

Pengaruh Immunoterapi, Probiotik dan Jinten Hitam terhadap CD4⁺IFN γ , Eosinofil, dan Skor Asma

Effect of Immunotherapy, Probiotic, and Nigella Sativa on CD4⁺IFN γ , Eosinophil Count, and Asthma Score

Indira Ratih¹, Ery Olivianto², Wisnu Barlianto³, HMS Chandra Kusuma²

¹Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

²Divisi Respiriologi-Departemen Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

³Divisi Alergi-Imunologi-Departemen Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang

ABSTRAK

Mekanisme patofisiologi asma terjadi berdasarkan proses inflamasi jalan nafas yang dipicu oleh limfosit T, dan berhubungan dengan berlebihnya produksi sitokin tipe 2 relatif terhadap sitokin tipe 1. Interferon- γ yang diproduksi oleh sel CD4⁺ merupakan antagonis IL-4 dan IL-5 yang berperan dalam patofisiologi asma. Pada asma juga terjadi eosinofilia bronkial yang merupakan penanda terjadinya proses inflamasi pada asma. Immunoterapi merupakan salah satu pengobatan pada asma yang menyebabkan pergeseran Th2 ke Th1 tetapi masih memiliki beberapa keterbatasan, sehingga perlu penelitian baru mengenai adjuvan seperti probiotik dan jinten hitam untuk meningkatkan efektivitas dari immunoterapi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian probiotik dan jinten hitam terhadap jumlah CD4⁺IFN γ , eosinofil dan perbaikan klinis pada anak asma yang mendapatkan immunoterapi fase rumatan. Penelitian ini merupakan penelitian *randomized clinical trial*. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok (immunoterapi dan plasebo, immunoterapi dan probiotik, immunoterapi dan jinten hitam, serta immunoterapi, probiotik dan jinten hitam). Parameter imunologis diperiksa menggunakan *flowcytometry* dan perbaikan klinis dinilai menggunakan skor ACT. Penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna dari CD4⁺IFN γ dan eosinofil darah jika dibandingkan antar 4 kelompok. Skor ACT menunjukkan perbedaan yang signifikan sebelum dan sesudah perlakuan pada semua kelompok. Dengan demikian, pemberian adjuvan probiotik atau jinten hitam, maupun kombinasi keduanya dapat meningkatkan perbaikan klinis pada penderita asma ringan, namun tidak menunjukkan perbedaan parameter imunologis antara lain CD4⁺IFN γ dan eosinofil.

Kata Kunci: ACT, asma, CD4⁺IFN γ , eosinofil, immunoterapi, jinten hitam, probiotik

ABSTRACT

Pathophysiology mechanism of asthma occurs based on airway inflammation induced by T lymphocyte and related to overproduction of type 2 cytokines relative to type 1 cytokines. Interferon- γ produced by CD4⁺ cell is antagonist IL-4 and IL-5 which has roles in asthma pathophysiology. In asthma, bronchial eosinophilia as a marker of inflammation is also occurred. Immunotherapy, one of asthma treatments, leads to a shift from Th2 to Th1 but with some limitations, so a new study about adjuvant such as probiotics and Nigella sativa to improve the efficacy of immunotherapy is necessary. The aim of this study is to find the effect of probiotics and Nigella sativa in CD4⁺IFN γ , eosinophil count and clinical improvement of asthmatic children who receive immunotherapy maintenance. This study is a randomized clinical trial research. Subjects were divided into 4 groups (Immunotherapy and placebo; Immunotherapy and Nigella sativa; Immunotherapy and probiotics; as well as Immunotherapy, Nigella sativa, and probiotics). Immunological parameter was examined using flowcytometry and clinical improvement was assessed using Asthma Control Test (ACT) score. This study shows no significant differences in CD4⁺IFN γ and eosinophil counts among 4 groups. Nevertheless, ACT score shows significant differences before and after treatment in all groups. In conclusion, administration of either probiotics adjuvant or Nigella sativa or both can improve clinical score in asthma although without showing differences in immunological parameters such as IFN γ and eosinophil.

Keywords: ACT, asthma, CD4⁺IFN γ , eosinophil, immunotherapy, Nigella sativa, probiotic

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 3, Februari 2015; Korespondensi: Indira Ratih. Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto 2 Malang. Telp (0341) 366242 Email: indira.ratih@gmail.com

PENDAHULUAN

Asma merupakan penyakit kronik anak yang paling banyak terjadi di dunia. Di Indonesia, prevalensi asma pada anak antara 3% hingga 17,4% (1). Hasil penelitian *International Study of Asthma and Allergies* (ISAAC) menunjukkan bahwa di Indonesia prevalensi penyakit asma meningkat dari 4,2% pada tahun 1995 menjadi 5,4% pada tahun 2003 (2,3).

Mekanisme patofisiologi asma terjadi berdasarkan proses inflamasi jalan nafas yang dipicu oleh limfosit T, yang berhubungan dengan peningkatan produksi sitokin oleh Th2 relatif terhadap produksi sitokin oleh Th1. Hipotesis Th2 pada asma mengatakan bahwa pergeseran keseimbangan respon tipe Th1 ke tipe Th2 memodulasi eosinofilia, produksi IgE, hiperresponsifitas jalan nafas, dan inflamasi kronik (4,5). Th1 memiliki peranan penting dalam patofisiologi asma. Limfosit TCD4⁺ dibagi menjadi 2 subset, Sel Th1 memproduksi sitokin tipe 1 *Interleukin* (IL)-2, *Interferon* (IFN)- γ dan *Tumor Necrotizing Factor* (TNF)- α , yang memediasi imunitas terhadap patogen virus dan bakteri sementara sel Th2 memproduksi sitokin tipe 2 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13 yang berperan dalam mekanisme alergi. Salah satu sitokin penting yang dihasilkan oleh Th1 adalah IFN- γ . Interferon- γ adalah antagonis IL-4 yang berperan dalam produksi IgE, dan juga antagonis IL-5 yang berperan dalam proliferasi dan aktivasi eosinofil (6). IFN- γ dihasilkan salah satunya oleh limfosit CD4⁺.

Pada asma juga terjadi eosinofilia bronkial yang merupakan penanda terjadinya proses inflamasi pada asma. Pemeriksaan eosinofil darah sering digunakan sebagai alternatif pemeriksaan dibandingkan dengan menggunakan sputum dengan alasan kenyamanan. Peningkatan eosinofil darah juga bisa menandakan kontrol asma yang lebih rendah (7).

Pada anak asma dan rinitis, disebutkan bahwa *House Dust Mite* (HDM) merupakan alergen utama, sehingga pemberian imunoterapi spesifik HDM baik dengan cara subkutan atau sublingual bertujuan untuk mencapai toleransi imun terhadap HDM. Imunoterapi menyebabkan pergeseran respon Th2 ke Th1 dan membangkitkan IL-10 dan TGF- β untuk memproduksi sel Treg (8). Respon imun Th1 spesifik terhadap alergen menghambat pengembangan penyakit alergi dengan menginduksi produksi IFN- γ , yang menghambat perkembangan sel-sel Th2. Sitokin IL-10 dan TGF- β menginduksi perubahan respon sel B dalam mendukung antibodi IgG4 dan antibodi IgA, dan menekan produksi IgE (8,9).

Tujuan pengobatan asma adalah agar penderita dapat menjalankan kehidupan sehari-harinya secara normal (3). Penelitian mengenai imunoterapi spesifik menggunakan ekstrak yang terstandarisasi telah menunjukkan perbaikan dari gejala klinis, kebutuhan obat-obatan, fungsi paru dan kualitas hidup (10). Namun demikian, pemberian alergen alami dapat berakibat peningkatan terjadinya reaksi sistemik yang diperantarai IgE dan reaksi anafilaktik. Oleh karena itu perlu dikembangkan strategi alternatif berupa agen yang mampu berperan sebagai modulator respon sel T tanpa potensi terjadinya *cross-link* IgE pada sel mast. Selain itu perlu juga dipertimbangkan suatu adjuvan untuk potensiasi kemampuan alergen untuk menginduksi Th2 ke Th1 (11). Salah satu tambahan

terapi yang sedang banyak diteliti adalah penggunaan imunomodulator seperti probiotik dan jinten hitam.

Salah satu khasiat berharga jinten hitam adalah efek imunomodulator dari zat-zat yang dikandungnya (12). Injeksi secara intraperitoneal selama 5 hari sebelum pajanan ovalbumin mampu memperlemah inflamasi jalan nafas yang ditunjukkan dengan penurunan secara signifikan dari sitokin Th2, eosinofilia paru dan hiperplasia sel goblet (13). Penelitian menggunakan mencit asma oleh Barlianto dkk menunjukkan jinten hitam mampu menurunkan jumlah sel T CD4⁺, meningkatkan jumlah sel Treg, mencegah *airway remodelling*, dan memodulasi respon imun (14).

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang jika diberikan dalam jumlah yang cukup akan bermanfaat untuk kesehatan manusia. *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria* merupakan jenis probiotik yang sering diteliti dan dikonsumsi (15). Penelitian probiotik pada manusia masih terbatas dan hasilnya masih merupakan kontroversi. Chen, dalam penelitiannya terhadap anak dengan asma dan rinitis alergi terdapat perbaikan klinis setelah pemberian *Lactobacillus gasseri* setiap hari selama 2 bulan (16).

Asthma dapat dikontrol secara efektif dengan melakukan intervensi dini untuk menghentikan pajanan terhadap faktor risiko yang mensensitisasi saluran nafas. Salah satu sistem skor yang sering digunakan dan telah tervalidasi untuk menilai kontrol klinis asma adalah *Asthma Control Test* (ACT) atau tes kontrol asma. Sistem skor ACT dapat digunakan dengan mudah dalam penanganan pasien asma sehari-hari oleh karena sistem skoring ini tanpa menyertakan pengukuran fungsi paru dan dapat digunakan untuk mengevaluasi pengendalian asma pada anak usia 4-17 tahun (3,17). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh probiotik dan *Nigella sativa* (jinten hitam) terhadap jumlah CD4⁺IFN γ ⁺ dan eosinofil pada anak asma ringan yang mendapatkan imunoterapi serta perbaikan klinis dengan menggunakan *Asthma Control Test* (ACT).

METODE

Subjek Penelitian

Subjek penelitian sebanyak tiga puluh dua anak berusia 4-14 tahun yang terdiagnosis asma berdasarkan Pedoman Nasional Asma Anak (PNAA) untuk anak usia ≥ 5 tahun dan Indeks prediksi Asma (IPA) untuk anak < 5 tahun. Kriteria inklusi yang digunakan meliputi menunjukkan hasil positif tersensitisasi alergen HDM berdasarkan *Skin Prick Test* dan terdiagnosis *intermittent* atau *mild persistent asthma* berdasarkan kriteria *Global Initiative for Asthma* (GINA), serta orang tua menandatangani *informed consent*. Kriteria eksklusi penelitian adalah pasien asma dengan komorbiditas lainnya, pasien dengan imunodefisiensi atau imunokompromais, riwayat alergi berat, mengkonsumsi kortikosteroid dosis terapi selama 1-2 minggu, vit D3 lebih dari 2000 iu/hr selama 3-4 bulan, β blocker, penghambat ACE, antibiotik, antagonis leukotriene, teofilin, anti kolinergik, kromolin dan ketotifen pada 2 minggu sebelum dan selama penelitian.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *randomized clinical trial*, *single blind*, *pre* dan *post test control group* untuk eosinofil dan

skor ACT dan *post test control group* untuk CD4⁺IFN γ . Penelitian ini telah disetujui oleh Panitia Etik Penelitian Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.

Terdapat empat kelompok perlakuan (kelompok imunoterapi dan plasebo; imunoterapi dan *Nigella sativa*; imunoterapi dan probiotik; imunoterapi, *Nigella sativa* dan probiotik). Setelah dilakukan randomisasi sampel diberikan perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuannya selama 56 minggu.

Pemberian Imunoterapi dan Ajuvan Probiotik atau *Nigella Sativa*

Imunoterapi diberikan secara subkutan sekali seminggu untuk fase induksi dengan dosis dinaikkan bertahap sesuai protokol imunoterapi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang yang kemudian dilanjutkan fase rumatan selama 42 minggu dengan pemberian suntikan 3 minggu sekali dengan dosis rumatan. Probiotik yang digunakan adalah ProBi dari Medifarma yang berisi 2×10^9 cfu/gr *mixed life* bacteria *Lactobacillus acidophilus* LA-5TM dan *Bifidobacterium lactis* Bb-12TM, dikonsumsi setiap hari dengan dosis 1 sachet per hari. *Nigella sativa* yang digunakan jinten hitam dalam bentuk serbuk yang dikapsul dan diberikan dengan dosis 15 mg/kgBB/hari.

Periksaan, Pengukuran, dan Analisis

Pengambilan sampel darah dilakukan di laboratorium Patologi Klinik (Laboratorium sentral) RSSA oleh petugas laboratorium. Sampel darah dicampur dengan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) dan langsung dilakukan Isolasi PMN dengan *Ficoll-Hypaque* dan kultur dari darah perifer sampel serta pemurnian PBMC dengan *flow cytometry*. Analisis jumlah sel CD4⁺IFN γ dari PBMC dengan menggunakan *flow cytometry* (Becton Dickinson FACS Calibur). Hasil analisis berupa persentase dihitung dengan menggunakan *software* BD Cell Quest Pro. Analisis jumlah eosinofil menggunakan teknik *flow cytometry* dengan *Automated hematology analyzer* Sysmex xt4000i yang didapatkan hasil dalam satuan persen. Penilaian ACT dilakukan dengan pengisian kuesioner oleh subjek penelitian dengan didampingi oleh orang tua. Uji normalitas dilakukan dengan Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas dengan *Lavene Statistic*. Untuk membandingkan jumlah sel CD4⁺IFN γ , eosinofil dan skor ACT antar kelompok perlakuan digunakan uji ANOVA *one way*. Untuk membandingkan jumlah eosinofil dan skor ACT sebelum perlakuan, setelah induksi dan setelah rumatan juga digunakan uji ANOVA *one way* pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

HASIL

Karakteristik Subjek

Total subjek pada penelitian ini adalah 32 anak terdiagnosa asma ringan yang menjalani rawat jalan di Poli Alergi dan Imunologi Anak Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar. Tabel 1 menunjukkan data karakteristik subjek penelitian. Didapatkan 1 pasien pada kelompok imunoterapi, probiotik dan *Nigella Sativa* yang *drop out* karena tidak meminum sesuai yang diharuskan. Distribusi sampel hasil randomisasi meliputi kelompok imunoterapi dan plasebo (n=8), kelompok imunoterapi dan probiotik (n=8), kelompok imunoterapi dan *Nigella sativa* (n=8), kelompok imunoterapi dan probiotik dan *Nigella sativa*

(n=7). Selama penelitian in berlangsung, tidak didapatkan efek samping pemberian imunoterapi, *Nigella sativa* maupun probiotik.

Tabel 1. Karakteristik subjek

Karakteristik	kelompok A (n=8)	kelompok B (n=8)	Kelompok C (n=8)	kelompok D (n=7)	Total (n=31)
a. Jenis Kelamin					
Laki-laki	5 (5/8)	2 (2/8)	4 (4/8)	4 (4/7)	15
Perempuan	3 (3/8)	6 (6/8)	4 (4/8)	3 (3/7)	16
b. Usia (tahun)					
<5 tahun	1 (1/8)	1 (1/8)	1 (1/8)	0	3
≥ 5 tahun	7 (7/8)	7 (7/8)	7 (7/8)	7 (7/7)	21
c. Riwayat atopi orangtua					
tidak memiliki	2 (2/8)	2 (2/8)	1 (1/8)	3 (3/8)	8
memiliki	6 (6/8)	6 (6/8)	7 (7/8)	4 (4/8)	23
d. Hasil skin prick test					
HDM	3 (3/8)	4 (4/8)	2 (2/8)	1 (1/8)	10
HDM + food	3 (3/8)	2 (2/8)	4 (4/8)	5 (5/8)	14
HDM + pet	1 (1/8)	1 (1/8)	0	0	2
HDM + food + pet	1 (1/8)	1 (1/8)	2 (2/8)	1 (1/8)	5
e. Status gizi					
gizi baik	8 (8/8)	6 (6/8)	7 (7/8)	7 (7/8)	28
gizi kurang	0	2 (2/8)	1 (1/8)	0	3
f. Diagnosis					
asma <i>intermittent</i>	4 (4/8)	1 (1/8)	3 (3/8)	1 (1/8)	9
asma <i>mild persistent</i>	4 (4/8)	7 (7/8)	5 (5/8)	6 (6/8)	22

Perbandingan Rerata Jumlah CD4⁺IFN γ antar Kelompok Perlakuan

Hasil pemeriksaan *flow cytometry* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value}=0,367$) rerata CD4⁺IFN γ antara kelompok dengan perlakuan pemberian imunoterapi, imunoterapi dan jinten hitam, imunoterapi dan probiotik, dan imunoterapi, jinten hitam dan probiotik (Tabel 2). Rerata CD4⁺IFN γ tertinggi didapatkan pada kelompok imunoterapi dan probiotik ($17,5063 \pm 11,5762$).

Tabel 2. Perbandingan rerata CD4⁺IFN γ antar kelompok perlakuan

	Imunoterapi (A) ($\pm$ SD)	Imunoterapi + jinten hitam (B) ($\pm$ SD)	Imunoterapi+ probiotik (C) ($\pm$ SD)	Imunoterapi + jinten hitam + probiotik (D) ($\pm$ SD)	P value
CD4 ⁺ IFN γ (%)	10,121 $\pm$ 4,54	10,706 $\pm$ 9,213	17,506 $\pm$ 11,577	13,477 $\pm$ 9,632	0,367

Perbandingan Jumlah Eosinofil Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Tidak didapatkan perbedaan jumlah eosinofil yang signifikan antar kelompok perlakuan baik itu sebelum perlakuan ($p\text{-value}=0,441$), setelah fase induksi ($p\text{-value}=0,662$) dan setelah fase rumatan ($p\text{-value}=0,760$) yang ditunjukkan pada Tabel 3. Jika dilihat tiap kelompok, seperti pada Tabel 3, juga didapatkan perbedaan yang tidak signifikan antara eosinofil sebelum perlakuan, setelah induksi dan setelah rumatan baik itu pada kelompok imunoterapi dan plasebo ($p\text{-value}=0,363$); imunoterapi dan jinten hitam ($p\text{-value}=0,766$); imunoterapi dan probiotik ($p\text{-value}=0,298$) dan imunoterapi, jinten hitam dan probiotik ($p\text{-value}=0,500$).

Tabel 3. Hasil perbandingan rerata eosinofil sebelum perlakuan, setelah induksi dan setelah rumatan antar kelompok perlakuan

	Imunoterapi + plasebo ($\pm$ SD)	Imunoterapi + Jinten hitam ($\pm$ SD)	Imunoterapi + probiotik ($\pm$ SD)	Imunoterapi + probiotik + jinten hitam ($\pm$ SD)	P value
Eosinofil(%) pre perlakuan	5,050 $\pm$ 3,359	8,413 $\pm$ 5,579	8,400 $\pm$ 6,015	6,671 $\pm$ 2,951	0,441
Eosinofil(%) post induksi	5,187 $\pm$ 3,096	6,875 $\pm$ 2,749	5,513 $\pm$ 3,666	6,714 $\pm$ 3,367	0,662
Eosinofil(%) post rumatan	6,938 $\pm$ 2,019	7,363 $\pm$ 4,008	8,912 $\pm$ 3,628	7,943 $\pm$ 5,320	0,760

Peningkatan Skor ACT Sebelum dan Sesudah Perlakuan

Skor ACT setelah fase rumatan memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan (p -value=0,02). Hal tersebut berbeda dengan skor ACT sebelum perlakuan yang tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok (p -value=0,45) seperti ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil perbandingan skor ACT sebelum perlakuan dan setelah rumatan antar kelompok perlakuan

	Imunoterapi+ plasebo	Imunoterapi+ Jinten hitam	Imunoterapi+ probiotik	Imunoterapi+ probiotik+ jinten hitam	P value
ACT pre perlakuan	16,5 $\pm$ 1,414	14,38 $\pm$ 4,307	15,75 $\pm$ 2,121	15,86 $\pm$ 1,464	0,45
ACT post rumatan	20,25 $\pm$ 1,035	20,62 $\pm$ 1,598	22,62 $\pm$ 2,066	22,29 $\pm$ 1,704	0,02

Tabel 4 menunjukkan perbandingan rerata skor ACT pada tiap kelompok. Dalam penelitian ini didapatkan peningkatan skor ACT yang bermakna pada masing-masing kelompok sampel yang mendapat imunoterapi dan plasebo (p -value=0,000< α), imunoterapi dan jinten hitam (p -value=0,002), imunoterapi dan probiotik (p -value=0,000) dan imunoterapi, jinten hitam dan probiotik (p -value=0,000). Skor ACT post rumatan yang tertinggi didapatkan pada kelompok imunoterapi dan probiotik (22,62 $\pm$ 2,066).

DISKUSI

Setelah pemberian perlakuan selama 56 minggu, didapatkan hasil bahwa ada perbedaan yang tidak bermakna secara statistik jumlah CD4⁺IFN γ setelah pemberian imunoterapi dan plasebo; imunoterapi dan jinten hitam; imunoterapi dan probiotik; serta imunoterapi, jinten hitam dan probiotik. Beberapa penelitian terdahulu mengenai peran IFN γ pada alergi memang memberikan hasil yang bervariasi. Pada penelitian oleh Ohashi *et al* pada penderita rinitis alergi serbuk bunga dengan imunoterapi subkutan dengan jangka waktu yang bervariasi menunjukkan bahwa tidak terdapat perubahan IL-4, IgE spesifik dan IFN- γ yang bermakna pada penderita yang menjalani imunoterapi kurang dari 3 tahun (18). Begitu juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Van Bever yang menyatakan bahwa tidak ada perubahan kadar IFN- γ yang bermakna setelah pemberian imunoterapi (19). Gardner dalam penelitiannya menggunakan *flowcytometri* juga

menyatakan tidak ada perubahan bermakna dari prosentase CD4⁺IFN γ setelah pemberian imunoterapi selama 9 bulan (20). Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Majori dan Hyo-bin yang menyatakan terdapat peningkatan CD4⁺IFN γ setelah pemberian imunoterapi (21,22). Walaupun demikian pada penelitian-penelitian tersebut semua subjek penelitian mengalami perbaikan secara klinis setelah pemberian imunoterapi tanpa harus didapatkan peningkatan signifikan dari CD4⁺IFN γ . Hal ini kemungkinan disebabkan mekanisme imunoterapi dalam menurunkan respon pembentukan sitokin Th2 tidak harus melalui mekanisme peningkatan Th1.

Efektivitas dari imunoterapi bergantung pada jenis antigen, dosis dan durasi. Penelitian menurut Fujita *et al* menyebutkan imunoterapi baru memberikan efek modulasi respon imun setelah minimal 6 bulan (23). Penelitian lain yang dilakukan oleh O'Hehir *et al* dengan menggunakan imunoterapi sublingual HDM menunjukkan pada pemberian imunoterapi setelah 12 bulan baru terdapat peningkatan produksi TGF- β dan IL-10 yang dihasilkan oleh Treg ((CD4(+)/CD25(+)/CD127(lo)/Foxp3(+)) dan terjadi peningkatan IFN- γ (24).

Dari 31 sampel didapatkan 10 pasien dengan uji kulit positif terhadap HDM saja sedangkan 21 lainnya memiliki hasil uji cukit kulit positif terhadap HDM dan alergen lainnya. Imunoterapi yang diberikan adalah HDM spesifik sehingga hasil CD4⁺IFN γ yang bervariasi dapat disebabkan karena faktor alergen yang multipel. Pasien dengan atopi cenderung memiliki kadar IFN γ lebih rendah dibandingkan non atopi dan setelah dilakukan rangsangan dengan antigen spesifik maka kadar IFN γ pada kelompok atopi dapat meningkat lebih tinggi dibandingkan kelompok normal atau non atopi (25). Pada penelitian ini kemungkinan variasi hasil bisa juga dipengaruhi oleh faktor atopi.

Pada kelompok imunoterapi dan probiotik didapatkan rerata CD4⁺IFN γ yang paling tinggi. Strain bakteri dalam probiotik merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan terapi probiotik dalam menginduksi toleransi imun (26). Penelitian mengenai penggunaan probiotik pada manusia khususnya dalam hal alergi masih kontroversi. Strain yang digunakan pada penelitian-penelitian dahulu berbeda-beda dengan dosis dan durasi yang tidak sama. Penggunaan probiotik dalam terapi penyakit alergi didasarkan pada kemampuan probiotik memodulasi *toll-like receptor* dan pengenalan antigen proteoglikan dari enterosit, yang akan mengaktifkan sel dendritik dan meningkatkan respon sel Th1, sehingga akan menurunkan respon sel Th2 (27). Probiotik dapat menginduksi perkembangan sel Treg yang akan memproduksi TGF- β dan IL-10 dan menghasilkan kondisi homeostasis dengan cara menghambat sitokin dari sel Th1 dan Th2 (28). Pada penelitian ini digunakan probiotik yang mengandung *Bifidobacterium lactis* dan *Lactobacillus acidophilus*. *L. acidophilus* merupakan penginduksi IL-12 yang poten dimana IL-12 merupakan sitokin yang meregulasi diferensiasi Th1 dan menghambat respon Th2. Hasil dari kelompok imunoterapi+probiotik ini juga menunjukkan perbaikan klinis yang lebih baik dibandingkan kelompok imunoterapi saja kemungkinan dikarenakan pergeseran ke arah Th2 melalui IL-12 bukan IFN γ .

Menurut penelitian Boskabady *et al* pada hewan coba

yang disensitisasi dengan ovalbumin kemudian diberikan ekstrak *Nigella sativa* dibandingkan dengan tanpa *Nigella sativa* didapatkan hasil kelompok yang mendapat *Nigella sativa* mengalami perbaikan gambaran patologis jaringan paru serta didapatkan peningkatan IFN γ yang signifikan (29). Pada penelitian Abbas yang membandingkan aktivitas anti-inflamasi dan bronkodilator dari *Nigella sativa* dengan *dexamethasone* pada tikus asma didapatkan hasil pada kelompok *Nigella sativa* terdapat penurunan eosinofil, IgG1 dan IgG2 dimana efek ini sebanding dengan *dexamethasone* (30). Kalus dalam penelitiannya menyebutkan *Nigella sativa* dapat memperbaiki gejala asma dan rinitis alergi (31). *Nigella sativa* dapat meningkatkan jumlah limfosit TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dan sel limfosit T CD8⁺ serta menurunkan jumlah sel limfosit T CD4⁺ (14). Penelitian-penelitian sebelumnya banyak yang menggunakan ekstrak atau sediaan oil sedangkan pada penelitian kami digunakan serbuk sehingga harus dipertimbangkan penelitian lanjutan untuk membandingkan penggunaan serbuk dengan ekstrak atau oil.

Menurut penelitian terdahulu pada pasien asma didapatkan hasil bahwa kadar IL-4 dan IFN γ pada cairan *bronchoalveolar* lebih tinggi dibandingkan dengan kadarnya pada darah perifer. Penelitian ini juga didukung oleh hasil penelitian dari Krug yang menunjukkan bahwa kadar IL-2 dan IFN γ yang diperiksa dari cairan *bronchoalveolar* pasien asma lebih tinggi dibandingkan kadar dalam darah perifer (32). Adanya perbedaan distribusi sel efektor yang bisa disebabkan oleh adanya peristiwa *homing* baik ke paru maupun ke organ limfonodi sekunder. Pada penelitian ini hanya dilakukan pengukuran kadar sitokin pada darah perifer sehingga perlu dipertimbangkan pengukuran kadar sitokin pada cairan *bronchoalveolar* untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.

Pada penelitian ini jumlah eosinofil darah tiap kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik. Dari keempat kelompok perlakuan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan baik sebelum perlakuan, setelah fase induksi dan setelah fase rumatan. Pada penelitian yang dilakukan Jang *et al* yang memeriksa beberapa penanda inflamasi saluran nafas antara lain *Nitric oxide* metabolit, eosinofil dan *Eosinophils Cationic Protein* (ECP) pada darah dan sputum menunjukkan eosinofil pada sputum merupakan penanda yang lebih akurat dibandingkan dengan penanda yang lain pada pasien asma (33). Penelitian yang dilakukan Halvani *et al* menunjukkan kadar eosinofil darah pada pasien asma lebih tinggi dibandingkan populasi normal. Selain itu juga ditunjukkan bahwa pada pasien asma yang menggunakan steroid inhalasi memiliki kadar eosinofil darah yang lebih rendah dibandingkan yang tidak menggunakan steroid. Pada penelitian sebelumnya oleh Gibson *et al* yang meneliti 18 pasien asma alergi yang terpapar alergen inhalasi, 13 diantaranya menunjukkan peningkatan kadar eosinofil dan basofil selama 24 jam setelah paparan. Pada penelitian yang dilakukan Evans *et al* menunjukkan bahwa pemakaian steroid inhalasi pada 10 pasien asma ringan menurunkan eosinofil darah. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa penggunaan steroid inhalasi dapat menurunkan kadar eosinofil darah, namun demikian hipotesis tersebut masih perlu diuji lebih jauh (34).

Penelitian yang dilakukan Spector dan Tan menunjukkan variasi yang signifikan dari kadar eosinofil darah dalam

rentang waktu 24 jam pada individu yang sama. Pada penelitian tersebut menunjukkan kadar tertinggi eosinofil dicapai sebelum sore hari. Pada penderita asma sedang menunjukkan variasi yang lebih beragam. Eosinofil darah tepi berasal secara umum dari sumsum tulang. Waktu paruh eosinofil pada sirkulasi adalah 18 jam. Rata-rata waktu transit pada darah adalah 26 jam, namun bisa juga lebih lama oleh sitokin yang mencetuskan keberadaan eosinofil seperti pada asma atau kondisi eosinofilik yang lain. Variasi dari jumlah eosinofil sering dihubungkan dengan efek menurunkan dari hormon kortisol. Kadar kortisol didapatkan pada jumlah yang paling tinggi pada pagi hari dan rendah pada malam hari (8). Faktor lain yang mempengaruhi jumlah eosinofil adalah stres fisik dan psikis, pengobatan dengan sistemik kortikosteroid, agen simpatomimetik, dan aminofilin. Pada penelitian sebelumnya yang meneliti dari berbagai bentuk klinis asma, pada pasien asma akut dan parah didapatkan hasil eosinofilia yang rendah, yang kemungkinan disebabkan oleh adanya stres yang meningkatkan sekresi kortisol (8).

Dari seluruh sampel didapatkan uji kulit positif terhadap HDM saja dan 17 lainnya memiliki hasil uji cukit kulit positif terhadap HDM dan alergen lainnya. Imunoterapi yang diberikan adalah HDM spesifik sehingga hasil eosinofili yang bervariasi dapat disebabkan karena faktor alergen yang multipel. Pasien dengan atopi cenderung memiliki kadar eosinofil lebih tinggi dibandingkan non atopi dan setelah dilakukan rangsangan dengan antigen spesifik maka kadar eosinofil pada kelompok atopi dapat meningkat lebih tinggi dibandingkan kelompok normal atau non atopi. Selain itu interaksi antara atopi dan peningkatan kadar eosinofil pada asma sangat kuat pada usia anak-anak dan mulai menurun pada dewasa (35). Pada penelitian ini kemungkinan variasi hasil bisa juga dipengaruhi oleh faktor atopi.

Dalam penelitian ini, nilai ACT pada semua kelompok perlakuan mengalami peningkatan. Penelitian oleh Kalus *et al* menunjukkan penurunan keluhan subjektif pada penderita alergi yang mengkonsumsi minyak jinten hitam (31). Penelitian Ahmad dkk pada anak dengan *wheeze* yang menunjukkan peningkatan *pulmonary index*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Isik dkk pada penderita rinitis alergika yang mendapatkan imunoterapi+jinten hitam (36,37). Studi-studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa *Nigella sativa* terbukti memiliki efek anti oksidan, anti histamin dan anti inflamasi (38,39). Pada studi hewan coba, efek anti histamin dari *Nigella sativa* disebabkan karena efek antagonis terhadap reseptor Histamin H1 dan juga memiliki efek *blocking* pada reseptor muskarinik. Efek dilatasi bronkus dari *Nigella sativa* bisa disebabkan karena *Nigella sativa* menghambat sistem syaraf *non-adrenergic non-cholinergic* (29). Perbaikan klinis pada studi ini, disebabkan oleh efek *Nigella sativa* sebagai anti inflamasi, anti histamin dan imunomodulator pada asma.

Skor ACT pada kelompok imunoterapi dan probiotik menunjukkan peningkatan yang signifikan dan memiliki rerata skor ACT yang paling tinggi setelah fase rumatan. Studi ini sama dengan studi sebelumnya oleh Chen *et al* bahwa pemberian *Lactobacillus gasseri* selama 2 bulan pada anak dengan asma dan rinitis alergi menunjukkan peningkatan fungsi paru, perbaikan gejala klinis asma dan rinitis alergi (16). Hasil yang berbeda didapatkan pada penelitian Giovanini dan Stockert yang memberikan probiotik *Lactobacillus casei* selama 1 tahun dan

Enterococcus faecalis selama 22 minggu yang tidak menunjukkan perbedaan klinis yang signifikan. Perbedaan ini bisa disebabkan perbedaan jenis probiotik, lingkungan dan individu yang menerima probiotik (40,41).

Mekanisme probiotik dalam memperbaiki klinis asma diduga berhubungan dengan efek anti inflamasi dan anti alergi. Studi yang dilakukan oleh Forsythe dengan pemberian *Lactobacillus uteri* menunjukkan bahwa pemberian probiotik bisa mencegah masuknya eosinofil pada lumen saluran nafas dan parenkim paru, serta dapat menurunkan TNF α , IL-5 dan IL-13 di cairan bronkoalveolar (42). Penelitian oleh Yu dan Lee menunjukkan sesudah perlakuan pemberian probiotik terdapat penurunan hiperresponsif saluran nafas, penurunan jumlah eosinofil, IgE, IL-4 dan IL-13 di cairan BAL model mencit asma (5,43).

Pada kelompok perlakuan pemberian imunoterapi, jinten hitam dan probiotik didapatkan juga perbedaan yang sangat bermakna rerata skor ACT. Selain itu rerata skor ACT setelah fase rumatan juga hampir sama besar dengan kelompok probiotik. Hal ini berarti bahwa kombinasi pemberian imunoterapi HDM, jinten hitam dan probiotik bermanfaat terhadap perbaikan klinis anak asma ringan. Perbaikan klinis ini bisa karena potensiasi dari efek anti inflamasi, anti histamin, dan imunomodulasi dari ketiganya.

Kelemahan pada studi ini adalah tidak diketahuinya jumlah CD4+IFN γ dan pada anak normal non asma

(kontrol sehat) dan pada anak asma yang tidak mendapat perlakuan. Tidak bisa diketahui apakah jumlah sel CD4+IFN γ dan eosinofil sebelum dimulainya perlakuan tersebut lebih rendah, sama atau lebih tinggi dibandingkan kontrol sehat. Selain itu, kecilnya jumlah sampel dapat menimbulkan bias seleksi dan rendahnya kontrol. Sampel tidak tinggal di rumah sakit pada keseluruhan penelitian sehingga tidak bisa mengontrol paparan lingkungan luar saat pengambilan sampel darah sehingga menimbulkan hasil yang bervariasi. Penelitian selanjutnya dibutuhkan dengan jumlah sampel yang lebih banyak dan mengontrol faktor-faktor seperti sensitivitas alergen, pencetus asma, obat-obatan lainnya.

Dapat disimpulkan secara imunologis pemberian ajuvan probiotik (*mixed live bacteria Lactobacillus acidophilus La-5TM, Bifidobacterium lactis Bb-12TM*) dan *Nigella sativa* tidak menimbulkan peningkatan jumlah CD4+IFN γ dan penurunan jumlah eosinofil anak asma ringan yang mendapat imunoterapi spesifik HDM setelah fase rumatan tetapi pemberian ajuvan tersebut menunjukkan manfaat secara klinis. Perlu dilakukan penelitian lain dengan menggunakan kontrol negatif yaitu anak normal non asma dan anak asma ringan yang tidak mendapat perlakuan. Penelitian lanjut harus mengendalikan variabel perancu yang ada dalam penelitian ini yaitu komorbiditas asma (rinitis alergi), dan positif terhadap sensitisasi selain HDM.

DAFTAR PUSTAKA

- Supriyatno B, Noenoeng R, dan Setyanto DB. *Pedoman Nasional Asma Anak*. Jakarta: IDAI; 2004.
- Pearce N and Dowes J. *The Global Epidemiology of Asthma in Children*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2006; 10(2): 125-32.
- Global Initiative for Asthma. *The Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. (Online) 2012. <http://www.ginasthma.org/>
- Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, and Johnston SL. *Increased Interleukin-4, Interleukin-5, and Interferon-Gamma in Airway CD4 and CD8 T Cells in Atopic Asthma*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2005; 171: 224-230
- Yu J, Jang SO, Kim BJ, et al. *The Effects of Lactobacillus rhamnosus on the Prevention of Asthma in a Murine Model*. Allergy Asthma and Immunology Research. 2010; 2(3): 199-205.
- National Asthma Education and Prevention Program. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*. Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services; National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute; 2007.
- Krug N, Erpenbeck VJ, Balke K, et al. *Cytokine Profile of Bronchoalveolar Lavage-Derived CD4⁺, CD8⁺, and $\gamma\delta$ T Cells in People with Asthma after Segmental Allergen Challenge*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2001; 25(1): 125-31.
- Spector SL and Tan RA. *Is a Single Blood Eosinophil Count a Reliable Marker for Eosinophilic Asthma?* Journal of Asthma. 2012; 49(8): 807-810.
- Taher YA. *Allergen Specific Immunotherapy: The Future Cure for Allergic Asthma Mechanisms and Improvement in a Mouse Model*. Journal of Allergy and Immunology. 2007; 2: 412-418.
- Yonekura S, Okamoto Y, Sakurai D, et al. *Sublingual Immunotherapy with House Dust Extract for House Dust-Mite Allergic Rinitis in Children*. Allergology International. 2010; 59(4): 381-388.
- Cevit O, Kendirli SG, Yilmaz M, Altintas DU, and Karakoc GB. *Specific Allergen Immunotherapy: Effect on Immunologic Markers and Clinical Parameters in Asthmatic Children*. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 2007; 17(5): 286-291
- Kopp MV. *Role of Immunomodulator In Allergen Specific Immunotherapy*. Allergy. 2011; 66: 792-797.
- Ozugurlu F, Sahin S, Idiz N, et al. *The Effect of Nigella sativa oil Against Experimental Allergic Encephalomyelitis via Nitric Oxide and Other Oxidative Stress Parameters*. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France). 2005; 51(3): 337-342.
- Paarakh PM. *Nigella sativa Linn.—A comprehensive Review*. Indian journal of Natural Products and Resources. 2010; 1(4): 409-429.
- Barlianto W, Kusuma HMSC, Widodo MA, and Suharto S. *Crude Extract of Black Seed (Nigella Sativa) Can Modulate Tcd4+Cd25+Foxp3+ Lymphocytes in Asthmatic Mouse Model*. Paediatric Respiratory Reviews. 2012; 13: 554.
- Yamamoto T. *Basic Aspect of Mucosal Immune System*. KOSEF-JSPS Asian Science Seminar; Development of Mucosal Vaccines From Basic Research to Clinical Application International Vaccine Institute (IVI). 2004.

17. Chen YS, Jan RL, Lin YL, Chen HH, and Wang JY. *Randomized Placebo Controlled Trial of Lactobacillus on Asthmatic Children With Allergic Rinitis*. *Pediatric Pulmonology*. 2010; 45(11): 1111-1120.
18. Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski MA, et al. *Development of the Asthma Control Test: A Survey for Assessing Asthma Control*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004; 113(1): 59-65.
19. Ohashi Y, Nakai Y, Kakinoki Y, et al. *Immunotherapy Affects the Seasonal Increase in Specific IgE and Interleukin-4 in Serum of Patients with Seasonal Allergic Rinitis*. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1997; 46(1): 67-77.
20. Van Bever, Vereecke, Bridts, Declerk, and Stevens. *Comparison between the In vitro Cytokine productin of Mononuclear Cells of Young Asthmatic with and Without Immunotherapy*. *Clinical & Experimental Allergy*. 1998; 28(8): 943-949.
21. Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, and O'Hehir RE. *Induction of T regulatory Cells by Standardized House Dust Mite Immunotherapy: An Increase in CD4+CD25+ Interleukin 10+ Tcells Expressing Peripheral Tissue Trafficking Markers*. *Clinical & Experimental Allergy*. 2004; 34(8): 1209-1219.
22. Majori M, Bertacco S, Piccoli ML, Melej R, Pillegi V, and Pesci A. *Specific Immunotherapy Downregulates Peripheral Blood CD4 and CD8 T-Lymphocyte Activation in Grass Pollen-Sensitive Asthma*. *European Respiratory Journal*. 1998; 11(6): 1263-1267.
23. Kim H, Jin H, Lee S, et al. *The Effect of Rush Immunotherapy with House Dust Mite in the Production of IL5 and IFN γ from the peripheral Blood T Cells of Asthmatic Children*. *Journal of Korean Medical Science*. 2009; 24(3): 392-397.
24. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, and Akdis CA. *Mechanisms of Allergen-Specific Immunotherapy*. *Clinical and Translational Allergy*. 2012; 2(1): 1-8.
25. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, et al. *House Dust Mite Sublingual Immunotherapy – The Role for TGF Beta and Functional Regulatory T Cells*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009; 180(10): 936-947.
26. O'Brien RM, Byron KA, Varigos GA, and Thomas WR. *House Dust Mite Immunotherapy Results in A Decrease in Der p-2 specific IFN-gamma and IL-4 Expression by Circulating T Lymphocytes*. *Clinical & Experimental Allergy*. 1997; 27(1): 46-51.
27. Choi IS. *Immune Tolerance by Induced Regulatory T Cells in Asthma*. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 2012; 4(3): 113-115.
28. Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, and Roy D. *Immunomodulatory Effect of Probiotics in The Intestinal Tract*. *Current Issues in Molecular Biology*. 2008; 10(1-2): 37-54.
29. Versalovic J, Iyer C, Lin YP, Huang Y, and Dobrogosz W. *Comensal-derived Probiotics as Anti-Inflammatory Agents*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2008; 20: 86-93.
30. Boskabady MH, Keyhanmanesh R, Khameneh S, Doostdar Y, and Khakzad MR. *Potential Immunomodulation Effect of the Extract of Nigella Sativa on Ovalbumin Sensitized Guinea Pigs*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2011; 12(3): 201-209.
31. Abbas AT, Abdel-Aziz MM, Zalata KR, and Abd Al-Galel Tel-D, *Effect of Dexamethasone and Nigella Sativa on Peripheral Blood Eosinophil Count, IgG1 and IgG2a, Cytokine Profiles and Lung Inflammation in Murine Model of Allergic Asthma*. *The Egyptian Journal of Immunology*. 2005; 12(1): 95-102.
32. Kalus U, Pruss A, Bystron J, et al. *Effect of Nigella sativa (Black Seed) on Subjective Feeling in Patients with Allergic Diseases*. *Phytotherapy Research*. 2003; 17(10): 1209-1214.
33. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, and Viola JP. *The Role of Interferon- γ on Immune and Allergic Response*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100(1): 137-144.
34. Jang A, Yeum C, and Choi I. *Nitric Oxide Metabolites, Eosinophils and Eosinophilic Cationic Protein in Patients with asthma: Sputum versus Blood*. *Journal of Korean Medical Science B*. 2003; 18(4): 489-493.
35. Halvani A, Tahghighi F, and Nadooshan HH. *Evaluation of Correlation between Airway and Serum Inflammatory Markers in Asthmatic Patients*. *Lung India*. 2012; 29(2): 143-146.
36. Arbes SJ Jr, Calatroni A, Mitchel HE, and Gergen PJ. *Age-dependent Interaction between Atopy and Eosinophils in Asthma Cases: Results from NHANES 2005-2006*. *Clinical & Experimental Allergy*. 2013; 43(5): 544-551.
37. Işık H, Çevikbaş A, Gürer ÜS, et al. *Potential Adjuvant Effects of Nigella sativa Seeds to Improve Specific Immunotherapy in Allergic Rinitis Patients*. *Medical Principles and Practice*. 2010; 19(3): 206-211.
38. Ahmad J, Khan RA, and Malik MA. *A Study of Nigella Sativa Oil in the Management of Wheeze Associated Lower Respiratory Tract Illness in Children*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010; 4(7): 436-439.
39. Gilani AH, Aziz N, Khurram IM, Chaudhary KS, and Iqbal A. *Bronchodilator, Spasmolytic and Calcium Antagonist Activities of Nigella Sativa Seeds (Kalonji): A Traditional Herbal Product with Multiple Medicinal Uses*. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 2001; 51(3): 115-120.
40. Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, and El-Kashef HA. *Thymoquinone-Induced Relaxation of Guinea-Pig Isolated Trachea*. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 2001; 110: 333-345.
41. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, et al. *A Randomized Prospective Double Blind Controlled Trial on Effects of Long-Term Consumption of Fermented Milk Containing Lactobacillus Casei in Pre-School Children with Allergic Asthma and/or Rinitis*. *Pediatric Research*. 2007; 62(2): 215-220.
42. Stockert K, Schneider B, and Porenta G. *The Effect of Acupuncture and Probiotics in Children with Asthma*.

Focus on Alternative and Complementary Therapies. 2007; 12(3): 194-196.

43. Forsythe P, Inman MD, and Bienenstock J. *Oral*

Treatment with Live Lactobacillus Reuteri Inhibits the Allergic Airway Response in Mice. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2007; 175(6):561-569.