dalam pelepasan komponen *bioaktif* pada di saluran pencernaan adalah :

- 1) Kekuatan mekanik. Gerakan peristaltik kolon yang kuat dipadukan tekanan yang lebih lemah dari lambung dan bagian atas usus, menyebabkan terurainya kapsul pada bagian bawah saluran cerna.
- 2) Mekanisme variasi pH dan waktu . Polimer kapsul penyalut yang sensitif terhadap perubahan pH memungkinkan kapsul tetap bertahan di lambung tetapi menjadi sangat sensitif terhadap Enzim pencernaan.
- 3) Aktivitas lokal dari Enzim-Enzim yang dihasilkan mikrobiota. Variasi potensial redoks yang dihasilkan mikrobiota seperti β -glucoronidase membantu pelepasan komponen *bioaktif*.

Gambar di bawah menunjukkan mekanisme pelepasan komponen *bioaktif*.



Gambar 2.3 Mekanisme pelepasan komponen *bioaktif*¹⁷

Alginat merupakan polimer polisakarida yang umum digunakan oleh para peneliti dalam proses enkapsulasi dengan kombinasi *spray drying* dan *extrusion*. Alginat dapat membentuk gel dan dapat digunakan untuk membentuk kompleks dengan chitosan untuk mengontrol pelepasan molekul *bioactive* dan sel hidup, tergantung pada karakteristik kimia dari kapsul, alginat yang membentuk kapsul biasanya diaplikasikan untuk memfasilitasi pelepasan komponen *bioactive* pada ileum atau kolon¹⁷

II. 2 *Lactobacillus plantarum* IS-10506, bakteri indigenus asal dadih

II. 2.1 Sejarah pemanfaatan susu fermentasi

Asal usul susu fermentasi tidak bisa dipastikan secara jelas. Namun demikian, ketika kambing mulai dternakkan di Mesopotamia kira-kira 5000 tahun SM, kelompok nomad (yang hidup berpindah pindah tempat) menyimpan susu yang baru diperah dari ternaknya dalam kulit hewan atau dalam belanga dari tanah liat pada iklim yang panas, sehingga terbentuk '*curd*' yaitu penggumpalan susu. Maka mulailah sejarah pengolahan fermentasi susu secara tradisional, melibatkan proses fermentasi spontan yang terjadi secara alami. Bakteri asam laktat yang berperan dalam fermentasi adalah kontaminan alami pada susu tersebut. Tidak ada catatan yang jelas kapan orang mulai menggunakan susu sebagai salah satu bahan makanan, tetapi konsumsi susu tercatat dalam kitab suci yang menceritakan bahwa untuk menjamu tiga orang tamunya, Nabi Ibrahim menyediakan '*curd*' susu sapi (dadih) kepada tamunya. Berbagai jenis metode proses fermentasi susu secara tradisional beragam dari satu tempat ke tempat lainnya. Asal bakteri asam laktat yang aktif dalam fermentasi bisa dari wadah untuk fermentasi, susu segar, saluran pencernaan hewan dan manusia, serta tanaman.¹²

Tabel 2.1 Susu Fermentasi Tradisional di Asia¹²

Nama	Asal negara
Dadiah	Indonesia
Dahi	India
Dough	Iran
Ayran	Turki
Juhug	Lebanon
Kashk, Lavg, Mast	Iran
Kalyk	Armenia
Koumiss, Kefir	Rusia
Laban rayeb	Arab Saudi
Labneh, Iebneh	Lebanon dan negara Saudi lainnya
Yogurt	Turki, Bulgaria
Zabadi, Zabade	Sudan
Airag, Eidosensuu, Tsuge, Sanyuu	Mongolia

Awalnya berbagai jenis susu fermentasi diproses secara tradisional dengan pertumbuhan spontan mikroba yang terlibat dan bisa tumbuh baik di media susu. *Strain* bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi sangat beragam dari satu tempat ke tempat lainnya, mengingat proses fermentasi berlangsung secara spontan dan juga bergantung pada kondisi fermentasi setempat. Sekarang proses fermentasi susu yang dikendalikan dengan cermat menggunakan kultur starter dimana teknologi fermentasi susu melibatkan fisiologi dan biokimia mikroba, memungkinkan produksi susu fermentasi jumlah besar dan mutu yang stabil.¹²

II. 2.2 Dadih, susu fermentasi dari Sumatra Barat

Dadiah adalah susu sapi fermentasi tradisional asal Indonesia yang dipercayai memiliki manfaat yang menguntungkan bagi kesehatan manusia⁹ Dadiah yang menyerupai dahi dari India, telah diproduksi ratusan tahun di Indonesia, khususnya di Sumatra Barat dari susu kerbau dengan cara yang sederhana. Suku Minangkabau memproses susu kerbau yang baru diperah tanpa dimasak, dimasukkan ke dalam potongan bambu, kira-kira sebanyak 150 ml, ditutup dengan daun pisang atau plastik dan dibiarkan hingga dua malam pada suhu ruang sampai menjadi kental menyerupai yogurt. Hal yang menarik disini adalah bahwa susu segar tidak diberi perlakuan panas, jadi susu segar dan mentah difermentasikan secara spontan, dan produk akhir dadiah didominasi oleh bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat *indigenous* dalam susu kerbau berperan dalam proses fermentasi dadiah, mengalahkan bakteri kontaminan yang terkandung dalam

susu kerbau mentah tadi. Proses pembuatannya dilakukan secara tradisional, sederhana dan tidak memperhatikan faktor *higienis* namun tidak pernah dilaporkan adanya kasus yang menunjukkan merugikan^{12, 14, 20}



Gambar 2.4 a. Bioyoghurt b-c proses pembuatan dadih di potongan bambu¹²

II. 2.3. Peranan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 asal dadih

Lactobacillus plantarum IS-10506 adalah salah satu dari lima *strain* bakteri yang diisolasi dari dadih. Kelima *strain* yang telah teridentifikasi kembali dengan *PCR* adalah *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan IS-20506 *Enterococcus faecium* IS-27526, IS-23427 dan IS-16183. Kelima *strain* tersebut kemampuan adaptasi pada pH yang rendah dan resistan terhadap keberasaan *lysozyme*¹³

Berbagai penelitian telah dilakukan pada ke lima *strain* bakteri *indigenous* asal dadih, untuk membuktikan kemampuan *strain* bakteri tersebut bagi aplikasi kesehatan manusia, didasarkan pada kriteria seleksi *strain* probiotik. Kemampuan untuk melekat pada permukaan mukosa merupakan prasyarat penting bagi kelompok bakteri probiotik untuk proses kolonisasi dan proses eliminasi bakteri pathogen. Collado et all telah meneliti permukaan sel beberapa *strain* bakteri asam laktat asal dadih untuk melihat kemampuan agregasi dan adesi pada hydrocarbon. Kemampuan autoagregasi berhubungan dengan proses kolonisasi, sedangkan ko-agregasi dibutuhkan untuk berinteraksi secara langsung dengan bakteri patogen. Hasil penelitian tersebut menunjukkan *strain*

Lactobacillus plantarum IS-10506, *Enterococcus faecium* IS-23427 dan IS-27526 menunjukkan presentasi kemampuan adesi terhadap hydrocarbon dan juga kemampuan autoagregasi. Di sisi lain, semua *strain* dadih menunjukkan kemampuan agregasi dengan patogen (ko-agregasi) dengan presentasi yang spesifik (*strain-specific*) dan tergantung pada waktu serta kondisi inkubasi.²¹ Berdasarkan penelitian tersebut maka dilakukan sebuah penelitian lanjutan yang menunjukkan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 memiliki kemampuan adesi pada mukus intestine manusia yang tertinggi (9,8%) bila dibandingkan dengan *strain* dadih lainnya (kisaran 1.4 % – 9.8 %). *Strain* bakteri asam laktat dadih juga dapat mengikat dan menghilangkan bakteri patogen secara *in vitro strain-specific* dan *pathogen-specific*. Kemampuan adesi dan ko-agregasi dari *strain* bakteri *indigenus* asal dadih ini salah satunya dimungkinkan karena adanya sifat toleransi terhadap asam lambung dan garam empedu.¹¹

Selain memiliki daya adesi yang kuat sebagai prasyarat terjadinya kolonisasi, *Lactobacillus plantarum* IS-10506 juga memiliki kemampuan untuk menghilangkan racun hasil metabolik bakteri pathogen (*antimicrobial activity*). Bakteri pathogen yang ditemukan sebagai kontaminan pada air minum, menghasilkan *microcystins* suatu *cyclic heptapeptide hepatotoxins* yang memiliki potensi sebagai promotor tumor (*tumor promoters*) dan karsinogen terutama pada sel-sel hati. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan IS-20506 serta *strain* komersial probiotik lainnya telah terbukti memiliki kemampuan *active metabolic elimination* terhadap Mycrocystin-LR (MC-LR) pada suhu inkubasi 37°C pH 7 dengan suplementasi glukosa. Data tersebut menunjukkan bahwa bakteri probiotik memiliki manfaat dekontaminasi biologis dan efek eliminasi *microcystins* pada saluran pencernaan manusia.^{14,22}

Kemampuan antimutagenik juga dimiliki *strain Lactobacillus plantarum* IS-10506. Surono et al membuktikan bahwa asam amino *pyrolyzate* (Trp-P1) sebagai mutagen, konsentrasinya pada sampel urin dan fekal lebih rendah pada tikus yang diberi suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan *Enterococcus faecium* IS-27526 bila dibandingkan dengan tikus kontrol dan tikus yang diberi suplementasi susu skim.²³

Lactobacillus plantarum IS-10506 juga telah terbukti mampu meningkatkan respon imunitas. Surono et al telah membuktikan bahwa *Lactobacillus plantarum* IS-10506 mampu meningkatkan respon imun alami (*innate immunity*) dengan parameter *TLR2*, *TLR4*, *NF-κB p65*, *NF-κB p105/p 60* dan menurunkan degranulasi sel mast (menurunkan level histamine dan gejala alergi) sehingga terjadi peningkatan respon imun *Th1* dan *Treg* serta juga keseimbangan *Th1-Th2*.²⁰ Selain respon imun alami, *Lactobacillus plantarum* IS-10506 juga terbukti mampu meningkatkan respon imun adaptif khususnya respon imun *humoral*. Pada penelitian dengan menggunakan tikus yang diberi suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506, *Lactobacillus plantarum* IS-20506 dan *Lactobacillus casei shirota* group didapatkan bahwa suplementasi ketiga *strain* tersebut mampu meningkatkan bakteri asam laktat asal fekal dan juga produksi *sIgA*, dan *Lactobacillus plantarum* IS-10506 menunjukkan hasil yang paling baik.²⁴

Selain penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* menggunakan hewan coba, penelitian klinis berbasis komunitas juga telah dilakukan pada orang dewasa sehat, dimana viabilitas bakteri asam laktat asal fekal subjek orang dewasa sehat yang mendapat suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 terbukti signifikan lebih tinggi dibandingkan kontrol.²⁵

II.3 Pola Perkembangan sistem imunitas anak baduta

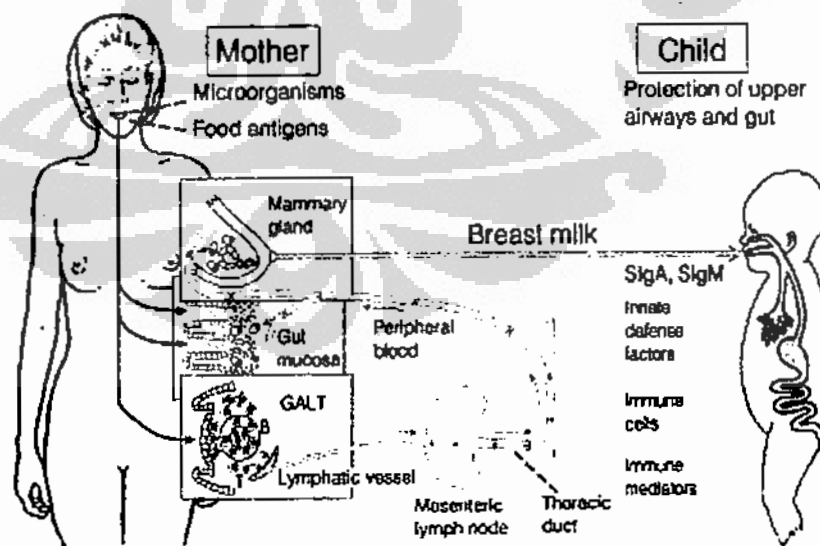
II.3.1 Pola perkembangan imunitas

Pada awal periode neonatus terjadi proses kolonisasi. Proses tersebut melibatkan interaksi antara mukosa saluran pencernaan bayi dengan stimulasi protein antigen dari lingkungan dan juga komponen susu formula dan juga ASI. Mukosa sendiri merupakan lingkungan yang sangat rentan terhadap kontaminan dari lingkungan, bahkan 200 kali lebih besar kemungkinan terpapar bila dibandingkan dengan kulit dan 90% patogen menginfeksi manusia melalui mukosa saluran pencernaan sebagai jalan masuk (*portal entry*) oleh karenanya infeksi pada mukosa merupakan faktor utama yang mempengaruhi kesehatan anak di bawah usia 5 tahun.²⁶ Mukosa *Gastrointestinal Tract* (GIT) fetus berada pada

kondisi steril sebelum bayi dilahirkan, segera setelah bayi dilahirkan dan kontak dengan dunia luar, maka terjadi proses kolonisasi pada awal kehidupannya. Terdapat konsepsi yang kontradiktif bahwa bayi yang baru saja lahir memiliki sistem imun yang naive. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa sel T dan sel B bayi yang baru lahir memiliki kemampuan berespon secara spesifik terhadap antigen. Seorang ibu yang selama kehamilannya mendapatkan vaksin tetanus toxoid, akan melahirkan bayi yang memiliki antibodi *IgM* yang spesifik terhadap tetanus toxoid. Demikian pula ibu yang terinfeksi *Ascaris sp.* bayinya akan menunjukkan reaksi yang spesifik terhadap parasit tersebut pada saat kelahiran.²⁷

Organ *lactating mammary* merupakan bagian dari sistem imun yang terintegrasi dalam tubuh dimana antibodi dari air susu ibu mencerminkan refleksi simulasi antigen yang berasal dari *Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)*. Sebuah penelitian membuktikan bahwa *sIgA* dari air susu ibu menunjukkan spesifikasi antibodi terhadap respon antigen baik dari saluran pencernaan maupun saluran pernafasan. Sekretori antibodi ditargetkan bagi antigen infeksius dari lingkungan ibu yang secara tidak langsung memiliki kesamaan dengan lingkungan anak khususnya pada masa satu tahun kehidupan pertamanya. Oleh karenanya, asupan air susu ibu mewakili integrasi imunologis yang sesungguhnya antara ibu dan anaknya.

Gambaran relasi ini dapat diilustrasikan pada gambar di bawah ini.²⁶



Gambar 2.5 Integrasi imunitas mukosal antara ibu dan anak²⁶

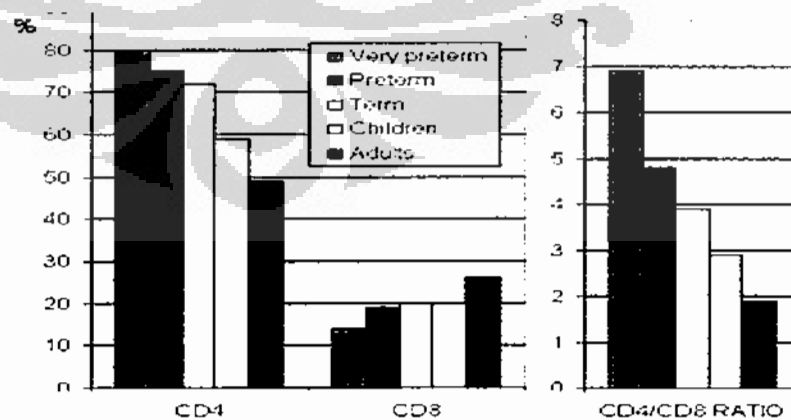
Perkembangan sistem imun atau ontogeni dari sistem imun dimulai pada tahap awal embrio berlanjut sepanjang kehidupan fetus dan akan menjadi lengkap beberapa tahun setelah kelahiran. Sebagai contoh differensiasi *lymphocyte* T terjadi pada minggu ke 7 kehamilan²⁸

II.3.2 Perkembangan produksi immunoglobulin

Sintesis awal *IgG* dan *IgM* awalnya terjadi di limpa pada masa kehamilan sekitar 10 minggu, kemudian mengalami peningkatan hingga masa kehamilan 26 minggu. Level ini meningkat dengan drastis pada saat kelahiran. Bayi yang baru lahir, mempunyai level serum *IgM*, *IgA*, *IgE* yang rendah. Proteksi awal bayi diperoleh dari ASI dimana bayi yang mendapatkan asupan ASI akan memperoleh *IgA* khususnya sebagai proteksi terhadap mikroba saluran pencernaan dan juga *IgG* dipindahkan dari ibu melalui plasenta sebagai proteksi selama satu tahun pertama kehidupan bayi. Belum matangnya sel limphosit T dan B dan juga Antigen *presenting cell* (APC) ikut berperan pada rendahnya produksi antibodi pada bayi yang baru lahir²⁷.

II.3.3 Perkembangan produksi sel T dan sitokin

Belum matangnya perkembangan sel T dan sel B berpengaruh terhadap belum maksimalnya produksi sitokin. Pada bayi yang baru lahir, persentasi lymphosit sel T CD 4 lebih tinggi bila dibandingkan dengan level pada anak dan orang dewasa. Fakta yang sebaliknya terjadi pada konsentrasi sel lymphosit sel T CD8 [(lihat gambar di bawah ini).^{28, 29, 30}



Gambar 2.6 Persentasi sel lymphosit T CD4⁺ dan CD8⁺²⁸

II.3.4 Hubungan perkembangan bakteri normal dan sistem imunitas

Pola perkembangan mikrobiota saluran pencernaan pada bayi dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya^{28,31}:

1. Proses bayi dilahirkan (*mode of delivery*)

Bayi yang dilahirkan secara normal (melalui vagina) akan terkolonisasi sejak awal oleh bakteri yang berasal dari vagina dan fekal ibunya, paling tidak 25% *Lactobacillus* diperoleh bayi dari vagina ibunya. Sedangkan bayi yang dilahirkan melalui operasi sesar umumnya akan terkolonisasi bakteri dari lingkungan rumah sakit atau tenaga medis sehingga memiliki jumlah koloni bakteri alami yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan kelahiran normal. Belum lagi terdapat kecenderungan koloni *Clostridium difficile* dan *Escherichia coli* umumnya tinggi pada bayi sesar.

2. Usia kelahiran bayi (*prematurity*) dan paparan antibiotika

Bayi yang dilahirkan tidak cukup umur memiliki kecenderungan kolonisasi oleh *Clostridium difficile*. Demikian pula bayi yang dilahirkan dengan permasalahan yang memerlukan pengobatan antibiotika. Pemberian antibiotika tersebut akan menekan semua bakteri anaerob, kecuali *Clostridia*. Koloni *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* jarang ditemukan pada bayi yang mendapat perlakuan antibiotika. Terlebih lagi, bayi yang mendapat perawatan dalam inkubator akan semakin berkurang intensitas kontak dengan mikrobiota dari ibunya sehingga berdampak pada pola perkembangan mikrobiota saluran pencernaan dan tentu saja perkembangan imunitas bayi.

3. Pola diet (*feeding*)

Bayi yang mendapat asupan air susu ibu (ASI), akan memiliki koloni *Bifidobacterium* dan bakteri asam laktat (LAB) yang lebih banyak dibanding dengan bayi yang diberikan susu formula dimana koloni *C.difficile* yang ditemukan akan lebih tinggi. Dominasi dari *Bifidobacteria* pada ASI dipengaruhi oleh komposisi ASI yang kaya akan faktor bifidogenic seperti oligosakarida. Oligosakarida adalah karbohidrat yang dapat mempromosi perkembangan *Bifidobacteria* dimana monosakaridanya resisten terhadap Enzim pencernaan.

Oligosakarida tidak diproduksi oleh susu sapi, oleh karenanya dalam susu formula, oligosakarida diantikan oleh prebiotik (*fructo-oligosaccharides (FOS)*, *inulin*, *gluco-oligosaccharides*, *galacto-oligosaccharides (GOS)*). Prebiotik yang ditambahkan pada susu bayi mampu mempengaruhi perkembangan sistem imunitas pada bayi. Di bawah ini adalah tabel komposisi Air Susu Ibu yang menggambarkan kayanya komponen sel imun yang terkandung dalam ASI.

Tabel 2.2 Komposisi Air Susu Ibu²⁸

Komponen terlarut (*soluble*)

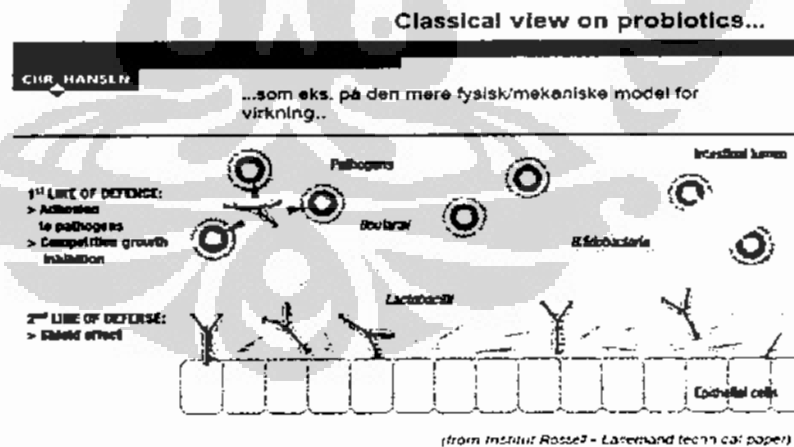
- * faktor imunitas spesifik : *slgA, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD*, komponen sekretory, antiidiotype, antigen histocompatibility
 - * Sitokin, kemokin dan reseptor : *IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, GRO- α , MCP-1, RANTES, TGF- β 1 ϵ 2, cCD14, TLR, sFas, sFasL.*
 - * Faktor imunitas alami: komplemen, faktor kemotaktik, lactoferin, lisozyme, faktor properdin, manna binding lectin, Interferon, alfafetoprotein, substansi antiadherence (*oligosakarida*, mucin, lactadherin, glycan, k-casein) faktor antivirus, lemak globul susu, faktor penghambat migrasi, sCD14, β -defensin-1, Asam lemak, monogliserin, pre dan post peptida antimikroba pencernaan
 - *Prebiotik, faktor bifidogenic, *oligosakarida*
 - *Hormon dan faktor pertumbuhan: prolaktin, kortisol, insulin, tiroksin, prostaglandin, eritropoerin, EGF, VEGF, NGF, *TGF*
 - *komponen lain : protein pembawa, Enzim, nukleotida, LCPUFA, HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cell)
- SEL AIR SUSU**
- * total jumlah: kolostrum $1-3 \times 10^6$ / ml ; susu matang : $\sim 1 \times 10^5$ /ml
 - * tipe sel :
- makrofag : $\sim 60\%$ (lisozyme, lactoferin, *IgA*, komplemen, sitokin, faktor B, fagositosis, aktivitas bakterial, APC.
- Neutrofil : $\sim 25\%$ (fagositosis, aktivitas antibakterial)
- Lymphosit : $\sim 10\%$ (80% lymphosit T teraktivasi, sitokin, *IgA*)

Tabel ini diterjemahkan dalam bahasa Indonesia

II.4 Sistem imunitas mukosal

II.4.1. Anatomi sistem imunitas mukosal

Saluran pencernaan dilindungi lapisan musin setebal 400 μ m menyelimuti dinding usus manusia agar terlindung dari kerusakan mekanis dan invasi bakteri pathogen, disamping berfungsi sebagai habitat dan nutrisi mikroflora alami pada epithelial^{12,32} Saluran pencernaan mengandung sekitar 10¹⁴ bakteri yang terdiri berbagai jenis species (lebih dari 500 species) dimana kandungan terbanyak terdapat pada usus besar. Lebih dari 1 kg bakteri ada dalam saluran pencernaan manusia. 45-65% komponen padat dari fekal manusia terdiri dari bakteri.⁴ Usus halus tersusun atas *crypt* dan villi yang berperan untuk meningkatkan permukaan absorpsi nutrisi, sedangkan pada usus besar tidak ditemukan vili dan permukaan epiteliumnya rata. Lapisan epitel terdiri dari sel enterosit, sel *paneth*, sel *goblet* yang membentuk pertahanan fisik terhadap invasi bakteri dan mensekresi protein antimikroba yang akan berikatan dengan dinding sel bakteri untuk membantu eliminasi bakteri yang menembus lapisan mukus. Permukaan mukosa intestin dipenuhi dengan komunitas mikroba. Suatu lapisan mukus terletak di atas lapisan epitel. Bakteri banyak tersebar di lapisan mukus luar sedangkan lapisan mukus bagian dalam resisten terhadap penetrasi bakteri³³ Secara garis besar struktur tersebut dapat dilihat pada gambaran di bawah ini.



Gambar 2.7 Lapisan mukus permukaan mukosa intestin³⁴

Respon imun sistem imunitas mucosal dipengaruhi oleh sel-sel lymphoid. Sel-sel lymphoid terletak pada tiga kompartemen yang berbeda yaitu *organized gut-associated lymphoid tissue* (GALT), lamina propia dan permukaan epithelium. GALT yang merupakan bagian terbesar dari *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* (MALT), tersusun atas komponen selular (*Peyer patches* (PP) dan *Mesenteric Lymph Nodes* (MLN)), sel-sel imun (sel T, sel B dan sel dendritic) serta sel yang unik seperti sel M (*microfold cell*), *paneth cell*, *Intra Epithelial Lymphocytes* (IELs). Seluruh struktur lymphoid ini diyakini sebagai lokasi induksi, sedangkan lamina propia dan struktur epithelium merupakan kompartemen efektor.^{26, 35}

Lamina propia (LP) yang terletak di bawah epithelium mengandung sel B (khususnya sel plasma yang menghasilkan *sIgA*), sel T, sel stroma dan Antigen Presenting Cell (APC) seperti makrofag dan sel dendritic. GALT dan struktur MALT lainnya dilapisi oleh *Follicle-associated epithelium* (FAE) yang ditandai dengan struktur yang khas yaitu sel *Microfold* (M cell). Sel M memiliki struktur *brush border* yang tidak beraturan, merupakan salah satu jalur transport makromolekul dan mikroorganisme dari lumen ke dalam *Peyer's Patches* (PP).^{10, 35, 36}

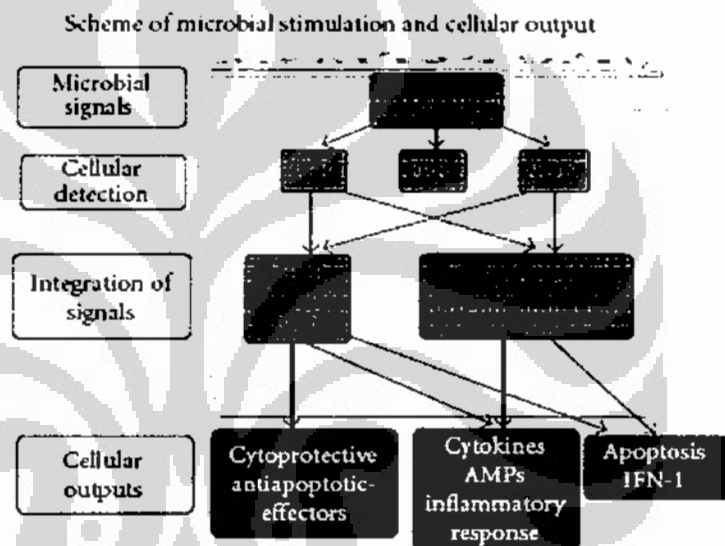


Gambar 2.8 Struktur anatomi *Microfold cells*³⁶

II.4.2 Stimulasi interaksi mikroba dan mukosa intestinal

Mukosa intestinal dilengkapi dengan trans-membrane atau reseptor intra sitoplasmic (*intra-cytoplasmic receptors*) yang dikenal dengan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang mampu mengenali, membedakan dan berikatan dengan ligan mikroba *Microbial-associated molecular patterns*

(MAMPs) seperti lipopolysakarida, flagelin, peptidoglikan dan *formylated peptides*. Mikroba alami (*commensal bacteria*) dan patogen pada permukaan mukosa dapat menginduksi sinyal MAMPs untuk menstimulasi PRRs yang meliputi *Toll-like receptors* (TLRs), *formylated peptide receptors* (FPRs) atau *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NODs) yang akan menentukan keluaran sinyal yang didasarkan pada stimulasi awal. Respon yang dapat terjadi dapat berupa respon proteksi terhadap bakteri komensal, respon inflamasi terhadap organisme patogen atau stimulasi reaksi apoptosis. Abnormalitas yang terjadi pada proses ligan PRRs dan MAMPs berkaitan dengan penyakit inflamasi pada saluran pencernaan.^{10,37}



Gambar 2.9 Skema stimulasi mikroba dan output reaksi selular³⁷

II.4.3 Respon imun non spesifik

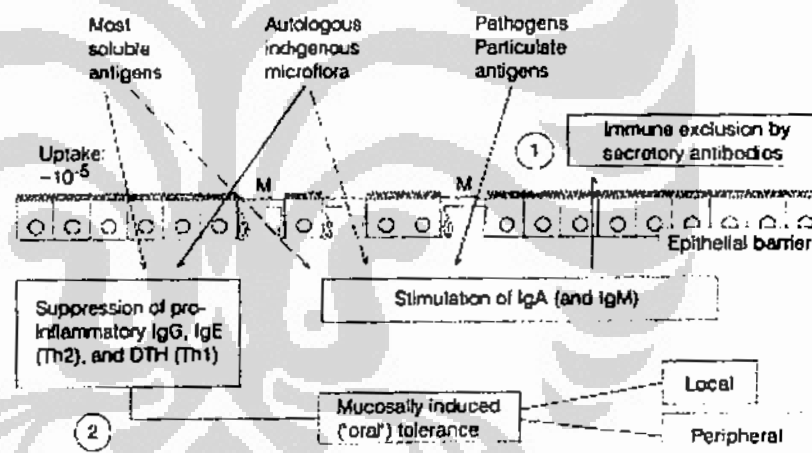
Respon imun non spesifik merupakan lini pertahanan pertama terhadap inang yang diinduksi oleh berbagai stimuli dan berlangsung dalam waktu yang sangat singkat. Sejumlah protein dapat diproduksi aktivasi makrofag oleh *Lipopolisakarida* (LPS) meliputi sitokin seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (*TNF- α*), *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*. *TLR* dan sel dendritik memicu produksi protein antimikroba dan *sIgA* yang dapat berperan memperkuat pertahanan mukus pada permukaan epitel dan juga menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri komensal. Antimikroba yang disekresi sel paneth mampu membatasi transport

bakteri patogen dan komensal masuk ke dalam *MLN*. Induksi produksi Interferon gamma (*IFN- γ*) di lymphosit dapat menghambat replikasi virus, ekspresi *MHC-I* dan *MHC-II*, stimulasi lymphosit T-helper, aktivasi makrofag dan meningkatkan *immunogenicity* vaksin. Secara garis besar implikasi induksi *Lactic Acid Bacteria* (LAB) menghasilkan peningkatan kemampuan makrofag dan leukosit, meningkatkan sekresi Enzim lisosom dan meningkatkan kemampuan pagositik sistem makrofag-monosit.^{10, 33, 38, 39, 40}

II.4.4 Respon imun spesifik

Secara garis besar respon adaptif sistem imun mukosa adalah:²⁶

- (1) Pengikatan antigen oleh *sIgA* dan *sIgM* dengan penghambatan kolonisasi mikroorganisme dan penetrasi patogen
- (2) Mekanisme supresi untuk menghindari over reaksi lokal dan peripheral substansi yang menginvasi permukaan mukosa.

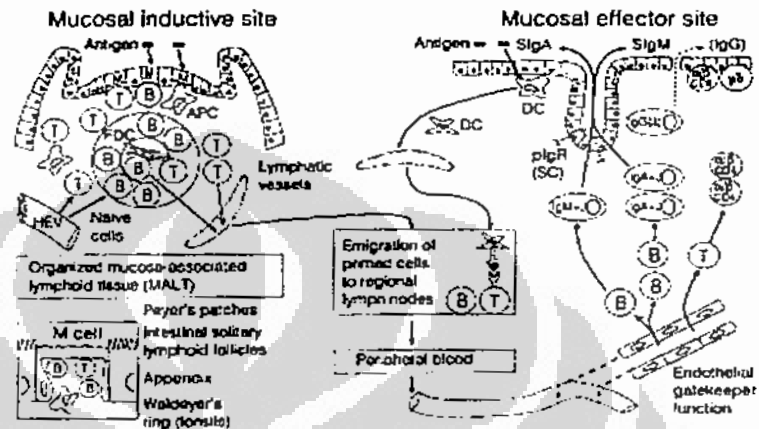


Gambar 2.10 Skema mekanisme sistem adaptif sistem mukosa²⁶

II.4.5 Respon imun humoral

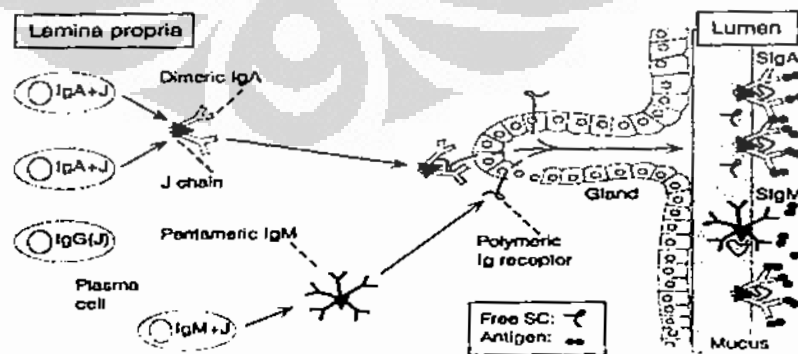
Sel T dan B naive masuk MALT (dan nodus lymphia) melalui *High Endothelial Venules* (HEV). Pada bagian induktif antigen masuk melalui sel M dan diikat profesional APC (sel B dan *follicular dendritic cells* (FDC)) setelah pengikatan tersebut, sel B dan sel T berpindah dari MALT menuju nodus lymphia regional melalui pembuluh vesel lymphatic. Pada bagian efektor sel dendritik di

mukosa juga dapat mengikat antigen, dan seperti halnya APC dari bagian induktif, keduanya mengalami pematangan menjadi APC aktif yang menstimulasi sel T untuk menghasilkan respon imun yang sesuai. Proses ekstravasasi pada lokasi efektor melibatkan molekul adesi dan kemokin yang terekspresi pada mikrovaskularisasi dan sel endotel^{26,41}.

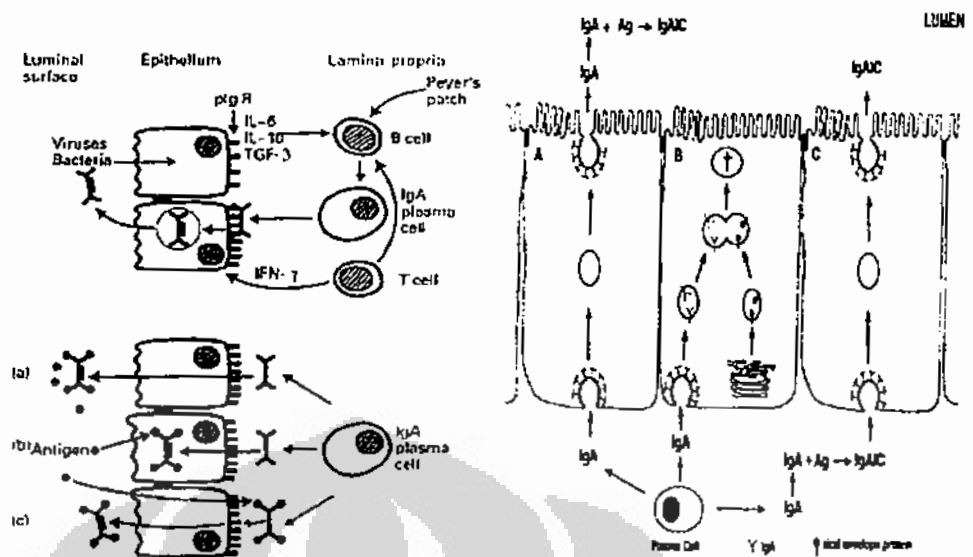


Gambar 2.11 Mekanisme respon imun spesifik²⁶

Di bawah ini adalah model transport dimeric *IgA* yang mengandung rantai J (*IgA*+J) dan pentameric *IgM* (*IgM*+J) dengan reseptor *Ig* polymeric (*plgR*) yang diekspresikan pada sel epitel sekretory. *sIgA* dan *sIgM* akan bertindak pada garis pertama dengan mengekspresikan reaksi imun pengikatan antigen pada permukaan epitel. Gambar di bawah ini menerangkan bahwa rantai J juga diekspresikan oleh sel plasma *IgG*, namun tetap bebas dalam sitoplasma dan akan terdegradasi. Komponen sekretory yang bebas akan dikeluarkan pada saat rantai J mencapai terpecah pada bagian apikal sel epitel.



Gambar 2.12 Mekanisme pengikatan rantai J dan Komponen Sekretori (SC)²⁶



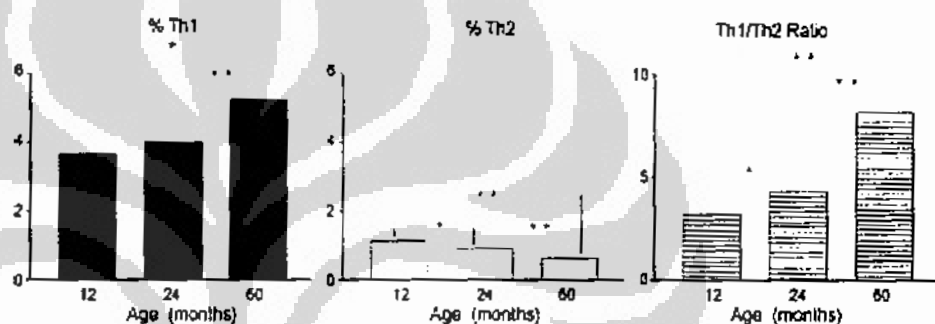
Gambar 2.13 Interaksi sel epitel dengan lymphosit pada mukosa^{42, 43}

Virus dan bakteri yang menginvasi sel epitel akan menstimulasi produksi sitokin pro dan anti inflamasi. Sel T pada lamina propia akan menghasilkan *IFN* yang akan meningkatkan regulasi ekspresi *pIgR* pada sel epitel dan memfasilitasi transport *pIgA* ke permukaan lumen. *sIgA* dapat berinteraksi dengan luminal antigen melalui^{42, 43}:

- IgA* dapat endositosis pada permukaan basolateral dengan *pIgR*, transitosis dan disekresi ke lumen dan akan berikatan dengan antigen membentuk imun kompleks (*IgAIC*) menghasilkan netralisasi intraselular.
- Pada sel yang telah terinfeksi antigen (misalnya virus), transitosis vesikle yang mengandung *IgA* akan mengalami fusi dengan virus, sehingga memungkinkan degradasi produksi virus baru.
- IgA* juga dapat membentuk imun komplek (*IgAIC*), dimana kompleks imun tersebut akan diendositosis dengan *pIgR* melewati sel epitel dan dikeluarkan di lumen.

II.4.6 Respon imun selular

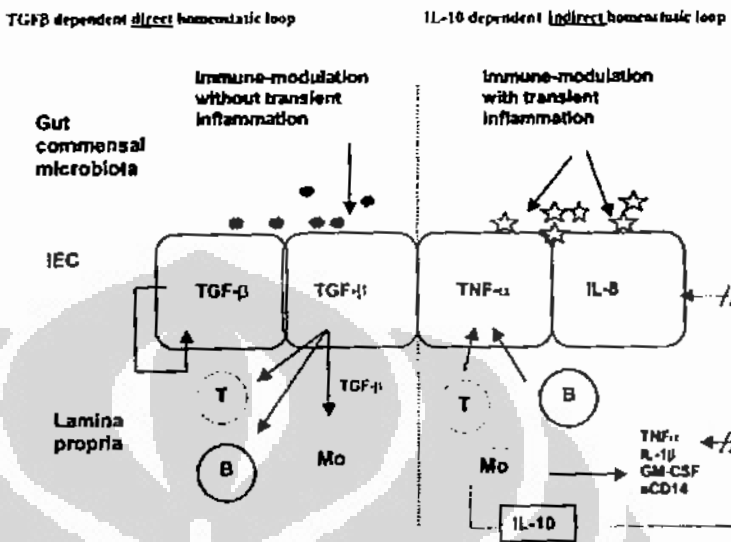
Sekitar 33% penyakit pada anak usia di bawah lima tahun disebabkan karena paparan lingkungan khususnya pada masa *prenatal* dan awal perkembangan *post* natal (WHO, 2006) di sisi lain pada awal perkembangannya respon imun anak belum berkembang dengan baik, oleh karenanya sangat rentan terhadap paparan kontaminan dari lingkungan. Salah satu parameter respon imun yang dapat diukur adalah sitokin, protein dengan berat molekul yang sangat kecil, disekresi oleh sel imun dan dapat mengatur durasi serta intensitas respon imun. Di bawah ini adalah gambaran perbandingan perkembangan *Th1* dan *Th2* sejalan dengan umur perkembangan anak.⁷



Gambar 2.14 Perkembangan *Th1* dan *Th2* pada anak⁷

Th1 subset berperan dalam mencegah penyakit dari patogen intraselular seperti virus, bakteri, jamur, kapang dan protozoa. Sekresi dari *IL-12* akan menstimulasi produksi sitokin pro-inflamasi seperti *IFN- γ* dan *TNF- α* , reaksi selanjutnya adalah aktivasi makrofag. Sedangkan *Th2* subset berperan menunjang respon imun *humoral* dengan aktivasi sel B dan promosi *switching* kelas antibodi. Ekspresi *Th2* yang berlebihan akan berdampak pada aktivasi atopi seperti alergi, eczema, asthma. Telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa suplementasi probiotik pada anak alergi, dapat menurunkan ekspresi *Th2* dan menghasilkan keseimbangan *Th1/Th2*. Selain *Th1/Th2* subset sel T lainnya adalah *Treg* atau *Th3* yang memiliki peran untuk menjaga homeostasis intestinal. Sebagai contoh *Treg* mensekresi *IL-10* yang akan menekan ekspresi *Th1* pada kasus inflamasi. Probiotik yang diberikan pada penyakit Crohn's, dapat menstimulasi sekresi *IL-10* dan *TGF- β* dan menghasilkan keseimbangan.⁴⁴

Pada stimulasi *in vitro* sel epitel, nampak bahwa sel epitel menunjukkan respon yang berbeda bila distimulasi dengan bakteri non-patogen dan bakteri patogen.



Gambar 2.15 Model regulasi homeostasis aktivasi sel epitel⁴⁵

TGF-β sebagai sitokin anti-inflamasi meregulasi produksi antibodi *IgA*. Di sisi lain induksi *TGF-β* dan *IL-10* pada usus besar mencit yang diinokulasi dengan *Lactobacillus* dapat menekan sekresi *TNF-α*, *IL-6* dan *IL-12*, fenomena tersebut juga dibuktikan dengan *Lactobacillus* GG yang mampu menghambat ekspresi *TNF-α* sebagai salah satu proinflamasi yang utama pada inflamasi kronis di intestin.^{39, 46}

TGF-β dapat menghambat ekspresi gen *NF-κB* dan produksi sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh makrofag dan sel dendritik. Komposisi induksi mikrobiota akan mempengaruhi ekspresi *TGF-β* dan *thymic lymphopietin (TSLP)*. Dimana *TSLP* yang dihasilkan oleh sinyal *TLR* akan memperkuat produksi *APRIL* dan *BAFF* yang berperan dalam *class swichting IgA*.¹⁰

Galdeano et all menemukan bahwa beberapa bakteri probiotik dapat berperan sebagai adjuvan pada mukosa dan respon imun sistemik. Stimulasi bakteri probiotik dapat menginduksi sel epitel dan sel imun yang memungkinkan ekspresi berbagai sitokin di intestin.⁴¹ Di bawah ini adalah gambaran pengaruh bakteri asam laktat terhadap ekspresi sitokin.

Tabel 2.3 Pengaruh pemberian bakteri asam laktat terhadap ekspresi sitokin pada lamina propia usus halus⁴¹

TABLE 1. Effects of administration of lactic acid bacteria on the number of IgA-secreting and cytokine-producing cells in the lamina propria of the small intestine⁴¹

Organism	Feeding period (days)	No. of cells producing:						
		Cytokines						IgA
		TNF- α	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	
<i>L. casei</i> CRL 431	2	90 \pm 8*	124 \pm 15*	24 \pm 6	13 \pm 3	86 \pm 23*	40 \pm 2*	99 \pm 21
	5	74 \pm 10*	116 \pm 18*	28 \pm 7	19 \pm 4*	38 \pm 7	27 \pm 13	100 \pm 12
	7	52 \pm 7	85 \pm 19*	20 \pm 9	27 \pm 8*	42 \pm 6	63 \pm 8*	135 \pm 17*
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> CRL 423	2	79 \pm 6*	59 \pm 22*	40 \pm 8	23 \pm 11	67 \pm 4*	85 \pm 9*	135 \pm 23*
	5	59 \pm 11	72 \pm 18*	42 \pm 8	17 \pm 4	51 \pm 9*	68 \pm 8*	92 \pm 12
	7	43 \pm 12	209 \pm 34*	42 \pm 15	17 \pm 4	146 \pm 8*	97 \pm 23*	95 \pm 18
<i>L. acidophilus</i> CRL 724	2	52 \pm 7	51 \pm 25*	27 \pm 8	20 \pm 16*	44 \pm 11	30 \pm 7	173 \pm 24*
	5	51 \pm 9	73 \pm 11*	25 \pm 7	37 \pm 11*	87 \pm 19*	55 \pm 6*	168 \pm 25*
	7	22 \pm 11	64 \pm 6*	31 \pm 13	25 \pm 8	87 \pm 18*	34 \pm 8*	135 \pm 17*
Control		24 \pm 4	17 \pm 6	31 \pm 12	11 \pm 2	27 \pm 7	18 \pm 6	88 \pm 17

Dosis optimum pemberian bakteri asam laktat agar dapat berperan sebagai adjuvant adalah 10^8 - 10^9 cfu/hari. Induksi *TNF- α* oleh bakteri probiotik diperlukan dalam perannya menginisiasi interaksi antara sel imun pada lamina propia dan sel epitel intestinal. *IFN- γ* juga memegang peranan yang penting dalam proses pematangan beberapa sel imun seperti sel dendritik dan juga sebagai kontrol proliferasi sel pada saluran pencernaan⁴¹

II.5 Insiden diare dan probiotik

Telah banyak penelitian yang menunjukkan suplementasi probiotik pada pasien diare dapat menurunkan insidens diare dan mengurangi durasi kejadian diare khususnya pada kasus anak-anak. Terapi anak diare dengan pemberian antibiotika mempengaruhi mikrobiota normal yang ada pada usus. Insiden diare pada anak kelompok usia 1 - 4 tahun merupakan penyebab kematian tertinggi (23,2%) Sebagian diare akut disebabkan karena infeksi, dampak yang dapat terjadi adalah pengeluaran toksin yang dapat mengganggu sekresi dan reabsorpsi cairan dan elektrolit dengan akibat dehidrasi, gangguan keseimbangan elektrolit dan gangguan keseimbangan asam basa.^{2, 47}

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* untuk mengkaji manfaat pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* IS 10506 pada anak usia 1 – 2 tahun pada komunitas daerah Larangan, Cileduk Tangerang. Parameter yang dijadikan tolak ukur pengukuran adalah respon imun *humoral* (fekal *sIgA*) dan respon imun selular (*TGF β-1* dan *TNF α*).

III.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada komunitas anak usia 1 – 2 tahun di sekitar Puskesmas Larangan Cileduk Tangerang Banten pada bulan Maret -Agustus 2010. Pengujian sampel dilakukan di *Institute of Human Virology and Cancer Biology* (IHVCB) FK UI serta Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor pada September-Oktober 2010.

III.3 Populasi dan sampel penelitian

III.3.1 Populasi penelitian

Populasi subjek penelitian ini adalah komunitas anak usia 1 – 2 tahun yang berada pada daerah layanan Puskesmas Pusat Larangan Cileduk Tangerang Banten. Daerah yang dijadikan lokasi penelitian adalah Kelurahan Gaga, Larangan Selatan, Larangan Utara, Cipadu dan Pesanggrahan. Subjek yang dijadikan penelitian berada dalam kondisi sehat dan tidak sedang mengonsumsi antibiotika selama 3 bulan intervensi penelitian serta tidak dilakukan vaksinasi.

Untuk menilai status kesehatan subjek penelitian, pada awal suplementasi dan akhir satu bulan periode suplementasi setiap subjek dilakukan pemeriksaan fisik oleh dokter staf Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran UI. Apabila subjek mengalami sakit, maka subjek akan diperiksa oleh dokter yang terlibat dalam penelitian, dengan demikian maka segala jenis pengobatan (terapi antibiotika) yang diterima subjek tetap berada dalam pengawasan selama masa tiga bulan suplementasi perlakuan.

Pengambilan darah *pre* dan *post* suplementasi dilakukan oleh paramedis yang berpengalaman dari laboratorium Nidea Larangan Cileduk Tangerang Banten. Guna menjaga kepatuhan subjek dalam suplementasi perlakuan, maka lima orang ibu kader puskesmas dilibatkan untuk memantau lima daerah komunitas.

III.3.2 Sampel penelitian

Jumlah atau besar sampel yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 20 anak terbagi dalam 2 jenis kelompok perlakuan. Adapun jumlah total responden yang terkumpul adalah 24 anak, 4 anak (20 %) Drop Out karena alasan perijinan orang tua atau tidak memenuhi persyaratan kesehatan (sakit dan harus mendapatkan terapi antibiotika).

III.4 Desain penelitian

Desain penelitian ini adalah *Randomized double blind placebo controlled pre-post trial*. Penelitian ini dilakukan terhadap 20 subjek anak usia 1- 2 tahun dengan dua jenis perlakuan :

1. Suplementasi mikroenkapsulasi probiotik 700 mg viabilitas 10^{10} cfu/ml dan 22 mg maltodextrin
2. Suplementasi mikroenkapsulasi placebo probiotik 700 mg dan 22 mg maltodextrin

III.5 Tahap persiapan perlakuan

III.5.1 Mikroenkapsulasi probiotik

Kultur probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 viabilitas 10^{11} cfu/ml yang telah di kultivasi pada Laboratorium Fakultas Bioteknologi Pangan Universitas Atmajaya Jakarta, dibekukan dengan nitrogen cair untuk selanjutnya dibawa ke Laboratorium Kimia Farma Bandung guna proses mikroenkapsulasi. Metode ini dilakukan sesuai *Standard Operasional Prosedure* (SOP) Kimia Farma Bandung.

Tahap penyalutan

Sebelum dilakukan pembuatan pelet, telah dilakukan uji interaksi tiap komponen (2 variabel misalnya antara susu krim dan avicel) selama satu minggu pada suhu 60°C, bila terjadi perubahan warna dan bau maka kombinasi tersebut tidak dapat dipergunakan. Untuk melakukan penyalutan, dipersiapkan 300 gram Avicel ph 10,1, 300 gram New Zealand Skim Milk Powder, 2,86 gram Na Alginat, 3,3 gram CaCO₂ dan 50 ml Aquadest. Kultur bakteri *Lactobacillus plantarum* IS 10506 dilarutkan dengan susu UHT dalam beker glass 250 ml dan diaduk hingga homogen. Campurkan avicel, susu krim serta kultur dalam super mixer Yenchen, diputar selama 2 menit dengan kecepatan *main impeller 300 rpm chopper 1500 rpm*. Setelah tercampur rata, hasil campuran dikeluarkan ke dalam wadah stainless stell yang tertutup agar terjaga kelembabannya, namun bila terasa kurang homogen ditambahkan susu UHT.

Tahap pengayakan

Hasil campuran dimasukkan dalam *extruder frewitt* dengan nomor ayakan 20. Hasil ayakan ditampung dalam wadah stainless stell untuk selanjutnya dilakukan tahap *pilling*.

Tahap pilling

Campuran dimasukkan ke dalam alat *sferonizer* untuk membentuk pelet yang halus. Campuran diputar selama 5 detik dengan kecepatan 1300 rpm. Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam mesin pengering.

Tahap pengeringan

Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam *Bed Dryer Yenchen* pada suhu 29°C 2-3 atm selama 50 menit. Setelah 50 menit, kadar LOD (*Loss On Drying*) sampel diperiksa dengan *Halogen Moisture Analyzer* selama 6 menit dengan berat optimal 1 gram sampel. Bila kadar LOD masih di atas 6,9 maka campuran harus dikeringkan kembali.

Tahap penyalutan

Bila nilai LOD campuran telah mendekati angka 6 maka campuran mulai disalut dengan Na Alginat dan CaCO₂ yang telah disterilisasi. Apabila larutan penyalut Na Alginat dan CaCO₂ telah habis, tabung selang dikeluarkan dan dicuci dengan air untuk mencegah interaksi antara Na Alginat dan CaCO₂ yang dapat

membentuk kristal. Kadar LOD diperiksa kembali untuk memastikan kecembaban campuran yang terbentuk masih berada di bawah angka 6,9. Serbuk yang dikeringkan disaring dan siap untuk digunakan.

III.5.2 Penimbangan kapsul mikroenkapsulasi

Mikroenkapsulasi diuji viabilitasnya dengan menggunakan MRS agar atau MRS broth dan didapati nilai sekitar 10^{10} cfu/ml. Selain itu dilakukan pengujian bakteri patogen (*E.coli*) yang terbukti negatif (pelet tidak mengandung bakteri patogen). Pelet mikroenkapsulasi kemudian ditimbang sesuai dua jenis perlakuan. Proses penimbangan ini dilakukan di Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN) Departemen Kesehatan Jakarta dengan diawali proses perijinan yang menyertakan *form Biosafety*. Penimbangan dilakukan dalam *Laminar Air Flow Chamber* (LAFC) dengan menggunakan timbangan analitik. Serbuk dimasukkan dalam kapsul ukuran 00 kemudian dikemas dalam plastik sebanyak tujuh kapsul untuk konsumsi satu subjek setiap satu minggu. Kapsul yang telah disiapkan kemudian didistribusikan pada setiap subjek di bawah tanggungjawab ibu kader yang telah ditentukan. Proses pemantauan sekaligus penyampaian kapsul suplementasi dilaksanakan satu kunjungan setiap satu minggu. Pemantauan kepatuhan suplementasi dilakukan melalui kunjungan langsung atau alat komunikasi lainnya.

III.6 Tahap pelaksanaan

III.6.1 Rekrutmen subjek penelitian

Setelah memperoleh perijinan dari Puskesmas Pusat Larangan Cileduk Tangerang Banten, maka dengan dibantu tenaga ibu kader yang berada di daerah dengan kecenderungan diare yang cukup tinggi (khususnya Gaga dan Larangan), peneliti melakukan pengarahan dan rekrutmen subjek penelitian yang memenuhi kriteria penelitian.

Kriteria inklusi :

- Anak usia 1 – 2 tahun (baduta) sehat di komunitas
- Baduta tidak menggunakan atau mendapatkan produk yang mengandung susu fermentasi (*yoghurt*) atau suplementasi probiotik secara rutin seminggu sebelum mulai dan selama suplementasi
- Bersedia mengikuti penelitian hingga selesai selama 90 hari dan menandatangani formulir persetujuan

Kriteria ekskusi :

- Baduta menderita penyakit akut maupun kronik
- Baduta sedang dalam terapi antibiotika

Orang tua subjek penelitian yang telah mempelajari dan menandatangani *informed consent* yang disampaikan peneliti, diperiksa kesehatan fisiknya oleh dokter dan diambil sampel darahnya oleh paramedis laboratorium Nidea. Subjek membawa pulang satu pot fekal steril yang telah diberi nama dan catatan asupan makan selama tujuh hari untuk menilai status gizi subjek. Penelitian ini telah melalui proses *Ethical clearance* oleh komisi etik FK UI.

Subjek penelitian akan diberlakukan *Drop Out* apabila :

- * Subjek tidak kooperatif selama periode penelitian
- * Subjek tidak mengikuti perlakuan yang diberikan selama 90 hari berturut-turut
- * Subjek mengalami sakit sehingga harus mengonsumsi antibiotika
- * Subjek mengonsumsi antibiotika atau makanan fermentasi seperti tape, tauco dan asinan dalam periode 90 hari suplementasi.

Pengambilan sampel darah dilakukan oleh tenaga paramedis dari Laboratorium Nidea, Larangan Cileduk Tangerang Banten.

Prosedur Standard Operasional (SOP) pengambilan sampel darah adalah sebagai berikut :

Prosedur pengambilan sampel plasma

- 3 ml darah dimasukkan dalam tabung EDTA
- Diamkan selama 30 menit
- Sentrifuge 1000 g selama 15 menit

- Ambil plasma, *aliquot* dan simpan dalam *cryotube*. Sampel disimpan sementara dalam -20°C dalam freezer di lokasi penelitian, dipindahkan dengan menggunakan *dry ice* ke freezer -80°C di IHVCB.

Untuk pengujian $\text{TGF } \beta\text{-1}$ diperlukan penambahan sentrifugasi 10.000 g selama 10 menit pada suhu $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ untuk menghasilkan pembuangan *platelet* yang baik.

Proses pengambilan sampel fekal

- * Fekal subjek ditampung dengan menggunakan sendok pada pot fekal yang telah disediakan
- * Fekal yang diambil adalah fekal yang belum terkontaminasi
- * Sampel fekal dimasukkan dalam pot, kemudian diserahkan pada laboratorium untuk disimpan dalam kulkas dengan suhu sekitar $4^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$ dan selanjutnya secara kolektif dipindahkan dengan menggunakan *dry ice* ke freezer -80°C di IHVCB
- * Proses pengambilan sampel hingga tahap penyimpanan dalam kulkas tidak lebih dari kurun waktu 1 jam.

III.6.3 Pemeriksaan fisik berkala

Untuk memantau dan memastikan status kesehatan subjek, maka pada tahap awal suplementasi (sebelum pengambilan sampel darah dan fekal) dilakukan pemeriksaan fisik oleh tenaga dokter dan wawancara subjek yang meliputi :

- Data pribadi subjek
- Data pribadi dan status sosiodemografi orangtua subjek
- Berat dan tinggi badan subjek
- Tinggi badan subjek
- Kejadian diare
- Riwayat vaksinasi (*medical history*)
- Pola pemberian ASI dan susu formula
- Golongan darah
- *Food recall* dan *food record*
- Pemeriksaan gigi mulut, torak dan abdomen.

Selain itu, pada setiap akhir satu bulan periode suplementasi, subjek penelitian juga dipantau kesehatan fisiknya oleh tenaga dokter dengan rincian parameter :

- Berat dan tinggi badan subjek
- Kejadian diare
- Kepatuhan pemberian suplementasi
- Riwayat kesehatan subjek
- Pemeriksaan gigi mulut, torak dan abdomen

Sebagai wujud apresiasi peneliti, maka setiap subjek akan mendapatkan uang transport dan souvenir setiap kali kedatangan pada pemeriksaan fisik dan pengambilan sampel.

III.6.4 Pengendalian dan pemantauan kepatuhan pelaksanaan suplementasi

Guna menjamin kepatuhan orangtua subjek dalam melaksanakan suplementasi maka diperlukan suatu mekanisme pengendalian dan pemantauan oleh tenaga peneliti dan tenaga ibu kader. 20 Subjek penelitian dikelompokkan berdasarkan daerahnya. Penelitian ini didukung oleh 5 tenaga ibu kader bertanggungjawab membantu memantau dan mendistribusikan sekitar 4-5 anak/ibu kader. Kapsul suplementasi diberikan oleh ibu kader atau peneliti setiap satu minggu sekali dengan menyertakan catatan penerimaan dan pemberian kapsul. Frekwensi kepatuhan suplementasi dicatat setiap sebulan sekali pada saat dilakukan pemeriksaan fisik.

III.7. Tahap pasca perlakuan

III.7.1 Pengambilan sampel darah dan fekal

Prosedur standard operasional pengambilan sampel darah dan fekal subjek pada akhir perlakuan sama dengan prosedur pengambilan darah dan fekal sebelum perlakuan. Sampel yang telah diambil, dipindahkan ke *Institute of Human Virology and Cancer Biology (IHVCB) FK UI*.

III.7.2 Ekstraksi sampel fekal

Metode ekstraksi ini mengacu pada Ferguson et al.⁴⁸ Sekitar satu gram fekal basah diambil, ditimbang dan dimasukkan ke tabung 50 ml setelah itu dicatat beratnya. Buffer ekstraksi (*phosphate-buffered saline* [PBS] [pH 7,4], 0,5% tween [Sigma-Aldrich] dan 0,05% sodium azide) ditambahkan sebanyak 10

ml pada setiap tabung yang telah berisi fekal. Sampel dihomogenkan dengan vortex, suspensi yang terbentuk disentrifugasi 1,500 g selama 20 menit pada 5°C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung steril Eppendorf yang berisi 20 µl *protease inhibitor* yang telah dilarutkan dalam *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), homogenkan dengan vortex. Sampel disentrifugasi pada microsentrifugasi 10,000 g selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan pada tabung Eppendorf kemudian disimpan pada -20°C. Guna mencegah rusaknya antibodi dalam fekal, maka semua pengerjaan ekstraksi fekal ini dilakukan di atas es.

III.7.3 Metode pengujian *sIgA*

Sebanyak 96 sumur *mikroplat Maxisorp* dilapisi dengan 100 µl *anti-human IgA* (1:4000) yang diencerkan dengan *buffer karbonat* dan diinkubasikan selama semalam pada suhu 4°C. Kemudian dicuci tiga kali dengan larutan pencuci *PBS-Tween 20 0,05%* sebanyak 200 µl dan dua kali dengan larutan akubidest atau *PBS 1X* sebanyak 200 µl. Setelah itu ke dalam setiap sumur ditambahkan 100 µl larutan *blocking* (*PBS-skim 5%*), inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C lalu dicuci sesuai prosedur pencucian di atas. Sampel dan standard *human-IgA* ditambahkan ke dalam plat sebanyak 100 µl (*duplo*) inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan dicuci. Kisaran konsentrasi *human IgA* yang digunakan adalah 0,0003125 – 0,01 µg/µl. Kemudian ditambahkan 100 µl *anti-human IgA peroxidase conjugate* (1:4000) yang telah diencerkan dengan *PBS*, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan dicuci. Setelah pencucian, ke dalam setiap sumur ditambahkan 100 µl larutan substrat *tetramethylbenzidine* (TMB), inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C sehingga terbentuk warna biru. Kerapatan optik diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 dan 615 nm (*dual*). Kurva standard *IgA* dibuat dari nilai rata-rata OD standard *IgA* sehingga didapat nilai konsentrasi *IgA*. Nilai tersebut dikonversi dengan dilusi berat sampel (10 kali) dan faktor pengenceran standard 100 kali (total 1000 kali).

III.7.4 Metode pengujian Elisa *TGF* β -1

Metode pengujian plasma *TGF*- β 1 mengacu manual kit Elisa RnD SystemTM

Persiapan larutan Aktivasi sampel

Untuk mengaktifkan latent *TGF* β 1 dalam bentuk *immunoreactive*, siapkan larutan untuk aktivasi asam dan netralisasi. Larutan sebaiknya disimpan pada tube *polypropylene* suhu ruang dan dapat disimpan selama satu bulan.

Persiapan reagen aktivasi

1 N HCL (100 ml)

Persiapkan 91.67 ml DW lalu tambahkan perlahan 8.33 ml 12 N HCL, homogenkan dengan vortex.

1,2 N NaOH/0,5 M HEPES (100 ml)

Persiapkan 75 ml *deionized water*, tambahkan perlahan 12 ml 10 N NaOH Campurkan. Tambahkan 11.9 g HEPES, campurkan. Hasil akhir larutan 100 ml dengan penambahan *deionized water* (DW).

Persiapan reagen pengujian

Buffer Pencuci

Bila telah mengkristal maka hangatkan pada suhu ruang campurkan secara baik hingga seluruh kristal terlarut dengan baik. Encerkan 25 ml Wash buffer dengan Deionized Water 600 ml hingga mencapai volume 625 ml

Larutan substrat (dipersiapkan dua jam sebelum digunakan)

Reagen substrat A dan B sebaiknya dicampurkan bersama dalam jumlah yang sama selama 15 menit sebelum digunakan. Hindarkan dari paparan sinar matahari dengan membungkus aluminium foil.

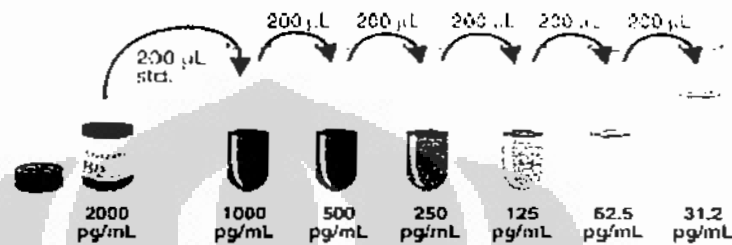
Larutan kalaibrator RD 5-35 (1X)

Encerkan 20 ml larutan kalibrasi RD 5-53 konsentrate pada 60 ml DW untuk mempersiapkan 80 ml larutan kalibrasi RD5-53 (1X).

Standard *TGF*- β 1

Campurkan standard *TGF* β -1 dengan 2 ml pelarut kalibrasi RD5-53. Hasil akhir rekontruksi ini menghasilkan larutan stock 2000 pg/ml. Campurkan standard untuk memastikan rekonstruksi yang baik dan biarkan standard selama minimum 5 menit untuk menghasilkan larutan yang baik.

Pipet 200 μ l larutan kalibrasi RD5-53 pada setiap tube. Gunakan larutan stock untuk menghasilkan seri 2-fold larutan standard seperti gambar di bawah ini. Campurkan setiap tube sebelum dipindahkan pada tube selanjutnya. Standard yang tidak diencerkan akan memiliki konsentrasi tertinggi (2000 pg/ml). Larutan kalibrasi RD5-53 akan memiliki konsentrasi terendah (0 pg/ml). Buanglah larutan rekonstruksi yang tidak terpakai.



Prosedur aktivasi sampel *TGF* β -1

Untuk mengaktifkan bentuk latent *TGF* β -1 pada bentuk *immunoreactive* yang dapat terdeteksi dengan menggunakan kit immunoassay (RnD), maka perlu dilakukan prosedur aktivasi sebagai berikut :

Pada 40 μ l plasma ditambahkan 20 μ l 1 N HCl, homogenkan lalu inkubasi selama 10 menit (dikerjakan di atas es). Netralisasi sampel yang bersifat asam dengan penambahan 20 μ l 1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES, homogenkan. Tambahkan larutan kalibrator RD5-53 (1X) hingga mencapai akhir akhir 80 μ l aktivasi sampel. Pengenceran sampel yang dilakukan adalah 2 kali (2 fold) dimana 80 μ l sampel aktivasi diencerkan dengan 80 μ l larutan RD 5-53 (1X) dengan nilai factor dilusi adalah 4. Simpan sampel yang telah diaktivasi pada suhu 2-8°C 24 jam sebelum digunakan.

Prosedur pengujian

Siapkan semua reagen, pengenceran standard, sampel yang telah diaktifkan, dan juga *microplate* sesuai prosedur persiapan reagen. Tambahkan 50 μ l Larutan pengujian RD1-73 pada setiap sumur. Kemudian tambahkan 50 μ l standard, kontrol dan sampel pada setiap sumur, kemudian tutuplah *microplate* dengan plastik penutup, inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi selama 2 jam, cucilah setiap sumur dengan buffer pencuci 400 μ l per sumur,

sebanyak 4 kali pencucian. Tambahkan 100 μ l *TGF- β 1 conjugate* pada setiap sumur, tutup dengan plastik penutup dan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi, lakukan pencucian setiap sumur dengan 400 μ l buffer pencuci sebanyak 4 kali pencucian. Tambahkan 100 μ l larutan substrat pada setiap sumur, inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, hindari dari pancaran cahaya. Tahap akhir adalah tambahkan 100 μ l larutan penghenti pada setiap sumur. Tentukan nilai *Optical Density* setiap sumur dengan menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 450 nm.

III.7.5 Metode pengujian Elisa *TNF- α*

Metode pengujian sampel plasma *TNF- α* dilakukan berdasarkan manual kit RnD system⁵⁰

Prosedur persiapan reagen

Buffer Pencuei

Bila telah mengkristal maka hangatkan pada suhu ruang campurkan secara baik hingga seluruh kristal terlarut dengan baik. Encerkan 20 ml *Wash buffer* dengan *Deionized Water* 480 ml hingga mencapai volume 500 ml

Larutan substrat

Reagen substrat A dan B sebaiknya dicampurkan bersama dalam jumlah yang sama selama 15 menit sebelum digunakan. Hindarkan dari paparan sinar matahari dengan membungkus aluminium foil.

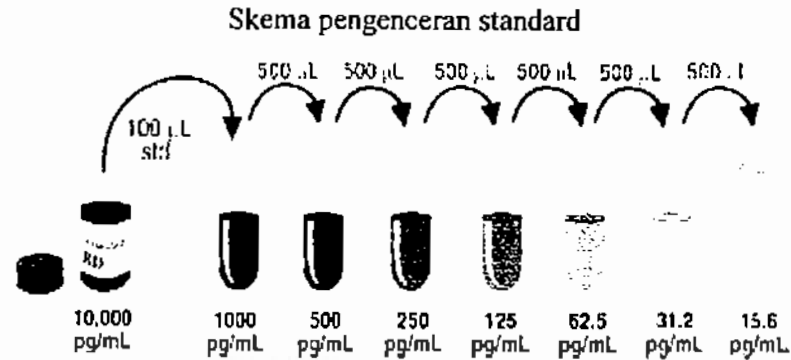
Larutan kalibrator RD 6-35

Untuk sampel plasma RD6-35 tidak perlu diencerkan.

Standard *TNF α*

Rekonstruksi *TNF α* dengan *Deionized Water*. Hasil rekonstruksi ini akan menghasilkan larutan stock 10000 pg/ml (lihat label pada vial). Biarkan standard ini selama 15 menit untuk menghasilkan larutan yang baik.

Pipet 900 μ l *Calibrator Diluet RD6-35* masukkan pada tube 1000 pg/ml, pipet 500 pg/ml dari tube tersebut, masukkan pada tube selanjutnya. Sehingga dihasilkan seri larutan standard seperti gambar di bawah ini. Larutan stock akan menghasilkan konsentrasi tertinggi (1000 pg/ml) sedangkan larutan kalibrasi akan menghasilkan standard terendah (0 pg/ml).



Larutan penguji RD1F

Dalam setiap sumur diperlukan 50 µl, bila ditemukan presipitate, campurkan dengan baik sebelum digunakan.

Larutan penghenti

Dalam setiap sumur diperlukan 50 µl,

Konjugate *TNF α*

Dalam setiap sumur diperlukan 200 µl

Prosedur Pengujian

Tambahkan 50 µl *Assay diluent* RD1F pada setiap sumur kemudian 200 µl *Standard*, sampel, kontrol ditambahkan pada setiap sumur. Tutup dengan *adesive strip*. Inkubasi plate selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah inkubasi 2 jam cucilah setiap sumur dengan mengisi setiap sumur sebanyak 400 µl sebanyak 4 kali. Setelah tahap pencucian, tambahkan 200 µl *TNF α conjugate* pada setiap sumur, tutup dengan *adesive strip*. Untuk sampel plasma inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Ulangi proses pencucian pada sebelumnya. Kemudian tambahkan 200 µl larutan substrat pada setiap sumur. Inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Setelah itu tambahkan 50 µl larutan penghenti. Warna larutan pada sumur akan berubah dari biru menjadi kuning, bila larutan berwarna hijau atau bila campuran warna nampak tidak merata, goyangkan untuk menghasilkan larutan yang baik. Tentukan titer larutan pada bacaan nilai OD 450 nm selama 30 menit.

III. 7.6 Pembuatan Kurva Standard

Kurva standard dibuat berdasarkan nilai OD standard yang digunakan (biasanya 3-5 standard). Nilai OD standard duplo tersebut dikonversi dengan menggunakan program Excel untuk mendapatkan kurva berikut nilai Regresi (R) dimana nilai regresi yang baik adalah nilai yang mendekati angka 1. Kurva ini kemudian digunakan untuk mengkonversi dan mendapatkan nilai titer berdasarkan OD duplo setiap sampel.

III.8 Uji Statistik

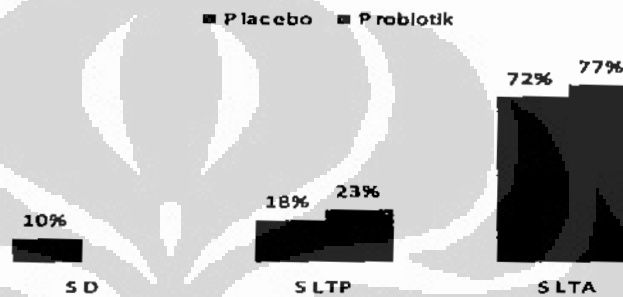
Pengujian data dilakukan dengan analisa non parametrik, analisa korelasi dengan alat uji statistic SPSS 16. Hasil uji normalitas menunjukkan sebaran data tidak bersifat normal, sehingga uji diarahkan pada uji non parametrik. Uji *Chi Square* data kategorikal melihat perbedaan konsentrasi, sedangkan uji korelasi *Spearman rho* untuk melihat korelasi yang ada. Nilai α yang digunakan adalah 0,05.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

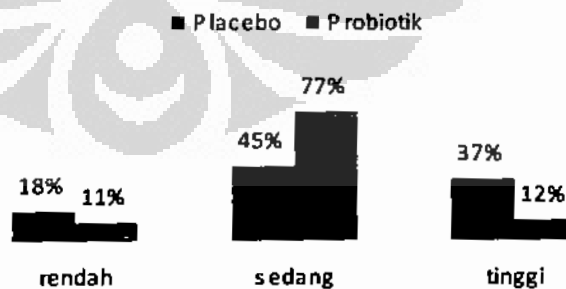
IV.1 Latar belakang pendidikan dan status ekonomi

Latar belakang orangtua dapat mempengaruhi pola asuh dan status gizi anak. Mayoritas tingkat pendidikan ibu adalah SLTA 72% dan 77% (lihat lampiran data responden)



Gambar 4.1 Tingkat pendidikan Ibu responden

Namun latar belakang pendidikan yang baik, juga harus ditunjang dengan status ekonomi yang memungkinkan daya beli orangtua responden untuk hidup dengan gaya hidup yang baik dan sehat. Umumnya orangtua memiliki status ekonomi sedang 45% dan 77% (lihat lampiran data responden) dengan ukuran pendapatan setiap bulannya Rp 625.000 s/d Rp 1.500.000)

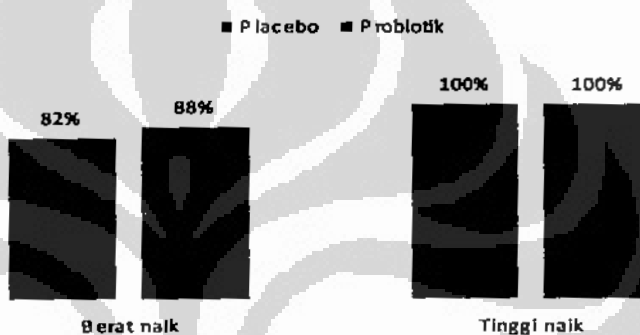


Gambar 4.2 Tingkat pendapatan orangtua

IV.2 Pola perkembangan kesehatan

IV.2.1 Pola perkembangan berat dan tinggi badan

Secara umum dapat dilihat bahwa berat badan dan tinggi badan responden baik di kelompok placebo maupun probiotik mengalami kenaikan (82% dan 88%). Kisaran persentase kenaikan berat badan pada kelompok probiotik (5-13%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan placebo dengan kisaran 3-10%. Sedangkan kisaran penambahan tinggi badan kelompok probiotik juga lebih tinggi (1,7-6,8%) bila dibandingkan kelompok placebo dengan kisaran 1,7-6,4%



Gambar 4.3 Persentase kenaikan berat dan tinggi badan

IV.2.2 Insiden kecenderungan diare

Responden kelompok probiotik cenderung memiliki insiden diare yang lebih kecil (33.3%) dibandingkan kelompok placebo (66.6%) namun uji korelasi Spearman tidak menunjukkan adanya korelasi antara diare dan perlakuan.



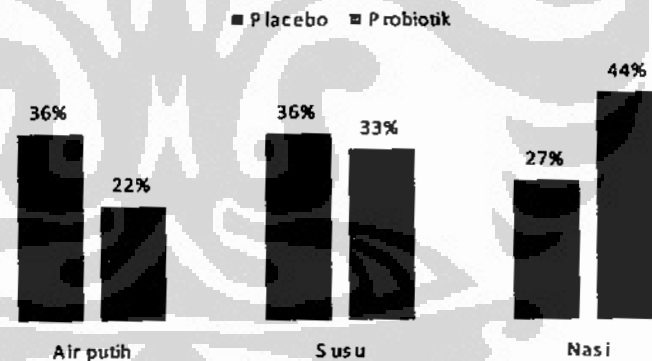
Gambar 4.4 Insiden diare selama tiga bulan

Fenomena pengaruh asupan ASI juga dapat diasumsikan dari kecenderungan 5 anak yang tidak mendapatkan ASI di Placebo, 3 diantaranya mengalami diare yaitu 60% , angka ini lebih besar dibandingkan kelompok Probiotik 17%, dimana 6 anak yang tidak ASI , 1 diantaranya mengalami diare pada bulan ke tiga dikarenakan penurunan kondisi fisik.

IV. 3. Respon imun baduta terhadap suplementasi mikroenkapsulasi

IV.3.1 Suplementasi mikroenkapsulasi

Berdasarkan hasil pemantauan yang direkapitulasi berdasarkan data pemeriksaan fisik didapatkan rerata kepatuhan suplementasi kelompok placebo sekitar 99 % sedangkan kelompok probiotik sekitar 97 % (lihat lampiran hubungan ASI-Kejadian diare-Kepatuhan suplementasi). Nilai viabilitas bakteri dari proses fermentasi (10^{11} cfu/ml) hingga mengalami penurunan namun masih dalam batas optimum (10^{10} cfu/ml). Asupan suplementasi dipadukan dengan cara berbeda, air putih, susu dan makanan disesuaikan pola makan responden.

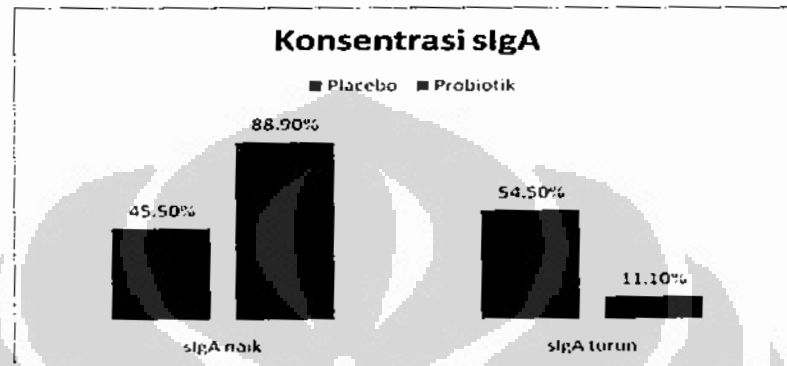


Gambar 4.5 Variasi pemberian suplementasi

IV.3.2 Respon imun humoral

Respon imun *humoral* yang ditandai dengan titer *sIgA* dari sampel fekal yang diuji dengan analisa chi square menunjukkan adanya pengaruh suplementasi probiotik walaupun tidak bermakna signifikan secara statistik dikarenakan jumlah sampel yang kecil. Demikian rerata kadar *sIgA* kelompok probiotik lebih tinggi

dibandingkan kelompok placebo. Dua responden dikeluarkan dari kelompok probiotik karena tidak memenuhi nilai kepatuhan suplementasi ditandai dengan adanya penurunan nilai titer *sIgA* (data tidak ditampilkan). Data tersebut merupakan gambaran, pentingnya nilai kepatuhan agar kolonisasi probiotik dapat berjalan optimal dalam upaya stimulasi respon imun.



Gambar 4.6 Persentase subjek yang mengalami kenaikan *sIgA*

Terdapatnya perbedaan persentase perubahan kenaikan nilai titer *sIgA* pada kelompok placebo 45,4 % sedangkan pada kelompok probiotik 88,9 %. Namun uji Chi Square dan Fisher's exact menunjukkan bahwa data ini tidak bernilai signifikan.

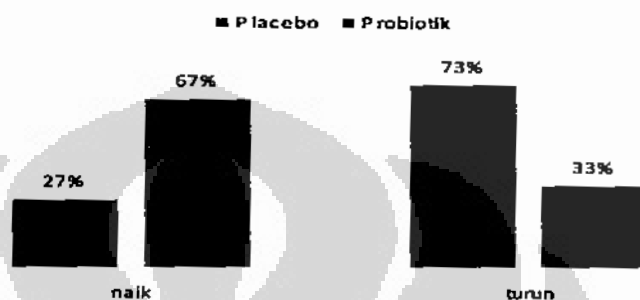
IV.3.2.1 Pengaruh ASI

Responden kelompok placebo secara umum lebih banyak yang masih mendapatkan asupan ASI (55%) bila dibandingkan kelompok probiotik (44%). Tidak semua asumsi korelasi yang ada dapat dibuktikan, tidak ada perbedaan bermakna persentase subjek yang mengalami kenaikan *sIgA* kelompok yang diberikan ASI (46,2%) dibandingkan kelompok yang tidak diberikan ASI (53,8).

IV.3.3 Respon imun selular

IV.3.3.1 Respon imun $TGF-\beta 1$

Persentase nilai kenaikan $TGF-\beta 1$ setelah analisa chi square pada kelompok probiotik menunjukkan tendensi yang lebih baik (66.7%) dibandingkan dengan kelompok placebo (27.3%).

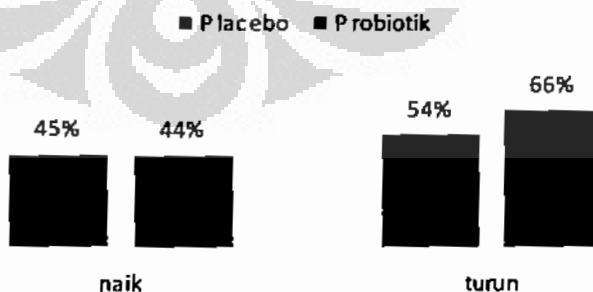


Gambar 4.7 Persentase subjek yang mengalami kenaikan $TGF-\beta 1$

Tidak selalu terjadi korelasi positif antara kenaikan IgA pada kelompok placebo maupun pada kelompok probiotik. Pada kelompok placebo Terdapat korelasi IgA dan $TGF-\beta 1$ rho -0.036 , Kelompok probiotik rho : 0.117

IV.3.3.2 Respon imun $TNF-\alpha$

Persentase nilai kenaikan $TNF-\alpha$ setelah analisa chi square pada kelompok probiotik menunjukkan tendensi perubahan penurunan yang hampir berimbang, probiotik (55.6%) dibandingkan dengan kelompok placebo (54.5%).

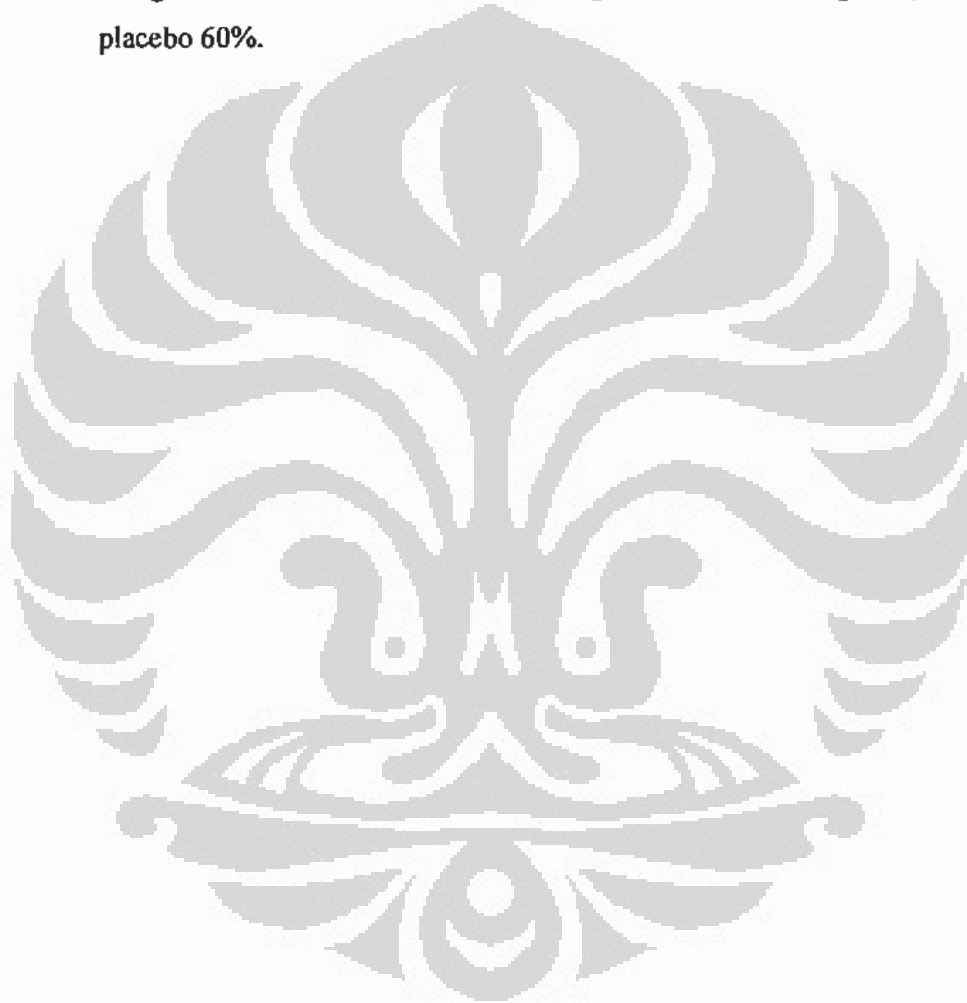


Gambar 4.8 Persentase subjek yang mengalami penurunan $TNF-\alpha$

Berdasarkan hasil uji korelasi Spearman $TGF-\beta 1$ dan $TNF-\alpha$ nampak bahwa kelompok placebo ρ : 0,164 dan kelompok probiotik ρ : 0,483. Sedangkan uji korelasi $sIgA$ dan $TNF-\alpha$ kelompok placebo ρ -0,164 kelompok probiotik -0,333

IV.4 Insidens Diare dan korelasinya dengan parameter respon imun

Berdasarkan hasil uji Chi square nampak perbedaan respon imun bila dikaitkan dengan insidens diare. Pada kelompok probiotik, 75% pasien yang mengalami kenaikan $TNF-\alpha$ akan mengalami diare, sedangkan pada kelompok placebo 60%.



BAB V

PEMBAHASAN

V.1 Latar belakang pendidikan dan status ekonomi

Tingkatan pendidikan yang cukup baik sebagai latar belakang guna memberikan pola asuh yang baik pada anak. Dengan latar belakang pendidikan yang baik, maka orangtua diharapkan dapat mengatur pola makan yang baik dan juga memudahkan komunikasi intelektual agar tercapai tujuan penelitian bagi kepentingan responden dan peneliti. Status ekonomi yang cukup baik, secara tidak langsung membawa pengaruh pada asupan makanan yang akan menunjang kecukupan nilai gizi, Dimana asupan gizi yang baik juga akan menunjang terbentuknya respon imun yang baik pada anak baduta.

V.2 Pola perkembangan kesehatan

V.2.1 Pola perkembangan berat dan tinggi badan

Pola perkembangan kesehatan responden dipantau oleh seorang dokter setiap akhir masa suplementasi satu bulan. Data mencakup pola kepatuhan asupan suplementasi, perkembangan berat dan tinggi badan, insiden diare dan penyakit lainnya dan pemeriksaan fisik kesehatan anak secara umum (gigi mulut, toraks, abdomen) (lihat lampiran data pemeriksaan jasmani). Pola perkembangan yang relatif sama antara kelompok probiotik dan placebo dikarenakan komposisi suplementasi placebo merupakan kombinasi susu krim yang secara tidak langsung juga merupakan asupan bergizi bagi responden. Asupan probiotik dan placebo keduanya berpotensi meningkatkan berat dan tinggi badan. Untuk dapat menilai apakah suplementasi probiotik berdampak pada perbaikan status gizi, perlu dilakukan analisa status gizi responden berdasarkan data *food record* responden. Selain itu, usia 1-2 tahun merupakan masa pertumbuhan anak yang cukup pesat. Responden probiotik ada yang tidak mengalami kenaikan berat badan dikarenakan pada bulan ke tiga yang bersangkutan mengalami sakit setelah menjalani perjalanan yang jauh. Demikian pula salah satu responden pada kelompok placebo juga tidak mengalami kenaikan berat pada bulan ke tiga dikarenakan mengalami sakit pada bulan ke tiga.

V.2.2 Insiden kecenderungan diare

Insiden kejadian diare sebagai salah satu penyakit yang sering dialami anak-anak menjadi salah satu latar belakang perlunya pengembangan dan pengujian terhadap manfaat asupan probiotik bila dibandingkan pola pengobatan antibiotika yang dapat menurunkan jumlah mikrobiota normal dan baik pada saluran pencernaan. Pada lampiran data dapat dilihat bahwa probiotik terbukti memiliki fenomena menurunkan kolonisasi bakteri patogen dan menekan insidens kejadian diare (lihat lampiran insiden diare). Responden kelompok probiotik cenderung memiliki insiden diare yang lebih kecil dibandingkan kelompok placebo. Diasumsikan bahwa suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang memiliki sifat adesi yang kuat memungkinkan kolonisasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 sehingga mampu meningkatkan ekspresi respon imun inang semakin baik ditandai dengan peningkatan konsentrasi *sIgA* dan *TGF-β1* sebagai sitokin pemicu ekspresi *sIgA*^{2,11,21}.

Bila dibandingkan dengan pola persentase perubahan titer *sIgA*, maka didapatkan suatu kecenderungan bahwa anak yang sejak awal mengalami diare, maka titer *sIgA*nya cenderung turun. Sebagai contoh kasus yang terjadi pada kelompok placebo, terdapat kecenderungan anak diare dikaitkan penurunan *sIgA*. Pada kelompok probiotik juga ditemukan kasus diare pada bulan ke tiga, responden no 19 mengalami penurunan *sIgA* sedangkan responden no 20 walaupun mengalami diare 3 hari, tidak menunjukkan penurunan titer *sIgA*. Perbedaan respon yang berbeda diantara dua responden kelompok probiotik ini menunjukkan bahwa diare tidak selalu menurunkan titer *sIgA*.

Dari pengamatan ekspresi respon imun selular, didapatkan suatu kecenderungan tidak selalu anak yang mengalami diare akan mengalami kenaikan ekspresi *TNF-α* sebagai pro-inflamasi yang dominan.²⁸

Selain diare, hasil pemeriksaan fisik juga mendapatkan asupan bahwa selama masa suplementasi, insiden kecenderungan responden mengalami sakit (ISPA) juga menurun terutama pada kelompok probiotik (diasumsikan anak menjadi lebih sehat). Fenomena ini ditandai dengan perbaikan pola asupan makan dan pola BAB (lihat data pemeriksaan fisik).

(ISPA) juga menurun terutama pada kelompok probiotik (diasumsikan anak menjadi lebih sehat). Fenomena ini ditandai dengan perbaikan pola asupan makan dan pola BAB (lihat data pemeriksaan fisik).

V. 3. Respon imun baduta terhadap suplementasi mikroenkapsulasi

V.3.1 Suplementasi mikroenkapsulasi

Suplementasi dalam bentuk mikroenkapsulasi merupakan prasyarat mobilisasi probiotik agar tidak terdegradasi dalam lambung dan mencapai saluran usus sebagai target sehingga respon imun yang diharapkan dapat distimulasi dengan optimal. Stimulasi yang optimum dalam durasi kurun waktu yang cukup dan kontinue memungkinkan kolonisasi *Lactobacillus plantarum* hingga stimulasi respon imun terekspresi. Kolonisasi tersebut dimungkinkan karena *Lactobacillus plantarum* telah terbukti memiliki kemampuan adesi yang kuat. Kurun waktu 90 hari merupakan kurun waktu minimal yang dipersyaratkan agar nilai asupan gizi yang diharapkan terjadi dapat dinilai dengan optimal. Namun nilai kepatuhan dan kerjasama antara orangtua responden dan peneliti tidak kalah penting menentukan optimalisasi pengaruh suplementasi mikroenkapsulasi. Nilai viabilitas bakteri dari proses fermentasi (10^{11} cfu/ml) hingga mengalami penurunan namun masih dalam batas optimum (10^{10} cfu/ml) menunjukkan adanya pengaruh aktifitas fisik selama tahapan proses mikroenkapsulasi^{17,18,19,43}. Bahan penyalut alginat mempunyai kelemahan dalam hal kestabilan, oleh karenanya diperlukan kombinasi Na alginat dan CaCO_3 serta avicel, kombinasi tersebut memungkinkan viabilitas mikroorganisme bertahan terhadap gerakan peristaltik, variasi pH dan aktivitas lokal Enzim pencernaan¹⁷

Selain faktor kemampuan kolonisasi, faktor keamanan suplementasi mikroenkapsulasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 juga harus diperhatikan. Uji viabilitas juga disertakan dengan pengujian keamanan kontaminasi bakteri patogen khususnya *Escheria coli*. Hasil uji viabilitas dan kontaminasi pelet mikroenkapsulasi menunjukkan hasil negatif keberadaan bakteri patogen dalam pelet. Selain itu, proses mikroenkapsulasi juga mempersyaratkan kelembaban LOD dibawah 6, sehingga kondisi yang memungkinkan tumbuh bakteri atau kontaminan telah dieliminir. Langkah-langkah inilah yang cukup menjamin

bahwa pelet mikroenkapsulasi yang diberikan pada responden berada pada batas faktor keamanan.

V.3.2 Respon imun *humoral*

Respon imun *humoral* yang ditandai dengan titer *sIgA* dari sampel fekal yang diuji dengan analisa chi square test menunjukkan adanya pengaruh suplementasi probiotik walaupun tidak bermakna signifikan secara statistik dikarenakan jumlah sampel yang kecil. Rerata kadar *sIgA* kelompok probiotik lebih tinggi dibandingkan kelompok placebo. Dua responden dikeluarkan dari kelompok probiotik karena tidak memenuhi nilai kepatuhan suplementasi ditandai dengan adanya penurunan nilai titer *sIgA* (data tidak ditampilkan). Data tersebut merupakan gambaran, pentingnya nilai kepatuhan agar kolonisasi probiotik dapat berjalan optimal dalam upaya stimulasi respon imun.

Terdapatnya perbedaan persentase perubahan kenaikan nilai titer *sIgA* pada kelompok placebo 45,5 % sedangkan pada kelompok probiotik 88,9 % hal tersebut diasumsikan karena optimalisasi kolonisasi yang memungkinkan induksi MAMPs *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang optimal (efisien dan kontinue) memungkinkan efek imunologis *Lactobacillus plantarum* IS 10506 dapat diekspresikan. Kenaikan nilai titer *sIgA* ini tercermin dengan penurunan insiden diare sebagai salah satu indikator perbaikan kesehatan karena kemampuan probiotik dalam kolonisasi dan eliminasi bakteri patogen penyebab diare. Namun hal ini tidak berarti bahwa seluruh responden pada kelompok probiotik terisolasi dari kontaminasi dari lingkungan. Tidak sepenuhnya dapat dipastikan bahwa seluruh persentase kenaikan titer *sIgA* disebabkan karena stimulasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 karena respon imun merupakan cerminan respon proses metabolisme fisiologis dalam tubuh terhadap segala stimuli antigen baik dari luar (bakteri, virus, protozoa) maupun dari dalam tubuh. Pernyataan tersebut ditunjang dengan data yang menyatakan bahwa dalam kelompok probiotik maupun placebo selalu terdapat dua respon yang berbeda (konsentrasi yang naik dan turun) sangat tergantung pada proses fisiologis tubuh dan respon imun yang terbentuk pada saat pengambilan sampel. Kecenderungan respon imun yang sama (naik dan turun) juga berlaku pada pengujian parameter respon selular (TGF- β 1 dan TNF- α).

V.3.2.1 Pengaruh ASI

Usia satu-dua tahun adalah masa dimana anak berhak mendapatkan asupan ASI. Kandungan ASI yang kaya dengan komponen imunologis (antara lain *sIgA*, *TGF-β1* dan *TNF-α*) memungkinkan respon imun tubuh responden yang baik, bila responden masih mendapatkan asupan ASI dari ibunya. Responden kelompok placebo secara umum lebih banyak yang masih mendapatkan asupan ASI (55%) bila dibandingkan kelompok probiotik (44%). Walaupun disisi lain, nilai kandungan gizi ASI ibu tidak terlepas dari asupan makanan ibu. Asupan ASI tidak akan memproteksi tubuh responden dari segala, salah satu responden yang masih mendapatkan asupan ASI namun mengalami penurunan daya tahan karena kelelahan, masih memungkinkan kekuatan stimuli bakteri penyebab diare menimbulkan respon yang lebih kuat.

Tidak semua asumsi korelasi yang ada dapat dibuktikan, tidak adanya perbedaan bermakna persentase subjek yang mengalami kenaikan *sIgA* antara kelompok yang diberikan ASI (46,2%) dibandingkan kelompok yang tidak diberikan ASI (53,8) menunjukkan bahwa sesuai penelitian Boother et all ASI merupakan faktor minor pada sekresi *sIgA*⁵¹

Seperti dikemukakan oleh WHO bahwa sebagian besar anak usia bawah lima tahun mengalami kecenderungan rentan terhadap penyakit⁴⁶, hal tersebut nyata pada rekapitulasi pemeriksaan fisik yang dilakukan setiap bulannya. Jelaslah bahwa asupan ASI khususnya nampak pada kelompok placebo, tidak cukup untuk memproteksi kecenderungan penyakit ISPA pada anak.

V.3.3 Respon imun selular

V.3.3.1 Respon imun *TGF-β1*

Ekspresi respon imun *TGF-β1* akan menstimuli ekspresi *sIgA*, dan juga menekan ekspresi pro-inflamasi *TNF-α*.^{10,41,49} oleh karenanya diharapkan kenaikan pada *TGF-β1* akan berkorelasi dengan kenaikan *sIgA*. Persentase nilai kenaikan *TGF-β1* setelah analisa non parametrik pada kelompok probiotik menunjukkan tendensi yang lebih baik (66.7%) dibandingkan dengan kelompok placebo (27.3%). Data tersebut menunjang teori yang menyatakan bahwa stimulasi bakteri komensal (termasuk diantaranya kelompok bakteri asam laktat

probiotik) akan meningkatkan ekspresi *TGF-β1* pada sel epitel mukosa intestinal. *TGF-β1* selanjutnya bersama *TSLP*, *APRIL* dan *BAFF* akan bersinergi menstimulir *class swichting* sel plasma B imunoglobulin A (*sIgA*).

Tidak selalu terjadi korelasi positif antara kenaikan *sIgA* pada kelompok placebo maupun pada kelompok probiotik. Berbagai asumsi dikemukakan pada interpretasi fenomena ini bahwa tidak signifikannya korelasi ekspresi antara *sIgA* dan *TGF-β1*. Bootcher at all juga menemukan bahwa selain ASI, *TGF-β1* pada rentang usia anak, merupakan faktor minor pada sekresi *sIgA*. Respon imun setiap individu bersifat sangat spesifik. Respon imun yang ditimbulkan setiap stimuli yang diberikan termasuk diantaranya adalah asupan suplementasi yang berbeda, pola asupan gizi anak, jumlah suplementasi yang efektif mencapai target saluran cerna. Kenaikan *sIgA* tidak bisa selalu dipastikan disebabkan karena induksi *TGF-β1* karena kita tidak pernah dapat memastikan stimuli yang terjadi dalam tubuh setiap individu. Hal tersebut menunjukkan bahwa mekanisme korelasi antara *sIgA* dan *TGF-β1* merupakan mekanisme yang dapat terjadi dengan atau tanpa asupan suplementasi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506. Kolonisasi bakteri komensal dapat terjadi secara alami. Pemberian bentuk makanan yang mengandung bakteri asam laktat telah dibatasi untuk mempersempit ruang asumsi bahwa ekspresi yang terjadi disebabkan oleh bakteri *Lactobacillus plantarum* IS-10506. Namun kita tidak dapat membatasi masuknya koloni lain atau asupan stimulasi antigen lain baik melalui makanan atau minuman yang dikonsumsi.

V.3.3.2 Respon imun *TNF-α*

Respon imun *TNF-α* sebagai sitokin proinflamasi merupakan ekspresi yang biasanya distimuli oleh induksi bakteri patogen. Penelitian dengan menggunakan beberapa bakteri asam laktat telah menunjukkan bahwa bakteri asam laktat dapat menginduksi penurunan ekspresi *TNF-α*, secara umum nampak bahwa persentase nilai penurunan pada kelompok probiotik (55.6%) berimbang dengan persentase kelompok placebo (54.5%).

Asumsi selanjutnya adalah untuk melihat mekanisme korelasi yang terjadi antara *TGF-β1* dan *TNF-α*. Secara teoritis terdapat stimulasi yang berbeda, bahwa bakteri asam laktat dapat menginduksi penurunan ekspresi *TNF-α* dan *TGF-β1* mampu menekan ekspresi NF-κB yang akan mengekspresi proinflamasi *TNF-α*.^{39,46} Namun berdasarkan hasil uji korelasi Spearman nampak bahwa tidak ditemukan korelasi yang signifikan. Data korelasi ini tidak signifikan secara statistik, walaupun bila dibandingkan dengan tabel yang menunjukkan perbedaan persentase perubahan pada *sIgA*, *TGF-β1*, *TNF-α* nampak perbedaan yang cukup jelas. Satu-satunya dasar yang mempengaruhi hal tersebut adalah kecilnya ukuran sampel terutama pada kelompok probiotik.

V.4 Insidens diare dan korelasinya dengan parameter respon imun

Korelasi respon imun yang akan dikaitkan dengan insiden diare, dibatasi pada respon imun selular *TNF-α*. Dimana proinflamasi *TNF* hampir selalu dikaitkan sebagai mekanisme reaksi pertahanan tubuh terhadap infeksi yang masuk. Probiotik memiliki peran dalam menekan respon proinflamasi *TNF-α* sehingga secara tidak langsung akan menekan respon inflamasi yang distimulasi dengan diare.

V.5 Kontroling pengujian (*limitation of study*)

Penelitian dengan basis uji pada komunitas yang dilanjutkan dengan pengujian laboratorium ini memungkinkan terjadinya mekanisme diluar jalur yang telah dipersiapkan sesuai Standard operasional yang telah ditetapkan.

1. Kepatuhan suplementasi perlakuan yang membutuhkan kerjasama yang baik. Kontroling melalui kontak langsung, alat komunikasi dan pemeriksaan fisik setiap satu bulan sekali merupakan mekanisme untuk menjaga kepatuhan suplementasi
2. Pengambilan dan pengolahan sampel darah (plasma dan serum) dan sampel fekal. Faktor lisis, akurasi jumlah darah dan fekal yang diperlukan serta proses penyimpanan sampel dapat menghindari proses mobilisasi yang dapat merusak sampel.

3. Pengamatan kesehatan fisik responden sebatas pemeriksaan torak, abdomen, gimul dan berat serta tinggi badan, tidak disertai dengan pemeriksaan laboratorium mengingat biaya yang tidak mencukupi
4. Akurasi pengujian sampel plasma dan fekal memerlukan konfirmasi persiapan pengujian yang benar untuk mengurangi kesalahan yang dapat terjadi.
5. Konsistensi dan frekwensi diare tidak direkapitulasi dengan detail, sehingga insidens diare hanya dapat digambarkan berdasarkan durasi waktunya.
6. Konsentrasi IgA pada fekal tidak dapat dipastikan homogen pada setiap gram sampel yang diambil, mengingat faktor asupan makan yang berbeda dan juga konsistensi fekal yang spesifik tergantung kondisi pada saat pengambilan sampel.
7. Keterbatasan dana menyebabkan penelitian ini hanya mengambil data sampel fekal satu kali yaitu pada awal dan akhir suplementasi
8. Jumlah sampel yang sangat kecil karena hambatan teknis di lapangan yang menyebabkan hanya 20 responden yang dapat terlibat dalam penelitian ini. Kecilnya jumlah sampel yang tidak memenuhi persyaratan ini, menyebabkan perbedaan pengaruh perlakuan yang ada tidak cukup signifikan untuk terlihat walaupun dalam beberapa perlakuan nampak bahwa nilai α (0,07) hampir mendekati batas signifikansi ($\alpha : 0,05$)

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

1. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan meningkatkan konsentrasi *sIgA* sebagai indikator respon humoral
2. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan meningkatkan konsentrasi *TGF-β1* sebagai indikator respon selular
3. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan menurunkan konsentrasi *TNF-α* sebagai indikator respon selular
4. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan mengekspresikan korelasi positif antara *sIgA* dan *TGF-β1*
5. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan mengekspresikan korelasi negatif antara *TGF-β1* dan *TNF-α*
6. Suplementasi *Lactobacillus plantarum* IS-10506 tidak signifikan menurunkan insidens diare kelompok probiotik

VI.2 Saran

1. Penelitian lanjutan dengan skala sampel yang lebih besar
2. Skrening pola mikrobiota sampel fekal pada dua perlakuan
3. Pengujian *IL-10* yang dapat menginduksi ekspresi *sIgA*
4. Pengujian perbandingan konsentrasi *sIgA* pada fekal dan saliva

DAFTAR REFERENSI

1. Carmen, M.C., I.S. Surono., M., Jussi., S.Seppo. Potential probiotic characteristic of *Lactobacillus* and *Enterococcus strain* isolated from tradisional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization Journal of Food Protection, 2007:70 (3)
2. Agustina, R., Widjaja L., Agus T., Hartati, N.S., Dewi, M., Jacques,B. The effect of early nutritional supplementation with a Mixture of probiotic, prebiotic, fiber and micronutrients in infant with Acute Diarrhea in Indonesia. Asia Pac J. Clin. Nutr. 2007:16(3)
3. Gill, H. Optimization of gut health using probiotic: rationale and the weight of evidence. International symposium on probiotic from asian tradisional fermented food for healthy gut function. Jakarta, 2008
4. Kun, Y.L. The kinetic and mechanism of probiotic effect. International symposium of probiotic from asian traditional fermented food for healthy gut function. Jakarta 2008.
5. Sonja, M.K. Effect of glucose in removal of microcystin-LR by Viable commercial probiotic *strains* and *strains* isolated from dadih fermented milk J Agricultural Food Chemistry. 2008:56
6. Subijanto, M.S., Agus F. Probiotic evidence for clinical application in children. International symposium on probiotic from asian traditional fermented food for healthy gut function. Jakarta. 2008
7. Duramad,P, I.B, Tager., N.T Holland. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. Toxicology letters. 2007; 172: 48-49.
8. Surono, IS. Potential dadih probiotic. International symposium on probiotic from asian traditional fermented food for healthy gut function. Jakarta 2008
9. Akuzawa,R. And I.S. Surono. 2002. Fermented milks of Asia. In: encyclopedia of dairy sciences (Ed.H Roginski, J.W. Fuqual and P.F. Fox) Academic Press Ltd. London, UK.pp 1045-1048
10. Wells, J.M., Oriana,R., Marjolein,M., Peter V.B. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosa interface.National academy of sciences "microbes ad health" 2009.
11. Collado, M.C., Ingrid, S., Jussi,M. Seppo,M. Potential probiotic characteristic of *lactobacillus* and *enterococcus strain* isolated from traditional dadih fermented milk against pathogen intestinal colonization. J. of food protection. 2007:70:700-705

12. Surono, I.S. Probiotik, susu fermentasi dan kesehatan. Jakarta: YAPMMI, ISBN 979-98871. 2004
13. Rojas, R. G., Apodaca. Mucosal immunity and the use of recombinant *sigA* as immunotherapy. 2002. 3: 944-956
14. Surono, I.S. M.C.Collado., S.Salmien., J.Meriluato.et all. Effect of glucose and incubation temperature on metabolically active *Lactobacillus plantarum* from dadih in removing microcystin-LR. Food and Chemical toxicology. 2008; 46: 502-507
15. www.conicet.gov.ar/.../images/sinlacto.jpg diunduh pada 1 maret 2009
16. www.dista.unibo.it/.../bifidobacterium.jpg. diunduh pada 1 maret 2009
17. Vos, Paul., Marijke, M.F., Spasojevic,M. Sikkema, J. Encapsulation for Preservation of functionality and targeted delivery of *bioactive* food components. International Dairy Journal. 2010; 20:292-302
18. Mortazavian,A. Seyed,H.R., Mohamad, R.E., Sara,S. Principle and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Iranian Journal of Biotechnology. 2007; 5
19. Ding,W.K., N.P Shah. An improved method for microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. Journal of food science. 2009; 74
20. Surono, I.S., Indonesian biodiversities, from microbes to herbal plants as potential functional foods. Journal of the faculty of agricultural. 2008; 44: 23-27.
21. Collado, M.C., et all. Indigenous dadih lactic acid bacteria : cell-surface properties and interaction with pathogens. Food microbiology and safety. 2007; 73: 89-93.
22. Nybom, S.M.K. et all. Effect of glucose in removal of microcystin-LR by viable commercial probiotic *strains* isolated from dadih fermented milk, Journal agricultural food chemistry. 2008; 56: 3714-3720.
23. Surono, I.S., Usman.P., Koesnandar and A. Hosono. *In vivo* antimutagenicity of dadih probiotic bacteria towards Trp-P1. Asian-Aust. Journal anim.sci. 2009; 22: 119-123
24. Florentino, R.F. Symposium on diet, nutrition and immunity. Asia pacific journal clinical nutrition. 2009; 18: 137-142

25. Adib, A., I.S.Surono., P. Sudharmono. Function of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 on healthy Indonesian adult. 2nd International symposium on probiotic and prebiotic as functional foods for human health promotion. Jakarta. 2010.
26. Brandtzaeg, P. Current understanding of gastrointestinal immuno regulation and its relation to food allergy. Annual N.Y academic sciences. 2002; 964: 13-45
27. Holt, P.G. C.A Jones. The development of immune system during pregnancy and early life. 2000. Allergy; 55: 688-697.
28. Chirico, G. Development of the immune system in neonatus. Journal arab neonatal forum. 2005; 2: 5-11
29. The infant immune system and immunization. Immunisation info. Auckland University. 2006.
30. Karlsson, H. Christina,H., Anna R., Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. Infection and immunity. 2002; 70: 6688-6696
31. Toole, P.W, MarcusJ.C. Gut microbiota: changes throughout the lifespan from infancy to elderly. International dairy journal. 2010; 20: 281-291
32. Cheroute, H. Madakamutil, L.Acquired and natural memory T cell join forces at mucosal front line. Natural review immunology. 2004 4(4):290-300
33. Duerkop, B.A., Shipra, V., Lora, V.H. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. 2009; 31: 368-376
34. Sudarmo, S.M. Molecular mechanism of probiotic on mucosal immune response. International symposium of probiotic from asian traditional fermented food for healthy gut function. Jakarta. 2008
35. Wershil, B.K., Glenn T.F. Gastrointestinal mucosa immunity. American academy of allergy, asthma & immunology. 2008; 121: 380-383
36. Jang, M.H. Mi-Na,K., Koichi, I., Masafumi, Y.et all. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. PNAS. 2004; 101
37. Harma,S., R., Christopher Y., Josef N. Molecular modulation intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. Journal of biomedicine and biotechnology. 2010: 15p
38. Herich, H., M. Levkut. Lactic acic bacteria, probiotics and immune system. Vet.med-czech. 2002; 6: 169-180.

39. Saulnier, N. M.A. Zocco., S.Di Caro., G.Gasbarrini., A. Gasbarini. Probiotics and small bowel mucosa: molecular aspects of their interactions. *Genes & nutrition*. 2006; 1: 107-116
40. Erickson, K.L and Neil, E.H. Probiotic immunomodulation in health and disease. *Journal of nutrition*. 2000.403-409.
41. Galdeano, C.M., A.de Moreno., G.Vinderola., M.E.Bibas., G.Perdigon. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and vaccine immunology*. 2007; 14: 485-492.
42. Mestecky, J. M.W Russell., C.O. Elson. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut*. 1999; 44:2-5
43. Lamm, M.E. Current concepts in mucosal immunity How epithelial transport of IgA antibodies to host defense. *Am. J. Physiology*. 1998; 274: 614-617.
44. Gillingham, L.G., D.W. Lescheid. Probiotic and mucosal immunity: strain-specific effects on *Th1/Th2* cell modulation. *IntJNM*; 2009;4(1):18-22
45. Schiffrin, E.J and S. Blum. Interaction between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical nutrition*. 2002; 56: 560-564
46. Trebjchavsky, I, I Splichal. Probiotic manipulate host cytokine response and induce antimicrobial peptides. *Folia microbial*. 2006; 2006: 51(5): 507-510.
47. Subijanto, MS., Reza R., Like J., Pitono, S Managemen diare pada bayi dan anak. Divisi Gastroenterologi FK Unair. Surabaya.
48. Peter, I.R., E.L. Calvert., E.J. Hall., M.J. Day. Measurement of immunoglobulin concentration in fekal of healthy dogs. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. September 2004; 11: 841-848
49. Manual kit *TGF-β1* Elisa RnD system
50. Manual kit *TNF-α* Elisa RnD System
51. Bottcher,M.F., Maria, C.J. and Bengt, B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatric Allergy and Immunology*. Mei 2002; 14: 35-41.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Pratiwi Dyah Kusumo
Jenis kelamin : Perempuan
Tempat/tgl lahir : Jakarta / 10 April 1969
Agama : Kristen protestan
Alamat : Jl Kediri VII Blok E16/25 Limus Pratama Cileungsi
Bogor 16820



Status : Menikah dengan dua anak
- Mulyo Martono (suami)
- Yosua Chrial Martono (anak 1)
- Petra Passa Martono (anak 2)

Riwayat pekerjaan : Staf pengajar tetap, Bagian Biologi Fakultas Kedokteran
Universitas Kristen Indonesia

Riwayat pendidikan : 1. SD Angkasa 8 Halim Jakarta Timur lulus tahun 1982
2. SMPN 41 Jakarta Selatan lulus tahun 1985
3. SMAN 8 Jakarta Selatan lulus tahun 1988
4. Jurusan Biologi FMIPA UI lulus tahun 1994

Sumber dana : Seamer tropmed UI

Jakarta, 28 Desember 2010


(Pratiwi Dyah Kusumo)

ABSTRACT

Effect of probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation on children younger than two year immune response

Diarrheal disease remains a serious public health problem in developing world, is well known as a significant contributor to malnutrition and one of the major causes of the annual morbidity and mortality among under-five children in the developing world. The use of antibiotics had not been effective and often followed by serious side effect. We investigated the benefit of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 isolated from dadih, fermented milk in bamboo tubes by natural LAB. This study was designed as *pre post randomized double-blind placebo clinical trial*. 20 children 1 – 2 years old were supplemented and divided into 2 treatment, probiotic and placebo groups. This in Larangan, Cileduk, Tangerang Banten province were recruited and involved in this study. They were supplemented for 90 days and every 30 days physically clinical examination by physician. There are an enhancement of presentation subyek who get a increasement titer of *sIgA* dan *TGF-β1* and suppression of *TNF-α* but not significant and there are no correlation significant between titer *sIgA*, *TGF-β1* and *TNF-α*. Supplementation probiotik make the diarrhea insidens lower than placebo.

Key word :

Lactobacillus plantarum IS-10506,
sIgA, *TGF-β1*, *TNF-α*

There has been a tremendous increase in the number of food products containing bioactive components with a health promoting or disease preventing effect. Bioactive food components can be divided into bioactive molecules and bioactive living cells (probiotics). Both bioactive molecules and bioactive living cells may benefit from encapsulation since many report low survival of bioactivity due to adverse effect (i) processing and storage in the products that serve as vehicles and due to (ii) deleterious circumstances during transport through the gastrointestinal tract. For probiotics, it may even be mandatory to apply protection by encapsulation as the survival of probiotics in traditional products such as in dairy foods and powdered formulas is low. Encapsulation promotes not only viability but more importantly also protects the functionality, and may facilitate targeted release in specific parts of the gut.¹

Specific selected lactic acid bacteria (LAB) strains from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have been increasingly introduced and characterized as probiotics for functional food products. A probiotic has been defined as a "live microorganism which when administered in adequate amounts confers a health benefit on the host". Many criteria have been suggested for the selection of probiotics, including safety, tolerance to gastrointestinal conditions, ability to adhere to the gastrointestinal mucosa, and competitive exclusion of pathogens. Adhesion to the intestinal mucosa would allow

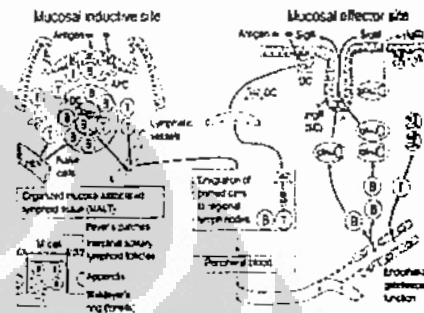
Draft artikel majalah kedokteran UI

colonization, although transient, of the human intestinal tract and has been related to the ability to modulate the immune system, especially during its development².

Dadih is fermented milk in bamboo tubes by natural LAB, and the resulting product is thought to be beneficial to human health. The benefits may be a result of the presence of the indigenous LAB involved in dadih fermentation. Indigenous bacteria LAB strains potency from dadih are tolerance to acid and bile, their antimicrobial activity against pathogenic bacteria, and their antimutagenic properties^{2,3}

lymphoid cells are located in three distinct compartments in the gut organized *gut-associated lymphoid tissue (GALT)*, the lamina propria, and the surface epithelium. GALT comprises the Peyer's patches, the appendix, and numerous solitary lymphoid follicles, especially in the large bowel. All these lymphoid structures are believed to represent inductive sites for intestinal immune responses. The lamina propria and epithelial compartment constitute effector sites but are nevertheless important in terms of cellular expansion and differentiation within the mucosal immune system. GALT and other *mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)* structures are covered by a characteristic *follicle-associated epithelium (FAE)*, which contains membrane (M) cells (Gambar 1). These specialized thin epithelial cells are particularly effective in the uptake of live and dead antigens from the gut lumen, especially when particulate in nature. Many enteropathogenic infectious bacterial and viral agents use the M cells as portals of entry. The GALT structures resemble lymph nodes

with B-cell follicles, intervening T-cell areas, and a variety of *antigen-presenting cell (APC)* subsets, but there are no afferent lymphatics supplying antigens for immunological stimulation. Therefore, the exogenous stimuli must come directly from the gut lumen, probably in the main via the M cells. Among the T cells, the CD4+ helper^{4,5}

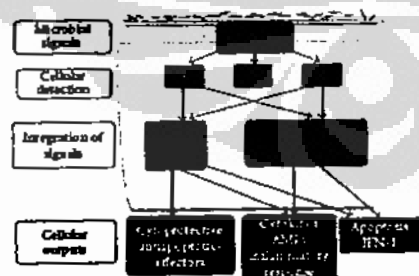


Gambar 1. Kompartemen GALT¹

There is evidence emerging that the microbiota modulates a series of processes that result in maturation, differentiation, and proliferation of the *Intestinal mucosa (IM)* at both cellular and molecular levels. Through a molecular chain of events, the microbiota provides a major drive for the maturation of the innate and adaptive immune systems. It has a profound effect on the intestinal barrier and on distant organs. Molecular microbial - mucosal interactions by providing a summary of the different strata of the IM, beginning with the microbiota as the outermost layer, and describe how different layers of the IM form a physical and immune barrier influenced by the microbiota.

Through a process of "cross talk" with the mucosal immune system, the microbiota negotiates mutual growth, survival, and inflammatory control of the intestinal

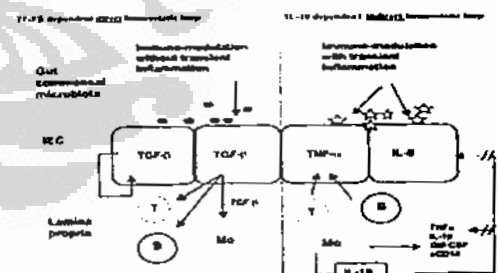
ecosystem The IM is equipped with trans-membrane or intracytoplasmic receptors, referred to as pattern recognition receptors (PRRs) that are defined by their ability to specifically recognize and bind distinctive microbial macromolecular ligands These ligands referred to as *microbial associated molecular patterns (MAMPs)* include lipopolysaccharide (LPS, component of gram-negative bacteria), flagellin, peptidoglycans, and formylated peptides. The transmembrane PRRs include the family of *Toll-like receptors (TLRs)*, that sample the extracellular and endosomal compartments, and the intracellular *NOD (Nucleotide - binding - oligomerization - domain) - like receptors (NLRs)* that confront and protect the cytoplasmic compartment This microbial-mucosal signaling cultivates immune tolerance (hyporesponsiveness) resulting in the development of a stable core microbiota. Establishing a core microbiota of diverse and native commensal species is critical and advantageous to the host as it provides competition to the pathogenic microbes. This process prevents pathogens from forming a niche for their persistence and proliferation.^{5,6}



Gambar 2. Stimulasi mikroba⁵

More than 33% of diseases in children less than 5 years of age are caused by environmental exposures (WHO, 2006). The main risk factors include pesticides, air and water pollution, lead, environmental tobacco smoke, infections, and inadequate diet. A growing number of childhood diseases have been linked to environmental exposures during prenatal and early postnatal development. Because the immune response plays a critical role in each of these diseases, it is important to consider the effects of toxicants on children's developing immune system⁷

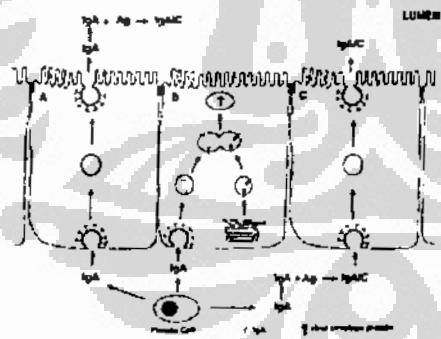
It has now become apparent that a cytokine network is associated with intestinal inflammations such as Crohn's disease, ulcerative colitis, and gastritis. Several studies have indicated that this cytokine network may play an important role in the pathogenesis of tissue injury at the mucosa. Among the cytokines determined to be associated with inflamed mucosal tissue are *IL-1, TNF-α, TGF-1 and IL-6*⁸ There is a contrast mechanism between TNF dan TGF when bacteria stimulated Intra Epitelial Lymphocyte.



Gambar 3. Perbedaan respon TNF-α TGF-β⁹

The bulk of the body's IgA antibodies, as well as the body's total pool of immunoglobulins, are produced by plasma cells in mucosal lamina propria, i.e., the loose

connective tissue beneath the epithelium that lines a mucous membrane. Production of IgA is especially prominent in the intestinal tract because of its length, enormous surface area, and exposure to the antigens of microbes and food. Most of this IgA is destined for local secretion because of the existence of a particular receptor-mediated transport mechanism through the epithelium. The receptor, termed the polymeric immuno. *Immunoglobulin receptor (pIgR)* synthesized by enterocyte and is expressed on the basolateral plasma membrane, where it has an opportunity to bind locally produced IgA (and IgM) antibodies. The resulting complex of pIgR and IgA next undergoes endocytosis and vesicular transport to the apical surface of the enterocyte, where the pIgR is proteolytically cleaved between its external and intramembranous domains, thereby releasing IgA, still bound to the external domain of the pIgR, into the secretions



Gambar 4. Mekanisme transport sIgA¹⁰

Neonatal age is characterized by a delicate process of adaptation from intra- to extra-uterine life. The immune system is particularly subject to problems of adaptation; indeed, a mature immune competence could cause unfavorable

effects due to maternal-fetal antigenic incompatibility, and is unnecessary to the fetus, which develops in a highly protective germ-free environment. The newborn infant, on the other hand, must be capable of defending himself against hostile microorganisms in the surroundings. As a result of these contradictory requirements the immune system is incompletely developed at birth. The antigenic inexperience and the prevalence of suppression factors during fetal life are responsible for the "physiological" immaturity of the immune function in newborn infants¹¹.

Material and method

This study was designed as pre post randomized double-blind placebo clinical trial. 20 children 1 – 2 years old were supplemented and divided into 2 treatment, probiotic (700 mg) and placebo (700 mg). This in Larangan, Cileduk, Tangerang Banten province were recruited and involved in this study. They were supplemented for 90 days and every 30 days physically clinical examination by physician.

Before we start the supplementation, procedure that we prepared are :

1. Kultivation and fermentation (AtmaJaya University)
2. Microencapsulation (Kimia Farma, Bandung)
3. Packing (PPOMN Jakarta)
4. Coding and distribution
5. Controlling
6. Pre-post sample collection from stool and plasma

After 90 days supplementation :

1. Extraction stool sample¹²
2. Elisa detection from plasma for : sIgA, TGF- β 1, TNF- α ^{13,14}

Statistical analysis

The data is not normally distributed so we use Chi-Square to analysis categorical data, and Spearman rho to analysis the correlation between parameter.

Result and discussion

According to cross tab Chi-Square analysis we find that there is an elevated subject percentage on sIgA 45.5% (placebo) 88.9% (probiotik) Fisher Exact Test α : 0,07 (not significant). TGF- β 1 analysis show that elevated subject percentage on placebo (27,30%) compare with probiotik (66.7%) α :0,078 (not significant). There is a similar comparison the subject percentage suppressed TNF- α between placebo (54.5%) probiotik (55.6%) chi-square test α : 0,964. Not always there is a teorically correlation. In this project that's no correlation between TGF- β 1 and sIgA rho: -0,036 (placebo) rho: 0,117 (probiotik). TGF- β 1 and TNF- α correlation rho: 0,164(placebo) rho: 0,483 (probiotik). Probiotic supplementation in this project not enough power to suppres the insidens of diarrhea α :0,178 and their correlation with TNF- α as a proinflammatory.

Dissecusion

Humoral and cellular responses
Lactobacillus plantarum IS-10506 supplementation will colonize and TGF- β 1 stimulate the class switching immunoglobulin and stimulate the production sIgA. There is an elevated subject who the post titer

sIgA is higher than pre titer. Seem that there is a correlation with TGF- β 1. There is a big enough differencies placebo compare with probiotic. Negatif correlation based on the opposite mechanism TNF- α (proinflamasi) and TGF- β 1 (antiinflamasi). But the only one reason that the sample quantity is very small. Because of that we cannot prove the effect of supplementation probiotic. We cannot strick to point that the elevated of sIgA and TGF- β 1 produce from supplementation of probiotic. Cause very complicated stimulation in mucosal. Supplementation probiotic can suppres the diarrhea insidens but not significant. Not always there is a positif correlation between insidens diarrhea and TNF- α . Bottler et all find that TGF- β 1 and mother's milk are minor factor to stimulate the expression sIgA and we too find that¹⁵.

Conclusion

Supplementation of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 is not significant to show there is a differencies between placebo and probiotic base on chi-square test sIgA, TGF- β 1 and TNF- α and Spearman rho show that there is no correlation between the immune parameter. The only one asumption for that is a very small sample quantity to see the significant of the supplementation.

Draft artikel majalah kedokteran UI

Reference

1. Vos, Paul., Marijke, M.F., Spasojevic, M. Sikkema, J. Encapsulation for Preservation of functionality and targeted delivery of *bioactive* food components. *International Dairy Journal*. 2010; 20:292-302
2. Surono, I.S. Probiotik, susu fermentasi dan kesehatan. Jakarta: YAPMMI, ISBN 979-98871. 2004
3. Akuzawa, R. And I.S. Surono. 2002. Fermented milks of Asia. In: encyclopedia of dairy sciences (Ed. H Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox) Academic Press Ltd. London, UK. pp 1045-1048
4. Brandtzaeg, P. Current understanding of gastrointestinal immuno regulation and its relation to food allergy. *Annual N.Y academic sciences*. 2002; 964: 13-45
5. Jang, M.H. Mi-Na, K., Koichi, I., Masafumi, Y. et al. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *PNAS*. 2004; 101
6. Wells, J.M., Oriana, R., Marjolein, M., Peter V.B. Epithelial crosstalk at the microbiota - mucosa interface. *National academy of sciences "microbes ad health" 2009*
7. Duramad, P, I.B, Tager., N.T Holland. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicology letters*. 2007; 172: 48-49.
8. McGee, D.W., Bamberg, T., Vitkus, J.D., McGhee, J.R. A Synergistic relationship between TNF- α , IL-1, TGF- β , IL-6. *Immunology*, 1995. 86:6-11.
9. Schiffrin, E.J. and S. Blum. Interaction between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of clinical nutrition*. 2002; 56:560-564.
10. Lamm, M.E. Current concepts in mucosal immunity How epithelial transport of IgA antibodies to host defense. *Am. J. Physiology*. 1998; 274: 614-617.
11. Chirico, G. Development of the immune system in neonatus. *Journal arabneonatal forum*. 2005; 2: 5-11
12. Peter, I.R, E.L. Calvert., E.J. Hall and M.J. Day. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004: 841-848.
13. Manual kit RnD System Elisa test for TGF- β 1 plasma
14. Manual kit RnD System Elisa test for TNF- α plasma
15. Bottcher, M.F., Maria, C.J. and Bengt, B. Cytokine, chemokine and secretory IgA levels in human milk in relation to atopic disease and IgA production in infants. *Pediatric Allergy and Immunology*. Mei 2002; 14: 35-41.

Draft artikel majalah kedokteran UI

Lampiran Data pemeriksaan fisik dan data berat serta tinggi badan (A)

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN PERTAMA

NO	DATA PEMERIKSAAN FISIK Konsultasi kunjungan 2						
	DIARE	PIJP	MAKAN	SAKIT	KAPSUL	PERKEMBANGAN LAIN	
1.	8-8 Mei	BIASA, tiap hari	NAIK	Mata Diare	LANCAR	Sakit mata, dr Zaki (14 April), Diare, dr Zaki (8-9 Mei)	
2.	TIDAK	Lebih teratur	NAIK	Batuk pilek 1 Minggu	1 Minggu	Tidak minum kapsul awal April selama 1 minggu	
3.	TIDAK	Lebih teratur	BIASA	Demam (12/5)	13-20 Mei	Demam, Dr Wiliaksana (RS Aminah)	
4.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK	Demam	2 Hari	Demam, pukeemas, tidak diberi antibiotika	
5.	TIDAK	Lebih teratur	NAIK	Alergi	2 Hari	Gatal / alergi kulit (berobat sendiri)	
6.	TIDAK	Lebih teratur	NAIK	Batuk	16-19 Mei	Batuk, dr Albert, tidak terpu sampai tidak diberikan tinja sendiri	
7.	8-7 Mei	BIASA, tiap hari	NAIK	Batuk pilek	4 Hari		
8.	2 Hari	Lebih teratur	NAIK	Batuk pilek	LANCAR		
9.	TIDAK	2 hari sekali	NAIK		LANCAR		
10.	TIDAK	BIASA, tiap hari	BIASA	Batuk pilek	LANCAR	Pup tidak keras, makan masih kurang	
11.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK		LANCAR		

OATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN KE-DUA

Konsultasi kunjungan 3		DATA PEMERIKSAAN FISIK				
NO	DIARE	MAKAN	SAKIT	KAPSUL	PERKEMBANGAN LAIN	
1.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Pilek	LANCAR		
2.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Pilek	LANCAR		
3.	TIDAK	BIASA, tiap hari		LANCAR		
4.	TIDAK	BIASA, tiap hari		LANCAR		
5.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Gatal kulit	LANCAR		
6.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Sedang sulit	LANCAR		
7.	27 hari	BIASA, tiap hari	Diare 3 hari	LANCAR	diare, balut pilek, demam, obat temorax	
8.	TIDAK	BIASA, tiap hari		1 Hari		
9.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Panas	LANCAR		
10.					TIDAK DATANG, DIGABUNG BULAN KE TIGA	
11.	TIDAK	BIASA, tiap hari	Bebuk pilek	LANCAR		

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN KE-TIGA

NO	DATA PEMERIKSAAN FISIK Konsultasi kumpulan 4						
	DIARE	PUP	MAKAN	SAKIT	KAPSUL	PERKEMBANGAN LAIN	
1.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK	Demam	9-16 Juni	Demam, awal Juni	
2.	TIDAK	BIASA, tiap hari	biasa		lancar		
3.	3 Hari	BIASA, tiap hari	biasa	Batuk, muntaber	5 hari	Batuk, muntaber sekitar satu minggu, 4-11 Juni	
4.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK		lancar		
5.	TIDAK	BIASA, tiap hari	biasa		lancar		
6.	28-30 Juni	BIASA, tiap hari	NAIK	Sedewaan	lancar		
7.	3 hari	BIASA, tiap hari	biasa	diare 28 Juni - 1 Juli	lancar		
8.	TIDAK	BIASA, tiap hari	biasa		Lancar	kedang tumbuh gigi	
9.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK	Batuk pilek	lancar		
10.	2 hari	2/3 hari sekali	Kedang baik		lancar	kedang kepala dimuntahin, minggu lalu diare dua hari	
11.	2 hari	BIASA, tiap hari	biasa		lancar	dua mng lalu, diare 2 hari	

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN

NO	Kunjungan 2		Kunjungan 3		Kunjungan 4		Persentase kenaikan berat	Persentase kenaikan linggi
	Berat	Tinggi	Berat	Tinggi	Berat	Tinggi		
1.	9.3	78	9.4	79	9.6	79	3.225806452	3.287973856
2.	9.4	80	9.4	80	10.1	81	8.602150538	1.75878397
3.	8.7	73.5	8.6	76	8.5	76	-1.149425287	5.56555556
4.	10.8	82	10.6	82	11.2	83	7.692307692	5.083281138
5.	7.9	72.5	8.2	75	8.4	76	3.703703704	4.827688207
6.	9.7	74	9.7	77	10.3	77	5.102040816	4.761804762
7.	8.9	70	9.2	74.5	9.2	74.5	6.976744186	8.428671429
8.	8.8	76	9.1	76	9.2	76	10.84337349	4.109589041
9.	9.6	77	9.3	77	9.3	77	-3.125	4.054054054
10.	11.5	84	11.7	86	11.7	86	8.333333333	7.5
11.	10.7	82.5	10.7	83.5	10.6	84	3.921568627	2.43802438

LAMPIRAN DATA PEMERIKSAAN FISIK (B)

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN PERTAMA

NO	DATA PEMERIKSAAN FISIK Konsultasi kunjungan 2						PERKEMBANGAN LAIN
	DIARE	PUP	MAKAN	SAKIT	KAPSUL		
12.	TIDAK	BIASA, tiap hari NAIK		Demam 2 hari	LANCAR		
13.	TIDAK	BIASA, tiap hari NAIK			LANCAR		
14.	3 Hari	BIASA, tiap hari BIASA		Batuk pilek	2 Hari		
15.	TIDAK	BIASA, tiap hari NAIK			1 hari		
16.	1 hari	BIASA, tiap hari NAIK		Sakit mata	LANCAR	terkadang kapsul yang masuk hanya setengah	
17.							TIDAK DATANG, DIGABUNG BULAN KE DUA
18.							TIDAK DATANG DIGABUNG BULAN KE DUA
18.	TIDAK	BIASA, tiap hari BIASA			LANCAR		
20.	TIDAK	Lebih teratur	BIASA		LANCAR		

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN KE-DUA

NO	DATA PEMERIKSAAN FISIK Konsultasi kunjungan 3						
	DIARE	PUP	MAKAN	SAKIT	KAPSUL	PERKEMBANGAN LAIN	
12.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK		LANCAR		
13.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK		LANCAR		
14.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK	Batuk pilek	2 Hari		
15.							TIDAK DATANG, DIGABUNG BULAN KE TIGA
16.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK		LANCAR		
17.	TIDAK	BIASA, tiap hari	NAIK	Batuk pilek	2 Hari		Berobat dr Zaki 17 mei. Batuk pilek
18.	TIDAK	BIASA, tiap hari	BIASA	Pilek	LANCAR		
19.	TIDAK	BIASA, tiap hari	BIASA		LANCAR		
20.	TIDAK	Lain teratur	Sedang sulit	Batuk	2 Hari		Berobat puskesmas, diberi antibiotika

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN BULAN KE-TIGA

NO	DATA PEMERIKSAAN FISIK Konsultasi, kunjungan 4						
	DIARE	PUP	MAKAN	SAKIT	KAPSUL	PERKEMBANGAN LAIN	
12.	TIDAK	BIASA, tiap hari biasa			lancar		
13.	TIDAK	BIASA, tiap hari biasa			lancar		
14.	TIDAK	BIASA, tiap hari biasa		Batuk pilek	2 Hari		
15.	TIDAK	BIASA, tiap hari Mambalik		Batuk pilek	lancar		
16.	TIDAK	BIASA, tiap hari biasa			lancar		
17.	TIDAK	BIASA, tiap hari NAIK			2 hari	16 Juni Batuk pilek ke dr Zakudin	
18.	TIDAK	BIASA, tiap hari biasa			lancar		
19.	1 mgg	BIASA, tiap hari biasa		diare	lancar	Diare, akhir juni selama satu minggu	
20.	3 hari	BIASA, tiap hari NAIK			lancar	Pertengahan juni 3 hari	

DATA PEMERIKSAAN FISIK RESPONDEN

NO	Kunjungan 2		Kunjungan 3		Kunjungan 4		Kenalkan berat	Kenalkan tinggi
	Tinggi	Berat	Tinggi	Berat	Tinggi	Berat		
12.	78	10.1	80	10.5	81	10.7	7	3.846153846
13.	73	10.3	76	10.8	78	11.5	13.86138614	6.849315088
14.	69	7.9	70	7.9	73	7.9	8.219178082	5.797101449
15.	76	X	X	10	79	10.4	11.827956899	4.605263158
16.	79.5	11.9	82.5	12.3	83	12.1	15.23809524	4.402515723
17.	80	11	80	12	82.5	12	9.090909091	3.125
18.	81	9.6	81	10.1	85	10.4	8.333333333	4.938271605
19.	84	11.3	84	11.2	85	11.2	-2.608695652	1.785714286
20.	79	11.6	81	12	82.5	12	6.194690265	3.797468354

DATA Uji ELISA elga

No	PRE			POST			Berat	Titer/berat (log ₁₀ /gram)	Titer (Ug/ml)	ODberast	Titer (Ug/ml)	ODberast	Titer (log ₁₀ /gram)	Titer/berat (log ₁₀ /gram)	
	OD 1	OD 2	rerata	OD 1	OD 2	rerata									
1	0.245	0.245	0.245	0.231132075	0.000607	0.000607	2.2	0.24	0.150606009	0.000377	0.000377	287.2727273	0.000377	228.5454546	
2	0.190	0.190	0.186	0.148484848	0.000425	0.000425	1.65	0.183	0.222083333	0.000685	0.000685	571.7083333	0.000685	571.7083333	
3	0.242	0.242	0.2275	0.29042105	0.000342	0.000342	1.2	0.282	0.64821428	0.000218	0.000218	77.19842657	0.000218	77.19842657	
4	0.162	0.162	0.151	0.107857143	0.000359	0.000359	1.4	0.211	0.148571429	0.00047	0.00047	339.4285714	0.00047	339.4285714	
5	0.182	0.182	0.1645	0.12602893	0.000393	0.000393	1.4	0.284	0.148571429	0.00056	0.00056	361.0789474	0.00056	361.0789474	
6	0.228	0.228	0.2335	0.178722222	0.000584	0.000584	1.9	0.233	0.118671642	0.00056	0.00056	278.7313433	0.00056	278.7313433	
7	0.227	0.227	0.2275	0.11378	0.000542	0.000542	2.01	0.232	0.118671642	0.00056	0.00056	278.7313433	0.00056	278.7313433	
8	0.209	0.209	0.2175	0.19273109	0.000555	0.000555	2.0	0.211	0.196	0.2045	0.073035714	0.000457	163.0892857	0.000457	163.0892857
9	0.237	0.237	0.2175	0.109708955	0.000505	0.000505	2.51	0.183	0.178431373	0.000373	0.000373	396.0784314	0.000373	396.0784314	
10	0.176	0.176	0.1565	0.104333333	0.000279	0.000279	1.8	0.177	0.19	0.1835	0.101644444	0.000379	210.5277778	0.000379	210.5277778
11	0.273	0.273	0.2825	0.2734375	0.000671	0.000671	2.7	0.223	0.08292683	0.000325	0.000325	194.4814815	0.000325	194.4814815	
12	0.264	0.264	0.2655	0.263465847	0.00046	0.00046	1.19	0.253	0.204821849	0.000801	0.000801	505	0.000801	505	
13	0.232	0.232	0.2355	0.269017241	0.000571	0.000571	4.82	0.227	0.11125	0.000533	0.000533	281.673	0.000533	281.673	
14	0.243	0.243	0.241	0.154487179	0.000592	0.000592	1.62	0.252	0.153946914	0.000631	0.000631	389.2283951	0.000631	389.2283951	
15	0.165	0.165	0.1645	0.119767442	0.00031	0.00031	740	0.252	0.2365	0.125526316	0.000587	308.9738642	0.000587	308.9738642	
16	0.183	0.183	0.177	0.174757282	0.000384	0.000384	382	0.241	0.15789231	0.000367	0.000367	459.1923077	0.000367	459.1923077	
17	0.181	0.181	0.154	0.113235284	0.000308	0.000308	226	0.175	0.184	0.115	0.000407	234.5	0.000407	234.5	
18	0.162	0.162	0.149	0.135454545	0.000282	0.000282	265	0.164	0.169	0.165	0.000348	347.6	0.000348	347.6	
19	0.164	0.164	0.1595	0.150471898	0.000306	0.000306	307	0.209	0.203	0.206	0.137333333	0.00048	319.8466867	0.00048	319.8466867
20	0.181	0.181	0.1805	0.180331079	0.00033	0.00033	370	0.152	0.165	0.1685	0.198125	0.000323	403.81725	0.000323	403.81725

DATA SELISIH KONSENTRASI SIGAPRE OAN POST						
No	SELISIH					
	OD	OD/gram	Persentase	liter	Titer/gram (μ g/gram)	Persentase
1	-0.005	-0.122041	-52.80148	-1.85E-06	-304.897084	-53.2878683
2	-0.013	-0.037576	-25.30512	-0.0000481	-93.5757876	-28.04885899
3	0.039	-0.077269	-25.80952	0.0001443	-141.120514	-19.79726199
4	-0.0115	-0.068036	-53.80795	-4.285E-05	-107.889288	-58.22351138
5	0.0435	0.028498	23.73428	0.00018095	110.1366005	48.88515325
6	0.033	0.010541	8.126775	0.0001221	47.7739181	16.24817898
7	0.005	0.001922	1.689355	1.85E-06	7.858343284	2.900357485
8	-0.013	-0.109737	-80.04023	-4.81E-05	-281.079378	-81.55002478
10	-0.0355	0.070222	64.8952	-0.00013135	114.8660284	46.7786324
10	0.027	-0.002389	-2.28967	0.0000999	21.494444444	13.16889653
11	-0.0395	-0.190845	-89.79471	-0.00014615	-504.737289	-72.18589868
12	0.038	0.001157	0.568403	0.0001408	49.20792078	10.79813338
13	-0.013	-0.091767	-45.2017	-4.81E-05	-230.816103	-46.86282139
14	0.0105	0.00076	0.491778	0.0000386	9.933523267	2.618944786
15	0.084	0.005759	4.80838	0.0002772	68.7798876	28.63516302
16	0.0615	0.011012	6.301282	0.00020296	76.69903868	20.04265912
17	0.03	0.001765	1.558442	0.000099	27.88235294	12.3036889
18	0.017	0.030545	22.55034	0.0000561	82.61616182	31.15529684
19	0.0465	-0.013138	-8.731452	0.00018345	11.98930818	3.84183137
20	-0.002	0.017788	9.863707	-4.8E-06	33.41924157	9.022637645

Faktor dilusi : standard 100 x pengenceran feces 10 x

DATA UJI ELISA TGF-β1

No	NILAI PRE						NILAI POST						KESIMPULAN	
	Nilai.1	Nilai.2	Mean	Titer (pg)	4 X Titer (pg)	Nilai.1	Nilai.2	Mean	Titer (pg)	4 X Titer (pg)	Selisih (pg)	% selisih		
1	0,061	0,071	0,066	110	440	0,084	0,067	0,0655	109,1667	436,6667	-3,33333	-0,75758		
2	0,074	0,071	0,0725	120,8333	483,3333	0,072	0,069	0,0705	117,5	470	-13,33333	-2,75862		
3	0,072	0,068	0,07	116,6667	466,6667	0,067	0,065	0,066	110	440	-26,66667	-5,71429		
4	0,073	0,071	0,072	120	480	0,068	0,077	0,0725	120,8333	483,3333	3,333333	0,694444		
5	0,068	0,069	0,0685	114,1667	456,6667	0,069	0,069	0,069	115	460	3,333333	0,72927		
6	0,07	0,081	0,0755	125,8333	503,3333	0,071	0,069	0,07	116,6667	466,6667	-36,66667	-7,28477		
7	0,065	0,073	0,069	115	460	0,07	0,072	0,071	118,3333	473,3333	13,33333	2,898551		
8	0,073	0,085	0,079	131,6667	526,6667	0,068	0,069	0,0685	114,1667	456,6667	-70	-13,2911		
9	0,071	0,078	0,0745	124,1667	496,6667	0,068	0,071	0,0695	115,8333	463,3333	-33,33333	-6,71141		
10	0,097	0,105	0,101	168,3333	673,3333	0,073	0,073	0,073	121,6667	486,6667	-186,6667	-27,7228		
11	0,07	0,07	0,07	116,6667	466,6667	0,065	0,073	0,069	115	460	-6,66667	-1,42857		
12	0,064	0,065	0,0645	107,5	430	0,073	0,078	0,0755	125,8333	503,3333	73,33333	17,05426		
13	0,081	0,082	0,0815	135,8333	543,3333	0,069	0,07	0,0695	115,8333	463,3333	-80	-14,7239		
14	0,085	0,09	0,0875	145,8333	583,3333	0,095	0,088	0,0915	152,5	610	26,66667	4,571429		
15	0,069	0,065	0,067	111,6667	446,6667	0,069	0,068	0,0685	114,1667	456,6667	10	2,238806		
16	0,068	0,069	0,0685	114,1667	456,6667	0,069	0,072	0,0705	117,5	470	13,33333	2,919708		
17	0,071	0,072	0,0715	119,1667	476,6667	0,077	0,069	0,073	121,6667	486,6667	10	2,097902		
18	0,093	0,069	0,081	135	540	0,077	0,072	0,0745	124,1667	496,6667	-43,33333	-8,02469		
19	0,071	0,071	0,071	118,3333	473,3333	0,066	0,067	0,0665	110,8333	443,3333	-30	-6,33803		
20	0,073	0,072	0,0725	120,8333	483,3333	0,076	0,072	0,074	123,3333	493,3333	10	2,068966		

DATA HASIL ELISA TNF- α

No	DATA PRE					DATA POST					KESIMPULAN			
	Nilai Absorbansi					Titer (pg)	Nilai Absorbansi					Titer (pg)	Selisih (pg)	% selisih
	1	2	X				1	2	X					
1	0,155	0,149	0,152	27,53316	0,219	0,156	0,1875	40,91063	13,377	48,5867405				
2	0,155	0,136	0,1455	25,08377	0,151	0,138	0,1445	24,70694	-0,3768	-1,502286439				
3	0,162	0,145	0,1535	28,09841	0,111	0,12	0,1155	13,77887	-14,32	-50,96210977				
4	0,152	0,143	0,1475	25,83743	0,164	0,142	0,153	27,90999	2,0726	8,021561746				
5	0,155	0,141	0,148	26,02584	0,157	0,133	0,145	24,89535	-1,1305	-4,343721471				
6	0,149	0,139	0,144	24,51852	0,137	0,13	0,1335	20,56181	-3,9567	-16,13765839				
7	0,121	0,112	0,1165	14,1557	0,127	0,12	0,1235	16,79351	2,6378	18,63426699				
8	0,129	0,122	0,1255	17,54717	0,138	0,212	0,175	36,20025	18,653	106,3025566				
9	0,125	0,119	0,122	16,22826	0,127	0,128	0,1275	18,30083	2,0726	12,77133223				
10	0,121	0,118	0,1195	15,28619	0,118	0,117	0,1175	14,53253	-0,7537	-4,930334155				
11	0,119	0,112	0,1155	13,77887	0,11	0,105	0,1075	10,76423	-3,0146	-21,87872513				
12	0,127	0,109	0,118	14,72094	0,127	0,115	0,121	15,85143	1,1305	7,679468838				
13	0,128	0,119	0,1235	16,79351	0,127	0,114	0,1205	15,66302	-1,1305	-6,73170967				
14	0,115	0,113	0,114	13,21362	0,118	0,115	0,1165	14,1557	0,9421	7,129575393				
15	0,125	0,121	0,123	16,60509	0,117	0,112	0,1145	13,40204	-3,2031	-19,28959735				
16	0,113	0,101	0,107	10,57581	0,129	0,119	0,124	16,98192	6,4061	60,57323269				
17	0,107	0,108	0,1075	10,76423	0,101	0,104	0,1025	8,88075	-1,8842	-17,50381472				
18	0,128	0,13	0,129	18,86607	0,1	0,1	0,1	7,938	-10,928	-57,9244644				
19	0,128	0,139	0,1335	20,56181	0,129	0,118	0,1235	16,79351	-3,7683	-18,32669846				
20	0,099	0,1	0,0995	7,749585	0,11	0,1	0,105	9,82215	2,0726	26,7442063				

KORELASI KEJADIAN DIARE - KEPATUHAN SUPLEMENTASI

No	Diare	Kapsul		Diare	Kapsul		Diare	Kapsul
PLACEBO								
1	3 hari	100%			100%			92%
2		92%			100%			100%
3		92%			100%		3 hari	94%
4		97%			100%			100%
5		97%			100%			100%
6		95%			100%		3 hari	100%
6	2 hari	95%		3 hari	100%		3 hari	100%
7	2 hari	100%			98%			100%
8		100%			100%			100%
9		100%			100%		2 hari	100%
10		100%			100%		2 hari	100%
		97%			100%			99%
								99%
PROBIOTIK								
1		100%			100%			100%
2		100%			100%			100%
3	3 hari	97%			97%			97%
4		100%			100%			100%
5	1 hari	50%			100%			100%
6		100%			97%			97%
7		100%			100%			100%
8		100%			100%		7 hari	100%
9		100%			97%		3 hari	100%
		94%			99%			99%
								97%

RANCANGAN PLATE UJI ELISA

Rancangan plate ELISA berdasarkan nomor responden (duplo)

PLATE 1

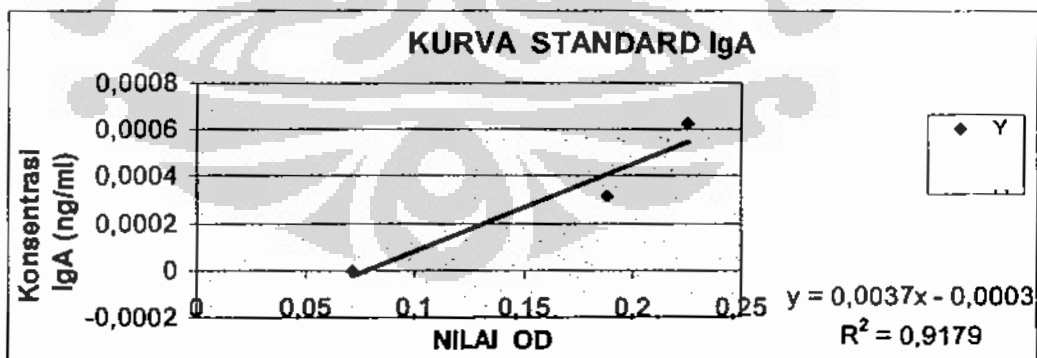
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Std 1	1.1	1.2	4.1	4.2	7.1	7.2	10.1	10.2	13.1	13.2
B	Std 2	Std 2	1.1	1.2	4.1	4.2	7.1	7.2	10.1	10.2	13.1	13.2
C	Std 3	Std 3	2.1	2.2	5.1	5.2	8.1	8.2	11.1	11.2	14.1	14.2
D	Std 4	Std 4	2.1	2.2	5.1	5.2	8.1	8.2	11.1	11.2	14.1	14.2
E	Std 5	Std 5	3.1	3.2	6.1	6.2	9.1	9.2	12.1	12.2	15.1	15.2
F	Std 6	Std 6	3.1	3.2	6.1	6.2	9.1	9.2	12.1	12.2	15.1	15.2
G	0	0										
H	0	0										

PLATE 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Std 1	16.1	16.2	19.1	19.2	22.1	22.2	25.1	25.2	28.1	28.2
B	Std 2	Std 2	16.1	16.2	19.1	19.2	22.1	22.2	25.1	25.2	28.1	28.2
C	Std 3	Std 3	17.1	17.2	20.1	20.2	23.1	23.2	26.1	26.2	29.1	29.2
D	Std 4	Std 4	17.1	17.2	20.1	20.2	23.1	23.2	26.1	26.2	29.1	29.2
E	Std 5	Std 5	18.1	18.2	21.1	21.2	24.1	24.2	27.1	27.2	30.1	30.2
F	Std 6	Std 6	18.1	18.2	21.1	21.2	24.1	24.2	27.1	27.2	30.1	30.2
G	0	0										
H	0	0										

Catatan : 1-20 adalah nomor responden (duplo) 21-30 tidak termasuk penelitian

KURVA STANDARD UJI ELISA sIgA FEKAL



RANCANGAN PLATE UJI ELISA TGF-β1

Rancangan Plate Elisa

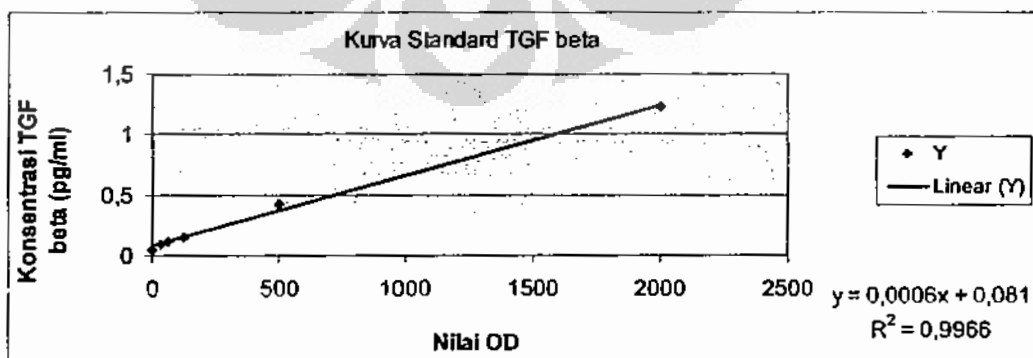
Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1	1.2	9.1	9.2	17.1	17.2	25.1	25.2	33.1	33.2	41.1	41.2
B	2.1	2.2	10.1	10.2	18.1	18.2	26.1	26.2	34.1	34.2	42.1	42.2
C	3.1	3.2	11.1	11.2	19.1	19.2	27.1	27.2	35.1	35.2	Std 1	Std 1
D	4.1	4.2	12.1	12.2	20.1	20.2	28.1	28.2	36.1	36.2	Std 2	Std 2
E	5.1	5.2	13.1	13.2	21.1	21.2	29.1	29.2	37.1	37.2	Std 3	Std 3
F	6.1	6.2	14.1	14.2	22.1	22.2	30.1	30.2	38.1	38.2	Std 4	Std 4
G	7.1	7.2	15.1	15.2	23.2	23.2	31.1	31.2	39.1	39.2	Std 5	Std 5
H	8.1	8.2	16.1	16.2	24.1	24.2	32.1	32.2	40.1	40.2	Std 6	Std 6

Plate 2

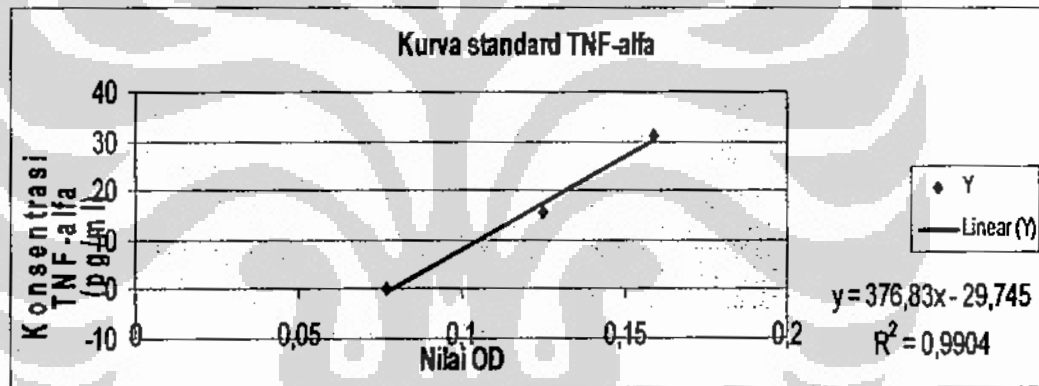
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1	1.2	9.1	9.2	17.1	17.2	25.1	25.2	33.1	33.2	41.1	41.2
B	2.1	2.2	10.1	10.2	18.1	18.2	26.1	26.2	34.1	34.2	42.1	42.2
C	3.1	3.2	11.1	11.2	19.1	19.2	27.1	27.2	35.1	35.2	43.1	43.2
D	4.1	4.2	12.1	12.2	20.1	20.2	28.1	28.2	36.1	36.2	44.1	44.2
E	5.1	5.2	13.1	13.2	21.1	21.2	29.1	29.2	37.1	37.2	45.1	45.2
F	6.1	6.2	14.1	14.2	22.1	22.2	30.1	30.2	38.1	38.2	43.1	43.2
G	7.1	7.2	15.1	15.2	23.2	23.2	31.1	31.2	39.1	39.2	44.1	44.2
H	8.1	8.2	16.1	16.2	24.1	24.2	32.1	32.2	40.1	40.2	45.1	45.2

Catatan : 1- 45 adalah nomor responden (yang digunakan dalam penelitian ini hanya nomor 1-20) Sampel duplo.



RANCANGAN PLATE UJI ELISA TNF- α

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1	1.2	5.1	5.2	9.1	9.2	13.1	13.2	17.1	17.2	21.1	21.2
B	1.1	1.2	5.1	5.2	9.1	9.2	13.1	13.2	17.1	17.2	21.1	21.2
C	2.1	2.2	6.1	6.2	10.1	10.2	14.1	14.2	18.1	18.2	22.1	22.2
D	2.1	2.2	6.1	6.2	10.1	10.2	14.1	14.2	18.1	18.2	22.1	22.2
E	3.1	3.2	7.1	7.2	11.1	11.2	15.1	15.2	19.1	19.2	23.1	23.2
F	3.1	3.2	7.1	7.2	11.1	11.2	15.1	15.2	19.1	19.2	62.5	62.5
G	4.1	4.2	8.1	8.2	12.1	12.2	16.1	16.2	20.1	20.2	15.6	15.6
H	4.1	4.2	8.1	8.2	12.1	12.2	16.1	16.2	20.1	20.2	0	0



Crosstabs

Status IgA * group Crosstabulation

			group		
			Probiotik	Placebo	Total
Status IgA naik	Count		8	5	13
	% within Status IgA		61.5%	38.5%	100.0%
	% within group		88.9%	45.5%	65.0%
	% of Total		40.0%	25.0%	65.0%
turun	Count		1	6	7
	% within Status IgA		14.3%	85.7%	100.0%
	% within group		11.1%	54.5%	35.0%
	% of Total		5.0%	30.0%	35.0%
Total	Count		9	11	20
	% within Status IgA		45.0%	55.0%	100.0%
	% within group		100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total		45.0%	55.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.105 ^a	1	.043		
Continuity Correction ^b	2.418	1	.120		
Likelihood Ratio	4.461	1	.035		
Fisher's Exact Test				.070	.058
Linear-by-Linear Association	3.900	1	.048		
N of Valid Cases	20				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,15.

b. Computed only for a 2x2 table

Crosstab

			group		
			Probiotik	Placebo	Total
Status TGFb	naik	Count	6	3	9
		% within group	66.7%	27.3%	45.0%
	turun	Count	3	8	11
		% within group	33.3%	72.7%	55.0%
Total		Count	9	11	20
		% within group	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.104 ^a	1	.078		
Continuity Correction ^b	1.716	1	.190		
Likelihood Ratio	3.177	1	.075		
Fisher's Exact Test				.175	.095
Linear-by-Linear Association	2.949	1	.086		
N of Valid Cases	20				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,05.

b. Computed only for a 2x2 table

Crosstab

			group		
			Probiotik	Placebo	Total
Status TNFa	naik	Count	4	5	9
		% within group	44.4%	45.5%	45.0%
	turun	Count	5	6	11
		% within group	55.6%	54.5%	55.0%
Total		Count	9	11	20
		% within group	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.002 ^a	1	.964		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.002	1	.964		
Fisher's Exact Test				1.000	.658
Linear-by-Linear Association	.002	1	.965		
N of Valid Cases	20				

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,05.

b. Computed only for a 2x2 table

Nonparametric Correlations

ANALISA KORELASI ANTARA IgA, TGF- β dan TNF- α

Kelompok Placebo

Correlations

			PersenIgA	Persen TGF	Persen TNF
Spearman's rho	PersenIgA	Correlation Coefficient	1.000	-.036	-.164
		Sig. (2-tailed)		.915	.631
		N	11	11	11
	Persen TGF	Correlation Coefficient	-.036	1.000	.164
		Sig. (2-tailed)	.915	.	.631
		N	11	11	11
	Persen TNF	Correlation Coefficient	-.164	.164	1.000
		Sig. (2-tailed)	.631	.631	.
		N	11	11	11

ANALISA KORELASI IgA , TGF- β dan TNF- α Kelompok Probiotik

Correlations

			PersenIgA	Persen TGF	Persen TNF
Spearman's rho	PersenIgA	Correlation Coefficient	1.000	.117	-.333
		Sig. (2-tailed)		.765	.381
		N	9	9	9
	Persen TGF	Correlation Coefficient	.117	1.000	.483
		Sig. (2-tailed)	.765	.	.187
		N	9	9	9
	Persen TNF	Correlation Coefficient	-.333	.483	1.000
		Sig. (2-tailed)	.381	.187	.
		N	9	9	9

Crosstab

			group		
			Probiotik	Placebo	Total
Status diare	diare	Count	3	7	10
		% within group	33.3%	63.6%	50.0%
tidak	Count	6	4	10	
	% within group	66.7%	36.4%	50.0%	
Total	Count	9	11	20	
	% within group	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.818 ^a	1	.178		
Continuity Correction ^b	.808	1	.369		
Likelihood Ratio	1.848	1	.174		
Fisher's Exact Test				.370	.185
Linear-by-Linear Association	1.727	1	.189		
N of Valid Cases	20				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,50.

b. Computed only for a 2x2 table

Crosstab

group				Status TNFa		
				naik	turun	Total
Probiotik	Status diare	diare	Count	3	0	3
			% within Status TNFa	75.0%	.0%	33.3%
	tidak	Count	1	5	6	
		% within Status TNFa	25.0%	100.0%	66.7%	
	Total	Count	4	5	9	
		% within Status TNFa	100.0%	100.0%	100.0%	
Placebo	Status diare	diare	Count	3	4	7
			% within Status TNFa	60.0%	66.7%	63.6%
	tidak	Count	2	2	4	
		% within Status TNFa	40.0%	33.3%	36.4%	
	Total	Count	5	6	11	
		% within Status TNFa	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

group		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Probiotik	Pearson Chi-Square	5.625 ^a	1	.018		
	Continuity Correction ^b	2.756	1	.097		
	Likelihood Ratio	6.959	1	.008		
	Fisher's Exact Test				.048	.048
	Linear-by-Linear Association	5.000	1	.025		
	N of Valid Cases	9				
Placebo	Pearson Chi-Square	.052 ^c	1	.819		
	Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
	Likelihood Ratio	.052	1	.819		
	Fisher's Exact Test				1.000	.652
	Linear-by-Linear Association	.048	1	.827		
	N of Valid Cases	11				

a. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,33.

b. Computed only for a 2x2 table

c. 4 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,33.

RINCIAN INFORMASI UNTUK SUBYEK

TENTANG PENELITIAN

Judul penelitian:

“Pengkajian fungsi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan zinc terhadap aktivitas antidiare dan respon imun humoral anak baduta di komunitas

”Assessment of Probiotic Function of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 and the effect of probiotic and zinc on prevention of diarrhoea and humoral immune response in Indonesian young children, a community based trial”

Bagian dari studi :

Fungsi Probiotik pada anak balita sehat di komunitas Indonesia

Pendahuluan:

Probiotik merupakan salah satu suplemen makanan yang berisi mikroba hidup yang dapat hidup pada traktus intestinal manusia dan memberikan pengaruh kesehatan yang menguntungkan bagi *hostnya*, antara lain dengan cara menjaga keseimbangan mikrobiota saluran cerna.

Dari beberapa jenis probiotik, bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme probiotik terpenting yang dapat mempengaruhi sistem imun. Salah satu bakteri jenis ini adalah *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang berasal dari susu fermentasi tradisional dadih. Penelitian Surono dkk (2009) membuktikan bahwa konsumsi probiotik berisi bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dengan dosis 10^{10} cfu sekali sehari selama 21 hari pada pasien HIV positif aman dan memberikan efek yang baik terhadap keseimbangan mikrobiota saluran cerna.

Penelitian terhadap orang dewasa sehat sudah dilakukan, dan mengingat pentingnya fungsi probiotik serta di Indonesia belum ada penelitian uji klinis probiotik pada anak bawah dua tahun sehat, maka peneliti terdorong untuk melakukan penelitian ini pada anak balita usia 1-2 tahun sehat yang hidup bebas di komunitas/masyarakat di Jakarta, dengan harapan dapat membuktikan fungsi probiotik lokal yang cocok untuk anak baduta Indonesia.

Pada penelitian ini dilakukan tiga periode, yaitu: Pelaksanaan penelitian dibagi dalam 3 periode yaitu periode pra-perlakuan (rekrutment, pengumpulan data questioner, dan persiapan, serta pengambilan sampel darah 5 ml dan feses, periode perlakuan selama 90 hari. Peneliti memberikan probiotik atau plasebo mikroenkapsulasi, atau serbuk seng atau plasebo serbuk seng sulfat 10 mg setiap hari pada subyek penelitian selama 90 hari berturut-turut dan periode pasca-perlakuan yaitu pengambilan darah dan feses, dan analisis laboratorium

Spesimen feses diambil dan disimpan dalam tabung feses dengan sendok khusus dalam tabung feses untuk dianalisa kandungan bakteri asam laktat dalam feses segar dalam waktu 1 – 2 jam dengan mengkultur metode plate counting, dan satu tabung dibekukan untuk dianalisis secara molekuler.

Sebagian spesimen feses diuji sekretori IgA dengan metode sandwich ELISA

Spesimen darah diambil sebanyak 3 ml dengan jarum suntik steril sekali pakai bebas seng, untuk segera diambil serumnya dan dibekukan sampai siap dianalisis.

Tujuan dari penelitian:

Rincian informasi ini ditujukan untuk periode perlakuan suplementasi produk probiotik, dengan tujuan :

Subyek yang dapat berpartisipasi dalam penelitian adalah yang memenuhi **syarat-syarat** sebagai berikut:

Kriteria inklusi :

Subyek adalah bayi dua tahun (baduta) Indonesia sehat di komunitas dengan prevalensi diare tinggi, berusia 1 – 2 tahun

Tidak mendapat/menggunakan produk yang mengandung susu fermentasi (yoghurt) atau suplemen probiotik secara rutin seminggu sebelum mulai dan selama suplementasi

Bersedia mengikuti penelitian hingga selesai selama 90 hari dan menandatangani formulir persetujuan.

Kriteria eksklusi :

Baduta menderita penyakit akut maupun khronis

Sedang dalam terapi antibiotik

Kriteria pengeluaran (*drop out*) :

Apabila subyek tidak kooperatif selama periode penelitian

Apabila subyek tidak mengikuti perlakuan yang diberikan selama 90 hari berturut-turut

Apabila subyek mengkonsumsi antibiotik atau makanan fermentasi seperti tape, tauco dan asinan, dalam periode 90 hari suplementasi

Besar sampel

Pada penelitian ini akan dibuat 4 kelompok yaitu kelompok perlakuan probiotik, seng, kombinasi probiotik dan seng, dan kontrol atau plasebo menggunakan maltodekstrin yang masing-masing terdiri dari 15 orang.

Besar sampel ditetapkan 18 untuk masing-masing kelompok, sudah termasuk 20 persen kemungkinan drop out.

Pemilihan subyek berdasarkan syarat-syarat tersebut di atas. Pelaksanaan penelitian akan dilaksanakan terhadap anak baduta sehat yang hidup bebas di komunitas/masyarakat.

Penelitian ini tidak menimbulkan masalah etik yang sangat berarti, pengambilan sediaan feses subyek akan dilakukan dengan sangat hati-hati dan dilakukan oleh petugas kesehatan yang berkompeten yaitu perawat yang berpengalaman, informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini akan disimpan dan dirahasiakan dan akan digunakan hanya untuk tujuan penelitian.

Penelitian ini akan memberi **manfaat langsung** kepada subyek dan tak langsung bagi masyarakat:

Apabila diperoleh hasil yang positif, penelitian ini akan memberi manfaat tak langsung kepada masyarakat, sehingga diharapkan konsumsi probiotik untuk menjaga kesehatan saluran cerna beralih ke probiotik lokal dan tidak tergantung kepada probiotik impor yang belum pernah teruji fungsinya terhadap orang Indonesia.

Setiap orang tua subyek dapat menanyakan penjelasan lebih lanjut mengenai tujuan penelitian, prosedur penelitian, manfaat dan kerugian serta tindakan pencegahan

apabila kerugian tersebut menjadi masalah. Keikutsertaan subyek ditandai dengan penandatanganan surat persetujuan keikutsertaan (*informed consent*) oleh orang tua subyek. Partisipasi subyek adalah sukarela dan mereka dapat mengundurkan diri kapan saja selama waktu penelitian tanpa ada sanksi apapun juga. Data hasil uji laboratorium yang diperoleh dijamin kerahasiaannya.

Apabila diperlukan penjelasan lebih lanjut, dapat menghubungi:

Dr. Ingrid S. Surono, MSc

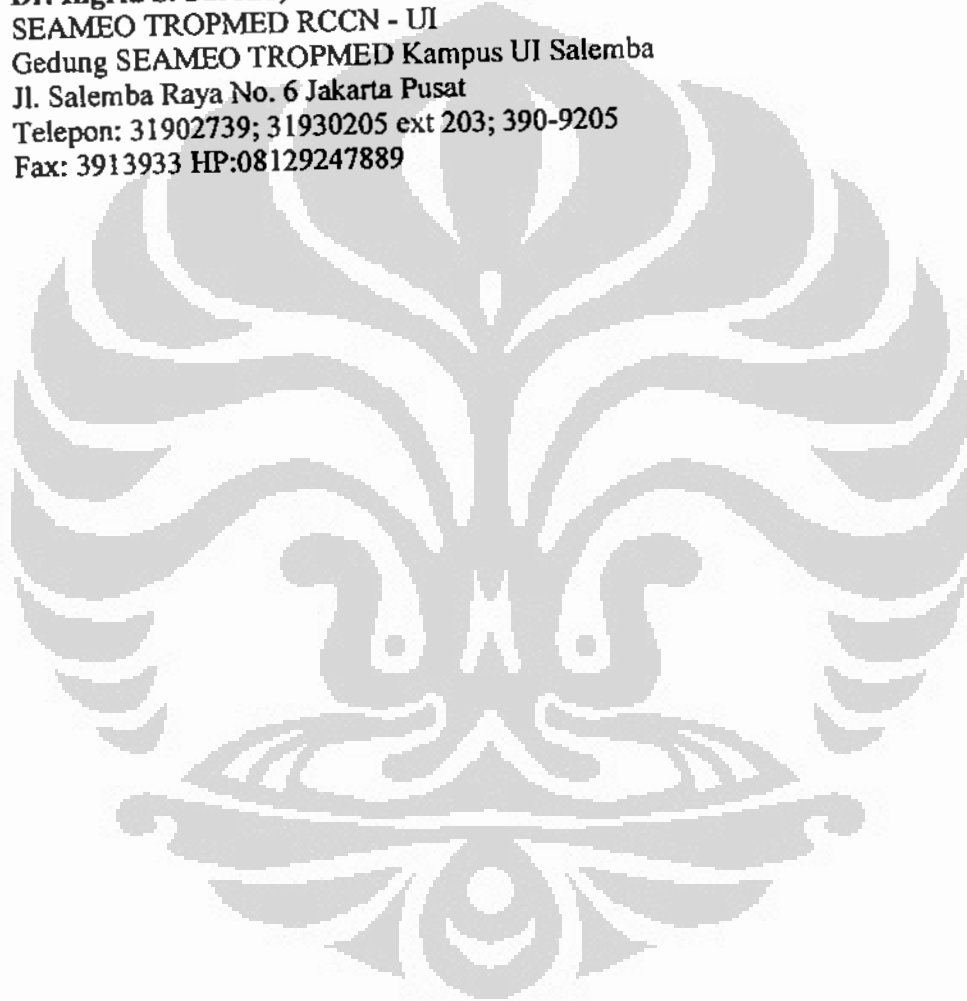
SEAMEO TROPMED RCCN - UI

Gedung SEAMEO TROPMED Kampus UI Salemba

Jl. Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat

Telepon: 31902739; 31930205 ext 203; 390-9205

Fax: 3913933 HP:08129247889



Formulir A

**SURAT PERSETUJUAN
UNTUK BERPARTISIPASI DALAM PENELITIAN**

**“Pengkajian fungsi probiotik *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan zinc terhadap aktivitas antidiare dan respons imun humoral anak balita di komunitas”
(Assessment of probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 and zinc on humoral immune response and suppression on morbidity of diarrhoea)**

(Lembar untuk Ibu/Keluarga)

Setelah mendengar penjelasan mengenai tujuan penelitian, prosedur penelitian, resiko dan manfaat penelitian, dan semua pertanyaan-pertanyaan saya yang berkaitan dengan penelitian ini telah terjawab sepenuhnya,

Saya mengerti bahwa akan dilakukan terhadap anak saya :

1. Wawancara untuk mengetahui data demografi dan informasi keadaan sosial ekonomi secara umum keluarga saya dan anak saya.
2. Wawancara dan pencatatan untuk mengetahui pola konsumsi, asupan gizi, riwayat diare, riwayat vaksinasi, riwayat laktasi pada anak saya
3. Anak saya akan memperoleh asupan probiotik atau plasebo berbentuk granula kering dalam wadah kapsul sehari satu selama 90 hari dan atau seng sulfat atau plasebo seng dalam bentuk serbuk mikroenkapsulasi 22 mg. Saya akan bekerja sama dengan peneliti untuk memberikan probiotik dan atau seng atau plasebo tersebut, secara sukarela
4. Saya akan menyerahkan sampel feses sebelum dan sesudah 3 bulan suplementasi dengan petunjuk menyiapkan dan wadah yang telah disediakan
5. Anak saya diijinkan untuk diambil darahnya sebanyak 1 sendok teh (8 ml), sebelum dan sesudah suplementasi oleh perawat yang berpengalaman

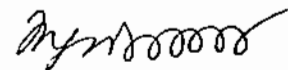
Maka dengan ini saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : _____
Umur : _____ tahun
Jenis kelamin : _____
Alamat : _____

Menyatakan setuju bahwa anak saya akan berpartisipasi sebagai subyek penelitian ini secara sukarela dan bebas tanpa ada paksaan, dengan catatan apabila suatu ketika merasa dirugikan dalam bentuk apapun berhak membatalkan persetujuan ini.

Jakarta, tanggal ____/____/2010
Pembuat pernyataan,

Mengetahui Penanggung jawab penelitian,



(_____)

(Dr Ingrid S. Surono, MSc)