

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data respons imun pada mencit yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis* pada berbagai kelompok perlakuan dengan indikator konsentrasi interleukin-10 (IL-10) dan gambaran histologis paru. Konsentrasi IL-10 diperoleh melalui metode ELISA dengan adanya perubahan warna dari larutan yang semula tidak berwarna menjadi biru sebagai tanda terjadinya reaksi antibodi serum dengan antibodi tersier berlabel enzim yang kemudian dengan penambahan *stop solution* akan berubah menjadi warna kuning sehingga diperoleh nilai OD yang diukur pada  $\lambda=450$  nm dengan satuan pg/mL. Sedangkan gambaran histologis paru pada tiap kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 4.3; 4.4;4.5;4.6;4.7 dan 4.8.

##### 4.1.1 Konsentrasi interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 (IL-10) merupakan sitokin yang dihasilkan oleh makrofag dan sel dendritik yang terbentuk akibat respon imun akibat paparan *Mycobacterium tuberculosis*. Nilai *Optical Density* (OD) pada tiap perlakuan ditunjukkan pada Tabel 4.1 di bawah ini:

Tabel 4.1 Rerata nilai OD pada tiap kelompok perlakuan

Perlakuan	Nilai OD pada pengulangan ke-				Rerata
	I	II	III	IV	
K	0.115	0.111	0.096	0.113	0.109
K+	0.095	0.089	0.078	0.085	0.087
K-	0.132	0.107	0.156	0.107	0.125
P1	0.114	0.119	0.117	0.096	0.111
P2	0.096	0.107	0.106	0.109	0.104
P3	0.085	0.095	0.088	0.098	0.091

Keterangan:

K : Kontrol normal

K+ : Kontrol positif, hanya diberi PSK saja

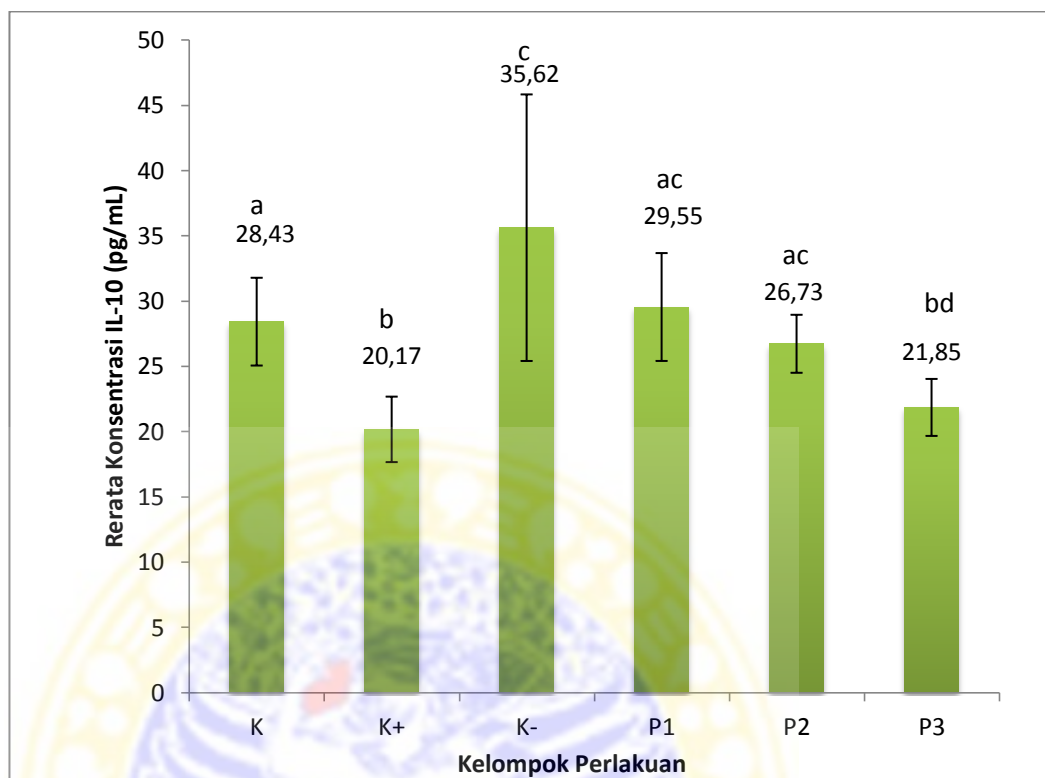
K- : Kontrol negatif, hanya terpapar *M. tuberculosis* saja

P1 : Pemberian PSK sebelum terpapar *M. tuberculosis*

P2 : Pemberian PSK sesudah terpapar *M. tuberculosis*

P3 : Pemberian PSK sebelum dan sesudah terpapar *M. tuberculosis*

Data nilai OD yang telah diperoleh dikonversi menjadi nilai konsentrasi dengan satuan pg/mL menggunakan persamaan eksponensial  $\ln Y = 1,517 + \ln 0,012$  selengkapnya berada di Lampiran 2. Data rerata konsentrasi IL-10 yang diperoleh dari tiap perlakuan pada penelitian ini disajikan pada Gambar 4.1 di bawah ini:



Gambar 4.1 Rerata konsentrasi IL-10 pada tiap kelompok perlakuan. K: Kontrol normal; K+: Kontrol positif hanya diberi PSK saja; K-: Kontrol negatif hanya terpapar *M. tuberculosis* saja; P1: Pemberian PSK sebelum terpapar *M. tuberculosis*; P2 : Pemberian PSK sesudah terpapar *M. tuberculosis*; P3 : Pemberian PSK sebelum dan sesudah terpapar *M. tuberculosis*.

Dari Gambar 4.1 yang menyajikan rerata konsentrasi IL-10 pada tiap perlakuan. Pada kelompok K sebagai kontrol normal yaitu 28,43 pg/mL. Kelompok K+ sebagai kontrol positif yang hanya diberi polisakarida krestin (PSK) dengan dosis 50 mg/BB rerata konsentrasi IL-10 sebesar 20,17 pg/mL. Kelompok K- sebagai kontrol negatif diberi paparan *M. tuberculosis* saja memiliki rerata IL-10 35,62 pg/mL. Pada kelompok perlakuan P1 dengan pemberian PSK seminggu berturut-turut sebelum terpapar *M. tuberculosis* rerata konsentrasi IL-10 sebesar 29,55 pg/mL. Kelompok perlakuan P2 dengan

pemberian PSK seminggu berturut-turut setelah terpapar *M. tuberculosis* memiliki rerata konsentrasi IL-10 26,73 pg/mL. Sedangkan pada kelompok perlakuan P3 yaitu pemberian PSK seminggu pada saat sebelum dan sesudah terpapar *Mycobacterium tuberculosis* memiliki rerata konsentrasi IL-10 sebesar 21,85 pg/mL.

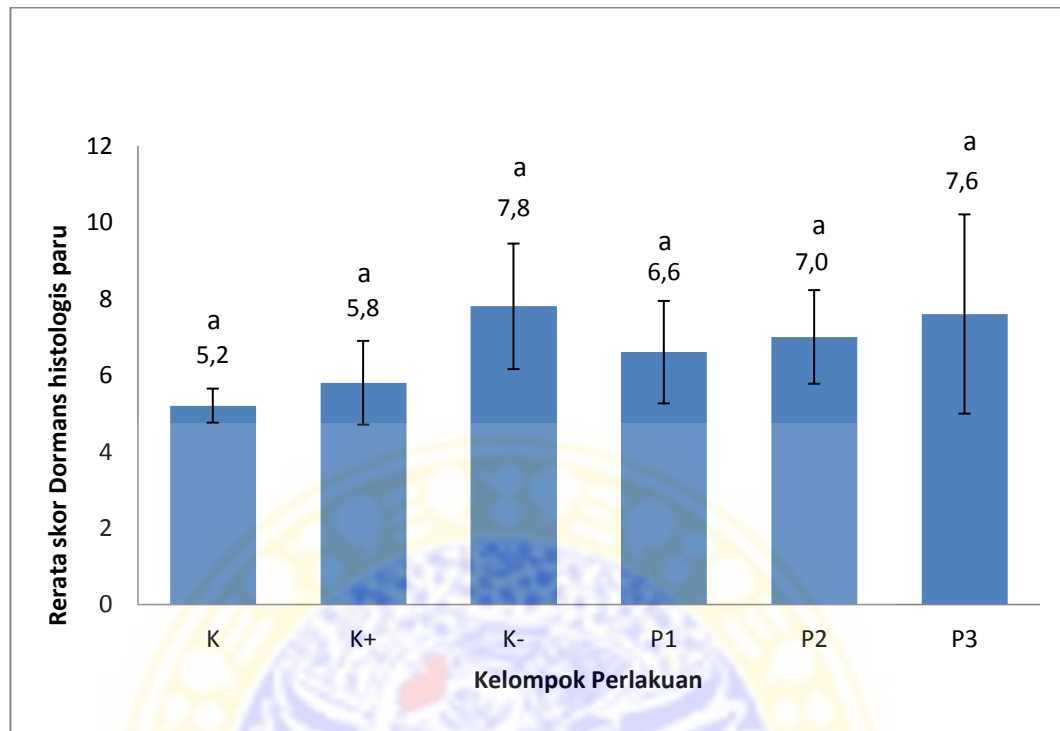
Uji distribusi Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data konsentrasi IL-10 berdistribusi normal dengan  $p > 0,05$  ( $0,651 > 0,05$ ) yang selengkapnya terlampir pada Lampiran 3. Data konsentrasi IL-10 dilanjutkan dengan Brown-Forsythe dan hasilnya menunjukkan bahwa terdapat pengaruh  $p < 0,05$  ( $0,039 < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian PSK pada kelompok perlakuan berpengaruh terhadap konsentrasi IL-10 mencit.

Dilanjutkan dengan uji t ( $\alpha = 0,05$ ) selengkapnya terlampir pada Lampiran 3 didapatkan hasil sesuai Gambar 4.1 dapat diketahui setiap kelompok perlakuan konsentrasi IL-10 menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan lainnya. Hal ini berarti bahwa pemberian polisakarida krestin *Coriolus versicolor* dengan dosis 50 mg/kg BB berpengaruh terhadap konsentrasi IL-10 mencit yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis*. Kelompok K memperlihatkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok K+, K- dan P3. Kelompok K+ menunjukkan perbedaan signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K, K-, P1 dan P2, tetapi tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan P3. Pada kelompok K- menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok perlakuan K, K+ dan P3. Sedangkan pada kelompok perlakuan P1 dan P2 berbeda signifikan terhadap K+ dan P3, tetapi rerata

konsentrasi IL-10 pada kelompok P1 dan P2 melebihi kelompok K dan mendekati rerata kelompok K-. Kelompok P3 memberikan hasil yang berbeda signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok K, K+, P1, P2 dan menunjukkan tidak ada beda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K+.

#### **4.1.2 Gambaran histologis paru**

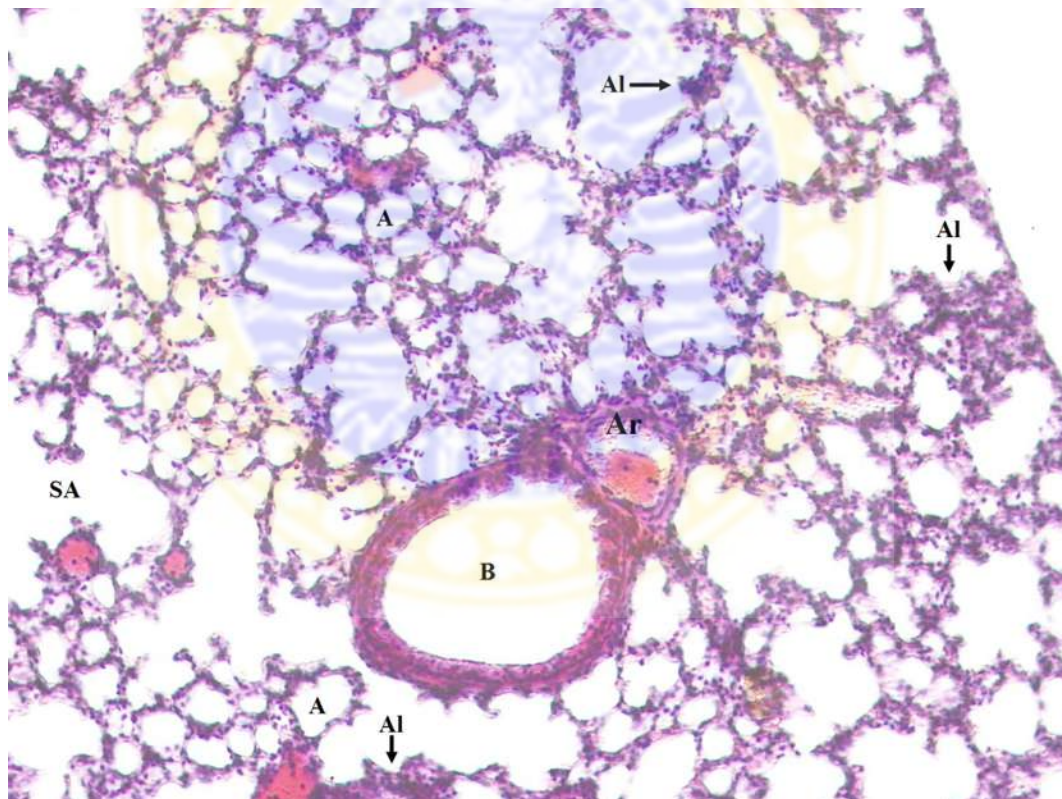
Gambaran histologis paru diperoleh dengan melakukan pembuatan preparat terlebih dahulu dan kemudian diamati dibawah mikroskop. Kerusakan paru meliputi peribronkiolitis, pervaskulitis, alveolitis dan granuloma yang diukur berdasarkan skor Dormans *et al.* (2004) dalam Koendhori (2008) selengkapnya berada pada Lampiran 6. Data rerata skor pemeriksaan kerusakan paru disajikan pada Gambar 4.2. Sedangkan gambaran histologis paru pada tiap kelompok perlakuan disajikan pada gambar di bawah ini:



Gambar 4.2 Rerata konsentrasi skor histologis kerusakan paru pada tiap kelompok perlakuan. K: Kontrol normal; K+: Kontrol positif hanya diberi PSK saja; K-: Kontrol negatif hanya terpapar *M. tuberculosis* saja; P1: Pemberian PSK sebelum terpapar *M. tuberculosis*; P2 : Pemberian PSK sesudah terpapar *M. tuberculosis*; P3 : Pemberian PSK sebelum dan sesudah terpapar *M. tuberculosis*.

Gambar 4.2 menyajikan data rerata skor kerusakan paru berupa peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan granuloma pada seluruh kelompok perlakuan yang telah dihitung sebelumnya berdasarkan skor Dormans *et al.* (2004) dalam Koendhori (2008) selengkapnya terlampir pada Lampiran 5. Rerata tertinggi kerusakan paru yaitu terjadi pada kelompok perlakuan K- yang hanya dipapar *Mycobacterium tuberculosis*. Rerata terendah dijumpai pada kelompok perlakuan K normal sebesar 5,2. Pada kelompok perlakuan K+, P1, P2 dan P3 masing-masing memiliki rerata kerusakan paru sebesar 5,8; 6,6; 7,0 dan 7,6.

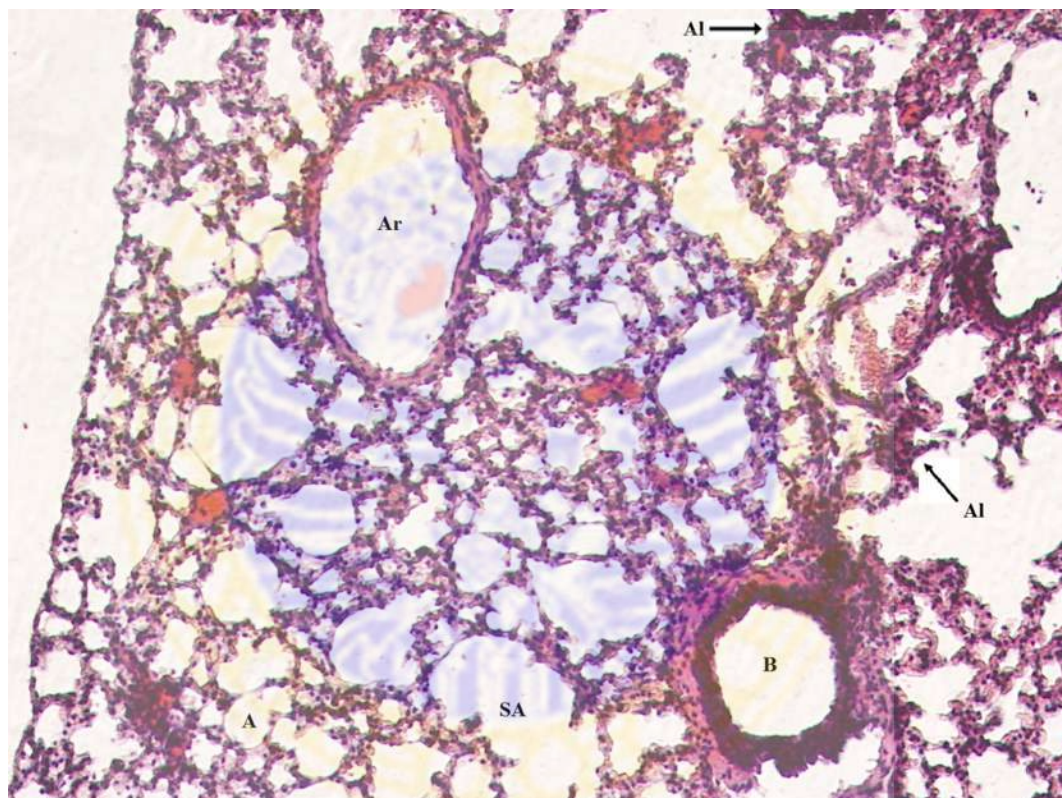
Uji analisis kerusakan paru berupa statistik Kruskal Wallis selengkapnya terlampir pada Lampiran 7 didapatkan hasil sesuai Gambar 4.2 dapat diketahui setiap kelompok perlakuan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian polisakarida krestin *Coriolus versicolor* dengan dosis 50 mg/kg BB selama 7 hari belum mampu mengembalikan kondisi kerusakan paru berupa peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis dan pembentukan granuloma pada mencit yang terpapar *M. tuberculosis*.



Gambar 4.3 Gambaran histologis paru kelompok kontrol normal (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri; B: bronkiolus; SA: *saccus* alveolus).

Gambar 4.3 diatas terlihat adanya bronkiolus, alveolus, pembuluh darah arteri dan *saccus* alveolus. Pada kelompok perlakuan kontrol normal ini tidak

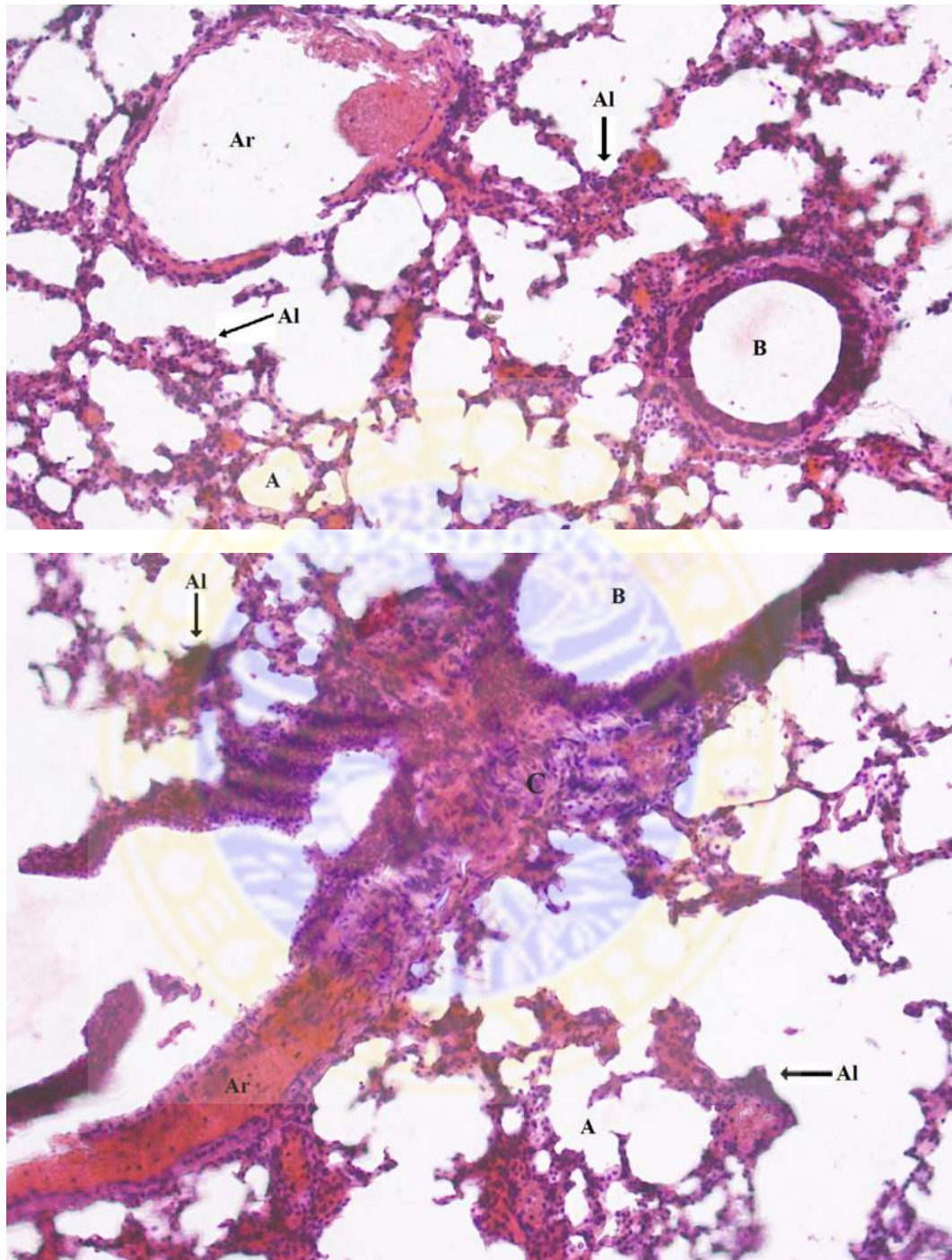
tampak adanya sel-sel radang pada bronkiolus dan pembuluh darah. Pada gambar 4.3 terlihat adanya alveolitis yaitu peradangan yang terjadi pada dinding alveolus. Sel-sel dinding alveolus tidak hanya tersusun atas sel epitel pipih selapis, melainkan juga infiltrasi dari sel-sel inflamasi yang menandakan terjadinya peradangan.



Gambar 4.4 Gambaran histologis paru kelompok kontrol positif (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri; B: bronkiolus; SA: *saccus* alveolus).

Pada kelompok perlakuan kontrol positif yang diberi PSK saja tidak tampak adanya sel-sel radang pada bronkiolus dan pembuluh darah. Seperti halnya pada kelompok kontrol normal, kelompok kontrol positif ini juga ditemukan adanya alveolitis yaitu infiltrasi sel-sel radang pada alveolus.

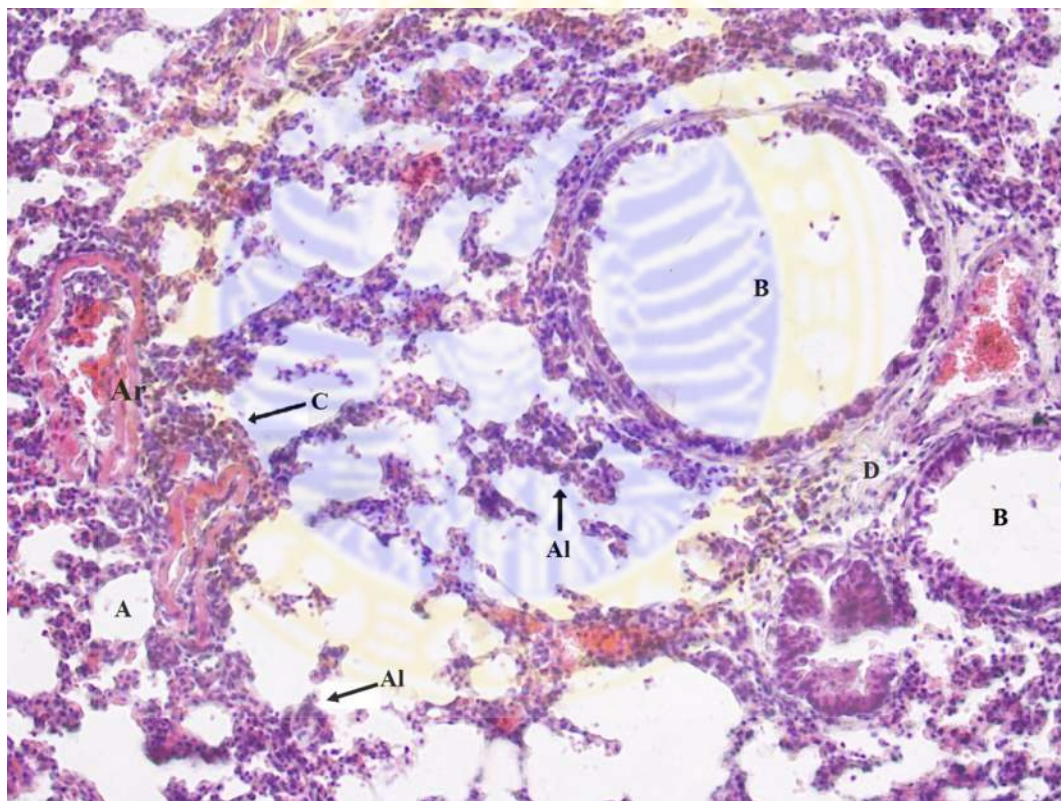




Gambar 4.5 Gambaran histologis paru kelompok kontrol negatif (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri; B: bronkiolus; C: perivaskulitis ).

Pada gambar diatas, dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif gambaran histologis paru menunjukkan terjadi peradangan terutama pada dinding alveolus (alveolitis ditunjuk huruf Al). Dinding alveolus dikelilingi oleh sel-sel

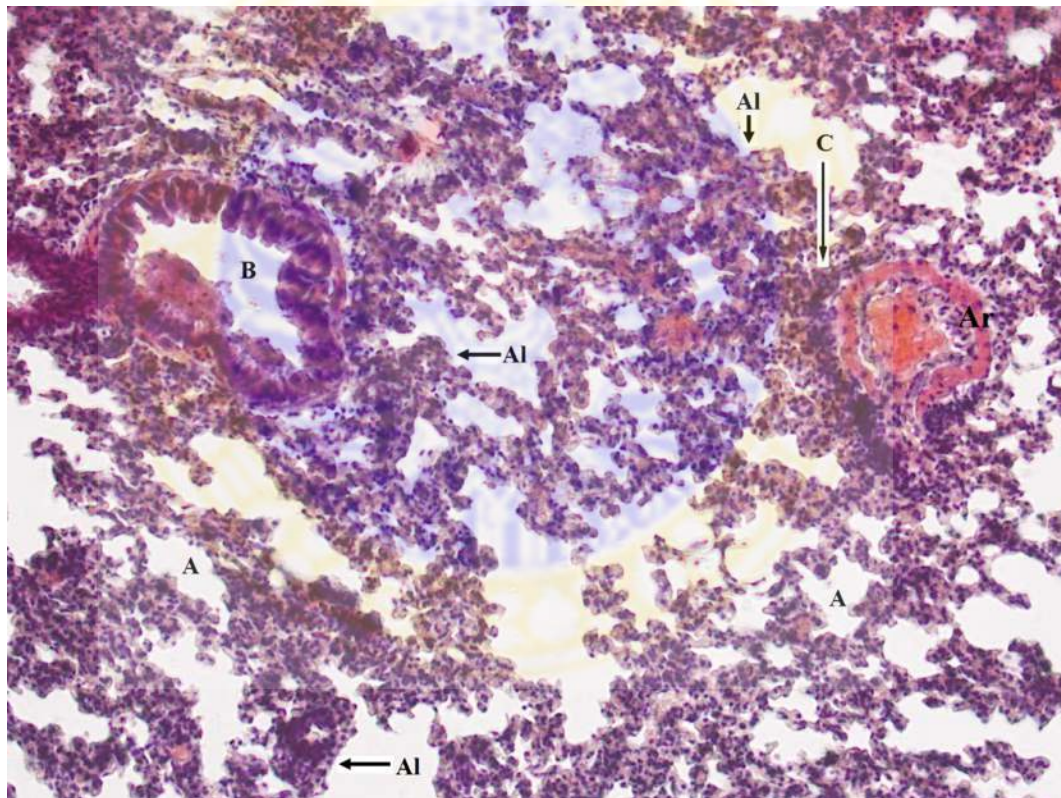
radang yang lebih banyak daripada kelompok kontrol normal dan kelompok kontrol positif. Susunan alveolus yang seharusnya terlihat seperti jaring-jaring, pada kelompok perlakuan ini dinding alveolus mengalami pelebaran sehingga terlihat susunan alveolusnya tidak beraturan. Selain itu, juga menampakkan adanya perivaskulitis yang ditunjuk oleh huruf C. Perivaskulitis merupakan peradangan yang terjadi pada pembuluh darah. Pada gambar bawah menunjukkan pembuluh darah arteri banyak dikelilingi oleh sel-sel radang.



Gambar 4.6 Gambaran histologis paru kelompok perlakuan P1 (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri; B: bronkiolus; C: perivaskulitis; D: BALT (*Bronchus-associated lymphoid tissue*)).

Gambar 4.6 hasil dari pengamatan yaitu terjadi infiltrasi sel-sel radang pada alveolus (alveolitis) dan pembuluh darah arteri (perivaskulitis). Dinding alveolus dikelilingi oleh sel-sel radang, sehingga nampak dinding alveolus

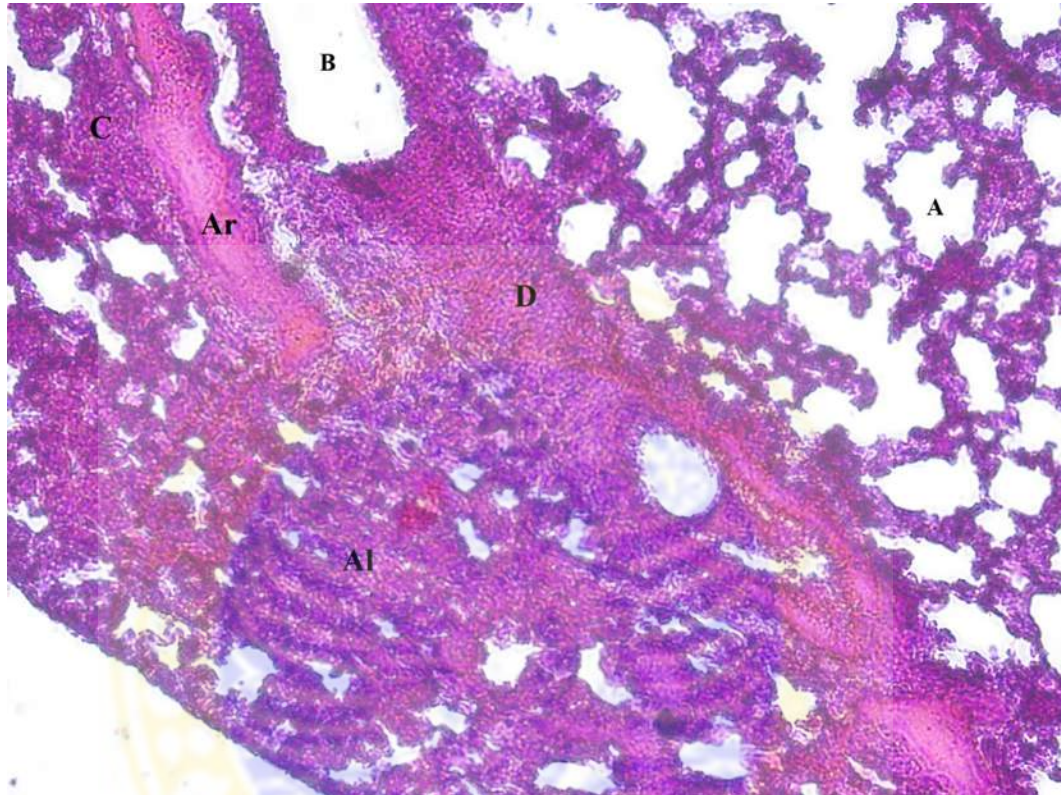
menebal. Alveolitis terjadi hampir di seluruh penampang jaringan paru kelompok P1. Perivaskulitis tampak jelas terjadi, yaitu disekeliling dua pembuluh darah arteri pada gambar di atas diinfiltrasi oleh sel-sel radang yang berkerumun. Terlihat juga dengan adanya BALT (ditunjuk huruf D) yang terletak didekat bronkiolus. *Bronchus-associated lymphoid tissue* (BALT) ini merupakan kumpulan sel-sel limfosit dan secara alamiah memang umumnya terletak di dekat bronkus dan bronkiolus.



Gambar 4.7 Gambaran histologis paru kelompok perlakuan P2 (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri; B: bronkiolus; C: perivaskulitis).

Pada kelompok perlakuan P2, sama halnya dengan hasil kelompok perlakuan P1 yaitu terjadi perubahan jaringan paru berupa infiltrasi sel-sel radang

pada dinding alveolus (alveolitis) yang terlihat di seluruh penampang jaringan paru dan infiltrasi sel-sel radang (perivaskulitis) pada pembuluh darah arteri.



Gambar 4.8 Gambaran histologis paru kelompok perlakuan P3 (A: alveolus; Al: alveolitis; Ar: arteri B: bronkiolus; C: perivaskulitis; D: peribronkiolitis).

Gambaran histologis paru kelompok perlakuan P3 di atas tampak perubahan jaringan paru yang berbeda dari kelompok perlakuan sebelumnya. Pada kelompok perlakuan P3 selain terjadi infiltrasi sel-sel radang pada dinding alveolus (alveolitis), pembuluh darah (perivaskulitis) juga terjadi peradangan pada bronkiolus (peribronkiolitis) yang ditunjuk oleh huruf D. Alveolitis yang terjadi sangat terlihat pada alveolus bagian bawah kiri pada gambar. Alveolus banyak dikelilingi oleh sel-sel radang sehingga tampak tersusun lebih dari satu sel. Begitu

halnya dengan bronkiolitis yang terjadi, sel- sel radang terlihat berkerumun penuh disekitar bronkiolus.

## 4.2 Pembahasan

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh sebelumnya sesuai dengan tujuan penelitian yaitu mengetahui pengaruh pemberian polisakarida krestin *Coriolus versicolor* terhadap konsentrasi interleukin-10 (IL-10) dan gambaran histologis paru mencit yang terpapar *Mycobacterium tuberculosis* dapat dijelaskan sebagai berikut:

### 4.2.1 Konsentrasi interleukin-10 (IL-10) setelah pemberian polisakarida krestin *Coriolus versicolor* pada mencit yang terpapar *M. tuberculosis*.

*Mycobacterium tuberculosis* adalah bakteri berbentuk basil tahan asam yang berkembang sangat lambat, bersifat patogen dan pada umumnya menginfeksi melalui sistem respirasi. Terdapat lebih kurang 8 juta kasus baru tuberkulosis di dunia dan sedikitnya 1,5 juta orang meninggal per tahunnya (Flynn, 2004). Eliminasi oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* terutama bergantung pada suksesnya interaksi antara makrofag terinfeksi dan limfosit T (Ma *et al.*, 2010 ; van Crevel *et al.*, 2002).

Menurut Barerra *et al.*, (2004) aktivasi sel T adalah sebuah proses yang dimediasi melalui dua sinyal yaitu oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang berperan penting dalam respon imun melawan bakteri patogen. Sinyal yang pertama adalah antigen spesifik dan membutuhkan *Toll-Like Receptor* (TLR) berikatan ke *Major Histocompatibility* (MHC) atau kompleks antigen yang berhasil terpresentasi pada APC. Sinyal yang kedua adalah antigen dan

keterlibatan interaksi molekul adesi dan molekul kostimulator yang mengikat ligan masing-masing pada sel T. Selain itu Vankayalapati dan Peter (2009) juga menguatkan bahwa respon imunitas diperoleh terhadap paparan *M. tuberculosis* dimediasi oleh limfosit B dan limfosit T terutama T *helper* (Th). Limfosit T memiliki peran vital dalam mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* dengan memproduksi berbagai macam sitokin.

Bai *et al.*, (2004) menjelaskan bahwa secara prinsip imunitas diperoleh sel CD4<sup>+</sup> (Th) dibagi menjadi dua tipe ekspresi sitokin oleh Th1 dan Th2. Th 1 mensekresi IL-1, IL-12, lymphotoxin- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  untuk mengaktifkan makrofag. Sedangkan jenis sitokin yang dihasilkan oleh Th2 meliputi IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 (North, 1998 ; van Crevel *et al.*, 2002). Kerja kedua T *helper* ini bersifat antagonis yaitu saling menghambat satu sama lain. Salah satu sitokin Th2 yang turut berperan penting dalam tuberkulosis ialah interleukin 10 (IL-10). Ketidakhadiran IL-10 menaikkan imunitas Th1 dan kehadirannya memiliki peran penting sebagai elemen regulator yang mengurangi respon Th1 (Higgins *et al.*, 2009). Sekresi IL-10 merupakan respons spesifik terhadap fagositosis dari *Mycobacterium tuberculosis* (Shaw *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini, pengukuran konsentrasi IL-10 dari serum mencit pada berbagai perlakuan telah didapatkan. Gambar 4.1 dapat terlihat konsentrasi tertinggi terjadi pada kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok yang hanya dipapar *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil ini tidak sesuai dengan teori yang seharusnya konsentrasi IL-10 menurun akibat paparan *M. tuberculosis*. Telah disinggung di awal bahwa bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang menginfeksi

akan segera dieliminasi dengan difagositosis oleh makrofag. Ketika fragmen antigen ini dipresentasikan oleh APC dalam hal ini dikerjakan oleh makrofag maka sel Th0 (*T helper naïve*) akan mengalami diferensiasi. D'Ellios *et al.*, (2011) menjelaskan bahwa respon sitokin terhadap efektor dapat berupa kemampuan untuk mendiferensiasi Th0 menjadi Th1 dan Th2 di bawah pengaruh polarisasi sinyal dari lingkungan mikro. Faktor lingkungan dan genetik keduanya mempengaruhi diferensiasi menjadi Th1 atau Th2 dengan menentukan sitokin yang dihasilkan di awal pada lingkungan mikro untuk merespon sel Th0. Dominansi respon dari Th1 dan Th2 bergantung pada patogen dan latar belakang genetik dari sel *host* yang diikuti oleh imunitas *innate*. Pada kelompok perlakuan kontrol negatif, Th0 akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan secara otomatis akan memproduksi sitokin proinflamatori. Sitokin penting yang disekresi adalah IL-12 dan IFN- $\gamma$  yang memiliki kemampuan untuk mengaktivasi makrofag sehingga fungsi opsonisasi akan berjalan dan bakteri patogen ini dapat dimusnahkan.

Hal ini diperkuat dengan pernyataan Abbas (1994) dalam Ma'at (2012) bahwa terdapat beberapa faktor yang memegang peran penting dalam merangsang limfosit Th0 menjadi subset Th1 dan Th2 antara lain yaitu sitokin, sitokin yang paling awal diproduksi setelah kontak dengan antigen akan menentukan kearah efektor mana dari subset Th akan dominan karena sitokin tersebut akan mampu menghambat fungsi efektor dari subset yang lain. Kedua, tipe sel (*Antigen Presenting Cell*) APC, APC yang berbeda akan mempresentasikan antigen yang berbeda sehingga memberikan rangsangan yang berbeda pula. Ketiga ialah sumber dan jumlah antigen dan faktor terakhir adalah lingkungan mikro.

Ketidak sesuaian ini dapat dijelaskan yaitu dikarenakan ketika bakteri patogen ini masuk ke dalam sel *host*, IL-10 yang dihasilkan tidak hanya oleh makrofag yang teraktivasi dan sel T yang respons terhadap Mycobacteria dan lipoarabinomannan penyusun Mycobacteria (Bai *et al.*, 2004 ; Oral *et al.*, 2006 ;van Crevel *et al.*, 2002) melainkan juga dapat dihasilkan oleh sel-sel dendritik dan monosit (Higgins *et al.*, 2009). Dorhoi dan Stefan (2014) dan Ma'at (2009) menjelaskan bahwa bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang berikatan dengan reseptor membran sel *Complement Receptor (CR)*, *Mannose Receptor (MR)*, *lectin DC-SIGN* dan *Dectin 1 / 2* mampu memicu aktivasi molekul adaptor *Caspase Recruitment Domain-Containing Protein 9 (CARD-9)*, *Proto-oncogene serine/threonin-protein kinase (RAF1)*, *Spleen Tyrosine Kinase (SYK)* turut berkontribusi terhadap sekresi IL-10. Konsentrasi IL-10 yang tinggi ini menandakan adanya hipersensivitas oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian yang dilakukan oleh Bai *et al.* (2004) menjelaskan ketika konsentrasi IL-10 terekspresi berlebihan pada tikus transgenik menunjukkan tidak ada peningkatan kerentanan atau kelemahan terhadap tuberkulosis selama tahap awal infeksi dan memiliki resiko meningkatkan bahaya reaktivasi bakteri patogen ini.

Pemberian polisakarida krestin (PSK) saja pada kelompok perlakuan kontrol positif tampaknya juga memberikan pengaruh terhadap keberadaan IL-10 dalam serum. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol normal konsentrasi IL-10 pada kelompok kontrol positif memiliki rerata lebih rendah yaitu dengan selisih 8.26 pg/mL. Polisakarida krestin *Coriolus versicolor* dengan bahan aktif  $\beta$ -glukan dalam hal ini bertindak sebagai imunomodulator (Jimenez *et al.*, 2005;



Meena *et al.*, 2013; Ooi dan Fang, 2000). Lebih spesifiknya yaitu dalam perlakuan kontrol positif ini peran PSK yaitu sebagai immunosupresor dengan menekan keberadaan IL-10. Para peneliti telah sepakat bahwa  $\beta$ -glukan memiliki kemampuan untuk meningkatkan induksi ekspresi sitokin. Hal ini dipertegas oleh Guggenheim *et al.* (2014) dalam penelitiannya bahwa *C.versicolor* memiliki kemampuan yang lebih untuk meregulasi dengan tingkatan yang rendah terhadap sitokin Th2 namun mampu meregulasi sitokin Th1 lebih tinggi baik pada uji *in vitro* maupun *in vivo*. Sitokin yang diregulasi oleh Th2 yang dimaksud dalam hal ini adalah IL-10 dan kemungkinan macam sitokin yang diregulasi oleh Th1 yaitu sitokin proinflamatori meliputi IFN- $\gamma$ , IL-12 dan TNF- $\alpha$ .

Polisakarida krestin yang diberikan baik sebelum atau sesudah terpapar *Mycobacterium tuberculosis* memiliki rerata yang tidak jauh beda dari kelompok perlakuan kontrol normal juga hampir mendekati nilai rerata kontrol negatif pada kelompok perlakuan P1 atau pemberian PSK sebelum paparan. Hal ini mengindikasikan bahwa pemberian PSK pada kelompok perlakuan P1 dan P2 kurang baik. Dimungkinkan setelah dilakukan pemaparan *M. tuberculosis* sitokin yang dihasilkan lebih mengarah ke Th2 sehingga konsentrasi IL-10 yang diproduksi masih tinggi, pemberian PSK sebelum atau sesudah pemaparan belum mampu bekerja sebagai immunosupresor dalam menekan konsentrasi IL-10 sehingga keberadaan IL-10 pada perlakuan ini tergolong tinggi. Menurut Goodridge *et al.* (2009)  $\beta$ -glukan dari berbagai sumber telah terbukti mampu memberikan efek terhadap keberadaan pro atau anti-inflamatori pada sel imun.

Dari hasil yang didapat pada perlakuan P1 dan P2 dominansi sitokin yang dihasilkan adalah IL-10 berasal dari Th2.

Berbeda halnya dengan pemberian polisakarida krestin yang dilakukan baik sebelum dan sesudah infeksi ternyata mempunyai konsentrasi IL-10 yang tidak jauh dari kelompok kontrol positif. Konsentrasi IL-10 yang tergolong rendah ini dikatakan lebih baik, karena dengan konsentrasi IL-10 yang rendah menandakan produksi sitokin Th1 meningkat dengan demikian akan banyak makrofag yang teraktivasi sehingga mampu melakukan fagositosis dan antigen akan tereliminasi. Polisakarida krestin yang diberikan dengan dosis 50 mg/kg BB selama 7 hari sebelum infeksi memungkinkan telah mempersiapkan sistem imun *innate* terlebih dahulu dengan meningkatkan stimuli pengaktifan sel-sel imunokompeten non spesifik seperti sel dendritik (DC), *Natural Killer* (NK) sel dan terutama sel efektor fagositosis profesional yaitu makrofag. Goodridge *et al.* (2009) memperkuat bahwa reseptor  $\beta$ -glukan Detin-1 yang berkolaborasi dengan sinyal TLR mampu menaikkan induksi aktivasi NF-kB dan induksi sitokin yang dihasilkan bergantung pada sel spesifik dan lingkungan mikro. Dalam kondisi ini lingkungan mikro yang dimaksud adalah lingkungan yang diakibatkan oleh paparan *Mycobacterium tuberculosis* yang efektif meningkatkan sitokin proinflamatori sehingga sel-sel fagositik ini telah siap menjalankan fungsinya dan mengaktifkan sel-sel imunokompeten lainnya sebagai *feed back* positif. Pemberian polisakarida krestin setelah infeksi diperlukan guna menambah stimuli pengaktifan sel-sel imunokompeten secara berlanjut.

#### **4.2.2 Gambaran histologis paru setelah pemberian polisakarida krestin *Coriolus versicolor* pada mencit yang terpapar *M. tuberculosis*.**

Organ paru merupakan bagian terpenting dalam sistem respirasi dan juga merupakan tempat yang rentan terhadap serangan *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri patogen ini mampu hidup dan reaktivasi di dalam paru-paru dan dapat menyebar ke seluruh jaringan tubuh. Karakteristik tuberkulosis paru adalah granuloma, terdiri dari makrofag dan sel-sel limfosit T dan B yang menunjukkan interaksi antara sel-sel imun dan *Mycobacterium tuberculosis*.

Pembentukan granuloma adalah proses organisasi yang tergantung pada invasi limfosit dengan perantaraan molekul adesi dan kemokin. Pemaparan *Mycobacterium tuberculosis* terhadap mencit merupakan suatu intervensi agen infeksi (Linawati *et al.*, 2013). Keberadaan granuloma merupakan mekanisme proteksi oleh jaringan akibat infeksi dengan fungsi utama yaitu mencegah penyebaran bakteri (de Noronha *et al.*, 2008).

Hasil pengamatan gambaran histologis paru pada seluruh kelompok perlakuan belum ditemukan adanya pembentukan granuloma. Hal ini dapat disebabkan dalam penelitian ini rentang waktu antara pemaparan pertama hingga pengorbanan hewan coba untuk diambil organ parunya hanya sekitar 21 hari, yang belum cukup untuk terbentuknya granuloma pada jaringan paru. Sesuai dengan pernyataan Linawati *et al.*, (2013) dan Co *et al.*, (2004) reaksi granulomatosa dapat terjadi jika lebih dari 21 hari. Selain itu, pemaparan yang dilakukan pada penelitian ini melalui intraperitoneal, sehingga jangkauan *M. tuberculosis* untuk menginfeksi paru terlalu jauh, kemungkinan penyebaran bakteri ini melalui pembuluh darah.

Meskipun tidak terbentuk granuloma histopatologi yang dapat teramati pada seluruh kelompok perlakuan yaitu kerusakan jaringan paru berupa alveolitis, perivaskulitis dan peribronkiolitis. Gambar 4.2 menunjukkan bahwa rerata skor kerusakan paru tertinggi terjadi pada kelompok perlakuan kontrol negatif yang hanya dipapar *Mycobacterium tuberculosis* dengan angka 7,8. Ini dapat dijelaskan oleh Kaufmann dan Anca (2013) menyatakan bahwa antigen *Mycobacterium tuberculosis* berperan dalam proses inflamasi seperti berkumpulnya sel imun pada paru yang terinfeksi dan kemampuannya dalam memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IFN dan IL-1. Proses inflamasi ini diperankan oleh kemokin. Sel epitelial disekitar daerah terinfeksi memproduksi *matrix metalloproteinase-9* (MMP9) yang memfasilitasi terjadinya inflamasi lokal. Pada kondisi inflamasi, *pyrin-domain containing3* (NLRP3) sangat diperlukan untuk bioaktivitas pelepasan IL-1 $\beta$  dan pelepasan IL-1 $\beta$  diregulasi oleh IFN melalui beberapa jalur yakni jalur negatif (iNOS/NO dan IL-10) dan jalur melalui positif *guanylate-binding protein* (GBP5). Elhers (2010) juga menambahkan bahwa reseptor DC-SIGN utamanya berperan sebagai molekul adesi selama terjadinya proses inflamasi yang terjadi saat terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.

Selain itu, menurut Jyonouchi *et al.*, (2007) dalam Koendhori (2008) menyatakan bahwa konsep yang menjelaskan proses kerusakan paru-paru karena penyakit tuberkulosis adalah reaksi *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH). Reaksi DTH di kulit dipicu apabila terdapat fragmen antigen yang dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang akan merangsang sel T memori. Hasil

presentasi ini akan memicu datangnya makrofag, monosit dan limfosit ke tempat antigen dipaparkan. Sel-sel imunokompeten ini kemudian mensekresikan sitokin inflamasi antara lain *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), IL-12 dan IFN- $\gamma$ . Hal ini mengakibatkan permeabilitas pembuluh darah meningkat karena pelepasan serotonin dan histamin, serta molekul-molekul adesi maka regulasinya meningkat pada endotelium darah sehingga meningkatkan perekrutan sel-sel lainnya menuju lokasi antigen.

Konsep selanjutnya yang menjelaskan proses kerusakan paru-paru karena penyakit tuberkulosis adalah Turner (2003) yang melaporkan bahwa adanya respon yang sangat cepat terhadap paparan *Mycobacterium tuberculosis* meskipun dengan dosis rendah, ini membuktikan kemungkinan besar respons ini sudah siap sebelumnya (*innate immunity*). Keberadaan makrofag dalam jumlah yang signifikan setelah pemaparan memungkinkan terlibatnya peran CD-1 atau mekanisme *Toll Like Receptor*.

Pada kelompok kontrol normal memiliki rerata skor kerusakan paru terendah yaitu 5,2 dan juga terlihat adanya peradangan pada alveolus disebut alveolitis. Infiltrasi sel-sel radang pada alveolus hanya sekitar 1-2 lapis sel radang, sehingga masih tampak dinding alveolus tidak begitu tebal. Peradangan ini dapat terjadi dikarenakan faktor eksternal diluar kendali peneliti. Faktor eksternal ini dapat berupa kondisi lingkungan rumah hewan yang tidak steril dan bercampurnya seluruh hewan coba dari penelitian lain dalam satu rumah hewan.

Pada kelompok kontrol positif yang hanya diberi polisakarida krestin saja juga ditemukan adanya alveolitis meskipun sel-sel radang yang terinfiltrasi hanya

tersusun atas 1-2 lapis sel radang. Ini tidak sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Cui dan Chisti (2003) yang menyatakan zat aktif  $\beta$ -glukan yang terkandung dalam polisakarida krestin *Coriolus versicolor* memiliki kemampuan untuk menginduksi aktivitas *glutathione peroksidase* sebagai pertahanan melawan kerusakan jaringan. Hal ini disebabkan PSK yang bekerja sebagai imunomodulator dan juga sebagai *inducer* ekspresi gen dari berbagai macam sitokin (Ooi dan Fang, 2000). Kemungkinan sitokin yang diproduksi adalah sitokin yang berasal dari Th1 berperan sebagai proinflamatori sehingga menyebabkan terjadi inflamasi pada jaringan. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Guggenheim *et al.* (2014) bahwa *C.versicolor* memiliki kemampuan meregulasi sitokin Th2 yang rendah. Sitokin yang diproduksi oleh Th2 salah satunya adalah IL-10 yang merupakan sitokin anti-inflamatori, dikarenakan keberadaan IL-10 ditekan sehingga terjadi peradangan yang mengakibatkan kerusakan jaringan.

Pada kelompok perlakuan pemberian polisakarida krestin sebelum paparan *Mycobacterium tuberculosis* (P1), kelompok perlakuan pemberian polisakarida krestin setelah paparan *Mycobacterium tuberculosis* (P2) memberikan hasil gambaran histologis yang sama yakni secara visualisasi tampak adanya perivaskulitis dan alveolitis. Sedangkan pada kelompok perlakuan pemberian polisakarida krestin sebelum dan sesudah paparan *Mycobacterium tuberculosis* (P3) Gambar 4.8 terlihat infiltrasi sel radang tidak hanya terjadi pada dinding alveolus (alveolitis) dan pembuluh darah (perivaskulitis) melainkan juga tampak adanya peradangan pada bronkiolus (peribronkiolitis). Kerusakan jaringan paru ini disebabkan karena respon jaringan terhadap masuknya antigen *M. tuberculosis*

dan pemberian polisakarida krestin (PSK) dengan dosis 50 mg/ kg BB dianggap belum mampu mengembalikan keadaan jaringan paru yang rusak akibat paparan *M. tuberculosis*.

