

**PENGARUH IMUNOMODULASI TAHNIK KURMA  
AJWA TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI IL-12 DI  
MUKOSA PALATUM DAN PROFIL LIMFOSIT T DI SIRKULASI**

**Studi Eksperimental pada Tikus Neonatus Galur Wistar**

**DISERTASI**

**Disusun untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan Mencapai Gelar Doktor  
Program Studi Ilmu Kedokteran (S3)**



**Oleh**

**SUSILORINI**

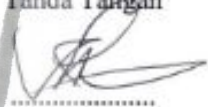


**T501508014**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN (S3)  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS SEBELAS MARET  
SURAKARTA  
2021**

*commit to user*

**PENGARUH IMUNOMODULASI TAHNIK TERHADAP  
EKSPRESI IL-12 DI MUKOSA PALATUM DAN  
PROFIL LIMFOSIT T DI SIRKULASI  
Studi Eksperimental pada Neonatus Tikus Wistar**

**DISERTASI**

	Oleh <b>SUSILORINI</b> T501508014		
	Nama		
Komisi Promotor Promotor	Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K) NIP. 195303311982021003	Tanda Tangan 	Tanggal 4/6/2021
Ko-Promotor I	Dono Indarto, dr., M. Biotech St., Ph.D NIP: 196701041996011001		3/6/2021
Ko-Promotor II	Brian Wasita, dr., Sp. PA. Ph.D NIP: 19790722005011003		3/6/2021

**Telah dinyatakan memenuhi syarat dan dinyatakan lulus  
Pada tanggal 26 Mei 2021  
Kepala Program Studi Ilmu Kedokteran S3  
Fakultas Kedokteran UNS**

  
Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K)  
NIP. 195303311982021003

*commit to user*

**PENGARUH IMUNOMODULASI TAHNIK TERHADAP  
EKSPRESI IL-12 DI MUKOSA PALATUM DAN  
PROFIL LIMFOSIT T DI SIRKULASI**

**Studi Eksperimental pada Neonatus Tikus Wistar**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Pada Sidang Tertutup dan  
Dinyatakan Telah Lulus Pada Tanggal 26 Mei 2021

**DISERTASI  
SUSILORINI  
T501508014**

**TIM PENGUJI**

Nama	Jabatan
Prof. Dr. Agus Kristiyanto, M.Pd NIP.196511281990031001	Ketua
Prof. Dr. Reviono, dr., Sp.P(K) NIP.196510302003121001	Sekretaris
Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K) NIP. 195303311982021003	Kepala Prodi/ Promotor
Dono Indarto, dr., M.Biotech St., Ph.D NIP.196701041996011001	Ko-Promotor I
Brian Wasita, dr.Sp.PA.Ph.D NIP. 19790722005011003	Ko-Promotor II
Prof.Dr.Adi Prayitno, drg., M.Kes NIP.19591101986011001	Pakar Dalam I
Vitri Widyaningsih, dr. MSc., Ph.D NIP.198204232008012001	Pakar Dalam II
Prof. Marsetyawan, dr., HNES, MSc., Ph.D NIP. 194809291975031006	Pakar Luar UNS

Tanda Tangan

Mengetahui  
Rektor Universitas Sebelas Maret

Prof. Dr. Jamal Wiwoho, SH, M. Hum.  
NIP. 196111081987021001

*commit to user*

**PANITIA PENGUJI DISERTASI****Ketua:**

Prof. Dr. Agus Kristiyanto, M.Pd

Ketua / Wakil Direktur Bidang Akademik Pascasarjana UNS

**Sekretaris:**

**Prof. Dr. Reviono, dr., Sp.P(K)**

Dekan FK UNS

**Anggota:**

1. Prof. Dr. Soetrisno, dr., Sp. OG(K)  
Kepala Program Studi S3 Ilmu Kedokteran UNS/ Promotor
2. Dono Indarto, dr., M. Biotech St., Ph.D  
Ko-Promotor 1
3. Brian Wasita, dr. Sp. PA. Ph.D  
Ko-Promotor 2
4. Prof. Dr. Adi Prayitno, drg., M. Kes  
Pakar Dalam UNS 1
5. Vitri Widyarningsih, dr. MSc., Ph.D  
Pakar Dalam UNS 2
6. Prof. Marsetyawan, dr., HNES, MSc., Ph.D  
Pakar Luar UNS  
Guru Besar Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada

## PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI

Saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Disertasi yang berjudul: "**Pengaruh Imunomodulasi Tahnik Kurma Ajwa pada Ekspresi IL-12 di Mukosa Palatum dan Profil Limfosit T Sirkulasi, I Studi Eksperimental pada Neonatus Tikus Wistar**" ini adalah karya penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dengan acuan yang disebutkan sumbernya, baik dalam naskah karangan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiaris, maka saya bersedia menerima sanksi, baik disertasi beserta gelar doktor saya dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi disertasi pada jurnal atau forum ilmiah harus menyertakan tim promotor sebagai *author* dan PPSK UNS sebagai institusinya. Apabila saya melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka saya bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, 3 Juni  
2021



Susilorini



## HALAMAN PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim, dengan menyebut asma Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Tiadalah semua ini terjadi karena kehendak Allah SWT, dan tidak ada daya upaya melainkan atas kehendak Allah SWT.

Karya ini merupakan salah satu persembahan saya kepada: Allah SWT dan Rasulullah SAW, Orang tua, suami, anak-anak saya dan seluruh keluarga, guru-guru saya dan seluruh teman dan sesama hamba Allah SWT yang sangat saya sayangi, dan saya bersyukur atas segala nikmat, perhatian, pengertian, dukungan dan kasih sayang melalui doa-doa yang dilantunkan dalam keheningan dan ketulusan hati.

Maka Allah mengilhamkan kepada jiwa itu jalan kefasikan dan ketakwaan (Allah bersumpah dengan bulan ketika mengikuti matahari tenggelam, ketika matahari tenggelam muncullah bulan. Allah bersumpah dengan siang ketika nampak jelas dengan cahayanya dan sinarnya menyingkap kegelapan. Allah bersumpah dengan malam jika telah menyelimutinya, dan kegelapan yang ada padanya. Allah bersumpah dengan langit dan aturan-aturan Allah atas makhluknya dan ialah yang menguasai. Allah bersumpah dengan bumi dan hamparannya dari semua arah. Allah bersumpah atas semua jiwa yang Allah ciptakan dengan sempurna ciptaanNYa, dan Allahlah yang mengetahui keadaan ciptaanNYa dan apa yang baik maupun yang buruk. QS.Asy-Syams).

“Maka tatkala mereka berpaling dari kebenaran , Allah memalingkan hati mereka”  
(QS.As-shaf:5)

Allah yang Maha Pengasih, yang telah mengajarkan Al-Qur'an, Dia menciptakan manusia, mengajarnya pandai bicara. Matahari dan bulan beredar menurut perhitungan dan tetumbuhan dan pepohonan keduanya tunduk kepadaNya. Dan langit telah ditinggikanNya dan Dia ciptakan keseimbangan agar kamu jangan merusak keseimbangan itu, dan tegakkanlah keseimbangan itu dengan adil dan janganlah kalian mengurangi keseimbangan itu. Dan Bumi telah dibentangkan-Nya untuk makhlukNya, di dalamnya ada buah-buahan dan pohon kurma yang mempunyai kelopak mayang dan biji-bijian berkulit dan bunga-bunga yang harum baunya. QS.Ar-Rahman: 1-13)

**Maka nikmat Allah yang manakah yang kamu dustakan?**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil ‘alamiin. Puji syukur kepada Allah SWT akhirnya penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal yang berjudul **“Imunomodulasi Tahnik Kurma Ajwa pada Ekspresi IL-12 di Mukosa Palatum dan Profil Limfosit T di Sirkulasi, Studi Eksperimental pada Neonatus Tikus Wistar”**.

Laporan hasil penelitian ini disusun dalam rangka memenuhi syarat kelulusan dalam Program Pendidikan S-3 Sains Kedokteran di Fakultas kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan manfaat baik di dunia dan akherat, bagi peneliti sendiri, bagi para pembimbing dan semua yang terlibat dalam penelitian ini, juga bagi masyarakat. Bimbingan dan arahan dari segenap tim Promotor dan Penguji senantiasa kami harapkan.

Selesaiannya disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Sebelas Maret.
2. Ketua Program Pasca Sarjana Universitas Negeri Sebelas Maret.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret.
4. Prof.Dr.Bambang Purwanto,dr,Sp.PD-KGH, FINASIM dan Prof. Dr. Soetrisno, dr., SpOG (K) selaku ketua Tim Penguji, Promotor dan Ketua Program Studi Pendidikan S3-Sains Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret.
5. Prof DR. Adi Prayitno, drg, MKes. selaku Penguji pakar dalam I
6. Prof. Marsetyawan,dr., MSc., Ph.D selaku penguji pakar luar.
7. Vitri Widyaningsih, dr, Ph.D selaku penguji pakar dalam ke II
8. Alm Prof.Dr.Suradi,dr.Sp.P (K), MARS, FIRS selaku Promotor.
9. Dono Indarto, dr., M.Biotech St., Ph.D selaku Ko Promotor I
10. Brian Wasita, dr. Sp.PA, Ph.D selaku Ko Promotor II

*commit to user*

11. Segenap dosen Program Doktor Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah banyak memberikan bekal ilmu pengetahuan, wawasan, dan pengalaman belajar yang sangat bermanfaat selama masa pendidikan.
12. Rektor Universitas Islam Sultan Agung
13. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
14. Dr.Sumarno, M.Si.Med, SpPA selaku pembaca sediaan imunohistokimia.
15. Para mahasiswa yang kami libatkan dalam penelitian ini Abang Ikhbal, Ardo Darma Saputra, dan Septi Ali.
16. Para staff, teknisi dan tenaga admin di LPPT 4 Universitas Gajah Mada.
17. Para teknisi dan tenaga admin di Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
18. Para teknisi dan tenaga admin di Bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Islam Sultan Agung.
19. Kedua orang tua kami ibunda Sri Hartati, dan alm. Ayahanda Sukanto yang telah mendidik dan mendoakan kami.
20. Suami kami DR.Ir. Achmad Syafii, M.Pd.I, Almh Ibunda Djanatun mertua kami, ananda Habibah Agyunina, Humaira Fadlina, Abdurrahim, Sofwa Aisyah, Sumayyah Izatuna, Fatimah Zuhrofana, Maryam Latifatunnisa, Muhammad Al Fatih, Aburrahman dan Abdullah yang senantiasa mendukung dan mendoakan kami.
21. Alm Nenek Sudarmi, kakak- kakak kami yang tercinta yang senantiasa mendoakan kami.
22. Segenap Civitas Akademika Universitas Negeri Sebelas Maret dan Universitas Islam Sultan Agung yang tidak kami sebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih banyak kekurangan, untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan disertasi ini.

Surakarta, 3 Juni 2021

*commit to user*



**RINGKASAN DISERTASI****PENGARUH IMUNOMODULASI TAHNIK KURMA AJWA  
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI *IL-12* DAN  
PROFIL LIMFOSIT T DI SIRKULASI****Studi Eksperimental pada Tikus Neonatus Galur Wistar**

Susilorini

NIM: T501508014

Periode neonatus merupakan periode kritis dalam perkembangan sistem imun manusia. Beberapa jalur sinyal seperti jalur sinyal yang diperantarai oleh *IL-12* mengalami penurunan regulasi, sehingga diferensiasi sel limfosit T dan aktifasinya cenderung pada respon imun yang bersifat imunotoleran (Gervasi dan Horton, 2014). Hal ini terutama akan mempengaruhi profil limfosit di darah dan proporsi limfosit *Th1* dan *Th2*,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , *Treg* dan T memori. Beberapa faktor yang melatarbelakangi kondisi ini adalah karena pada masa neonatus diversitas mikrobiota komensalnya masih belum lengkap dan seimbang. Kolonisasi mikrobiota komensal ini sangat penting bukan hanya dalam membangun sistem imun mukosa secara lokal akan tetapi juga secara sistemik. Keseimbangan ekosistem mikrobiota komensal tubuh pada masa neonatus dampaknya bisa mempengaruhi derajat kesehatan saat dewasa kelak. Saat ini diketahui banyak faktor yang menyebabkan neonatus cenderung mengalami kondisi ketidakseimbangan ekosistem yang disebut disbiosis seperti metode kelahiran melalui bedah Cesar, paparan antibiotik dan kondisi ibu yang juga mengalami disbiosis. Padahal disbiosis diketahui dapat menyebabkan berbagai macam penyakit baik infeksi, hipersensitivitas, metabolik, degeneratif dan neoplasia (Levy, 2017).

Tahnik diketahui sebagai metode memindahkan bakteri baik dari laki-laki dewasa pada neonatus dan telah dipraktekkan sebagai ajaran agama Islam dan dicontohkan oleh Nabi Muhammad SAW sejak masa awal perkembangan agama Islam (Ahmad, 2103). Tahnik adalah metode

*commit to user*

menggoreskan kunyahan kurma ke palatum dan gingiva neonatus. Bersama ASI keduanya akan menstimulasi sistem imun neonatus secara lokal dan sistemik. Mekanisme kerja tahnik menstimulasi sistem imun menyerupai mekanisme kerja metode transfer bakteri dan stimulasi orokutaneus. Kunyahan kurma mengandung oral microbiota, kandungan imunoreaktif dari saliva seperti sitokin,  $TGF-\beta$ , ekososome, kandungan bioaktif kurma seperti *chatelicidin* dan pelargonin akan meningkatkan aktivasi dan maturasi DCs mukosa memicu sekresi *IL-12*. Aktivasi DCs akan diikuti oleh diferensiasi, dan proliferasi sel T naif dan *ILCs*, dalam lingkungan yang tinggi *IL-12*, *IFN- $\gamma$* ,  $TGF-\beta$ , dan *retinoic acid*. Sel  $TCD8^+$  akan berproliferasi dan diikuti oleh apoptosis dan *survival* yang akan mengarahkan sel  $TCD8^+$  menjadi sel memori. Penggunaan kurma Ajwa dalam meningkatkan diversitas microbiota usus juga telah diteliti secara *in vivo* baik pada hewan coba maupun pada neonatus. Kurma sendiri terbukti mempunyai kemampuan imunomodulasi baik secara *in vitro* dan *in vivo*. Sebagai immunostimulant kurma terbukti mampu meningkatkan *IL-12* dan *IFN- $\gamma$*  (Karasawa *et al*, 2013)

Penelitian ini bertujuan untuk mengobservasi efek imunomodulasi tahnik dan pengaruh intensitasnya terhadap sistem imun seluler secara lokal dan sistemik. Secara lokal pengamatan dilakukan terhadap ekspresi *IL-12* di mukosa palatum, sedangkan secara sistemik pengamatan dilakukan pada profil limfosit T di sirkulasi dengan mengukur jumlah total limfosit, limfosit T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $FOXP3^+$  *TReg*, dan limfosit memori T  $CD8^+CD44^+$ . Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik yang menggunakan rancangan *posttest only control group design*. Subjek penelitian berupa neoatus tikus galur Wistar, berat badan 5-6 g, tidak cacat fisik, dan aktivitas tampak normal. Penelitian menggunakan 90 bayi tikus. Semua bayi tikus dikelompokkan berdasarkan induk yang sama. Baik pada tahap 1 dan 2 bayi tikus dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok terdiri tas 6 bayi tikus,

*commit to user*

yaitu kelompok kontrol, perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) dengan pengamatan dilakukan dengan 5 sekuen waktu yaitu hari ke-1, 5, 7, 13 dan 30. Kelompok kontrol hanya disusukan dengan ibunya.

Tahnik dilakukan dengan modifikasi, yaitu dengan mencampur kurma Ajwa yang digerus dengan saliva tikus jantan donor. Sebanyak 30g kurma ajwa digerus bersama saliva total dari donor tikus wistar jantan sampai halus. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditimbang sesuai dosis. Bayi tikus diberi perlakuan tahnik kurma yang diberikan dengan menggosokkan campuran saliva dan kurma yang sudah dihaluskan pada tempat yang steril ke langit-langit mulut/palatum sampai dengan ginggiva rahang atas dan bawah mulut bayi tikus 3 jam pada hari pertama setelah lahir menggunakan ujung logam yang disambungkan dengan alat *vibration meter*. Perlakuan tahnik hanya dilakukan 1 kali selanjutnya bayi dibiarkan menyusu kepada ibunya. Induk tikus putih galur Wistar dipelihara di dalam kandang plastik tertutup dan diberi alas sekam agar mudah menyerap air. Suhu ruangan dan kelembaban udara disesuaikan dengan keperluan fisiologis tikus berturut-turut, yaitu 26-28°C dan 70-80%. Induk tikus diberi makan berupa *pallet* dan air minum secara *ad libitum*. Kandang induk bayi tikus dibersihkan dan alas sekam diganti setiap 2-3 kali dalam satu minggu. Kesehatan bayi dan induknya diperiksa setiap hari. Pada hari ke-21 bayi tikus disapih dari induknya. Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi perlakuan tahnik intensitas ringan. Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi perlakuan tahnik intensitas berat. Terminasi dilakukan pada hari ke1, 5, 7, 13 dan 30. Pada hari ke-1 3 jam perlakuan setelah terminasi jaringan palatum dan mukosa gingiva dilakukan pengamatan ekspresi *IL-12* dengan metode imunohistokimia. Pengamatan ekspresi *IL-12* di mukosa palatum dan gingiva dilakukan dengan bantuan mikroskop *Olympus CX21* pada perbesaran 400x yang tersambung dengan kamera Optilab. Dilakukan pengukuran area fraksi yang mekspresikan *IL-12* dengan 2 kali pengamatan dengan selang waktu

*commit to user*

1 minggu menggunakan software *ImageJ RI.52a software* yang hasilnya diverifikasi oleh seorang ahli patologi anatomi.

Pengukuran terhadap 5 variabel yang dianalisis meliputi total limfosit, limfosit T  $CD4^+$ , limfosit T  $CD8^+$ , Limfosit Treg  $FoxP3^+$  dan limfosit memori T  $CD8^+CD44^+$  menggunakan flowsitometri dilakukan pada hari ke-1, 5, 7, 13 dan 30. Darah kelompok hari ke-1 diambil dengan melakukan dekapitasi. Darah kelompok hari ke-5, 7, 13 dan ke-30 diambil secara intrakardial. Sebelum diambil darahnya semua bayi tikus dianestesi. Darah digunakan untuk perhitungan jumlah limfosit di darah dengan flowsitometri. Marker pada permukaan sel dilakukan pengecatan dengan antibodi monoklonal terkonjugasi dengan label pewarna FITCs dan enzim peroksidase, serta antibodi isotype pasangannya, antibody anti  $CD4^+$  yang terkonjugasi dengan *PerCP / PE Cy7-A* 5  $\mu$ l, antibodi anti  $CD8^+$  yang terkonjugasi dengan *PE-A* 5  $\mu$ l, antibodi anti  $CD44$  yang terkonjugasi dengan *FiTc-A* 5  $\mu$ l. Sampel kemudian di analisa dengan *FACScan cytometer BD Facs Aria* dengan *Facs Diva software*.

Data ekspresi *IL-12* dari 2 kali pembacaan dilakukan analisis Blant Altman untuk mengetahui *level of agreement* dari 2 kali pembacaan dan dianalisis dengan uji *One Way Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc*. Data dari darah yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji *One Way Anova* dan *repeated Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc*, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Withney U. Taraf signifikansi  $\alpha=0,05$ .

Uji *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan nilai rerata dari ke-6 variabel diantara berbagai kelompok perlakuan pada waktu tertentu. Adapun *Repeted Anova* digunakan untuk menganalisis apakah terdapat perbedaan mengenai perubahan jumlah total limfosit, limfosit T  $CD4^+$ , limfosit T  $CD8^+$ , Limfosit Treg  $FoxP3^+$  dan

*commit to user*

limfosit memori T  $CD8^+CD44^+$  di darah dari waktu ke waktu pada kelompok tertentu. Hasil uji *One Way Anova* dan *Repeated Anova* menunjukkan perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Analisis data dilakukan dengan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 24.0 for Windows. Hasil dari penelitian ini menunjukkan :

- a. Perlakuan tahnik baik intensitas ringan dan kuat keduanya meningkatkan ekspresi *IL-12* di mukosa palatum neonatus Wistar. Intensitas tahnik mempengaruhi ekspresi *IL-12*. Rerata tertinggi adalah pada kelompok tahnik dengan intensitas keras. Rerata ekspresi *IL-12* kelompok kontrol adalah  $4,457 \pm 0,822$  kelompok tahnik intensitas ringan  $6,504 \pm 1,401$ , dan kelompok tahnik intensitas keras  $14,161 \pm 3,038$ . Terdapat perbedaan antar semua kelompok ( $p=0,0001$ ). Terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan tahnik ringan ( $p=0,0001$ ), kontrol dengan tahnik keras ( $p=0,0001$ ), tahnik ringan dengan tahnik keras ( $p=0,0001$ ).
- b. Perlakuan tahnik meningkatkan jumlah limfosit total pada darah pada hari ke-5,7,13 dan 30. Baik tahnik ringan maupun keras keduanya dapat meningkatkan jumlah total limfosit. Tidak terdapat pengaruh intensitas tahnik terhadap jumlah total limfosit di darah.
- c. Perlakuan tahnik mempengaruhi jumlah limfosit T  $CD4^+$  di darah pada hari ke- 1 dan ke-5. Dimana pada hari ke-1 dan ke-5 ini tahnik meningkatkan jumlah limfosit T  $CD4^+$  akan tetapi pada hari ke- 13 terjadi penurunan jumlah limfosit  $CD4^+$  yang diikuti dengan kenaikan pada hari ke-30 yaitu pada kelompok tehnik keras.
- d. Tapi perbedaan pada hari ke-30 ini tidak bermakna. Terdapat perbedaan hanya pada hari ke-1 ( $p=0,012$ ) dan ke-5 ( $p=0,002$ ).
- d. Tahnik meningkatkan jumlah limfosit *Treg FoxP3<sup>+</sup>* di darah pada hari ke-1, ke-5,7 dan 13. Pada hari ke-30 tidak ada perbedaan pada semua kelompok. Pada hari ke-1, dan ke-5 terdapat perbedaan antara

*commit to user*



intensitas ringan dan keras, akan tetapi pada hari ke-7 dan ke-13 tidak ada perbedaan antar intensitas.

- e. Tahnik meningkatkan jumlah limfosit T  $CD8^+$  di darah pada hari ke-5, ke-13 dan ke-30. Perbedaan intensitas tahnik tidak menimbulkan pengaruh. Pola perkembangan limfosit T  $CD8^+$  menunjukkan adanya fase penurunan pada hari ke-13, akan tetapi penurunan ini diikuti dengan peningkatan pada hari ke-30.
- f. Tahnik meningkatkan jumlah limfosit memori T  $CD8^+ CD44^+$  terlihat pada hari ke-13 dan hari ke-30. Profil limfosit memori T  $CD8^+$  pada kelompok tahnik ringan dan tahnik keras menunjukkan pola yang serupa, sedangkan kelompok kontrol menunjukkan pola yang berbeda terutama pada hari ke 13. Bila kelompok kontrol pada hari ke-13 menurun, maka pada kelompok tahnik baik ringan maupun keras justru cenderung menetap dan sedikit menurun pada hari ke-30. Pada hari ke-30 terlihat semua kelompok mengalami penurunan, akan tetapi baik kelompok tahnik ringan maupun keras reratanya masih lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tahnik mempunyai efek imunomodulasi yaitu berupa imunostimulasi pada limfosit T  $CD8^+$ , dan limfosit memori T  $CD8^+ CD44^+$ . Selain itu juga imunoregulasi dengan mempengaruhi jumlah limfosit Treg  $FOXP3^+$ . Hasil penelitian ini konsisten dengan hasil penelitian Karasawa *et al* (2011, 2013), meskipun jenis kurma digunakan Karasawa adalah kurma yang berbeda yaitu kurma Khalas dari Mesir. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tahnik menggunakan kurma Ajwa mampu meningkatkan ekspresi  $IL-12$  dan hal ini sejalan dengan penelitian Karasawa *et al* (2011). Kurma dengan polifenolnya pada penelitian Karasawa (2011) telah dibuktikan mampu meningkatkan ekspresi  $mRNA IFN-\gamma$  dan  $IL-12$  baik secara *in vivo* maupun secara *in vitro* (Karasawa, 2011). Penggunaan kombinasi polifenol dengan lipopolisakarida dari microbiota komensal juga telah

*commit to user*

diketahui memicu maturasi *DCs*, dan produksi sitokin proinflamasi seperti *IFN- $\gamma$*  dan *IL-12* (Corno, 2012).

Paparan kurma bercampur saliva terhadap mukosa palatum dan gingiva akan menimbulkan dampak yang sistemik, oleh karena diketahui mukosa palatum terutama adalah area yang permeabilitasnya tinggi dan merupakan area induktif yang dekat dengan area *NALT*. Penggoresan pada area ini akan memicu pengeluaran sitokin yang berefek bukan hanya lokal tapi juga sistemik. Tahnik akan merangsang produksi *IL-12* baik oleh keratinosit maupun oleh *DCs* mukosa. Mekanisme kerjanya terjadi melalui rangsang mekanik berupa goresan pada keratinosit yang melapisi mukosa palatum dan gingiva dan juga melalui adanya polifenol kurma dan mikrobiota komensal mulut yang berasal dari saliva tikus jantan donor.

Aktifasi limfosit T *CD8<sup>+</sup>* naif terjadi setelah paparan antigen dan membutuhkan jalur sinyal ke-3. Pemberi sinyal utama dalam hal ini adalah *antigen-presenting cells (APCs)* professional seperti *DCs* dan keratinosit, yaitu melalui sinyal primer dan sekunder yang akan ditangkap oleh *T cell receptor (TCR)* dan melalui molekul kostimulator. Penggoresan pada keratinosit akan memicu keratinosit mengeluarkan sitokin pro inflamasi dan *DAMPs* yang akan memperkuat sinyal stimulasi pada sel limfosit. Saat ini diketahui penelitian baik secara *in vitro* dan *in vivo* membuktikan bahwa sitokin seperti *IL-12* dan *IFN* tipe 1 bahkan dapat menstimulasi sel T secara langsung. *Interleukin 12 (IL-12)* dan *IFN* tipe 1 akan meningkatkan ekspresi *CD25* yang akan menyebabkan proliferasi yang meningkat cepat yang dipicu oleh *IL-12* melalui aktivasi jalur *PI3K* dan ekspresi *FoxM1* yang merupakan regulator gen siklus sel positif. Sitokin *IL-12* bersama *IFN* tipe 1 bukan hanya akan meningkatkan kemampuan *survival* limfosit T efektor dan meningkatkan proliferasi sel, akan tetapi juga meningkatkan sensitifitas terhadap antigen melalui peningkatan aviditas antigen dengan meningkatkan sinyal terhadap *TCR*, yang akan meningkatkan pula sinyal di proksimalnya

*commit to user*

Sekresi sitokin pro inflamasi akan meningkatkan fosforilasi *ZAP-70*, *PLC- $\gamma$* , dan *ERK1/2* sebagai respon stimulasi *TCR* (Kim dan Harty, 2014).

Inflamasi yang melibatkan sel imun *innate* dapat menyebabkan sekresi sitokin yang dapat mendorong akumulasi sinyal yang optimal untuk diferensiasi limfosit efektor T *CD8<sup>+</sup>* (Kim and Harty, 2014). Terdapat beberapa sitokin yang diperlukan dalam mendorong perkembangan sel efektor dan sel memori. *Interleukin-12 (IL-12)* mempengaruhi sel T dan sel *NK* dan diperlukan dalam perkembangan *Th1*. Pearce *et al* (2007) menjelaskan bahwa *IL-12* diperlukan dalam stimulasi sel T *CD8<sup>+</sup>* dan saat ini diketahui merupakan salah satu jenis sitokin yang dikembangkan sebagai adjuvan vaksin. *Interleukin-12 (IL-12)* akan berikatan dengan reseptor *IL-12* dan mempengaruhi sel T *CD8<sup>+</sup>* menjadi sel T efektor teraktifasi. Di sisi lain peningkatan *IL-12* ini akan mempengaruhi homeostasis dari pembentukan sel memori T *CD8<sup>+</sup>* bersama dengan sitokin lain seperti *IFN- $\gamma$* , *IL-6* dan *TGF- $\beta$*  (Pearce *et al*, 2007; Kim dan Harty, 2014).

Tahnik selain meningkatkan *IL-12* dimungkinkan akan mempengaruhi pengeluaran sitokin lain yang mempengaruhi diferensiasi sel limfosit progenitor di stroma dan di sekitar mukosa yang menyebabkan terjadinya sirkulasi limfosit matur di darah. Kemampuan tahnik meningkatkan *Treg* yang diketahui mempunyai kemampuan regulator dengan mengeluarkan sitokin anti inflamasi seperti *IL-10*, dan *TGF- $\beta$* , yang diketahui dalam penelitian lain mungkin akan menghambat apoptosis sel limfosit *CD8<sup>+</sup>* dan sel memori dan meningkatkan kadar faktor *survival* seperti *IL-2* dan *IL-4* (Boyman, 2012).. Pola perkembangannya limfosit efektor dan memori meliputi fase ekspansi yang ditandai dari peningkatan jumlah sel dan fase kontraksi yang disebabkan adanya mekanisme apoptosis fisiologis yang terlihat dengan adanya penurunan jumlah setelah kurang lebih 13 hari paparan antigen, dan diikuti fase homeostatis setelah kurang lebih hari ke-30 paparan antigen. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mekanisme

*commit to user*

imunomodulasi mungkin tidak hanya dipengaruhi oleh intensitas tahnik, dan ekspresi *IL-12* saja. Pada intensitas goresan yang kuat (7-9 mm/s) rerata ekspresi *IL-12* yang lebih tinggi dibanding intensitas goresan ringan (3-5mm/s), akan tetapi terbukti secara sistemik jumlah limfosit total,  $CD8^+$  dan limfosit memori tidak tergantung pada intensitas goresan tahnik. Faktor yang lain yang berperan selain goresan adalah mikrobiota komensal yang terkandung pada saliva serta komponen prebiotik pada kurma Ajwa, yang memungkinkan kolonisasi mikroba komensal di sepanjang mulut dan saluran cerna. Saat ini diketahui bahwa palatum dan gingiva adalah area kolonisasi bakteri dimana area palatum adalah area yang disebutkan sebagai area *systemic shedding* karena dapat menyebabkan penyebaran mikroba secara sistemik ke tempat lain.

Selain itu kandungan saliva dan efek dari kandungan kurma seperti betakaroten, dan lignin akan meningkatkan lingkungan mikro yang kaya *retinoic acid* dan *SCFA* sehingga terjadi diferensiasi *Treg* yang meningkat. Kolon merupakan area yang secara kronik terekspose bakteri komensal dan terdapat hipotesa bahwa anak tikus yang mempunyai *Treg* rendah terjadi karena ususnya belum terkolonisasi oleh bakteri komensal dewasa (Cahenzli *et al*, 2012; Hill *et al*, 2017). Saat ini diketahui bahwa diferensiasi *Treg* dapat dipicu dengan berbagai cara seperti pemberian bakteri komensal dewasa melalui metode transplantasi bakteri, pemberian *TGF- $\beta$* , pemberian antigen makanan, pemberian bakteri probiotik, dan pemberian *SCFA*. Populasi *Treg* di kolon berasal dari timus (*tTreg*) dan dari perifer (*pTreg*) (Nutchs *et al*, 2018). Penelitian Nutchs *et al* (2018) membuktikan bahwa pemberian mikroba komensal dengan metode *fecal transplant therapy* akan mengaktifasi diferensiasi *Treg* secara cepat dalam waktu 1 hari setelah pemberian ekspresi *FoxP3* yang tinggi didapatkan pada hari ke-2, sedangkan pada penelitian secara *in vivo* yang lain (Gottschalk *et al*, 2010; Kretschmer *et al*, 2005; Weissler *et al*, 2015) yang menggunakan antigen makanan diferensiasi *pTreg* diketahui terjadi

*commit to user*

pada hari ke-4 setelah pemberian antigen, ditandai oleh ekspresi *FoxP3*<sup>+</sup> yang dideteksi pada hari ke-4. Penelitian Atarashi *et al*(2011) yang memberikan spesies bakteri seperti *Clostridia* dan penelitian Geuking *et al* ( 2011) yang memberikan bakteri spesies lain pada tikus germfree membuktikan pengaruh bakteri dalam meningkatkan *pTreg*. Penelitian Cebula *et al* (2013) membuktikan bahwa setelah pemberian antibiotik bakteri komensal akan memicu proliferasi atau retensi dari *tTreg* yang reaktif terhadap antigen bakteri. Hasil penelitian Smith *et al* (2013) *bacteria-derived SCFA* dapat meningkatkan ekspansi dari *pTreg* yang sudah terdapat pada usus sebelumnya. Kolonisasi mikroba komensal dewasa pada usus neonatus pada beberapa penelitian akan menyebabkan diferensiasi *DCs* menjadi subset *DCs103*<sup>+</sup> yang akan menyebabkan sel T naif teraktifasi menjadi *Treg*. Secara *in vitro* menurut hasil penelitian Chen *et al*( 2003) terdapat peranan *TGF-β* dalam menginduksi *pTReg* dimana hanya dengan *TGF-β* saja sel T akan mengekspresikan *FoxP3*<sup>+</sup>. Menurut Konkel dan Chen (2011) *TGF-β* adalah faktor penting yang akan memicu sel T naif berdiferensiasi menjadi *Treg* di usus. Hasil penelitian Combes *et al* (2007) dan Welty *et al* (2013) menambah bukti bahwa *DCs103*<sup>+</sup> berperan dalam diferensiasi sel *Treg*. Hasil penelitian ini menunjukkan bukti bahwa tahnik dapat meningkatkan jumlah limfosit T *CD8*<sup>+</sup> pada hari ke-5, ke-13 dan ke-30 dan memori T *CD8*<sup>+</sup> pada hari ke-1, ke-7, ke-13 dan hari ke-30.

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan terdapat imunomodulasi tahnik terhadap ekspresi *IL-12* dan profil limfoist di sirkulasi dari neonatus tikus galur Wistar. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan mekanisme homeostasis ini dengan melihat parameter yang lain seperti *TGF-β*, *IL-10*, *IL-6*, dan *IFN-γ*.



## A SUMMARY OF DISSERTATION

### IMMUNOMODULATION OF TAHNEEQ ON PALATAL IL-12 EXPRESSION AND LYMPHOCITES T PROFILE IN SIRCULATION

Experimental Study on Neonatal Wistar rats

Susilorini

Student Number: T501508014

The neonatal immune system, which tends to be immunotolerant, makes it more susceptible to infection, especially due to viruses. Several signaling pathways, such as that are mediated by IL-12, are down-regulated, so that T lymphocyte differentiation and its activation tends to be immunotolerant (Gervasi and Horton, 2014). This mainly affects the lymphocyte profile in the blood and the proportion of Th1 and Th2 lymphocytes, CD4 +, CD8 +, TReg and T memory. Some of the factors behind this condition are due to the incomplete and balanced diversity of the commensal microbiota. This commensal microbiota colonization is very important not only in the development of the immune system locally but also systemically. The balance of the commensal microbiota ecosystem of the body is very important and the neonatal period is a critical period for the development of the human body ecosystem, its impact can affect the degree of health later of life. Currently, it is known that there are many factors that cause neonates to experience an imbalance in the ecosystem called dysbiosis, such as the method of delivery by C-section, exposure to antibiotics and the condition of the mother who also experiences dysbiosis. Even though dysbiosis is known to cause various kinds of diseases, including infection, hypersensitivity, metabolic, degenerative and neoplasia (Levy, 2017).

Tahnik is known as a method of transferring good bacteria from adult males to neonates and has been practiced as Islamic teachings and was exemplified by the Prophet Muhammad SAW since the early days of the development of Islam (Ahmad, 2103). Tahnik is a method of rubbing chewed dates onto the palate and gingiva of the neonates. Together with

*commit to user*

breast milk, both will stimulate the neonatal immune system locally and systemically. The mechanism of action of the technique to stimulate the immune system resembles the mechanism of action of the method of bacterial transfer and orocutaneous stimulation. The content of oral microbiota in saliva and breast milk microbiota together with immunoreactive content such as cytokines, TGF $\beta$ , exosomes, bioactive content of dates such as chatelicidin and pelargonin will increase the activation and maturation of mucosal DCs, triggering the secretion of IL-12. Activation of DCs will be followed by the differentiation and proliferation of naïve T cells and ILC, in an environment high in IL-12, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , and retinoic acid. TCD8 + cells will proliferate followed by apoptosis and survival which will lead TCD8 + cells to become memory cells.

The use of Ajwa dates in increasing the diversity of the gut microbiota has also been studied in vivo both in experimental animals and in neonates. Dates have been shown to have immunomodulating abilities both in vitro and in vivo. As an immunostimulant, dates are able to increase IL-12 and Interferon  $\gamma$  (Karasawa et al, 2013). How the effect of tahnik using Ajwa dates on IL-12 expression and neonatal cellular immune system has not been studied. This study aims to observe the effects of technical immunomodulation and the effect of its intensity on the cellular immune system locally and systemically. Locally, observations were made on the expression of IL-12 in the mucosa of the palate and gingiva, while systemically observations were made on the T lymphocyte profile in the blood by measuring the total number of lymphocytes, CD4 + T lymphocytes, CD8 +. FOXP3 + TReg, and CD8 + CD44 + T memory lymphocytes.

This study is a laboratory experimental study using a posttest only control group design. The research subjects were baby rats, Wistar strain, weight 5-6 g, not physically disabled, and normal activity. The study used 90 baby rats. All baby mice were grouped under the same parent. Both at stage 1 and 2 baby rats were divided into 3 groups, each group consisting of 6

*commit to user*

baby rats, namely the control group, treatment 1 (P1) and treatment 2 (P2) with observations carried out with 5 time sequences, namely day 1, 5, 7, 13 and 30. The control group only breastfeeds the mother.

Tahneeq was carried out with a modification by mixing crushed Ajwa dates with the saliva of donor male rats. A total of 30g of dates are crushed together with the total saliva from the male Wistar rat donor until smooth. The scour was put into a beaker glass and weighed according to the dosage. The neonatal Wistar rats were treated with the crushed dates which was given by rubbing it onto the roof of the mouth / palate to the gingiva of the upper and lower jaw 3 hours on the first day after birth using a metal tip that is connected with the vibration meter tool. The tahnik treatment is only done once, then the baby is allowed to breastfeed to the mother. Wistar white rats are kept in closed plastic cages and covered with husks to absorb water easily. Room temperature and humidity were adjusted according to the physiological needs of the rats, respectively, 26-28 ° C and 70-80%. Mother rats were fed with pellets and drinking water ad libitum. The cages of the mother mice were cleaned and the husks changed every 2-3 times a week. The health of the baby and its mother is checked every day. On the 21st day, baby rats were weaned from their mother.

Treatment group 1 (P1) was given a soft intensity technique. Treatment group 2 (P2) was given a hard intensity technique. Termination was carried out on days 1, 5, 7, 13 and 30. On day 1 about 3 hours of treatment after termination, the IL-12 expression the palate tissue and gingival mucosa was observed using immunohistochemical staining. Observation of IL-12 expression in the palate and gingival mucosa was carried out using Olympus CX21 microscope at 400x magnification connected to an Optilab camera. Measurement of the area fraction expressing IL-12 with 2 observations with an interval of 1 week using ImageJ R1.52a software, the results were verified by an anatomical pathologist.

*commit to user*

Measurements of the 5 variables analyzed included total lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, FoxP3<sup>+</sup>Treg lymphocytes and CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T memory lymphocytes using flowsitometry carried out on day 1, 5, 7, 13 and 30. Blood group day 1 taken by decapitation. Blood in the 5, 7, 13 and 30 day groups was taken intracardially. Before the blood was drawn, all the baby rats were anesthetized. Blood is used for calculating the number of lymphocytes in the blood by flowsitometry. Markers on the cell surface were stained with monoclonal antibodies conjugated with FITCs and peroxidase enzyme stain labels, as well as their partner isotype antibodies, anti CD4<sup>+</sup> antibodies conjugated with PerCP / PE Cy7-A 5 µl, anti CD8<sup>+</sup> antibodies conjugated with PE-A 5 µl, anti CD44 antibody conjugated with 5 µl FiTc-A. The sample was then analyzed using the FACScan BD Facs Aria cytometer with the Facs Diva software.

In this study, there were 6 variables analyzed including the expression of IL-12, total lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> lymphocytes, Treg lymphocytes and CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> memory lymphocytes in the blood, all of which were on a ratio scale with percentage units. The independent variable is the technical treatment divided into 2 intensities with a ratio scale with units of mm / s. The data of *IL-12* expression from 2 readings was carried out by Blant Altman analysis to determine the level of agreement from 2 readings and analyzed with the One Way Anova test followed by the Post Hoc test. Data from blood that was normally distributed and homogeneous were analyzed using the One Way Anova and repeated Anova tests followed by the Post Hoc test, while the data that were not normally distributed and homogeneous were analyzed using the Kruskal Wallis test and followed by the Mann Withney test. Significance level  $\alpha = 0.05$ .

The One Way Anova test is used to determine whether there is a difference in the mean value of the 6 variables between various treatment groups at a certain time. Repeated Anova is used to analyze whether there

*commit to user*

are differences regarding changes in the total number of lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, FoxP3<sup>+</sup> Treg lymphocytes and CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> T memory lymphocytes in the blood from time to time in certain groups. The results of the One Way Anova and Repeated Anova tests showed significant differences, so it was followed by the Post Hoc test. Data analysis was performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) version 24.0 for Windows.

The results of this study indicate:

- a. Both soft and hard tahneeq could increased IL-12 expression in the mucosa of the palate and gingiva of the neonate Wistar. The intensity affects IL-12 expression. The highest average was in the hard tahneeq group. The mean IL-12 expression in the control group was  $4.457 \pm 0.822$ , the soft tahneeq group was  $6.504 \pm 1.401$ , and the hard tahneeq group was  $14.161 \pm 3.038$ . There were differences between all groups ( $p = 0.0001$ ). There was a difference between the control group with soft tahneeq ( $p = 0.0001$ ), control with hard tahneeq ( $p = 0.0001$ ), soft tahneeq with hard tahneeq ( $p = 0.0001$ ).
- b. Tahneeq increased the total lymphocyte count in the blood on days 5,7,13 and 30. Both soft and hard tahneeq can increase the total number of lymphocytes. There is no effect of the intensity on the total number of lymphocytes in the blood.
  1. Tahneeq affected the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in the blood on the 1st and 5th day. Where on the 1st and 5th day tahneeq increased the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, but on the 13th day there was a decrease in the number of CD4<sup>+</sup> lymphocytes followed by an increase on the 30th day, namely in the hard tahneeq group. But the difference on day 30 was meaningless. There was a difference only on day 1 ( $p = 0.012$ ) and day 5 ( $p = 0.002$ ).
- c. Tahneeq increased the number of FoxP3<sup>+</sup> Treg lymphocytes in the blood on day 1, 5, 7 and 13. On day 30 there was no difference in all

*commit to user*



groups. On day 1, and 5 there was a difference between soft and hard tahneeq, but on day 7 and 13 there was no difference between the groups.

- d. Tahneeq increased the number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the blood on days 5, 13 and 30. The difference in the intensity has no effect. The pattern of CD8<sup>+</sup> T lymphocyte development showed a decreasing phase on day 13, but this decrease was followed by an increase on day 30.
- e. Tahneeq increased the number of CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> T memory lymphocytes seen on day 13 and day 30. The profiles of CD8<sup>+</sup> T memory lymphocytes in the soft and hard tahneeq groups showed a similar pattern, while the control group showed a different pattern, especially on the 13th day tends to settle down and decrease slightly by day 30. On the 30th day, it was seen that all groups experienced a decline, but both the soft and hard tahneeq groups had a higher average than the control group.

The results showed that tahneeq had an immunomodulating effect in the form of immunostimulation on CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> T lymphocytes. In addition, immunoregulation by affecting the number of FOXP3<sup>+</sup> Treg lymphocytes, although on day 30 the effect was not significant. Tahnik is a method of transferring oral microbiome of adult which includes 700 species of oral bacteria which is proven not only to affect locally but also systemically. In previous research, the use of dates in immunomodulating the immune system was proven by Karasawa et al (2011, 2013), although the type of dates used by Karasawa were different dates, namely Khalas dates from Egypt. The results of this study prove that tahnik using Ajwa dates can increase IL-12 expression and this is in line with the research of Karasawa et al (2011). Dates with their polyphenols in Karasawa's (2011) study have been shown to increase IFN  $\gamma$  and IL-12 mRNA expression both in vivo and in vitro (Karasawa, 2011). The use of a

*commit to user*

combination of polyphenols with lipopolysaccharides from commensal microbiota has also been shown to trigger the maturation of DCs, and the production of proinflammatory cytokines such as IFN  $\gamma$  and IL-12 (de Corno, 2012).

Naive CD8<sup>+</sup> T lymphocyte activation occurs after antigen exposure and requires a 3rd signaling pathway. The main signaling in this case is professional antigen-presenting cells (APCs) such as DCs and keratinocytes, namely through primary and secondary signals that will be picked up by the T cell receptor (TCR) and through costimulator molecules. Scratching on keratinocytes will trigger keratinocytes to release pro-inflammatory cytokines and DAMPS which will amplify stimulation signals in lymphocytes. It is now known that both in vitro and in vivo studies have shown that cytokines such as IL-12 and IFN type 1 can even stimulate T cells directly. IL-12 and IFN type 1 will increase the expression of CD25 which will cause a rapidly increasing proliferation triggered by IL-12 through the activation of the PI3K pathway and expression of FoxM1 which is the regulator of positive cell cycle genes. IL-12 cytokines together with IFN type 1 will not only increase the survival ability of effector T lymphocytes and increase cell proliferation, but also increase sensitivity to antigens through increased antigen avidity by increasing signaling to TCR which will also increase the proximal signal (Kim and Harty, 2014). The secretion of pro-inflammatory cytokines will increase the phosphorylation of ZAP-70, PLCgamma, and ERK1 / 2 as a response to TCR stimulation.

Inflammation involving innate immune cells can cause the secretion of cytokines that can promote the optimal signal accumulation for CD8<sup>+</sup>T effector lymphocyte differentiation (Kim and Harty, 2014). There are several cytokines needed to promote the development of effector cells and memory cells, and IL-12 is one of the important cytokines that are needed in this case. IL-12 affects T cells and NK cells and is required for Th1 development. Pearce et al (2007) explained that IL-12 is needed in the

*commit to user*

stimulation of CD8<sup>+</sup> T cells and currently it is known to be a type of cytokine developed as a vaccine adjuvant. IL-12 will bind to IL-12 receptors and influence CD8<sup>+</sup>T cells to become activated effector T cells. On the other hand, this increase in IL-12 will affect the homeostasis of the formation of CD8<sup>+</sup> T memory cells along with other cytokines such as IFN  $\gamma$ , IL-6 and TGF- $\beta$  (Pearce et al, 2007; Kim and Harty, 2014). In addition, tahneeq may affect the release of other cytokines that affect the differentiation of progenitor lymphocytes in the stroma and around the mucosa, which causes circulation of mature lymphocytes in the blood. The pattern of effector lymphocyte development and memory includes an expansion phase characterized by an increase in the number of cells and a contraction phase due to a physiological apoptotic mechanism which is seen in a decrease in the number after approximately 13 days of exposure to antigens, and followed by a homeostatic phase after approximately 30 days of antigen exposure.

The results of this study indicate that the immunomodulation mechanism may not only be affected by the intensity of the tahneeq, and the expression of IL-12 alone. At hard intensity (7-9 mm / s) the mean of IL-12 expression was higher than soft intensity (4-5mm / s), but it was proven that the total lymphocyte count, CD8<sup>+</sup> and memory lymphocytes count were not dependent on the intensity. Other factors that play a role besides scratching are the commensal microbiota contained in saliva and the prebiotic components of Ajwa dates, which allow the colonization of commensal microbes along the mouth and digestive tract. In this study, a mixture of dates and saliva containing not only the bioactive content of dates and saliva, but also oral commensal microbiota etched into the mucosa will cause a local inflammatory response that can trigger lymphocyte proliferation and differentiation, especially TCD8<sup>+</sup> lymphocytes, through response to keratinocytes, APCs, IL-12 expression and also T cells directly.

The ability of tahneeq to increase Tregs is known to have regulatory ability by secreting anti-inflammatory cytokines such as IL-10, and TGF- $\beta$  which are known in other studies to inhibit the apoptosis of CD8<sup>+</sup> lymphocytes and memory cells and increase levels of survival factors such as IL-2 and IL-4. Boyman, 2012). The effect of tahneeq on Treg may occur through a mechanism that is mediated by colonization of adult commensal microbes residing in the mouths of male saliva donor rats. It is currently known that the palate and gingiva are areas of bacterial colonization where the palate area is an area known as the systemic shedding area because it can cause systemic spread of microbes to other places.

In addition, the saliva content and the effects of dates such as beta-carotene and lignin will increase the microenvironment rich in retinoic acid and SCFA, resulting in increased differentiation of Tregs. The colon is an area that is chronically exposed to commensal bacteria and there is a hypothesis that young mice have low Tregs because their intestines have not been colonized by adult commensal bacteria (Cahenzli et al, 2012; Hill et al, 2017). It is currently known that Treg differentiation can be triggered in various ways, such as giving adult commensal bacteria through the bacterial transplantation method, administering TGF $\beta$ , administering food antigens, administering probiotic bacteria, and administering SCFA. Colon TReg populations originate from the thymus (tTreg) and from the periphery (pTreg) (Nutch et al, 2018). The research of Nutch et al 2018 proved that giving commensal microbes with the fecal transplant therapy method would activate Treg differentiation rapidly within 1 day, whereas in other in vivo studies within 2 day (Gottschalk et al, 2010; Kretschmer et al, 2005; Weissler et al, 2015), using food antigen pTreg differentiation was known to occur on the 4th day after antigen administration, indicated by FoxP3<sup>+</sup> expression detected on day 4.



**PENGARUH IMUNOMODULASI TAHNIK KURMA AJWA  
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI *IL-12* DI MUKOSA  
PALATUM DAN PROFIL LIMFOSIT T DI SIRKULASI  
Studi Eksperimental pada Tikus Neonatus Galur Wistar**

Susilorini  
T501508014  
ABSTRAK

**Latar Belakang:** Sistem imun imunotoleran menyebabkan neonatus lebih rentan mengalami infeksi terutama infeksi virus. Salah satu penyebabnya adalah karena diversitas mikrobiota yang rendah pada masa neonatus, dan adanya *down* regulasi pada jalur sinyal pengaktifan *IL-12*. Tahnik adalah metode memindahkan mikrobiota saliva laki-laki dewasa kepada neonatus yang diperkirakan dapat meningkatkan sistem imun. Penelitian ini bertujuan mengkaji pengaruh imunomodulasi pada ekspresi *IL-12* di mukosa palatum dan profil limfosit T di sirkulasi.

**Metode:** Penelitian eksperimental dengan desain *post-test only* menggunakan 90 ekor tikus galur Wistar baru lahir. Semua bayi tikus dikelompokkan berdasarkan induk yang sama, dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri atas 30 bayi tikus, yaitu kelompok kontrol (tanpa tahnik), perlakuan 1 (P1: mendapatkan tahnik ringan) dan perlakuan 2 (P2: mendapatkan tahnik keras). Semuanya mendapatkan ASI ad libitum. Pengamatan dilakukan dengan 5 sekuen waktu (hari ke-1, ke-5, ke-7, ke-13 dan ke-30). Terminasi dilakukan pada setiap sekuen waktu. Pengamatan terhadap ekspresi *IL-12* di mukosa hanya dilakukan pada hari ke-1. Sistem imun seluler (meliputi jumlah limfosit T  $CD4^+$ , *Treg FoxP3<sup>+</sup>*, limfosit T  $CD8^+$ , Limfosit memori T  $CD8^+CD44^+$  dan total limfosit) diamati menggunakan flowsitometri pada 5 sekuen waktu. Ekspresi *IL-12* dianalisis dengan uji *One Way Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc*. Data limfosit di darah yang terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan *repeated Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc*, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dan homogen dianalisis dengan uji Friedman dan dilanjutkan dengan uji Mann withney. Taraf signifikansi  $\alpha=0,05$ .

**Hasil:** Penelitian ini membuktikan bahwa tahnik meningkatkan ekspresi *IL-12* di mukosa dan mampu meningkatkan jumlah, limfosit T  $CD4^+$  (sejak hari ke-1), Limfosit T  $CD8^+$  (sejak hari ke-5), limfosit memori T  $CD8^+CD44^+$  (hari ke-13) *Treg FoxP3<sup>+</sup>* (hari ke-1, ke-5, ke-7 dan ke-13) dan total limfosit (hari ke-5, hari ke-7 dan hari ke-1) di darah. Intensitas tahnik tidak mempengaruhi sistem imun seluler.

**Kesimpulan:** Tahnik mampu meningkatkan ekspresi *IL-12* di mukosa dan mempengaruhi profil limfosit T di sirkulasi.

Kata kunci: tahnik, ekspresi *IL-12*,  $TCD4^+$ , *Treg*,  $TCD8^+$ , T memori  $CD8^+CD44^+$ , total limfosit



## IMMUNOMODULATION OF TAHNEEQ ON IL-12 EXPRESSION AND LYMPHOCITES T PROFILE IN SIRCULATION

Experimental Study on Neonatal Wistar rats

Susilorini

Student Number: T501508014

### ABSTRACT

**Background:** Neonatal immune system tend to immunotolerant response, which could lead to high risk of viral infection. Tahneeq as a microbial transfer method from adult saliva to the neonatus, may modulate neonatal immune system by the colonisation of the commensal microflora at the oral mucose and gastrointestinal tracts. The aim of this study is investigating the immunomodulation effect of tahneeq on IL-12 expression and cellular immune system of neonatal Wistar Rats

**Method:** This study is a post test only experimental study used 90 neonatal Wistar rats. This study divided in to 3 groups control(C only breastmilk without tahneeq), Treatment 1(T1, soft tahneeq), and treatment 2 (T2, hard tahneeq) and 5 sequence times. Termination was done at day 1, 5, 7, 13 and 30. At day 1 (third hours after tahneeq) this study observed the IL-12 expression on the palatal and gingival mucose of the neonatal Wistar Rats. IL-12 expression was investigated using immunohistochemistry staining methods. All groups were observed sequentially for the total lymphocytes, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, FOXP3<sup>+</sup>TReg cells and CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T memory cells. Lymphocytes profil was investigated using flowcytometry. Data from IL-12 expression were analyzed by One Way Anova. Some data from blood which were normal distributed and homogen, were analyzed by One Way Anova and Repeated Anova test followed by Post Hoc test. Some data were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. Significance level ( $\alpha$ ) = 0,05.

**Results:** Tahneeq were able to increased IL-12 expression. The hard tahneeq gived the highest IL-12 expression. Tahneeq were able to modulate the cellular immune system systematically, and it was showed by the increasing of total lymphocytes, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup>TReg, and CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T Memory cell's at different sequens days. The level of intensity did'nt influence the lymphocytes profile in the blood.

**Conclusion:** Tahneeq showed to immunomodulate local and systemic cellular immune system of neonatal Wistar Rats.

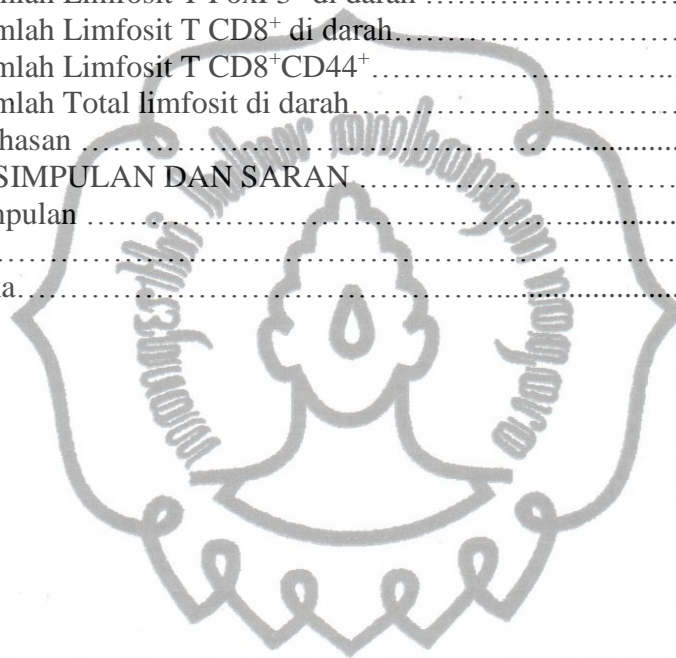
**Keywords:** Tahneeq, IL-12 expression, total lymphocyte, CD4<sup>+</sup>T cell's count, CD8<sup>+</sup>Tcell's count, FOXP3<sup>+</sup>Treg, CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>T cell's memory count.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN SUSUNAN TIM PROMOTOR .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
HALAMAN PANITIA PENGUJI .....	iv
PERNTAAN KEASLIAN DISERTASI .....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
RINGKASAN DISERTASI .....	ix
A SUMMARY OF DISSERTATION .....	xix
ABSRAK .....	xxviii
ABSTRACT .....	xxix
DAFTAR ISI .....	xxx
DAFTAR TABEL .....	xxxii
DAFTAR GAMBAR .....	xxxiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxxv
DAFTAR SINGKATAN .....	xxxvi
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	
A.Latar Belakang Masalah .....	1
B.Keaslian Penelitian .....	4
C.Rumusan Masalah .....	7
D.Tujuan Penelitian .....	7
E.Manfaat Penelitian.....	7
<b>BAB II. LANDASAN TEORI</b> .....	
A. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
1.Sistem Imun Neonatus.....	9
2.Imunomodulasi sistem imun neonatus.....	27
3.Ekspresi IL-12 di Mukosa Palatum.....	68
4.Tahnik.....	72
5.Aplikasi klinik ransangan mekanik pada mukosa.....	98
B. KERANGKA BERPIKIR.....	103
<b>BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b> .....	
A. Kerangka Konsptual .....	106
B. Hipotesis .....	107
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b> .....	
A. Jenis Penelitian .....	108
B. Rancangan Penelitian .....	108
C. Alur Penelitian.....	113
D. Penjelasan Alur Penelitian.....	114
E. Waktu Penelitian.....	116
F. Tempat Penelitian .....	116
G. Subyek Penelitian.....	116
H. Variabel Penelitian.....	118

*commit to user*

I. Definisi Operasional.....	118
J. Cara Kerja.....	120
K. Bahan dan Alat Penelitian .....	125
L. Etika Penelitian .....	127
M. Analisa Data .....	127
<b>BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	
A. Hasil Penelitian.....	133
1. Ekspresi IL-12 di Mukosa Palatum.....	133
2. Jumlah limfosit T CD4 <sup>+</sup> di darah.....	137
3. Jumlah Limfosit T FoxP3 <sup>+</sup> di darah .....	143
4. Jumlah Limfosit T CD8 <sup>+</sup> di darah.....	149
5. Jumlah Limfosit T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> .....	155
6. Jumlah Total limfosit di darah.....	161
B. Pembahasan .....	167
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	
A. Kesimpulan .....	184
B. Saran.....	185
Daftar Pustaka.....	188



## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Penelitian-penelitian terdahulu tentang kurma dan tahnik pada tikus.....	5
Tabel 2.1.	Biomolekul yang diproduksi oleh mikrobiota rongga mulut.....	15
Tabel 2.2.	Biomolekul tubuh yang mempengaruhi mikrobiota.....	16
Tabel 2.3.	Dampak defisiensi vit A dan RA pada diferensiasi sel T.....	57
Tabel 2.4.	Perbandingan kandungan mineral kurma Ajwa.....	76
Tabel 2.5.	Perbandingan kandungan protein pada kurma Ajwa dan kurma lain.....	77
Tabel 2.6.	Perbandingan flavonoid kurma ajwa dengan kurma lain.....	78
Tabel 2.7.	Perbandingan kandungan polifenol kurma Ajwa dibanding kurma lain.....	81
Tabel 2.8.	Perubahan saliva karena penyakit sistemik.....	85
Tabel 2.9.	Komponen protein dalam saliva.....	88
Tabel 2.10.	Kandungan hormon saliva.....	89
Tabel 4.1.	Definisi operasional.....	118
Tabel 4.2.	Indeks rata-rata berat badan dan tinggi badan balita sesuai dengan usianya.....	121
Tabel 4.3	Ringkasan uji statistik yang dilakukan pada variabel penelitian	132
Tabel 5.1.	Rerata Ekspresi IL-12 pada masing-masing kelompok.....	135
Tabel 5.2.	Rerata jumlah limfosit CD4 <sup>+</sup> di darah pada hari ke-1, 5, 7, 13, dan 30 pada masing-masing kelompok.....	137
Tabel 5.3.	Rerata jumlah limfosit TregFoxP3 <sup>+</sup> di darah pada hari ke-1, 5, 7, 13, dan 30 pada masing-masing kelompok.....	143
Tabel 5.4.	Rerata limfosit CD8 <sup>+</sup> pada hari ke-1, 5, 7, 13, dan 30 pada masing-masing kelompok.....	149
Tabel 5.5.	Rerata limfosit CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	155
Table 5.6	Rerata jumlah total limfosit di darah pada hari ke-1, 5, 7, 13, dan 30 pada masing-masing kelompok.....	161

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Distribusi	mikrobiota	11				
	tubuh.....						
Gambar 2.2.	Fase	kolonisasi	mikrobiota	mulut	13		
	manusia.....						
Gambar 2.3.	Area	induktif	dan	efektor	di	29	
	mukosa.....						
Gambar 2.4.	Proses	antigen	memicu	pertahanan	mukosa	dan	33
	sistemik.....						
Gambar 2.5.	Peranan sitokin pada mekanisme homeostasis proliferasi limfosit T CD8 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> .....						39
Gambar 2.6.	Mekanisme inhibisi Treg terhadap proliferasi dan apoptosis sel T efektor dan sel dendritik.....						47
Gambar 2.7.	Diversitas mikrobiota normal pada orang dewasa dan bayi baru lahir....						50
Gambar 2.8.	Contoh imunomodulasi oleh mikrobiota dan komponen makanan.....						52
Gambar 2.9.	Efek pleiotrofik retinoic acid pada sistem imun mukosa.....						56
Gambar 2.10.	Gambar efek pleiotropik stimulasi sel DCs.....						59
Gambar 2.11.	Respon imun terhadap antigen pada kondisi homeostasis dan inflamasi..						63
Gambar 2.12.	Contoh beberapa adjuvan vaksin pada neonatus .....						65
Gambar 2.13.	Keterbatasan produksi sitokin pada DCs neonatus.....						69
Gambar 2.14.	Stadium pematangan kurma menurut.....						75
Gambar 2.15.	Diagram distribusi eksosom pada saliva.....						93
Gambar 2.16.	Stimulus yang dapat memicu inflamasi pada keratinosit.....						94
Gambar 2.17.	Contoh proses pengeluaran DAMPs dan remodeling.....						96
Gambar 2.18.	Efek N.Vagus.....				stimulasi		98
Gambar 2.19.	Stimulasi oral pada neonatus preterm.....						99
Gambar 2.20.	Stimulasi orokutaneus.....				getaran		100
Gambar 2.21.	Gambar alat stimulator orokutaneus.....				getaran		101
Gambar 2.23.	Stimulasi nervus vagus dengan generator getaran subkutan yang						102

*commit to user*



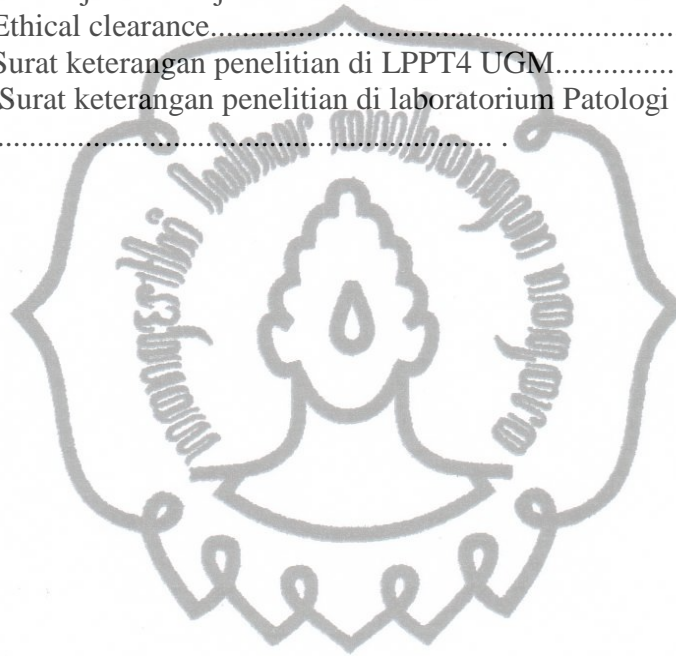
	diletakkan di dinding dada kiri.....	
Gambar 2.24.	Kerangka Berpikir.....	103
Gambar 3.1	Bagan Kerangka Konseptual Penelitian.....	106
Gambar 4.1.	Desain Penelitian.....	109
Gambar 4.2.	Alur penelitian.....	113
Gambar 5.1	Hasil pengecatan imunohistokimia ekspresi IL-12.....	134
Gambar 5.2.	Rerata ekspresi IL-12 pada mukosa palatum dan gingiva neonatus tikus Wistar yang diberi perlakuan tahnik.....	136
Gambar 5.3.	Pengaruh tahnik terhadap jumlah limfosit T CD4 <sup>+</sup> di darah bayi tikus Wistar.....	139
Gambar 5.4	Pola perubahan rerata jumlah limfosit CD4 <sup>+</sup> di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	141
Gambar 5.5 .	Hasil pemeriksaan flowsitometri jumlah limfosit T CD4 <sup>+</sup> .....	142
Gambar 5.6 .	Pengaruh tahnik terhadap jumlah limfosit Treg FoxP3 <sup>+</sup> di darah bayi tikus Wistar.....	145
Gambar 5.7.	Pola perubahan rerata jumlah limfosit Treg FoxP3 <sup>+</sup> di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	147
Gambar 5.8.	Hasil pemeriksaan flowsitometri pada jumlah limfosit TregFoxP3 <sup>+</sup> di darah.....	148
Gambar 5.9.	Pengaruh tahnik terhadap jumlah limfosit T CD8 <sup>+</sup> di darah bayi tikus Wistar.....	151
Gambar 5.10.	Pola perubahan rerata limfosit CD8 <sup>+</sup> di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	153
Gambar 5.11	Profil limfosit T CD8 <sup>+</sup> pada darah dengan flowsitometri.....	154
Gambar 5.12.	Pengaruh tahnik terhadap jumlah limfosit memori T CD8 <sup>+</sup> di darah bayi tikus Wistar.....	157
Gambar5.13.	Pola perubahan rerata jumlah limfosit CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	159
Gambar 5.14.	Profil limfosit limfosit memori TCD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> dihitung dengan flowsitometri.....	160
Gambar5.15.	Perbedaan rerata dari total limfosit dari hari ke hari pada masing-masing kelompok.....	163
Gambar5.16.	Pola perubahan rerata jumlah total limfosit di darah dari waktu ke waktu pada masing-masing kelompok.....	165

Gambar5.17. Hasil flowsitometri total limfosit pada bayi tikus Wistar pada hari ke-1, 5, 7, dan 30..... 166



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil uji statistik ekspresi IL-12.....	196
Lampiran 2. Hasil uji statistik jumlah limfosit TCD4+ di darah.....	202
Lampiran 3. Hasil uji statistik jumlah limfosit TregFOXP3+ di darah....	203
Lampiran 4. Hasil uji statistik jumlah limfosit TCD8+ di darah.....	202
Lampiran 5. Hasil Uji statistik jumlah limfosit Tmemori CD8+CD44+ di darah.....	210
Lampiran 6. Hasil uji statistik jumlah total limfosit di darah.....	213
Lampiran 7. Ethical clearance.....	217
Lampiran 8. Surat keterangan penelitian di LPPT4 UGM.....	218
Lampiran 9. Surat keterangan penelitian di laboratorium Patologi Klinik UGM.....	219



## DAFTAR SINGKATAN

ADP	: <i>adenosine diphosphat</i>
AHLs	: <i>Acyl-homoserine lactones</i>
AHR	: <i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
ATRA	: <i>All-trans-retinoic acid</i>
ATP	: <i>Adenosine tri phosphate</i>
APC	: <i>Antigen presenting cell</i>
APRIL	: <i>A proliferation inducing ligand</i>
ASC	: <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain</i>
BAFF	: <i>B cell-activating factor yang merupakan keluarga dari TNF</i>
BALT	: <i>Bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BCL-6	: <i>B cell lymphoma 6</i>
BPI	: <i>Bactericidal permeability increasing protein</i>
BPI-like proteins	: <i>Bactericidal permeability increasing like protein</i>
CCR7	: <i>C chemokine receptor 7</i>
CCLX9	: <i>Chemokine C-ligand 9</i>
CD	: <i>Cluster differentiation</i>
cDCs	: <i>Conventional dendritic cells</i>
CTLs	: <i>Citotoxic T lymphocytes</i>
CXCR5	: <i>CXC-chemokine receptor 5</i>
CXCL13	: <i>CXC-chemokine ligand 13 (</i>
DAMPs	: <i>Damaged antigen molecular patterns</i>
DCs	: <i>Dendritic cells</i>
dsRNA	: <i>Double strands ribonucleic acid</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAE	: <i>Follicle associated epithelium</i>
FALCs	: <i>Fat-associated lymphoid clusters</i>
FDCs	: <i>Follicular dendritic cells</i>
FLTs	: <i>Fat-associated lymphoid tissues</i>
FOXP3	: <i>Forkhead box P3</i>
FXR	: <i>Farnesoid X receptor</i>
GALT	: <i>Gastric-associated lymphoid tissue</i>
GPCR	: <i>G-protein coupled receptor</i>
GDP	: <i>Guanine diphosphate</i>
GTP	: <i>Guanine triphosphate</i>
GAP	: <i>GTPase activating protein</i>
HEV	: <i>High endothelial venules</i>
HMP	: <i>The Human microbiome project</i>
IBD	: <i>Inflammatory bowel disease</i>
iDCs	: <i>Interstitial dendritic cells</i>
iIELs	: <i>Induced intra epithelial lymphocytes</i>
ICAM 1	: <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	: <i>Interferon</i>

*commit to user*

IKK	: <i>Inhibitor kB kinase</i>
IKKe	: <i>Inhibitor kB kinase e</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
ILCs	: <i>Innate lymphoid cells</i>
ILFs	: <i>Isolated lymphoid follicles</i>
IP3	: <i>Inositol triphosphate</i>
IKK	: <i>Inhibitor kB kinase</i>
IKKe	: <i>Inhibitor kB kinase e</i>
IRAK	: <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	: <i>Interferon-regulatory factor</i>
ITAM	: <i>Its cytoplasmic tyrosine-based activation motif</i>
JAK	: <i>Janus tyrosine kinase</i>
JNK	: <i>c-JUN N-terminal kinases</i>
Lti	: <i>Lymphoid tissue inducer</i>
LXRs	: <i>Liver X receptors</i>
MADCAM 1	: <i>Mucosal vascular addressin cells adhesion molecule 1</i>
MAMPs	: <i>Microbes-associated molecular patterns</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mDCs	: <i>Myeloid dendritic cells</i>
mDCs	: <i>Migratory dendritic cells</i>
HC	: <i>Major histocompatibility complex</i>
MLNs	: <i>Mesenteric lymphonodes</i>
nAChRs	: <i>Nicotinic acethylcolin receptors</i>
NALT	: <i>Nasopharynx-associated lymphoid tissues</i>
NFkB	: <i>Nuclear factor kB</i>
nIELs	: <i>Natural intra ephitelial lymphocytes</i>
NIH	: <i>National Institute of Health</i>
Kp46	: <i>Natural killer (NK) cell markers 46</i>
NLRs	: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
NLT	: <i>Non lymphoid tissue</i>
PAMPs	: <i>Pathogen antigen moleccular patterns</i>
PBMCs	: <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
pDCs	: <i>Plasmacytoid dendritic cells</i>
pIgR	: <i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>
PLUNC	: <i>Palate lung and nasal epithelial clone proteins</i>
PPARs	: <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
PRRs	: <i>Patern recognition receptors</i>
PTK	: <i>Protein tyrosine kinase</i>
PuR	: <i>Purine receptors</i>
PXR	: <i>Pregnane X receptor</i>
RA	: <i>Retinoic acid</i>
RANK	: <i>Receptor activator of NF-κB</i>
RORγt	: <i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt</i>
SAPK	: <i>Stress protein kinase</i>
SCFA	: <i>Short chain fatty accid</i>

*commit to user*



ssRNA	: <i>Single strands ribonucleic acid</i>
STAT	: <i>Signal transducers activators of trancription</i>
TGF	: <i>Transforming growth factor</i>
TLR	: <i>Toll-like receptors</i>
TIR	: <i>Toll-IL-1 resistance domain</i>
TRAFs	: <i>Tumor Necrosing Factor-associated factors</i>
TBK1TANK- binding kinase 1	: <i>Transforming Growth Factor b Activated Kinase 1</i>
TSLP	: <i>Thymic stromal lymphopietin</i>
TCR	: <i>Tcell receptor</i>
VDR	: <i>Vitamin D receptor</i>

