

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Analisis Hasil

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terjadi peningkatan ekspresi TNF- α pada infeksi sekuensial *M. tuberculosis* yakni selama 8 minggu dan 16 minggu. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Infeksi *M.tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu. Sedangkan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α yang dikuantifikasi pada jaringan otak tikus dengan infeksi *M. tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu, dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Pemeriksaan dan perhitungan ekspresi TNF- α diamati dengan menghitung adanya warna coklat pada inti, inti, sitoplasma, dan dinding sel otak. Masing-masing slide pada bidang pandang dengan perbesaran 100x dan sebanyak 20 lapang pandang. Hasil dari penghitungan data kasarnya kemudian dianalisis untuk mengetahui hubungan antara kedua variabel. Berdasarkan hasil Uji statistik *linear correlation* didapatkan adanya hubungan yang kuat antara TNF- α dan lamanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Berdasarkan hasil penelitian ini, hubungan ekspresi TNF- α dengan lamanya infeksi *M. tuberculosis* pada *host* memiliki korelasi yang kuat artinya semakin lama infeksi yang terjadi maka semakin tinggi juga ekspresi TNF- α .

6.1.1 Patogenesis Ekspresi TNF- α pada Sel Otak *Mus musculus* yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis STRAIN H37RV dan CDC 151 memiliki kemampuan untuk merekonstruksi ulang sitoskeleton sehingga membuat bentuk sel menjadi tidak bulat lagi, sawar darah otak juga berubah bentuk sehingga kuman ini mampu masuk sendiri ataupun menembus bersama makrofag. Selain itu penelitian sebelumnya menggunakan otak pada penelitian ini juga telah membuktikan bahwa tidak ada perubahan ekspresi *VE Chaderin* pada *adherence junction* yang artinya sawar darah otak ini masih intact, tidak ada yang rusak. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ternyata leukosit/makrofag mampu masuk menembus sawar darah otak tanpa merusak strukturnya, yaitu dengan cara diapedesis.

Proses peradangan yang terjadi mengakibatkan aktivasi makrofag jaringan dan infiltrasi monosit. Jika proses peradangan tersebut terjadi pada otak maka mikroglia akan teraktivasi. Dalam penelitian ini, *M. tuberculosis* yang fokus primernya terbentuk di paru-paru kemudian pecah dan menyebar melalui peredaran darah dan limfe sehingga sampai di otak sebagai lokasi infeksi sekunder *M. tuberculosis* yang paling sering terjadi. Masuknya *M. tuberculosis* ke ruang subaraknoid mendorong produksi T CD4⁺ lokal sehingga berdiferensiasi menjadi Th1 (*T-helper 1*) dan Th2 (*T-helper 2*). Th1 akan bekerja untuk memproduksi IL-12 (*Interleukin 12*) dan IFN- γ (*Interferon γ*) yang pada awalnya akan memberikan respon imunoprotektif terhadap *M. tuberculosis*. Sementara Th2 menghasilkan IL-4 (*Interleukin 4*) dan IL-5 (*Interleukin 5*) yang berfungsi sebagai neuroprotektor dengan menekan aktivasi Th1 yang berlebihan serta menginduksi terjadinya proses inflamasi lebih hebat lagi. Kalau ditinjau dari dasar

imunologi, aktivasi mikroglia membutuhkan dukungan sitokin tertentu, terutama IFN- γ . IFN- γ dihasilkan oleh sel NK (*Natural Killer*) dan limfosit T CD1-restricted sebelum imunitas adaptif diaktifkan, tapi setelah imunitas adaptif diaktifkan, sumber utama IFN- γ adalah Th1. Sama seperti yang dijelaskan di atas setelah *M.tuberculosis* ditangkap mikroglia, maka mikroglia akan memproduksi beberapa sitokin termasuk diantaranya adalah TNF- α . Sementara itu, MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), ROS (*Reactive Oxygen Species*), NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) memainkan perannya sebagai anti-*M.tuberculosis* serta meningkatkan produksi sitokin seperti TNF- α .

Ketika terjadi aktivasi mikroglia di otak makan *M. tuberculosis* mulai dikenali oleh TLR (*Toll Like Receptor*) yakni gen pencetus inflamasi yang diekspresikan oleh sel mikroglia dan sel glia lainnya ketika terinfeksi *M.tuberculosis*. Tercetusnya TLR akan mengaktifkan jalur MyD88-dependent (*Myeloid Differentiation Protein 88*) dan IRAK (*IL-1 R-Associated Kinase*), mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B dan memicu produksi sitokin proinflamatori, antara lain IL-12 dan TNF- α . TNF- α akan mengerahkan lebih banyak lagi sel radang untuk menuju ke lokasi infeksi. Subfamili IRAK ada beberapa macam, tapi yang berperan besar dalam peningkatan sitokin adalah IRAK-1 dan IRAK-4. Keduanya akan berfosforilasi dan berikatan dengan TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) melalui reseptor TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*). TRAF6 dipisahkan dari reseptornya dan berikatan dengan TAK1, TAB1, dan TAB2 di membran sel, sehingga menghasilkan NF- κ B. Peningkatan produksi TNF- α juga dibuktikan akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak sehingga lebih mudah ditembus oleh makrofag.

6.1.2 Lokasi dan Jenis Sel yang Mengekspresi TNF- α pada Otak *Mus musculus*

Lokasi yang dominan mengekspresikan TNF- α adalah daerah parenkim otak. Mengapa paling banyak terjadi pada parenkim otak belum dapat diketahui dengan pasti alasannya. Penelitian lain yang menggunakan subjek kelinci juga menemukan bahwa ekspresi paling banyak terjadi pada bagian parenkim otak tapi juga belum bisa menjelaskan alasannya (Tsenova, 2000). Alasan sementara diduga karena TNF- α dihasilkan oleh mikroglia dan beberapa sel glia lain, di mana sel-sel ini berdistribusi banyak di bagian parenkim otak. Sehingga ekspresi TNF- α paling banyak terjadi di situ (Gary, Devin S, 2000). Pada penelitian ini, morfologi sel yang mengekspresikan TNF- α tidak nampak seperti mikroglia. Morfologi mikroglia adalah memiliki inti sel kecil dan bulat dikelilingi dengan banyak penjurulan berukuran kecil (Djuwita, 2012). Sel yang terlihat di mikroskop pada penelitian ini berbentuk bulat atau lonjong dan tidak nampak ada penjurulan berukuran kecil. Diduga bentuk sel ini adalah pembuluh darah, yakni arteriol serta venule. Pada penelitian ini nampak banyak sekali morfologi sel yang tercatat yang mengekspresikan TNF- α . Selain itu jika diperhatikan, seharusnya yang tercatat adalah sitoplasmanya, karena TNF- α diproduksi di sitoplasma, tapi pada penelitian ini, inti sel juga berwarna coklat.

6.1.3 Waktu yang diperlukan agar Ekspresi TNF- α muncul

Terdapat perbedaan yang jelas nampak dari segi waktu, jika hewan coba diinfeksi langsung pada otaknya dengan yang merupakan infeksi sekunder. Beberapa penelitian lain dengan hewan coba kelinci menunjukkan reaksi berbeda pada infeksi *M. tuberculosis*. 5 hari setelah infeksi terjadi, ekspresi TNF-

α sudah nampak pada parenkim otak dan kadar TNF- α juga sangat tinggi pada cairan serebrospinal (Tsenova, 2000). Sedangkan pada penelitian ini, nampak ekspresi TNF- α baru muncul pada minggu ke 8 dan sangat tinggi pada minggu ke 16. Sebelumnya, otak yang digunakan pada penelitian ini telah diuji imunohistokimia untuk diamati ekspresi mt38, yaitu antigen yang dimiliki oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Hasilnya positif dan terdapat peningkatan ekspresi antigen mt38 dari minggu ke 8 dan minggu ke 16. Hal ini mungkin saja terjadi dikarenakan jenis/strain *M.tuberculosis* yang mungkin saja berbeda dengan penelitian lain. *M. tuberculosis* jenis H37RV dan CDC 1151 adalah jenis yang paling sering menyerang manusia. Karena jenis ini memiliki kemampuan invasi serta mampu merubah struktur dari kompleks sel endotel pada otak manusia. Hal ini terjadi karena adanya tonjolan-tonjolan mikrovili pada pintu masuk, yang mendorong sel aktin pada sitoskeleton untuk melakukan penyusunan ulang. Selain itu gen Rv0986 dan Rv0987 yang dimiliki *M.tuberculosis* jenis ini memiliki potensi untuk meningkatkan virulensi dan adhesi terhadap sel inangnya. Pada penelitian lain tidak disebutkan jenis/strain *M.tuberculosis* yang digunakan. Prevalensi infeksi sekunder pada otak yang terjadi pada manusia baru terjadi pada tahun pertama setelah infeksi primer terjadi (Rock, 2008). Hal ini bisa dijelaskan dengan teori imunologi. Selain itu juga infeksi yang terjadi pada manusia awalnya pada paru lalu masuk ke peredaran darah dan limfe menuju ke organ-organ lain. Proses ini memerlukan waktu dan sangat tergantung dengan status imun dan terapi yang diterima. Sementara pada hewan coba kelinci yang dilakukan pada penelitian Tsenova (2000), infeksi langsung dilakukan pada CNS (*Central Nervous System*), sehingga hal ini sangat menjelaskan mengapa ekspresi TNF- α sangat cepat muncul.

Wallgreen (2002) mengutarakan bahwa perjalanan penyakit TB dimulai dari adanya infeksi/fokus primer yang terbentuk 3 – 8 minggu post infeksi. 1 – 6 bulan berikutnya dapat terjadi TB milier dan TB otak. Selanjutnya 1 – 12 bulan, akan menyebar ke pleura. Terakhir, 3 – 6 tahun post infeksi akan menyebar menjadi TB tulang, termasuk TB tulang belakang walaupun fokus dan kompleks primer telah hilang. Sehingga, dari acuan ini bisa disimpulkan bahwa hasil penelitian mendekati teori yang ada bahwa 1 – 6 bulan pertama post infeksi akan didapatkan TB otak (tentu saja jika tidak dilakukan terapi), sedangkan pada penelitian ini waktu yang digunakan adalah 8 minggu atau 2 bulan dan 16 minggu atau 4 bulan.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu :

1. Belum dilakukannya penghitungan ekspresi TNF- α di organ lain pada infeksi *M.tuberculosis* dengan waktu infeksi yang sama. Sehingga tidak diketahui dalam waktu itu organ apa saja yang sudah berespon terhadap infeksi yang terjadi dan tidak diketahui pula apakah ekspresi TNF- α pada setiap organ tersebut relatif sama atau ada yang lebih dominan.
2. Tidak dilakukan *double staining* pada penelitian ini sehingga morfologi sel tidak dapat diidentifikasi dengan pasti jenis sel neuron apa yang mengespresikan TNF- α .