

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Induksi Pristane terhadap Manifestasi Klinis Mencit Balb/c

Pengamatan perubahan kondisi pada hewan coba ditemukan mengalami bulu rontok (*alopecia*), deformitas sendi, ruam kulit, proteinuria (500mg/dl) yang semakin meningkat pada minggu ke-32. Ditemukan beberapa hewan coba yang mengalami *ascites* atau penumpukan cairan di rongga peritoneum saat dilakukan pembedahan minggu ke-16 dan ke-32. Cairan kental yang keluar berwarna putih kekuningan dengan volume kurang lebih 5cc, sehingga pada saat sebelum pembedahan hewan coba tampak seperti sedang hamil.

Pada penelitian ini, gejala klinis artritis mulai tampak pada minggu ke-8 setelah injeksi *pristane* dan mengalami peningkatan yang signifikan sampai minggu ke-32. Serta ditemukan 75% mencit mengalami artritis selama penelitian. Pengamatan artritis pada mencit dapat dilakukan dengan metode visual arthritis skor, dengan total skor 60 untuk tiap mencitnya. Dengan rincian, skor 5 diberikan apabila sendi *wrist* dan *ankle* mengalami pembengkakan dan skor 1 diberikan di setiap interphalangeal yang mengalami pembengkakan (Bas *et al.*, 2012). Pada penelitian terdahulu telah dijelaskan bahwa gejala klinis artritis mulai tampak pada minggu ke-12 setelah injeksi *pristane* intraperitoneal (Leiss *et al.*, 2013). Hasil penelitian tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang saat ini dilakukan. Jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu, gejala klinis artritis muncul lebih awal pada penelitian ini.

Pada penelitian lain menggunakan hewan coba *strain* mencit *New Zealand Mixed Mice* (MRL), didapatkan pada *strain* MRL/Mp-lpr/lpr presentasi manifestasi klinis artritis yaitu 75% , dermatitis 50%, vaskulitis 56%. Pada mencit *strain* MRL/Mp-+/+ presentasi manifestasi klinis artritis yaitu 75%, vaskulitis 8% (Wallace *et al.*, 2013). Pada mencit *strain* BXSB dan *New Zealand Mice* (NZB/BL) didapatkan manifestasi klinis nefritis yang lebih dominan. Jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu, presentasi manifestasi klinis artritis sama pada penelitian ini.

6.2 Pengaruh Induksi Pristane terhadap Kadar ANA

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun kronis dan kompleks (Zhou, 2011). Ditemukan banyak macam autoantibodi yang terdapat pada pasien LES, *antinuclear antibody* (ANA) adalah autoantibody yang sering ditemukan pada pasien LES. (Wallace *et al.*, 2007). ANA merupakan salah satu kriteria imunologis yang menunjukkan keparahan (*severity*) LES. Pengujian kadar ANA bersifat sensitif tetapi tidak spesifik. Kadar ANA yang tinggi menandakan tingkat keparahan LES juga tinggi.

Pada penelitian ini, pengukuran kadar ANA dilakukan mulai minggu ke-8 setelah induksi pristane hingga minggu ke-32. Didapatkan hasil kadar ANA mengalami peningkatan signifikan pada minggu ke-8,16,24,32 dengan kelompok kontrol sehat ($p=0.014$, $p=0.006$, $p=0.006$, dan $p=0.009$ secara berurutan). Berdasarkan hal diatas, dapat dikatakan bahwa induksi pristane mampu meningkatkan kadar ANA yang juga mempengaruhi peningkatan keparahan LES. Sehingga, induksi pristane pada mencit BALB/c telah dapat membuat mencit mengalami lupus. Pada penelitian lain juga menyebutkan terjadi peningkatan kadar ANA mencit balb/c dengan induksi pristane 0,5ml intraperitoneal mulai

minggu ke-12 dan ke-16. Selanjutnya pada minggu ke-32 tingkat kejadiannya mencapai 87,5% (Cui, et al.,2006).

Induksi pristane secara intraperitoneal memiliki hubungan dengan peningkatan kadar ANA di serum mencit. Kadar pristane dengan jumlah signifikan yang bertahan lama dalam rongga peritoneal menyebabkan apoptosis pada sel-sel pada berbagai organ di peritoneal (Calvani *et al.*, 2005). Proses tersebut menghasilkan autoantigen/*apoptotic body* yang menginduksi sinyal pembentukan sitokin-sitokin inflamasi yang menandai pembentukan suatu sindrom imunitas (Calvani, *et al.*, 2005). Autoantigen yang ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) tersebut menginduksi aktivasi sel B dan sel T. Hal ini menginduksi APC menghasilkan *Toll Like Receptor* (TLR) 7/8 dan 9 yang menginduksi peningkatan ekspresi gen IFN tipe 1. Peningkatan ekspresi IFN tipe 1 tersebut meningkatkan ekspresi IFN α dan β . Hal ini menyebabkan sel B menjadi autoreaktif secara langsung maupun tidak langsung. Sel B yang autoreaktif tersebut membentuk suatu kompleks imun yang akhirnya akan menyebabkan kerusakan jaringan dan menyisakan debris. Debris tersebut akan kembali ditangkap oleh APC dan kembali menginduksi aktivasi sel B, ini terjadi secara terus menerus.

Pada penyakit LES terjadi akumulasi *apoptotic body* yang memicu sekuel dari fenomena autoimun (Rottman dan Willis, 2010). Hal ini diperberat dengan terjadinya gangguan proses *clearance* terhadap adan apoptosis di jaringan. Makrofag merupakan salah satu APC yang memiliki peranan penting terhadap proses *clearance* tersebut. Telah diketahui pada penelitian sebelumnya bahwa pada pasien LES didapatkan peningkatan sel *Polymorphonuclear* (PMN) apoptosis dan makrofag namun peningkatan tersebut tidak diikuti dengan

kemampuan makrofag dalam mekanisme *clearance* dengan baik (Cui et al.,2006). Beberapa penelitian lain juga ditemukan penurunan kemampuan makrofag atau monosit tersebut melibatkan ekspresi protein permukaan , produksi sitokin dan kapasitas fagositosis namun mekanisme yang mendasari hal-hal tersebut belum sepenuhnya diketahui (Lee, 2010). Berdasarkan hal diatas, dapat dikatakan bahwa induksi pristane mampu mempengaruhi tingginya kadar ANA yang juga mempengaruhi peningkatan keparahan LES melalui sel B yang autoreaktif serta penurunan fungsi dari makrofag.

6.3 Perhitungan Alternatif Menggunakan *Effect Size*

Setelah berhasil menguji hipotesis dengan taraf signifikansi tertentu, maka bahasan selanjutnya adalah ukuran efek (*Effect Size*). Ukuran efek adalah besarnya efek yang ditimbulkan oleh parameter yang diuji di dalam pengujian hipotesis.

Rumus Cohen's d type effect size :

$$\left| \frac{\text{Rerata kelompok kontrol} - \text{Rerata kelompok perlakuan}}{\text{StandarDeviasi kelompok kontrol}} \right|$$

Interpretasi *Cohen's d type effect size* :

0.2-0.5 : Kecil

0.5-0.8 : Sedang

> 0.8 : Besar

a. Kontrol >< Minggu-8

$$= 3.61 \quad \left| \frac{2.68 - 8.25}{1.54} \right|$$

b. Kontrol >< Minggu-16

$$= 4.41 \quad \left| \frac{2.68 - 9.48}{1.54} \right|$$

c. Kontrol >< Minggu-24

$$= 18.25 \quad \left| \frac{2.68 - 30.8}{1.54} \right|$$

d. Kontrol >< Minggu-32

$$= 24 \quad \left| \frac{2.68 - 39.64}{1.54} \right|$$

Kontrol >< Rerata Semua Perlakuan

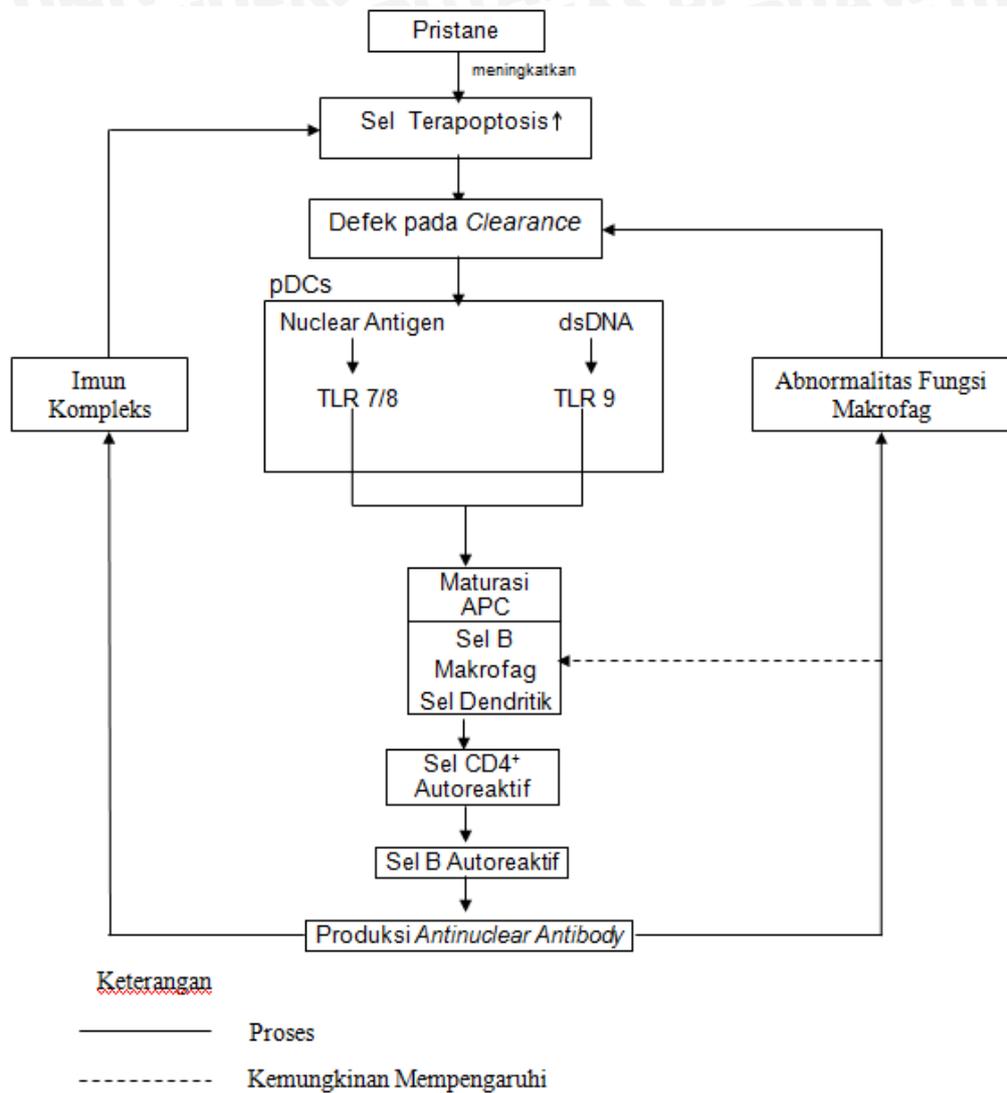
$$= 12.8 \quad \left| \frac{2.68 - 22.4}{1.54} \right|$$

Hasil data statistik menyebutkan bahwa data sampel yang didapat tidak homogen karena jumlah sampel penelitian (n) yang sedikit. Dari hasil interpretasi *Cohen's d type effect size* didapatkan bahwa $d > 0.8$ sehingga hasil penelitian bermakna. Didukung dengan adanya manifestasi klinis pada mencit balb/c yang di injeksikan dengan pristane.

6.4 Mekanisme Pristane Dalam Menginduksi Pembentukan ANA

Induksi pristane secara intraperitoneal pada mencit mengakibatkan apoptosis sel di mesenkim pada organ peritoneal. Akumulasi dari badan apoptosis mengandung berbagai macam *self antigen*. Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan dalam proses *clearance* dari badan apoptosis di

jaringan. Oleh karena itu makrofag memiliki peranan penting terhadap patogenesis penyakit LES. Pada orang penderita LES mengalami gangguan dari jumlah dan fungsi makrofag. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa terdapat peningkatan jumlah makrofag namun hal ini diikuti dengan penurunan fungsi dari makrofag terhadap proses *clearance* itu sendiri (Gambar 6.1). Namun penelitian terbaru belum mengetahui secara pasti bagaimana proses penurunan fungsi dari makrofag terhadap proses *clearance* itu sendiri (Westley *et al.*,2010). Pengaruh dari banyaknya hasil pembentukan imun kompleks yang diproduksi oleh sel B autoreaktif meningkatkan sel terapoptosis di mesenkim pada organ peritoneal yang memperberat proses *clearance* oleh makrofag (Gambar6.1). Dengan adanya abnormalitas dari fungsi makrofag itu sendiri dan meningkatnya jumlah sel terapoptosis hal tersebut menyebabkan peningkatan yang sangat signifikan dari kadar ANA di serum mencit dari minggu ke-4 hingga minggu ke-32. Proses inilah yang berlangsung secara terus menerus sehingga membentuk suatu siklus tanpa akhir yang memperberat manifestasi klinis dari patogenesis LES dari waktu ke waktu.



Gambar 6.1 Bagan Mekanisme Pristane Dalam Menginduksi Pembentukan ANA