

AKTIVITAS SEKRESI *REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATE* (ROI) PADA MAKROFAG PERITONEUM KUCING YANG DIINFEKSI DENGAN *M. Tuberculosis*

REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATE (ROI) SECRETION IN CAT MACROPHAGE INFECTED WITH *M. tuberculosis*

Ida Tjahajati¹, Subronto Prodjoharjono¹, Hardyanto Subono², Widya Asmara³, dan Nobuyuki Harada⁴

Bagian Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada¹, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada², Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada³, Immunology Division, Mycobacterium Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, Japan⁴

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas makrofag peritoneum kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. Penelitian menggunakan 48 ekor kucing sehat, dibagi dalam 4 kelompok, masing-masing kelompok 12 ekor. Kelompok I yaitu kelompok yang diinfeksi secara peroral *M. tuberculosis* dengan dosis 1×10^5 cfu, kelompok II yaitu kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan dosis 1×10^5 cfu, dan kelompok III yaitu kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan dosis 1×10^5 cfu, dan kelompok IV yaitu kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan. Pada minggu ke-1, 2, 12, dan 24, makrofag peritoneum diambil untuk diukur sekresi *reactive oxygen intermediate* (ROI) oleh makrofag dengan menggunakan *nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay*. Masing-masing periode pengukuran sekresi ROI oleh makrofag digunakan tiga ekor kucing, dan masing-masing kucing dibuat replikasi 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sekresi ROI oleh makrofag pada kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan aktivitas sekresi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok kucing yang diinfeksi secara intraperitoneal menunjukkan aktivitas sekresi ROI yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diinfeksi secara intramuskular dan per oral.

Kata kunci: aktivitas makrofag, sekresi ROI, *M. tuberculosis*, kucing

ABSTRACT

The experiment was done to measure the activity of peritoneum macrophage in cat infected with *M. tuberculosis*. Fourty eight (48) healthy cats were used in the experiment. The cats were then divided in to 4 groups of 12 cats. Group I was treated per orally with 1×10^5 cfu *M. tuberculosis*, group II was treated intraperitoneally with 1×10^5 cfu *M. tuberculosis*, group III was treated intramuscular with 1×10^5 cfu *M. tuberculosis*, and group IV was group which untreated. The reactive oxygen intermediate (ROI) secretion of macrophages were measure at 1st, 2nd, 12th, and 24th, after infection using *nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay*. Three cats were used to measure the ROI secretion of macrophage in each period, using triplicate sample for each cat. The result of the experiment showed that the ROI secretion of macrophage in all treatments group were higher than the control group. The activity of macrophage in intraperitoneal group was highest compare with intramuscular and per oral groups.

Keyword: macrophage activity, ROI secretion, *M. tuberculosis*, cat

PENDAHULUAN

Beberapa sumber menyebutkan bahwa kucing lebih resisten terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Francis, 1978; Acha and Szyfress, 1980; Francis cit Thoen, 1994), meskipun ada juga yang melaporkan bahwa kucing sama sensitifnya terhadap infeksi *M. tuberculosis* dan *M. bovis* (Rowold cit Francis, 1978). Disebutkan bahwa *Mycobacterium* yang dapat menyerang kucing meliputi *M. bovis*, *M. avium*, *M. microti*, *M. lepraemurium*, termasuk juga *M. tuberculosis*, dan beberapa atypical mycobacterium (Schiefer and Middleton, 1983), tetapi Isaac *et al.* (1983) melaporkan bahwa kasus tuberkulosis pada kucing lebih banyak disebabkan oleh *M. bovis* dibanding dengan yang disebabkan oleh *M. tuberculosis*. Akhir-akhir ini beberapa kasus tuberkulosis yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* pada kucing dilaporkan (Acha and Szyfress, 1980; Aranaz *et al.*, 1996; Wilesmith, 1994; Janz, 1996), dan yang terakhir strain bacillus dengan karakteristik diantara *human M. tuberculosis* dan *M. bovis* juga telah ditemukan sebagai penyebab tuberkulosis pada sejumlah kucing (Gunn-Moore and Jenkins, 1994; Gunn-Moore *et al.*, 1996; Bluden and Smith, 1996).

Mycobacterium dari *M. tuberculosis complex* telah diketahui dapat menyebabkan penyakit bentuk pulmonary, gastrointestinal, atau bentuk disseminated pada hewan piaraan, termasuk kucing (Acha and Szyfress, 1980; Anonim, 1992; Bennet and Gaskell, 1996). Kucing dapat tertular tuberkulosis karena berhubungan dekat dengan manusia atau sapi yang menderita tuberkulosis aktif (Acha and Szyfress, 1980). Peningkatan kasus tuberkulosis pada kucing yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* dibanding dengan *M. bovis* di Spanyol, dilaporkan diperkirakan karena adanya pergeseran lingkungan kucing yang banyak tinggal di lingkungan urban yang memungkinkan kucing banyak kontak dengan manusia termasuk mereka yang menderita tuberkulosis aktif (Aranaz *et al.*, 1996). Rute infeksi penularan tuberkulosis yang utama melalui respirasi, akan tetapi juga dapat secara alimentary melalui saluran pencernaan, dan melalui kulit atau perkutan. Disebutkan kucing yang menderita tuberkulosis bentuk lesi terbuka sehingga dapat mengekskresi kuman melalui sputum, urine atau feses (Jarrett and Lauder, 1957; Bluden and Smith, 1996; Aranaz *et al.*, 1996). Karena alasan tersebut, tuberkulosis pada kucing merupakan hal harus diwaspadai karena mempunyai resiko untuk dapat menularkan penyakit ke manusia (zoonotic disease) (Acha and Szyfress, 1980; Aranaz *et al.*, 1996).

Pada sistem imun manusia dan beberapa hewan percobaan, telah diketahui bahwa imunitas seluler memainkan peranan penting dalam mengatasi infeksi *M. tuberculosis*. Imunitas seluler diperantarai oleh sel T helper-1 (Th1) yang memproduksi sitokin tipe-1 yaitu interleukin (IL)-2 dan interferon-gamma (IFN- γ).

Interferon gamma kemudian mengaktifkan makrofag untuk memfagositosis *M. tuberculosis*, yang merupakan parasit intraseluler. Di lain pihak sel T helper-2 (Th2) memproduksi sitokin tipe-2 yaitu IL-4, IL-5, and IL-13, yang berfungsi untuk menghambat aktivitas makrofag (Graham *et al.*, 1994).

Makrofag dalam aktivitasnya dilengkapi dengan berbagai sistem untuk memusnahkan mikobakterial, yang mekanismenya telah banyak dipelajari terutama pada sistem imun hewan percobaan. Mekanisme sistem antimikobakterial meliputi fusi fagosom dan kompartemen lisosom, sekresi *reactive oxygen intermediate* (ROI) yang merupakan hasil produk ledakan respirasi (*burst respiratory*), dan juga produksi *reactive nitrogen intermediate* (RNI) melalui jalur sitotoksik *NOS2-dependent*. Fusi antara fagosom dan kompartemen lisosom akan membunuh microbial dengan enzim hidrolitik (Desjardins, 1995). *Reactive oxygen intermediate* dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pemusnahan/pembunuhan *Mycobacterium*, yang aktivitasnya diinduksi oleh sitokin IFN- α dan TNF- α (Barnes *et al.*, 1994).

Meskipun kasus tuberkulosis pada kucing telah dilaporkan, tetapi respon imun terhadap infeksi *M. tuberculosis* pada kucing belum banyak dipelajari. Beberapa literatur mengatakan bahwa kucing lebih resisten terhadap infeksi *M. tuberculosis* (Francis, 1978; Acha and Szyfress, 1980; Francis cit Thoen, 1994), namun penjelasan bagaimana dan mengapa kucing lebih resisten ditinjau dari aspek respon imun seluler dalam hal ini aktivitas makrofag belum pernah diteliti. Bagaimana aktivitas makrofag dalam sekresi ROI selama adanya infeksi tuberkulosis pada kucing sejauh ini belum pernah dilaporkan. Pada penelitian ini dipelajari aktivitas sekresi ROI oleh makrofag setelah kucing diinfeksi *M. tuberculosis*, untuk menjelaskan bagaimana kemungkinan terjadinya resistensi pada kucing terhadap infeksi kuman tersebut. Berdasarkan pada literatur yang mengatakan bahwa kucing lebih resisten terhadap infeksi *M. tuberculosis* dan ROI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan *Mycobacterium*, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah kucing yang diinfeksi *M. tuberculosis* akan menunjukkan aktivitas sekresi ROI yang lebih tinggi dalam usahanya untuk memusnahkan *M. tuberculosis* yang masuk dalam tubuh kucing.

MATERI DAN METODE

Hewan Percobaan

Empat puluh delapan kucing sehat dibagi dalam 4 kelompok, berdasarkan rute infeksi *M. tuberculosis*. Kelompok 1 yaitu kelompok yang diinfeksi secara oral dengan dosis *M. tuberculosis* 10^5 cfu, kelompok 2 yaitu kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan

dosis 10^5 cfu, kelompok 3 yaitu kelompok yang diinfeksi secara intramuskuler dengan dosis 10^5 cfu, dan kelompok 4 yaitu kelompok kontrol, kelompok yang tidak diberi perlakuan. *Mycobacterium* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *M. tuberculosis* strain H37Rv yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Daerah, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Jadwal pemeriksaan aktivitas makrofag

Aktivitas sekresi ROI makrofag peritoneum kucing diukur pada minggu ke-1, 2, 12, 24 setelah infeksi. Setiap tahap waktu yang telah ditentukan, diambil 3 ekor kucing dari masing-masing kelompok, untuk kemudian dilakukan isolasi makrofag dari rongga peritoneum, dan dilakukan pengukuran sekresi ROI. Pengukuran sekresi ROI oleh makrofag peritoneum untuk masing-masing kucing dilakukan secara *triplicate*.

Isolasi dan kultur makrofag peritoneum

Pada jadwal waktu yang telah ditentukan kucing dianestesi dengan menggunakan Anesject^R (kethamine) dengan dosis 0,1 mg/kg BB, disuntikkan secara intramuskuler. Setelah kucing tertidur, kemudian diletakkan pada posisi terlentang (dorso lateral) di atas gabus yang telah dilapisi dengan aluminium foil, kemudian kulit bagian perut didesinfeksi dengan alkohol 70%, selanjutnya kulit abdomen dibuka dengan gunting steril, sehingga tampak lapisan mesenterium, dan cavum peritoneum beserta isinya dapat terlihat dengan jelas.

Medium RPMI dingin kurang lebih 100 ml diinjeksikan ke dalam rongga peritoneum dan di-*massage* kurang lebih 3 menit, kemudian medium diaspirasi kembali. Aspirat yang telah diperoleh ditampung dalam tabung sentrifus steril, kemudian disentrifus pada kecepatan 1200 rpm, 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan 3 ml medium RPMI lengkap (mengandung FCS 10%) pada pellet yang telah diperoleh.

Jumlah makrofag yang telah dihitung, kemudian diresuspensikan lagi dengan medium RPMI lengkap sehingga didapat sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Suspensi sel yang telah dihitung, kemudian dikultur pada sumuran *microplate* 24 yang telah diberi *cover slips* bulat, setiap sumuran 200 μ l (5×10^5 sel), kemudian diinkubasi dalam incubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan medium RPMI lengkap sebanyak 1 ml pada tiap sumuran kemudian diinkubasikan lagi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian ditambahkan medium RPMI lengkap 1 ml pada tiap sumuran dan selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam.

Uji Sekresi ROI

Kemampuan makrofag peritoneum kucing dalam mensekresi *reactive oxygen reactive* (ROI)

diukur dengan *nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay*. Pada assay ini Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) akan menstimulasi makrofag untuk mensekresi ROI, dan adanya ROI (anion superoksida, O₂⁻) akan menyebabkan NBT tereduksi sehingga membentuk presipitat formazan yang tidak terlarut.

Untuk menstimulasi sekresi anion superoksida, kultur sel distimulasi dengan PMA dengan konsentrasi akhir 125ng/ml. Urutan cara kerja adalah sebagai berikut. Kultur makrofag dicuci 2 kali dengan RPMI, kemudian ditambahkan 500 μ l larutan NBT (1mg/ml PBS) yang mengandung 125 ng/ml PMA untuk tiap sumuran dan diinkubasikan pada incubator CO₂ 5%, 37°C selama 1 jam. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3 kali, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan methanol absolute selama 30 detik. Setelah kering dipulas dengan 2% Neutral Red Solution selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades. Setelah kering *cover slips* diangkat dari sumuran *microplate* untuk dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.

Aktivitas makrofag untuk mensekresi ROI diukur dengan menghitung persentase makrofag yang mensekresi ROI yaitu yang menunjukkan pembentukan formazan (warna gelap), dihitung 100 makrofag yang terlihat dibawah mikroskop cahaya, dan skor derajat pembentukan formazan oleh tiap 100 makrofag, dihitung dengan cara menjumlahkan besarnya skor yang dicapai oleh 100 makrofag. Skor 0 jika pada makrofag tidak terbentuk formazan, skor 1 jika pada makrofag terbentuk formazan tetapi tidak memenuhi seluruh sel, dan skor 2 jika formazan yang terbentuk memenuhi seluruh sel. Sebagai contoh perhitungan skor, misalnya dari 100 makrofag terdapat 20 sel yang tidak membentuk formazan (besarnya skor 0), 40 sel membentuk formazan tetapi tidak seluruh sel (besarnya skor 40) dan 40 sel membentuk formazan (besarnya skor 80), maka skor pada 100 sel makrofag adalah $0 + 40 + 80 = 120$.

Analisis Data

Perbedaan aktivitas makrofag dalam mensekresi ROI antar perlakuan dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan SPSS "*Univariate Analysis of Variance*" (Kinneer and Gray, 1999). Analisis dilakukan pada semua periode pengamatan, dan apabila terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan Dun'can test untuk membandingkan rerata data yang diperoleh antar kelompok.

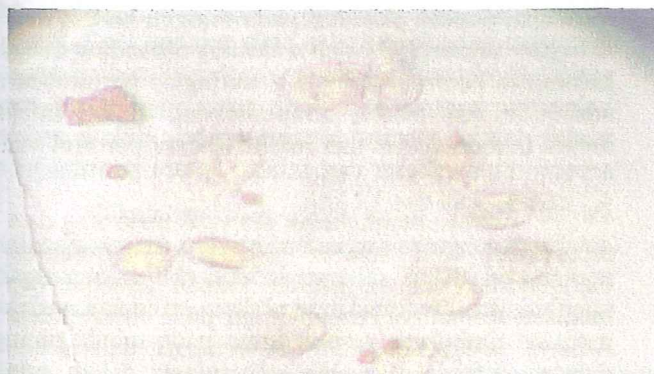
Dalam interpretasi dan penghitungan jumlah sel, selalu menyertakan orang ke-2, untuk dapat diperoleh konfirmasi penghitungan dan interpretasi hasil yang obyektif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

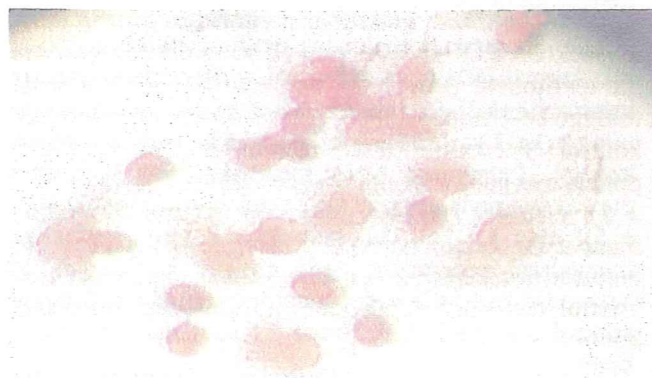
Aktivitas makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI diukur dengan NBT *reduction assay*. Reduksi NBT menunjukkan adanya lonjakan respirasi yang diikuti dengan pembentukan anion superoksida (O_2^-) yang akan mereduksi NBT membentuk formazan berwarna biru yang tidak terlarut. Aktivitas makrofag peritoneum kucing untuk mensekresi ROI dapat dinilai dari persentase makrofag yang mensekresi ROI (dihitung dari 100 makrofag) dan dari skor derajat pembentukan formazan oleh tiap 100 makrofag.

Gambaran makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI setelah diinfeksi *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 1.

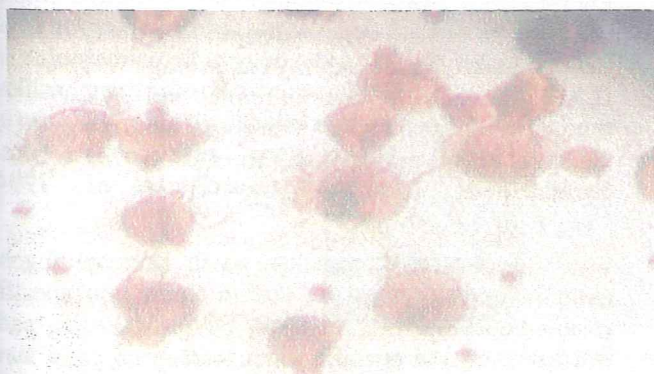
Dari Gambar 1. terlihat bahwa makrofag pada kelompok kontrol yaitu yang tidak diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan gambaran tidak terbentuknya formazan warna hitam pada makrofag dan hanya sedikit sel yang mensekresi ROI, sedang makrofag kelompok yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan terbentuknya formazan yang berwarna gelap (hitam) dengan jumlah yang lebih banyak. Pada kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal nampak makrofag sangat aktif mensekresi ROI, terlihat gambaran banyak makrofag dominan membentuk formazan berwarna hitam.



Gambar A



Gambar B



Gambar C



Gambar D

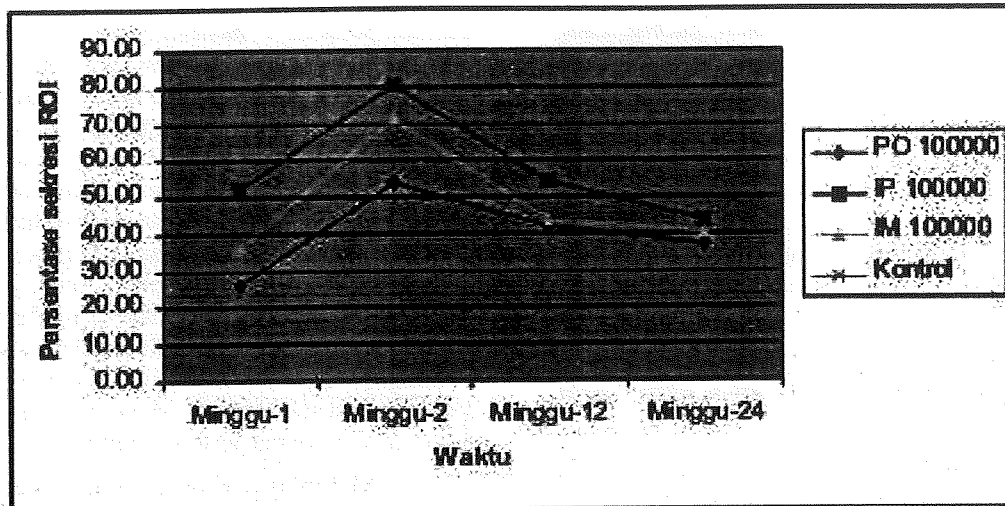
Gambar 1. Gambaran makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI pada minggu ke-2 setelah infeksi *M. tuberculosis* dengan dosis 10^3 cfu dengan pewarnaan Neutral Red. A. Pada kelompok kontrol, B. Pada kelompok per oral, C. Pada kelompok injeksi intramuskular, D. Pada kelompok injeksi intraperitoneal.

Persentase makrofag yang mensekresi ROI

Rata-rata hasil persentase makrofag yang mensekresi ROI pada semua kelompok dapat dilihat pada Gambar 2. Dari gambar terlihat bahwa jumlah persentase makrofag yang mensekresi ROI pada semua kelompok yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* mengalami peningkatan sampai puncak tertentu yaitu pada minggu ke-2, dan kemudian mengalami penurunan. Berbeda dengan kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak diinfeksi, menunjukkan aktivitas sekresi ROI yang relatif tidak mengalami peningkatan aktivitas yang berarti. Semua kelompok kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan adanya peningkatan sekresi ROI dibanding dengan kelompok kontrol pada semua periode waktu.

Makrofag peritoneum kucing kelompok kontrol menunjukkan persentase makrofag yang mensekresi ROI yang relatif tidak mengalami peningkatan yang berarti dari waktu ke waktu. Rata-rata persentase sel yang mensekresi ROI pada kelompok kontrol berturut-turut dari minggu ke-1, 2, 12, dan 24 adalah sebagai berikut $15,3 \pm 4$; $17,3 \pm 6,0$; $16,3 \pm 5,5$; $17,3 \pm 3,5$.

Persentase makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI pada kelompok yang diinfeksi secara peroral dengan *M. tuberculosis* 10^3 cfu pada minggu ke-1 yaitu $26,0 \pm 7,2$ atau 1,7 kali dari kelompok kontrol.



Gambar 2. Rata-rata hasil persentase makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI selama infeksi *M. tuberculosis* dengan dosis 10^5 cfu

Pada minggu ke-2 terjadi peningkatan aktivitas makrofag dan mencapai puncak aktivitas sekresi ROI dengan persentase $53,7 \pm 10,7$ atau 3,1 kali dibanding kontrol. Pada minggu ke-12 dan ke-24 berturut-turut adalah $42,0 \pm 10,5$ atau 2,6 kali dibanding dengan kelompok kontrol dan $37,3 \pm 6,4$ atau 2,3 kali dibanding dengan kelompok kontrol.

Persentase makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI pada kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan *M. tuberculosis* 10^5 cfu pada minggu ke-1 yaitu $52,3 \pm 8,7$ atau 3,4 kali dari kelompok kontrol. Persentase terus meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $80,7 \pm 5,1$ atau 4,7 kali dari kelompok kontrol, kemudian mengalami penurunan pada minggu ke-12 dan 24 berturut-turut $54,3 \pm 6,1$ atau 3,3 kali dari kelompok kontrol dan $43,7 \pm 5,7$ atau 2,5 kali dari kelompok kontrol.

Persentase makrofag peritoneum kucing yang mensekresi ROI pada kelompok yang diinfeksi secara intramuskuler dengan *M. tuberculosis* 10^5 cfu pada minggu ke-1 yaitu $36,0 \pm 9,5$ atau 2,4 kali dari kelompok kontrol. Persentase terus meningkat dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $71,3 \pm 15,8$ atau 4,1 kali dari kelompok kontrol, kemudian mengalami penurunan pada minggu ke-12 dan 24 berturut-turut $43,7 \pm 5,0$ atau 2,9 kali dari kelompok kontrol dan $40,3 \pm 5,1$ atau 2,3 kali dari kelompok kontrol.

Hasil analisis statistik menggunakan *Univariate Analysis of Variance* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($P < 0,01$) pada persentase makrofag yang mensekresi ROI pada semua kelompok yang dipengaruhi oleh rute infeksi dan waktu pengambilan makrofag. Uji analisis menggunakan Dun'can test menunjukkan bahwa urutan kelompok

perlakuan dalam aktivitas mensekresi ROI dari yang tertinggi adalah infeksi intraperitoneal 10^5 cfu, intramuskuler 10^5 cfu, dan per oral 10^5 cfu.

Dari hasil tersebut dan didasarkan hasil analisis statistik yang diperoleh, dapat terlihat bahwa aktivitas sekresi ROI makrofag kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan adanya peningkatan, dan mencapai puncak aktivitas pada minggu ke-2. Puncak aktivitas sekresi ROI oleh makrofag dibanding dengan kelompok kontrol dari yang tertinggi, berturut-turut adalah infeksi secara intraperitoneal, diikuti infeksi secara intramuskuler dan infeksi secara per oral yaitu 4,7 kali, 4,1 kali dan 3,1 kali.

Adanya peningkatan aktivitas makrofag dalam mensekresi ROI selama infeksi *M. tuberculosis*, membuktikan bahwa infeksi kuman tersebut dapat memacu timbulnya respon imun pada tubuh kucing. Adanya infeksi oleh *M. tuberculosis* dalam tubuh kucing, akan mengakibatkan berkembangnya respon imun baik non spesifik maupun spesifik. Respon imun non spesifik diawali dengan dengan fagositosis oleh sel NK dan makrofag. Selanjutnya makrofag menghasilkan IL-12, kemudian merangsang sel NK untuk menghasilkan IFN- α yang selanjutnya akan mengaktifasi makrofag (Barnes *et al.*, 1994; Baratawijaya, 2002).

Makrofag merupakan salah satu sel fagosit yang berperan baik pada sistem imun non spesifik maupun spesifik (Barnes *et al.*, 1994). Makrofag pada sistem imun non spesifik akan teraktivasi pada awal infeksi setelah berpaparan dengan antigen (*M. tuberculosis*), sedangkan pada sistem imun spesifik (*cell mediated immunity*, CMI) makrofag akan diaktivasi oleh sel T sehingga dapat berperan sebagai sel efektor yang lebih efektif untuk mengeliminasi *M. Tuberculosis* (Barner *et al.*, 1994). Juga dijelaskan oleh Abbas *et al.*

(2000) bahwa respon imun non spesifik dapat mengontrol pertumbuhan mikroba intraselular, namun untuk mengeliminasi mikroba tersebut umumnya memerlukan respon imun spesifik. Makrofag pada respon imun spesifik diaktivasi oleh limfosit (sel Th1 CD4+ dan CD8+) melalui sinyal CD40L-CD40 dan melalui sitokin IFN- α . Sitokin ini merupakan sitokin utama yang mengaktifkan makrofag sehingga berperan penting pada respon imun baik spesifik dan non spesifik (Barnes *et al.*, 1994).

Pada hasil penelitian dapat terlihat bahwa kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan adanya peningkatan aktivitas sekresi ROI oleh makrofag pada semua kelompok dibanding dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa adanya infeksi *M. tuberculosis* menyebabkan peningkatan aktivitas makrofag yang berupa sekresi ROI. Pada kelompok kontrol, walaupun ada aktivitas sekresi ROI namun aktivitas relatif stabil dan tidak ada peningkatan yang berarti. Dijelaskan oleh Chan and Kaufmann (1994) dan Tizard (2000), bahwa makrofag yang teraktivasi antara lain akan memperlihatkan, peningkatan produksi produksi ROI dan NO, peningkatan produksi enzim lisosom, peningkatan aktivitas fagositosis, dan terjadi perubahan ukuran atau bentuk dari makrofag (Chan and Kaufmann, 1994; Tizard, 2000). *Reactive oxygen intermediate* dan RNI merupakan produk oksidatif makrofag yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pembunuhan sebagai antimikrobal, yang produksinya diinduksi bersama-sama oleh sitokin IFN- α dan TNF- α (Flynn and Chan, 2001).

Dikatakan oleh Leijh *et al.* (1986) bahwa interaksi antara opsonim mikroorganisme dan membran fagosit tidak hanya menghasilkan ingesti tetapi juga menyebabkan metabolic burst, yang sangat

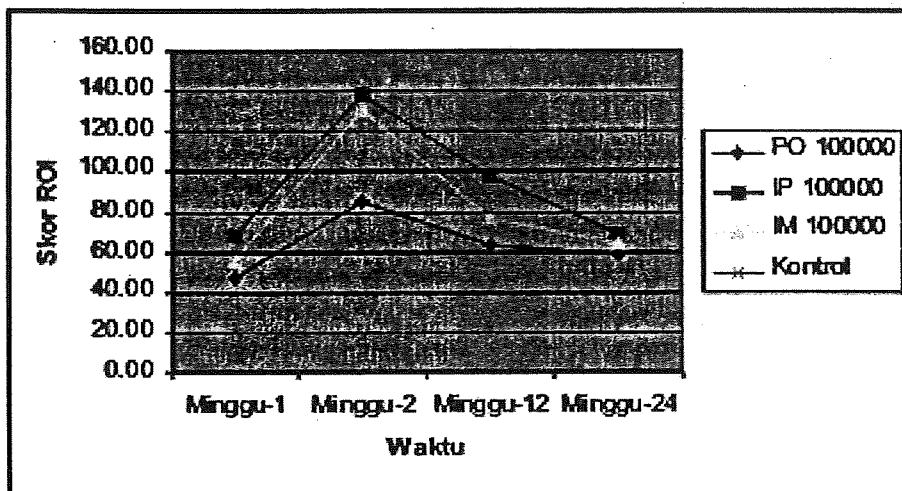
karakteristik dengan peningkatan kebutuhan oxygen dan menghasilkan anion superoxide (O_2^-) dan hydrogen peroxide (H_2O_2), yang keduanya memiliki aktivitas mikrobisidal. Pentingnya sistem untuk pemusnahan mikobakterial dapat terlihat jelas pada pasien yang memiliki *defect* (kelainan) pada aktivitas mikrobakbisidal pada granulosit dan monosit seperti pada penderita *chronic granulomatous disease* (Quie, 1972).

Urutan waktu yang menggambarkan aktivitas makrofag mensekresi ROI, dari aktivitas yang tertinggi adalah sebagai berikut minggu ke-2, 12, 24, dan 1. Hasil ini menggambarkan bahwa aktivitas makrofag pada kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag dapat terlihat mulai pada minggu pertama setelah infeksi, dan aktivitas makrofag mencapai puncak sekresi ROI pada minggu ke-2, selanjutnya aktivitas menurun sampai akhir penelitian.

Skor derajat pembentukan formazan

Rata-rata hasil skor derajat pembentukan formazan pada makrofag peritoneum kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 3. Dari gambar tersebut dapat terlihat bahwa derajat pembentukan formazan pada semua kelompok mengalami peningkatan sampai puncak tertentu, kemudian setelah itu mengalami penurunan. Kecuali pada kelompok kontrol derajat pembentukan formazan dari waktu ke waktu relatif rendah dan tidak mengalami perubahan yang menyolok.

Skor derajat pembentukan formazan pada kelompok kontrol berturut-turut dari minggu ke-1, 2, 12, dan 24 adalah $20 \pm 2,7$; $18,7 \pm 3,1$; $22,0 \pm 4,4$; $22 \pm 4,4$. Skor derajat pembentukan formazan pada pada semua kelompok kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*



Gambar 3. Rata-rata skor derajat pembentukan formazan oleh 100 makrofag peritoneum kucing pada masing-masing kelompok perlakuan selama infeksi *M. tuberculosis* dengan dosis 10^5 cfu

menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Semua kelompok perlakuan menunjukkan puncak skor derajat pembentukan formazan pada minggu ke-2, kemudian menurun sampai akhir penelitian. Pada puncak skor pada masing-masing kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol dari kelompok yang diinfeksi secara peroral 10^5 cfu yaitu $85,0 \pm 19,1$ atau 4,6 kali dari kelompok kontrol, intraperitoneal 10^5 cfu yaitu $138,0 \pm 13$ atau 7,4 kali dari kelompok kontrol, dan intramuskuler 10^5 cfu yaitu $130,7 \pm 33,5$ atau 7,0 kali kelompok kontrol.

Skor derajat pembentukan formazan pada semua kelompok kucing setelah dilakukan analisis secara statistik menggunakan *univariate analysis of variance* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($P < 0,01$) yang dipengaruhi oleh rute infeksi, dan waktu pengambilan makrofag. Uji analisis menggunakan Dun'can test menunjukkan bahwa urutan skor derajat pembentukan formazan kelompok perlakuan dari yang tertinggi adalah infeksi intraperitoneal 10^5 cfu, intramuskuler 10^5 cfu, dan peroral 10^5 cfu. Urutan waktu yang menggambarkan aktivitas makrofag, dari aktivitas yang tertinggi adalah sebagai berikut minggu ke-2, 12, 24, dan 1.

Dari hasil tersebut di atas dapat terlihat bahwa peningkatan aktivitas makrofag yang diukur dengan skor pembentukan formazan oleh makrofag setelah infeksi *M. tuberculosis*, ternyata gambaran menunjukkan hasil yang seirama dengan hasil jumlah persentase makrofag yang mensekresi ROI. Hasil ini mendukung hasil gambaran yang telah diperoleh bahwa adanya peningkatan aktivitas makrofag kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, selain ditunjukkan dengan adanya peningkatan aktifitas sekresi ROI, juga didukung dengan adanya peningkatan skor pembentukan formazan oleh makrofag.

Didasarkan pada hasil tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa adanya infeksi *M. tuberculosis* pada tubuh kucing dapat memacu respon imun pada tubuh kucing yang ditandai dengan peningkatan aktivitas makrofag dalam mensekresi ROI, yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah persentase makrofag yang mensekresi ROI dan peningkatan skor pembentukan formazan pada makrofag kelompok kucing yang diinfeksi *M. Tuberculosis* dibanding dengan kelompok kontrol. Dari hasil ini juga dapat disimpulkan bahwa sekresi ROI oleh makrofag mempunyai peranan penting selama terjadinya infeksi pada *M. tuberculosis* pada kucing.

Adanya peningkatan sekresi ROI (tingginya sekresi ROI) oleh makrofag, diduga ada hubungannya dengan resistensi kucing terhadap infeksi kuman tersebut. Peningkatan sekresi ROI terjadi karena adanya peningkatan aktifitas makrofag dalam usahanya untuk mengeliminasi atau memusnahkan *M.*

tuberculosis yang ada dalam tubuh kucing. Tingginya sekresi ROI memungkinkan pemusnahan kuman yang lebih efektif sehingga memungkinkan kuman dapat tereliminasi atau terbunuh pada awal infeksi, sehingga ada kemungkinan kucing akan lebih dapat mengatasi infeksi oleh kuman tersebut.

Untuk dapat mempelajari mekanisme pertahanan respon imun selular dalam mengatasi infeksi *M. tuberculosis* pada tubuh kucing yang melibatkan sistem imun spesifik, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang melibatkan sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th2 yang terlibat dalam mekanisme pertahanan terhadap infeksi kuman tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat Prof. Marsetyawan HNE, Prof. Supargiono, Dr. Mahardika, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, yang telah banyak memberikan petunjuk, masukan, dan saran, selama melakukan penelitian, sehingga beberapa kendala selama penelitian dapat teratasi. Ucapan terimakasih juga penulis haturkan kepada Kepala Laboratorium Hayati, Universitas Gadjah Mada, yang telah memberikan ijin dan fasilitas selama penelitian, dan Drh. Wilati, MS., selaku Kepala Bagian Mikrobiologi, Balai Laboratorium Kesehatan Daerah, Daerah Istimewa Yogyakarta, yang telah memberikan bantuan untuk memperoleh isolat dan fasilitas selama penelitian. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Sdr. Suprihatin (Mbak Aten) yang telah membantu selama penelitian berlangsung, dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, sehingga selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 2000. Cellular and Molecular Immunology, 4th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia. Hal. 291-302.
- Anonim, 1992. The Merck Veterinary Manual A Handbook of Diagnosis, Therapy, and Disease Prevention and Control for the Veterinarian. Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., USA.
- Aranaz, A., Liebana, E., Pickering, X., Novoa, C., Mateos, A., and Dominguez, L., 1996. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cat and dogs. *Vet. Rec.* 138, 53-58.
- Baratawidjaja, K.G., 2002. Imunologi Dasar. 5 Ed. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Barnes, P.F., Modlin, R.L., dan Ellner, J.J., 1994. In Tuberculosis Pathogenesis and Control. Bloom, B.R. Editor. American Society for Microbiology, Washington, DC. 417-436.

- Bennet, M. and Gaskell, R.M., 1996. Feline and Canine Infectious Diseases. Blackwell Wissenschaftsverlag GmbH kurfurstendamm, Berlin, Germany. Pp. 130-132.
- Blunden, A.S. and Smith, K.C., 1996. A pathological study of mycobacterial infection in a cat caused by variant with cultural characteristics between *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis*. *Vet. Rec.* 138, 87-88.
- Chan, J., Kaufmann, S.H.E., 1994. Immune mechanism of protection. In *Tuberculosis Pathogenesis and Control*. Bloom, B.R. Editor. American Society for Microbiology, Washington, DC. 389-417.
- Desjardins, M., 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the "kiss and run" hypothesis. *Trends. Cell Bio.* 5:183-186.
- Dolin, J.P., 1994. Global Tuberculosis Incidences and Mortality During 1990-2000. *Buletin World Health Organization*, 72(2): 213-220.
- Farrow, B.R.H. and Love, D.N., 1975. Infectious Diseases. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of Dog and Cat*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
- Gunn-Moore, D.A., Jenkins, P.A., and Lucke, V.M., 1996. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases by unusual mycobacterial variant. *Vet. Rec.* 138, 276-280.
- Graham, A., Rook, W., dan Bloom, B.R., 1994. Mechanism of pathogenesis in tuberculosis. In *Tuberculosis Pathogenesis and Control*. Bloom, B.R. Editor. American Society for Microbiology, Washington, DC. 485-502.
- Janz, R., 1996. Tuberculosis in Cat. *Vet.Rec.* 134:395.
- Kinnear, P.R. and Gray, C.D., 1999. SPSS for Window Made Simple 3rd Ed. Lawrence Erlbaum. ISBN 0-86377-827-5.
- Leijh, P.C.J., Furh, R.V., dan Zwet, T.L.V., 1986. In vitro determination of phagocyte and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocyte. Dalam Weir, D.M. Ed., *Cellular Immunology*, Blackwell Scientific Publication, London. Hal.46.1-46.21.
- Monies, R.J., Cranwell, M.P., Palmer, Inwald, J., Hewinson, R.G., Rule, B., 2000. Bovine tuberculosis in Domestic Cats. *Ve.Rec.* 146: 407-408.
- Quie, P.Q., 1972. Clinical manifestation of chronic in phagocyte function. In *phagocyte mechanisms in health and disease*, Eds. William, R.C. & Fudenburg, H.D.), Intercontinental, New York. p. 139.
- Romagnani, S., 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Allergy Asthma Immunol.* 85(1):9-18.
- Seder, R.A. and Mosmann, T.M., 1999. Differentiation of effector phenotypes of CD⁺ and CD8⁺ T cells. In Paul W.E. Ed. *Fundamental Immunology*, 4th Ed. Lippincott-Raven, pp.879-908.
- Snider, W.R., 1971. Tuberculosis in Canine and Feline: Review of the literature. *American Review Respiratory*, 104: 877-887.
- Thoen, C.O., 1994. Tuberculosis in Wild and Domestic Mammals. In *Tuberculosis Pathogenesis and Control*. Bloom, B.R. Editor. American Society for Microbiology, Washington, DC. 157-162.
- Tizard, I., 2000. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 6th Ed. W.B. Saunders Company, United State of America.
- Wilesmith, J.W., 1994. Tuberculosis in Cat. *Vet.Rec.* 134:359.