

B A B 6**PEMBAHASAN**

Penelitian ini dirancang untuk membuktikan dan mengungkap mekanisme perubahan respons imun di mukosa usus akibat paparan bahan aktif deterjen (ABS/LAS). Mengingat ABS dan LAS merupakan bahan toksik, maka kedua bahan tersebut akan menimbulkan stres pada sel yang terkait dengan sistem imun di mukosal. Agar dapat menyimpulkan hasil penelitian ini maka digunakan paradigma patobiologis berkonsep pada stress cell.

Penelitian ini merupakan jenis eksplanatif eksperimental dengan rancangan *the posttest-only control group design* yang dilakukan pada mencit. Rancangan tersebut dipilih mengingat untuk mendapatkan unit penelitian sampel tersebut harus dikorbankan. Agar data ini bisa diolah secara multivariat maka dilakukan beberapa uji yaitu uji homogenitas sampel uji normalitas dan uji konsistensi.

Untuk mengetahui pengaruh paparan ABS dan LAS pada respons imun mukosal maka dilakukan uji beda multivariat (manova). Sedangkan untuk mengetahui besar kontribusi dari setiap variabel yang terkait dengan perubahan respons imun mukosa usus yang terpapar dengan ABS/LAS dilakukan analisis diskriminan. Salah satu fungsi analisis diskriminan adalah untuk melihat besar kontribusi variabel pada aktifitas biologisnya, yang dalam penelitian ini hasil tersebut dipolakan (Pola perubahan PNI).

Penelitian mengenai ABS/LAS yang sudah dilakukan oleh peneliti terdahulu sejauh ini belum pernah mengungkap pengaruh lokal didalam tubuh akibat paparan ABS/LAS ini. ABS/LAS merupakan agen senobiotik yang toksis merupakan *stressor* , dapat menyebabkan stres pada sel epitel mukosa dan sel M mukosa usus yang mana kedua sel ini mempunyai peran pada sistem imun mukosal sehingga fungsi sistem imun mukosal ini akan mengalami modulasi.

Sistem imun mukosal merupakan pertahanan pertama terhadap imunogen atau patogen yang masuk tubuh per-oral, sehingga perubahan sistem imun lokal ini segera tampak ketika imunogen atau patogen tersebut melukai mukosa usus.

Dusahakan untuk menjaga validitas external dan internal sebaik-baiknya, supaya penelitian ini tetap sah. Pengontrolan validitas eksternal dengan cara randomisasi dan menghomogenitaskan sampel. Randomisasi menggunakan cara “sampel acak sistematis”, yaitu dari 100 mencit jantan umur 45 sampai 60 hari, dengan berat badan 25 sampai dengan 35 gram, diambil 30 ekor mencit. Dari 30 mencit ini, 10 mencit diberi paparan ABS, 10 mencit diberi paparan LAS, dan 10 mencit tidak diberi perlakuan atau sebagai kontrol dengan pemberian Aqua.

Untuk homogenitas sampel dilakukan uji statistik manova, ternyata sampel berasal dari populasi yang homogen. Untuk mengetahui sampel berasal dari distribusi normal dilakukan uji statistik normalitas, ternyata berdistribusi normal.

Dosis perlakuan untuk masing-masing kelompok sama, baik larutan ABS, larutan LAS, maupun Aqua untuk kontrol yaitu 0,1 cc setiap mencit. Pemberian secara oral dilakukan selama 7 hari beturut-turut setiap pagi hari, setelah selesai pada hari ke 8 mencit dimatikan, diambil usus halus beserta *Peyer Patches* nya. Kemudian organ tadi

dibagi dua, sebagian untuk sediaan jaringan blok parafin, sebagian untuk sediaan jaringan segar.

Perbedaan respons imun mukosal atas dasar analisis multivariat yang diwujudkan dalam bentuk pola perubahan respons imun mukosal (PPRIM) dengan menggunakan konsep PNI pada sel yang mengalami stres.

Semua variabel penelitian ini bersumber pada konsep psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres. Pengempirian variabel menjadi data digunakan untuk pemeriksaan morfofungsi yaitu melihat morfologi sel yang sedang berfungsi.

Pemrosesan jaringan dilakukan oleh peneliti dibantu oleh teknisi yang ahli dibidangnya dan diawasi oleh seorang ahli patobiologi (Patobiolog). Untuk pengamatan komponen imunoglobulin yang tidak mudah rusak dapat digunakan pemrosesan jaringan dengan metode parafin. Sedang untuk pengamatan limfosit T CD₄ dan limfosit T CD₈ yang mudah rusak dilakukan pemrosesan jaringan segar dengan metode pembekuan.

Penetapan lokasi pengamatan dilakukan oleh peneliti sebagai pengamat pertama bersama dengan pengamat kedua. Dengan harapan dapat mengurangi kemungkinan adanya perbedaan hasil pengamatan yang diakibatkan oleh perbedaan lokasi pengamatan. Disamping itu bila diperlukan penghitungan ulang, tidak akan mengubah lokasi penghitungan.

Pengamatan komponen sistem imun dilakukan dengan menggunakan alat yang sudah ditera ajeg. Dalam penelitian ini digunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan graticulae untuk memudahkan penghitungan komponen yang diamati. Untuk menguji apakah pengamatan setiap variabel yang dilakukan peneliti sudah benar maka

dilakukan uji Manova. Semua variabel respons imun bekerja dalam satu fungsi, maka teknik analisis yang digunakan adalah analisis multivariat.

Pemecahan masalah penelitian diperlukan suatu model terpikir (paradigma). Paradigma patobiologik pada hakekatnya merupakan model berpikir untuk menalar segala perubahan biologik yang tidak normal yang terjadi karena tubuh berinteraksi dengan lingkungan yang merusak. Penerapan paradigma untuk memecahkan masalah penelitian perlu ditetapkan suatu kerangka pikir atau konsep. Sehingga indikator yang ditetapkan merupakan cerminan dari suatu konsep yang digunakan dan diharapkan dapat untuk menajamkan hasil penelitian (Pujirahardjo, 1993). Atas dasar hal tersebut maka dalam penelitian ini digunakan konsep psikoneuroimunologis pada sel yang mengalami stres.

Bentuk interaksi variabel psikoneuroimunologis tersebut digambarkan sebagai pola. Pola psikoneuroimunologis pada hakekatnya merupakan pencerminan interaksi antara fungsi semua komponen yang terlibat dalam kelainan respon imun. Karena itu pola ini tidak cukup dicerminkan secara langsung dari besaran atau harga rata-rata masing-masing komponen, mengingat harga dari masing-masing komponen tersebut belum mencerminkan interaksi biologik yang terjadi. Untuk membuat pola psikoneuroimunologis dari hasil penelitian ini, dilakukan perkalian harga rata-rata dari variabel pembeda tersebut dengan suatu konstanta yaitu koefisien Fisher yang merupakan interaksi dari bermacam variabel dan mencerminkan besarnya peran dan kontribusi antar variabel dalam mekanisme biologik yang terjadi. Untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok ABS, LAS dan kelompok kontrol dilakukan uji

Manova. Ternyata ada perbedaan perubahan respons PNI yang signifikan antara grup yang terpapar dengan ABS dengan grup yang terpapar dengan LAS.

Untuk mengetahui variabel pembeda yang sangat menentukan atau pembeda terkuat diantara ke 2 grup tersebut dilakukan uji analisis diskriminan. Uji analisis diskriminan pada daerah induktif mukosal didapat 5 variabel pembeda terkuat yaitu limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, sel Mø dan SP IgA dengan kekuatan pembeda sebesar 100 %. Sedang daerah efektor mukosal didapat 3 variabel pembeda terkuat yaitu : SP IgG, limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ dengan kekuatan pembeda sebesar 90 %.

Agar variabel tersebut dapat mencerminkan pola perubahan respons psikoneuroimunologik diputuskan untuk membuat pola sebagai berikut : Pola dari perubahan respons imun mukosal (▲), yang dipolakan adalah :

1. Perubahan respons imun antara ABS (A) dengan Aqua (K)

A - K → ▲ :

A : bahan toxis yang sebenarnya dilarang.

2. Perubahan respons imun antara LAS (L) dengan Aqua (K)

L - K → ▲ :

L: bahan toxis yang bisa ditolerir.

Dari sini diharapkan akan bisa mengungkap mekanisme dari perubahan respons imun akibat *stressor* dengan pendekatan psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pembuatan pola perubahan psikoneuroimunologik daerah induktif mukosal dengan menggunakan 5 komponen psikoneuroimunologik yaitu limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, sel M ϕ dan SP IgA. Sedangkan pembuatan pola perubahan psikoneuroimunologik daerah efektor mukosal menggunakan 3 komponen psikoneuroimunologik yaitu SP IgG, limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺.

Uji analisis diskriminan juga menghasilkan harga kontribusi diskriminan setiap komponen variabel yang digunakan untuk membuat pola perubahan respons psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pola perubahan psikoneuroimunologik yang dibahas adalah pola pada daerah induktif mukosa usus dan daerah efektor mukosa usus. Pola ini diharapkan dapat menjelaskan proses kejadian mengapa pemberian paparan deterjen merubah respons imun mukosal. Dengan menganalisa PPRIM diharapkan bisa mengungkap mekanisme dari perubahan psikoneuroimunologik pada sel yang mengalami stres.

Pada penelitian ini digunakan istilah komponen imun seluler atau imunitas seluler dan komponen imun humoral atau imunitas humoral, sehubungan dengan konsep PNI yang berprinsip pada modulasi aktifitas sistem imun terhadap *stressor*. Modulasi/perubahan aktifitas sistem imun terjadi pada setiap variabel komponen sistem imun, dan diduga merupakan *General Adaptation Syndrome* (GAS). Bentuk imunitas humoral dan seluler ini merupakan bentuk respons imun adaptif (adaptasi, dan kegagalan dari adaptasi ini menimbulkan modulasi aktifitas sistem imun berupa respons imun yang

dicerminkan oleh GAS dengan melalui tingkatan sebagai berikut : (1). *Alarm stage* , (2). *Resistance/adaptation stage* dan (3). *Exhaustion stage*. (Mc Cance, 1994).

TABULASI DATA

VARIABEL	A B S INDUKTIF MUKOSAL			L A S INDUKTIF MUKOSAL		
	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN
IgA	-0,134	-0,147	0,020	0,268	1,011	0,271
IgM	-0,300	-	-	-0,367	-	-
IgG	0,00	-	-	-0,166	-	-
CD4	1,034	0,303	0,314	-1,367	-2,401	3,283
CD8	0,767	3,773	2,894	-0,232	0,369	-0,086
NK	-0,068	-3,779	0,257	-0,567	-7,946	4,506
MØ	-6,132	-0,949	5,820	-6,267	-3,395	8,744

VARIABEL	A B S EFEKTOR MUKOSAL			L A S EFEKTOR MUKOSAL		
	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN	AN. MANOVA	KOEF. FISHER	AN. DISKRIMINAN
IgA	-10,100	-	-	-10,00	-	-
IgM	-3,041	-	-	-8,575	-	-
IgG	2,167	1,984	4,301	-1,363	0,169	-0,180
CD4	-9,867	-0,963	9,505	-11,402	-1,287	14,682
CD8	-5,468	-2,566	14,032	-5,034	-1,594	8,028
NK	-0,434	-	-	-1,667	-	-
MØ	-6,633	-	-	-7,533	-	-

Paparan ABS dan LAS pada sistem imun mukosal dapat diamati pada 2 daerah yaitu daerah induktif dan daerah efektor. Perubahan daerah induktif mukosal lebih mencerminkan proses inisiasi/induksi dari sistem imun, sedang perubahan pada daerah efektor mukosal lebih mencerminkan bentuk efektifitas sistem imun mukosal (Stites,

1991; Hiroshi, 1994) seperti telah dilaporkan banyak peneliti bahwa ketahanan imunologis dimukosa didominasi oleh peran sekretori IgA walaupun tidak menutup kemungkinan peran CMI yang ada di mukosal. Hal ini didasarkan atas pertimbangan bahwa ketahanan imunologis yang ada di permukaan mukosa usus adalah S IgA (Tomasi, 1982; Ogra, 1994).

Kerangka konseptual yang digunakan menyatakan bahwa ABS/LAS sebagai *stressor* mempunyai zat aktif permukaan (surfaktan) dengan kedua kutub hidrofilik dan lipofiliknya akan merusak membran lipid bilayer dari sel M maupun sel epitel mukosal, hal ini akan menyebabkan masuknya imunogen yang tidak terbatas dan kemudian akan diterima oleh sel MØ atau sel NK pada area Dome, sehingga sel NK dan MØ ini juga akan mengalami stres.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan ABS di induktif mukosal menyebabkan penurunan SP IgA, SP IgM, sel NK dan MØ seperti terlihat pada analisis manova (Tabel 3). Dilihat dari mekanisme kerja biologiknya pada analisis diskriminan ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada semua komponen yang mempunyai nilai beda tinggi yaitu SP IgA, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK dan MØ (Tabel 5).

IL-1 yang dihasilkan oleh NK dan MØ yang stres akan memicu limfosit T CD₄⁺. Peningkatan Th-1 relatif lebih mendominasi pemicuan limfosit T CD₄⁺ dibandingkan dengan peningkatan Th-2 sehingga karena pengaruh IL-2 yang dihasilkan oleh Th-1 terjadi pemicuan untuk limfosit T CD₈⁺. (Bradley, *et al*, 1996). Th-2 mungkin meningkat pada pemicuan limfosit T CD₄⁺, dan terbentuk antibodi dimana diduga yang banyak adalah SP IgD sebagai imunoglobulin awal pada proses inisiasi untuk maturasi

imunoglobulin. Oleh karena suatu sebab SP IgD ini belum sampai bisa berubah menjadi SP IgA maupun SP IgM, sehingga SP IgA dan SP IgM ini negatif atau terjadi penekanan. Switching dari SP IgG tidak mungkin terjadi karena SP IgG = 0,00.

NK dan MØ tertekan, ini dapat dijelaskan bahwa diduga keduanya banyak yang rusak oleh karena toksisitas ABS ataupun untuk menanggulangi imunogen lain yang masuk pada area Dome induktif mukosal. Koefisien Fisher untuk NK negatif, MØ juga negatif ini menunjukkan penurunan aktifitas biologik keduanya pada daerah induktif mukosal. Analisis diskriminan untuk NK dan MØ positif yang berarti peran kontribusi di dalam pola sebagai variabel pembeda adalah besar, tetapi nilai ini sebenarnya jauh lebih rendah dibandingkan dengan bila tidak diberi paparan ABS, ini menunjukkan adanya penurunan aktifitas biologis.

Limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ terpicu, serta peran kontribusinya juga positif ini disebabkan pemicuan limfosit T CD₄⁺ oleh IL-1 didominasi oleh Th-2 tetapi ternyata Th-1 relatif lebih meningkat dibandingkan dengan Th-2, sehingga limfosit T CD₈⁺ juga meningkat.

Sedang paparan ABS di daerah efektor mukosal ternyata menekan hampir semua komponen sistem imun SP IgA, SP IgM, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK dan MØ, kecuali SP IgG, bisa dilihat dari analisis manovanya (Tabel 3).

Epitel mukosal yang mengalami stres ini akan memproduksi IL-1 dengan sangat berlebihan sehingga justru akan menekan T CD4. Penurunan T CD4 ini akan mempengaruhi penurunan subsetnya juga yaitu Th-1 dan Th-2. Penurunan Th-2 mempengaruhi produksi antibodi, disini terjadi penurunan IgA dan IgM, sedang IgG positif yang dimungkinkan karena terjadinya proses inflamasi akibat toksisitas dari ABS,

sehingga IgG meningkat. Penurunan sel Th-1 mempengaruhi terjadinya penurunan pada limfosit T CD₈⁺. Kontribusi IgG memang berlawanan dengan IgA, dimana peran kontribusi SP IgA di dalam pola tidak ada sehingga IgG berkontribusi positif dengan koefisien Fisher yang positif pula, ini menunjukkan *rearrangement* gen antara IgA dan IgG masih berlaku (Ogra, 1994). Sedang penekanan NK dan MØ, keduanya tertekan terkena langsung oleh toksisitas ABS selain itu juga karena pengaruh masuknya imunogen yang tak terbatas akibat kerusakan epitel mukosal, karena stres.

Pada analisis diskriminan limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ ini positif tetapi aktifitas biologisnya negatif (koefisien Fisher negatif). Kontribusi di dalam pola menunjukkan peran kontribusi variabel pembeda pada kedua perlakuan adalah positif, tetapi sebenarnya nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan seandainya tidak diberi paparan ABS.

Hasil penelitian pada paparan LAS di induktif mukosal menunjukkan efek penekanan pada setiap komponen sistem imun (SP IgM, SP IgG, limfosit T CD₄⁺, limfosit T CD₈⁺, sel NK, dan sel MØ kecuali SP IgA, seperti terlihat analisis manova (Tabel 3).

Kalau dilihat dari mekanisme kerja (*action*) biologisnya, ternyata memberikan kontribusi peran yang positif pada SP IgA, limfosit T CD₄⁺, sel NK dan MØ kecuali pada komponen sitotoksik limfosit T CD₈⁺. Padahal komponen seluler CD8 ini berguna untuk fungsi proteksi pada sistem imun mukosal, sehingga fungsi CD8 ini digantikan oleh komponen seluler yang mempunyai fungsi yang sama yaitu sel NK, sehingga kontribusi peran sel NK oleh pengaruh LAS pada daerah induktif ini cukup besar,

dibandingkan dengan sel NK karena pengaruh ABS, seperti terlihat pada analisis diskriminan (Tabel 5).

Sedang paparan LAS di daerah efektor mukosal menunjukkan bahwa pada daerah efektor mukosal sel yang mengalami stres adalah epitel mukosa yang juga bisa berlaku seperti $M\emptyset$ dan akan menghasilkan IL-1 yang akan mempengaruhi limfosit T helper (limfosit T CD_4^+) dan subsetnya yaitu perbandingan relatif antara Th-1 dan Th-2.

Produksi IL-1 oleh karena kerusakan epitel yang terjadi ini sangat berlebihan sehingga efeknya malahan menekan limfosit T CD_4^+ dimana penurunan ini mengenai kedua subset T helper yaitu Th-1 dan Th-2. Penurunan relatif sel Th-2 akan mempengaruhi produksi antibodi, sehingga SP IgA, SP IgM dan SP IgG juga negatif. Penurunan relatif sel Th-1 akan mempengaruhi sel limfosit T CD_8^+ sehingga limfosit T CD_8^+ juga negatif.

Paparan LAS pada daerah efektor mukosal, ternyata mensupresi semua komponen sel imun baik humoral maupun seluler SP IgA, SP IgM, SP IgG, limfosit T CD_4^+ , limfosit T CD_8^+ , sel NK, dan $M\emptyset$, seperti tercantum pada analisa manova (Tabel 4). SP IgA pada daerah efektor ini negatif walaupun SP IgA pada daerah induktif positif. Ini dimungkinkan karena pada daerah induktif mukosal SP IgA yang diamati adalah merupakan IgA sitoplasmik yang setelah masuk ke daerah efektor, IgA tadi segera disekresikan dan berikatan dengan komponen sekretorik menjadi S IgA untuk melakukan fungsi proteksi mukosal. Jadi SP IgA pada efektor negatif.

Sedang NK dan $M\emptyset$ keduanya tertekan karena terkena langsung oleh pengaruh toksisitas LAS selain itu juga karena pengaruh masuknya imunogen yang tak terbatas akibat kerusakan epitel mukosal, karena stres.

Pada analisis diskriminan limfosit T CD₄⁺ dan limfosit T CD₈⁺ ini positif tetapi aktifitas biologisnya negatif (koefisien Fisher negatif). Kontribusi di dalam pola menunjukkan peran kontribusi variabel pembeda pada kedua perlakuan adalah positif, tetapi sebenarnya nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan seandainya tidak diberi paparan LAS.

Dengan mencermati kontribusi variabel terhadap aktifitas biologisnya maka tampak bahwa paparan ABS induktif mukosal lebih menekan SP IgA, limfosit CD4, NK dan MØ dibanding dengan LAS. Walaupun peran sitotoksik pada CD8 relatif lebih baik dibanding dengan kelompok LAS (Grafik 3). Melihat kontribusi variabel terhadap aktifitas biologisnya maka kelompok ABS pada efektor mukosal lebih menekan CD4 dibanding dengan LAS namun tidak demikian halnya dengan CD8 dan SP IgG (Grafik 4). Dengan memperhatikan kedua pola tersebut kita bisa mencoba mengembangkan pemikiran bahwa ABS lebih merusak SP IgA di induktif mukosal, sehingga fungsi SP IgA pada daerah efektor tidak dapat diperhitungkan kontribusinya. Sebagai gantinya pada pola efektor mukosal yang muncul adalah SP IgG. Sesuai dengan pendapat Ogra, 1994 maka bila SP IgA menurun akan diikuti peningkatan SP IgG namun kondisi ini tidak menguntungkan sistem imunitas mukosal. Selanjutnya dengan memperhatikan imunitas seluler di mukosal maka paparan ABS di induktif mukosal dapat memicu limfosit T sitotoksik namun menekan MØ (Grafik 3). Demikian halnya imunitas seluler kelompok ABS di efektor mukosal justru memicu SP IgG. Selanjutnya bila mencermati imunitas seluler maka kontribusi CD8 untuk kelompok ABS relatif masih lebih baik dibanding kelompok LAS (Tabel 6).

Kesimpulan

Dengan memperhatikan berbagai variabel baik humoral maupun seluler pada daerah induktif mukosal dan daerah efektor mukosal maka dapat disimpulkan bahwa paparan ABS ternyata lebih merusak SP IgA di induktif mukosal, sehingga peran IgA di efektor mukosal menjadi terabaikan. Mengingat imunitas pada permukaan mukosa didominasi oleh SP IgA maka ABS sangat merugikan sistem imunitas di mukosa usus, sedangkan di dalam mukosa ABS relatif tidak terlalu merugikan imunitas seluler.

Keterbatasan penelitian

Tanpa bermaksud mengurangi validitas penelitian ini, maka peneliti sadar bahwa banyak kekurangan yang terjadi misalnya belum ditelitinya substansi yang dikeluarkan oleh yang mengalami stres (stress signaling substances) antara lain pemeriksaan interleukin (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, dan IL-10) dan IFN γ serta pemeriksaan subset dari limfosit T helper yaitu Th-1 dan Th-2. Hal tersebut karena kesulitan untuk "mendapatkan antibodi monoklonal". Namun berdasarkan kerangka konseptual pada halaman 6, maka keterbatasan ini bisa sedikit berkurang artinya.