

PENINGKATAN AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEUM KUCING YANG DIINFEKSI DENGAN *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 mempelajari aktivitas fagositosis makrofag peritoneum kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*.

Penelitian menggunakan 84 ekor kucing sehat, dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok yang diinfeksi secara peroral, intramuskular, intraperitoneal, dan kelompok kontrol yang tidak diinfeksi. Selanjutnya kelompok perlakuan dibagi dalam 2 kelompok dosis yaitu 1×10^4 cfu dan 1×10^5 cfu, sehingga terdapat 7 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor kucing. Pada minggu ke-1, 2, 12, dan 24 setelah infeksi, makrofag diambil dari cavum peritoneum untuk diukur aktivitas fagositosisnya secara *in vitro* dengan menggunakan latex bead. Masing-masing periode pengukuran aktivitas makrofag digunakan tiga ekor kucing, dan masing-masing kucing dibuat replikasi 3 kali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis makrofag peritoneum kucing pada semua kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan mencapai puncak aktivitas pada minggu kedua setelah infeksi. Meskipun peningkatan aktivitas fagositosis menurun setelah minggu kedua, namun peningkatan aktivitas fagositosis dapat terlihat sampai akhir penelitian dibanding dengan kelompok kontrol.

Kata kunci: aktivitas makrofag, fagositosis, latex bead, *M. tuberculosis*, kucing

ABSTRACT

The experiment was done to measure the peritoneum macrophage phagocyte activity in cat infected with *M. tuberculosis*.

Eighty four (84) healthy cats were infected with *M. tuberculosis* through either oral (group 1), intraperitoneal (group 2), or intramuscular (group 3). Each group was further divided into 2 groups based on the dosage of *M. tuberculosis* used in infection (i.e. 1×10^4 and 1×10^5 cfu). Each group was consisted of 12 cats. Group 7 was the control group, in which cats were untreated. The activity of macrophages were measured at 1st, 2nd, 12th, and 24th, after infection using *in vitro* latex bead phagocyte. Three cats were used to measure the macrophage activity in each period, using triplicate sample for each cat.

The results of the experiment showed that phagocyte activity increased in all infected group compared with the control group, and these activities reached to the plateau level at 2 weeks after infection. Although these enhanced activities were gradually diminished thereafter, higher levels of these activities were consistently observed until the end of experiment compared with control group.

Keyword: macrophage, phagocyte activity, latex bead, *M. tuberculosis*, cat

PENDAHULUAN

Mycobacterium tuberculosis merupakan penyebab tuberkulosis yang menyebabkan kematian hampir 2 juta manusia, dan terdapat 8 juta kasus baru setiap tahunnya. Menurut WHO (World Health Organization), sepertiga populasi penduduk dunia telah terinfeksi *M. tuberculosis* dan semua dalam resiko untuk menjadi reaktif (Dolin, 1994). Sehingga tuberkulosis masih merupakan problem internasional yang akhir-akhir ini semakin memburuk karena bertambahnya resiko bagi pasien, yaitu terutama pada pasien-pasien yang menderita AIDS dan yang mempunyai masalah dengan multi-drugs resistant *M. Tuberculosis*.

Mycobacterium dari *M. tuberculosis complex* juga telah diketahui dapat menyebabkan tuberkulosis bentuk pulmonary, gastrointestinal, atau bentuk disseminated pada hewan piaraan termasuk kucing (Snider et al., 1975; Anonim, 1992; Bennet and Gaskell, 1996; Montali et al., 2001). Kucing dapat tertular tuberkulosis karena berhubungan dekat dengan manusia atau sapi yang menderita tuberkulosis aktif (Acha and Szyfress, 1980; Foster et al., 1986; 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. Dikatakan bahwa infeksi pada kucing biasanya merupakan lesi yang terbuka, sehingga memungkinkan untuk dapat menularkan kuman ke lingkungan sekitarnya (Aranaz et al., 1996). Kucing dapat mengekskresi kuman melalui sputum, urine atau feces (Jarrett and Lauder, 1957; Farrow and Love, 1975; Aranaz et al., 1996). Karena alasan tersebut, tuberkulosis pada kucing merupakan hal harus diwaspadai karena mempunyai resiko untuk dapat menularkan ke manusia (zoonotic disease) (Acha and Szyfress, 1980; Aranaz et al., 1996).

Menurut Schiefer and Middleton (1983), mikobakterial yang dapat menyerang kucing diantaranya adalah *M. bovis*, *M. avium*, *M. microti*, *M. lepraemurium*, *M. tuberculosis*, dan *mycobacterium atypical*. Dilaporkan oleh Isaac et al. (1983), meskipun kucing dapat diinfeksi oleh *M. tuberculosis*, namun infeksi oleh *M. bovis* lebih banyak ditemukan, yang dihubungkan dengan kejadian tuberkulosis pada sapi. *Mycobacterium atypical* yang menginfeksi kucing dapat disebabkan oleh sejumlah mikobakterial yang secara alamiah bersifat saprofit dan menjadi pathogen fakultatif masuk melalui trauma atau luka. Akhir-akhir ini beberapa kasus tuberkulosis yang disebabkan oleh *M. tuberculosis* dilaporkan (Acha and Szyfress, 1980; Aranaz et al., 1996; Wilesmith, 1994; Janz, 1996), dan yang terakhir strain bacillus dengan karakteristik diantara human *M. tuberculosis* and *M. bovis* juga telah ditemukan sebagai penyebab tuberkulosis pada

sejumlah kucing (Bluden and Smith, 1996).

Pada sistem imun manusia dan beberapa hewan percobaan, telah diketahui bahwa imunitas seluler memainkan peranan penting dalam mengatasi infeksi *M. tuberculosis*. Imunitas seluler (CMI, cell mediated immunity) diperantarai oleh limfosit T dan makrofag (Margono, 1980). Limfosit T helper (sel Th) disebut juga sel T CD4 (cluster of differentiation) dan sel T sitotoksik atau sel T CD8. Fungsi sel T CD4 terutama menguatkan respon imun dengan menghasilkan beberapa sitokin, sedangkan sel T CD8 mampu melakukan lisis pada sel target yakni makrofag yang terinfeksi dengan kuman tuberkulosis, serta produksi interferon- (IFN-) yang mengaktivasi makrofag. Pada sel T CD4 terdapat polarisasi sel berdasarkan profil sitokin yang dihasilkannya, yaitu kelompok sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 memproduksi interleukin-2 (IL-2) dan IFN- yang mempunyai sifat protektif karena mengaktifkan makrofag untuk membunuh dan mencerna kuman yang telah difagositosis. Profil sitokin yang dihasilkan oleh kelompok Th2 yaitu beberapa macam interleukin seperti IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 bertindak sebagai penghambat aktivitas fungsi makrofag sehingga peranannya merugikan tubuh (Mosmann dan Sad, 1996).

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 fagositosis makrofag belum pernah dilaporkan. Penelitian terdahulu (Tjahajati dkk, 2003) menunjukkan bahwa makrofag pada kucing yang diinfeksi *M. tuberculosis* terjadi peningkatan aktivitas sekresi ROI dalam jumlah yang berlipat yang diduga ada hubungannya dengan mekanisme resistensi pada kucing terhadap infeksi kuman tersebut. Pada penelitian ini dipelajari aktivitas fagositosis makrofag setelah kucing terinfeksi *M. tuberculosis*, untuk mendukung hasil penelitian terdahulu sehingga dapat menjelaskan bagaimana kemungkinan terjadinya resistensi pada kucing terhadap infeksi *M. tuberculosis*. Didasarkan pada literatur yang menyatakan bahwa kucing lebih resisten terhadap infeksi *M. tuberculosis* dan makrofag merupakan fagosit yang memainkan peranan penting dalam mekanisme pemusnahan *Mycobacterium* yang masuk ke dalam tubuh, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah kucing yang diinfeksi *M. tuberculosis* akan menunjukkan aktivitas fagositosis yang lebih tinggi dalam usahanya untuk memusnahkan/mengeliminasi *M. tuberculosis* yang masuk dalam tubuh kucing.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Delapan puluh empat kucing dibagi dalam 4 kelompok, berdasarkan rute infeksi kuman *M. tuberculosis*. Kelompok 1 yaitu kelompok yang diinfeksi secara peroral, kelompok 2 yaitu kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal, kelompok 3 yaitu kelompok yang diinfeksi secara intramuskuler, dan kelompok 4 yaitu kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Kecuali kelompok kontrol, semua kelompok perlakuan dibagi dalam dua kelompok berdasarkan dosis *M. tuberculosis* yang diberikan yaitu dosis 1×10^4 dan dosis 1×10^5 sehingga terdapat 7 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor. *Mycobacterium* yang digunakan dalam penelitian adalah *M. tuberculosis* strain H37Rv yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Daerah, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Periode waktu pemeriksaan aktivitas makrofag

Aktivitas fagositosis makrofag peritoneum kucing diukur pada minggu ke-1, 2, 12, 24 setelah dilakukan infeksi. Masing-masing periode pengukuran aktivitas makrofag digunakan tiga ekor kucing, dan masing-masing kucing dibuat replikasi 3 kali.

Isolasi dan kultur makrofag peritoneum

Pada jadwal waktu yang telah ditentukan kucing dianestesi dengan menggunakan Anesject[®] (kethamine) dengan dosis 0,1 mg/kg BB, disuntikkan secara intramuskuler. Setelah kucing tertidur, kemudian diletakkan pada posisi terlentang (dorso lateral) pada 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 dimassage 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 pelet yang telah diperoleh.

Jumlah makrofag dihitung dengan menggunakan hemositometer 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 mikroplate 24 yang telah diberi cover slips bulat, setiap sumuran 200 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 Aktivitas fagositosis

Uji kemampuan fagositosis makrofag peritoneum kucing diuji dengan fagositosis nonspesifik secara in vitro menurut Leijk dkk. (1986) dengan menggunakan latex beads diameter 3 µm (Sigma Chem. Co). Latex beads diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml.

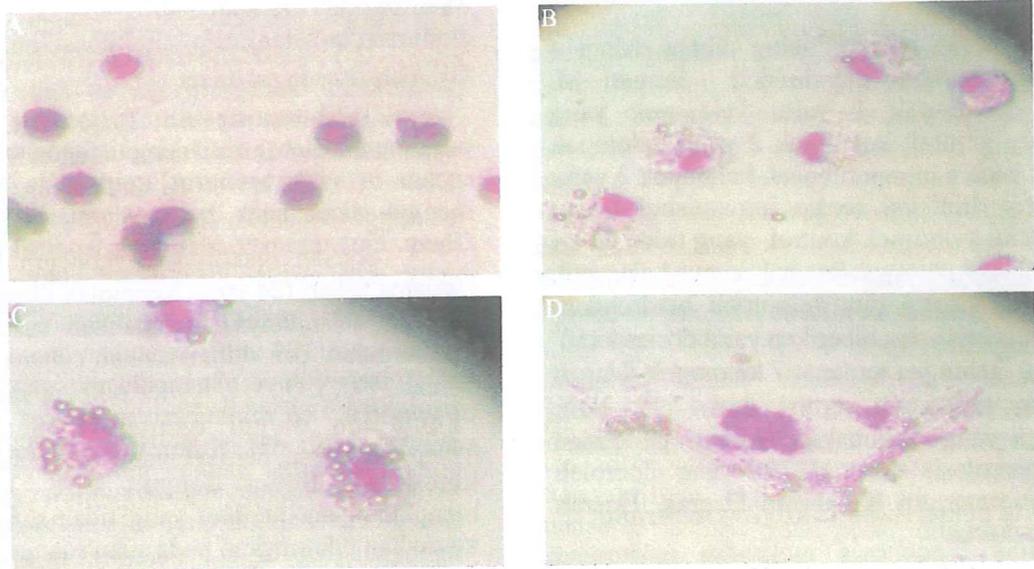
Setelah makrofag peritoneum kucing dikultur selama sehari (24 jam), kemudian dicuci 2 kali dengan RPMI, selanjutnya ditambahkan suspensi latex 200 µl/sumuran, dan diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 37°C, CO₂ 5%. Kultur dikeluarkan dari incubator kemudian dicuci dengan PBS 3 kali untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis, dan kemudian dikeringkan pada suhu ruangan dan difiksasi dengan methanol absolute selama 30 detik, selanjutnya methanol dibuang dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah preparat kering, dilakukan pengecatan dengan Giemsa 20% selama 30 menit. Selanjutnya hasil pengecatan dicuci dengan aquades, dan setelah kering cover slips diangkat dari sumuran kultur dan dikeringkan pada suhu kamar. Setelah kering ditaruh pada obyek gelas untuk dilihat di bawah mikroskop cahaya.

Aktivitas fagositosis makrofag dinilai dari persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex, dihitung dari 100 makrofag yang terlihat di bawah mikroskop cahaya, dan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh setiap makrofag. Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag dihitung dengan cara membagi jumlah partikel latex yang difagositosis dengan jumlah makrofag yang memfagositosis partikel latex. Sebagai contoh, bila pada saat membaca persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex (yang dihitung dari 100 makrofag) terdapat 10 sel yang memfagositosis partikel latex dan jumlah partikel latex yang difagositosis sebanyak 30 partikel, maka rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag adalah $30:10 = 3$ partikel.

Analisis Data

Perbedaan aktivitas makrofag (fagositosis latex) 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.



Gambar 1. Gambaran makrofag peritoneum kucing yang memfagositosis partikel latex secara *in vitro* pada minggu ke-2 setelah infeksi *M. tuberculosis* dosis 10^4 cfu dengan pewarnaan Giemsa. A. Pada kelompok kontrol, B. Pada kelompok per oral, C. Pada kelompok injeksi intramuskular, D. Pada kelompok injeksi intraperitoneal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

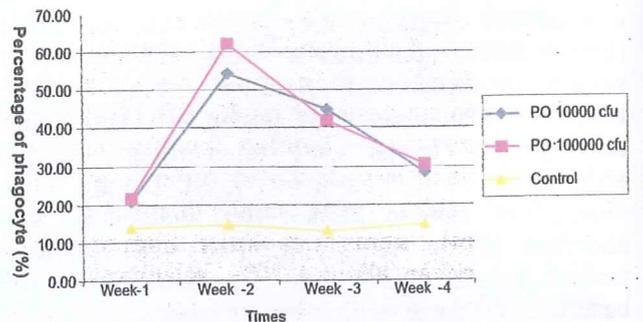
Aktivitas fagositosis makrofag peritoneum kucing diuji dengan fagositosis non spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan latex beads. Aktivitas fagositosis, dinilai dari dua hal yaitu persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex (dihitung dari 100 makrofag) dan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag (dihitung dengan cara membagi jumlah partikel latex yang difagositosis dengan jumlah makrofag yang memfagositosis).

Gambaran kemampuan makrofag dalam memfagositosis partikel latex setelah diinfeksi dengan *M. tuberculosis* dapat dilihat pada Gambar 1.

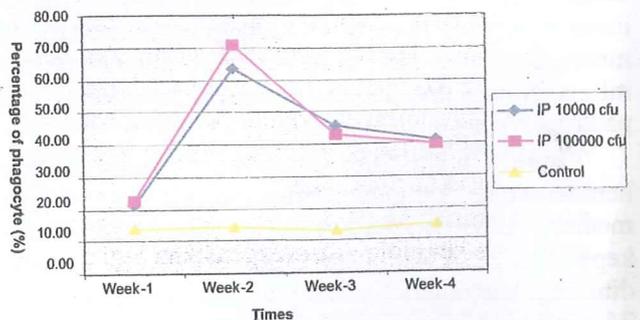
Dari Gambar 1. terlihat bahwa makrofag pada kelompok kontrol yaitu yang tidak diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan gambaran yang tidak aktif berbentuk bulat kompak dengan sedikit memfagositosis latex, sedang makrofag kelompok yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan gambaran yang aktif, ukuran lebih besar dengan sitoplasma yang lebih luas, dan bentuk yang sangat bervariasi. Pada kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal nampak makrofag sangat aktif, dengan penjurulan pseudopodi yang sangat variatif dan banyak memfagositosis partikel latex.

Persentase makrofag yang memfagositosis latex beads

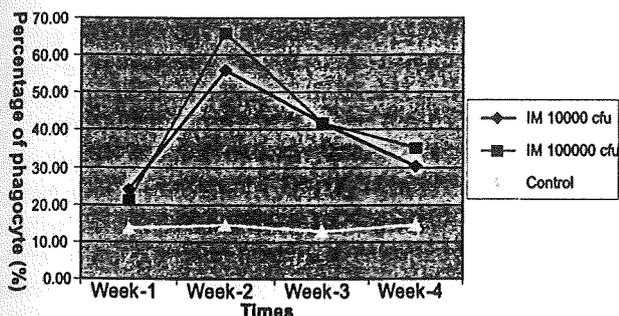
Hasil penghitungan rata-rata persentase makrofag peritoneum kucing yang memfagositosis partikel latex pada semua kelompok dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2.A. Rata-rata persentase makrofag yang memfagositosis latex pada kelompok PO



Gambar 2.B. Rata-rata persentase makrofag yang memfagositosis latex pada kelompok IP



Gambar 2.C. Rata-rata persentase makrofag yang memfagositosis latex pada kelompok IM

Dari Gambar 2, dapat terlihat gambaran persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada semua kelompok setelah diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. Semua kelompok perlakuan menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag pada semua periode waktu dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi, dan kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian. Nampak hasil yang berbeda pada kelompok kontrol, aktivitas fagositosis menunjukkan gambaran yang relatif stabil tidak mengalami perubahan dari satu periode waktu ke waktu berikutnya.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa aktivitas makrofag relatif tidak mengalami perubahan dari waktu ke waktu, berturut-turut rata-rata persentase fagositosis dari minggu ke-1, 2, 12, dan 24 adalah sebagai berikut $13,7 \pm 2,1$; $14,3 \pm 3,1$; $13,0 \pm 4,0$; $14,7 \pm 3,1$.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara peroral dengan *M. tuberculosis* 10^4 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol, pada minggu pertama yaitu $20,6 \pm 2,1$ dan menunjukkan adanya peningkatan persentase yang mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $54,3 \pm 6,0$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian berturut-turut minggu ke 12 dan 24 yaitu $44,7 \pm 5,0$ dan $28,0 \pm 5$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 3,8 kali dibanding dengan kelompok kontrol.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara peroral dengan *M. tuberculosis* dosis 1×10^5 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol, pada minggu pertama yaitu $21,7 \pm 4,2$ dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $62 \pm 4,6$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir

penelitian berturut-turut minggu ke 12 dan 24 yaitu $42,0 \pm 2,7$ dan $30,3 \pm 5,5$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 4,3 kali dibanding dengan kelompok kontrol.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan *M. tuberculosis* 10^4 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol pada minggu pertama yaitu $21,3 \pm 4,9$ dan menunjukkan adanya peningkatan aktivitas yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok yang diinfeksi peroral 10^4 cfu dan intramuskuler 10^4 cfu pada saat mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $65,7 \pm 7,8$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian berturut-turut minggu ke 12 dan 24 yaitu $45,3 \pm 8,4$ dan $41,0 \pm 3,6$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 4,7 kali dibanding dengan kontrol.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dengan *M. tuberculosis* dosis 1×10^5 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol pada minggu pertama yaitu $22,3 \pm 3,5$ dan mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $70,7 \pm 14,0$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian berturut-turut minggu ke 12 dan 24 yaitu $42,7 \pm 3,5$ dan $39,7 \pm 1,2$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 4,9 kali dibanding dengan kontrol.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara intramuskular dengan *M. tuberculosis* 10^4 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol, dan kelompok yang diinfeksi peroral dosis 10^4 cfu, pada minggu pertama yaitu $22,7 \pm 4,2$ dan menunjukkan adanya peningkatan persentase yang mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $64,0 \pm 5,6$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian berturut-turut minggu ke 12 dan 24 yaitu $41,7 \pm 3,8$ dan $30,3 \pm 4,2$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 4,5 kali dibanding dengan kelompok kontrol.

Persentase makrofag peritonium kucing yang memfagositosis partikel latex pada kelompok yang diinfeksi secara intramuskular dengan *M. tuberculosis* dosis 1×10^5 cfu, menunjukkan adanya aktivitas makrofag yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol, dan kelompok yang diinfeksi peroral dosis 1×10^4 cfu, pada minggu pertama yaitu $21,0 \pm 3,0$ dan menunjukkan adanya peningkatan persentase yang mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi yaitu $64,0 \pm 7,7$, kemudian mengalami penurunan sampai akhir penelitian berturut-turut

minggu ke 12 dan 24 yaitu $42,0 \pm 2,3$ dan $35,3 \pm 10,4$. Pada puncak aktivitas makrofag mencapai 4,5 kali dibanding dengan kelompok kontrol.

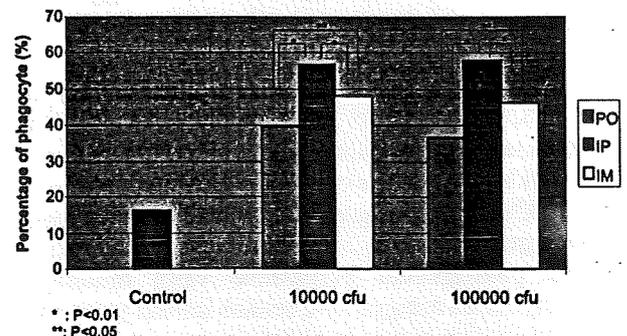
Hasil aktivitas makrofag dalam memfagositosis partikel latex pada semua kelompok perlakuan mencapai puncak aktivitas pada minggu kedua setelah infeksi. Peningkatan aktivitas fagositosis dibanding dengan kontrol pada puncak aktivitas dari urutan yang tertinggi adalah kelompok yang diinfeksi secara intraperitoneal dosis 1×10^5 cfu 4,9 kali, dosis 1×10^4 cfu 4,7 kali, diikuti kelompok yang diinfeksi secara intramuskuler dosis 1×10^4 cfu 4,6 kali, dosis 1×10^5 cfu 4,5 kali dan kelompok yang diinfeksi secara peroral dosis 1×10^5 cfu 4,33 kali dan dosis 1×10^4 cfu 3,8 kali. Hasil ini menunjukkan bahwa adanya infeksi *M. tuberculosis* memacu respon imun seluler non spesifik yaitu makrofag dalam aktivitas fagositosis yang berlipat dibanding kontrol, dalam usahanya untuk mengeliminasi/memusnahkan kuman yang masuk dalam tubuh kucing.

Makrofag merupakan mononuklear fagositosis yang berfungsi untuk menangkap kuman yang masuk dalam tubuh dan dilengkapi dengan berbagai sistem antimikrobal untuk memusnahkannya. Masuknya kuman *M. tuberculosis* akan memacu respon imun baik non spesifik maupun spesifik (Desjardins, 1995). Dijelaskan oleh Abbas et al. (2000) respon non spesifik dapat mengontrol pertumbuhan mikroba intaselular, namun untuk mengeliminasi mikroba memerlukan respon imun spesifik. Respon imun non spesifik melibatkan sel NK dan makrofag, dan respon imun spesifik melibatkan sel T (Th1 CD4 dan CD8). Pada awal infeksi *M. tuberculosis* yang difagositosis oleh makrofag, akan mengaktifkan makrofag menghasilkan IL-12, kemudian akan merangsang sel Natural Killer (NK) untuk menghasilkan IFN- α yang selanjutnya akan mengaktifkan makrofag dalam pemusnahan kuman. Interleukin-12 yang dihasilkan oleh makrofag akan berperan dalam memacu imunitas spesifik, yaitu merangsang perkembangan/proliferasi sel T untuk berkembang ke arah Th1 (Baratawijaya, 2002).

Respon imun spesifik dimulai dengan presentasi antigen MHC-II oleh makrofag. Antigen mikroba mula-mula diekspresikan pada permukaan makrofag sebagai MHC-II, sehingga makrofag dapat berinteraksi dengan Th CD4. Makrofag diaktivasi oleh sel Th (Th1, CD4) melalui sinyal CD40L-CD40, sehingga sel Th yang teraktivasi akan mensekresi sitokin IFN- α , yang selanjutnya akan mengaktifkan sel makrofag dalam pemusnahan kuman (Barnes et al., 1994; Baratawijaya, 2002). Sitokin IFN- α merupakan sitokin utama yang mengaktifkan makrofag, sehingga sitokin ini berperan penting baik pada respon imun non spesifik maupun spesifik dalam pemusnahan *M. tuberculosis* (Barnes et al., 1994).

Makrofag yang teraktivasi dapat diukur antara lain dengan melalui aktivitas fagositosis atau hasil lonjakan respirasi seperti sekresi ROI (Leijk et al. (1986). Dijelaskan juga oleh Tizard (2000) bahwa peningkatan aktivitas makrofag juga dapat dilihat dari bentuk dan ukuran makrofag, yang bertambah besar dan dengan penjurulan pseudopodi yang sangat bervariasi. Pada hasil penelitian, gambaran peningkatan aktivitas makrofag kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* dapat terlihat dengan jelas, yaitu ditunjukkan dengan adanya peningkatan aktifitas makrofag dalam memfagositosis latex, dan juga berubahnya bentuk makrofag yang berupa bertambah luasnya sitoplasma dan terbentuknya pseudopodi yang sangat variatif setelah infeksi dibanding dengan kontrol.

Hasil analisis statistik menggunakan SPSS Univariate Analysis of Variance menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($P < 0,01$) pada hasil persentase makrofag pada masing-masing kelompok perlakuan, yang dipengaruhi oleh rute infeksi dan waktu pengambilan makrofag. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan Duncan test menunjukkan bahwa urutan aktivitas makrofag dari kelompok yang menunjukkan aktivitas tertinggi adalah infeksi intraperitoneal 10^5 cfu, intraperitoneal 10^4 cfu, intramuskuler 10^5 cfu, intramuskuler 10^4 cfu, peroral 10^5 cfu, peroral 10^4 cfu, dan kontrol. Hasil analisis dengan Duncan Test untuk membandingkan rerata persentase makrofag yang memfagositosis latex karena pengaruh rute infeksi dapat dilihat pada Gambar 3.



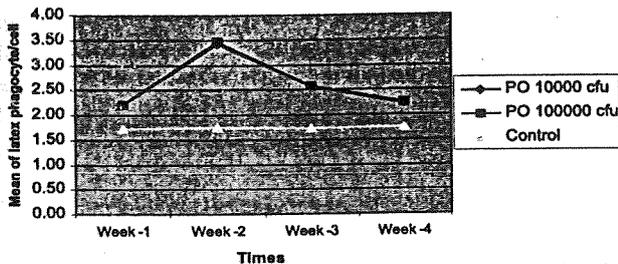
Gambar 3. Hasil analisis Duncan Test pada persentase makrofag yang melakukan fagositosis (pengaruh rute infeksi)

Perbedaan aktivitas makrofag peritoneum antar perlakuan, diduga berhubungan dengan mudahnya kuman *M. tuberculosis* dalam mencapai sistem imun di dalam tubuh kucing. Pemberian infeksi melalui rute intraperitoneal, kuman akan dengan cepat mencapai sistem imun, dan cepat difagositosis oleh makrofag yang ada pada cavum peritoneum, sedangkan pemberian intramuskuler dan per oral akan membutuhkan waktu untuk dapat mencapai sistem

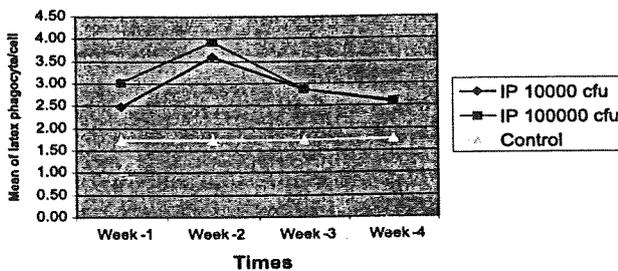
imun untuk dapat difagositosis oleh makrofag. Urutan waktu yang menggambarkan aktivitas makrofag dalam memfagositosis latex, dari aktivitas yang tertinggi adalah sebagai berikut minggu ke-2, 12, 24, dan 1. Hasil ini menggambarkan bahwa aktivitas makrofag pada kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan adanya peningkatan aktivitas makrofag dapat dilihat mulai pada minggu pertama setelah infeksi, selanjutnya aktivitas makrofag mencapai puncak pada minggu ke-2, dan kemudian aktivitas terus menurun sampai akhir penelitian.

Rerata jumlah latex yang difagositosis oleh tiap makrofag

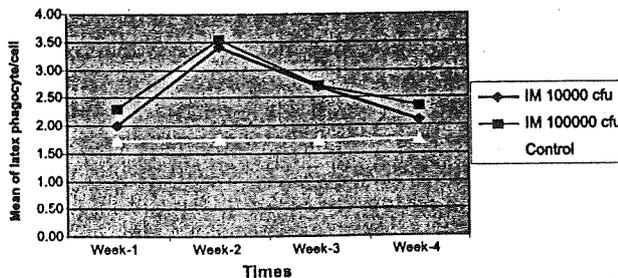
Tingginya aktivitas fagositosis makrofag peritoneum juga dapat dinilai dari rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag. Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag pada semua kelompok yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* mula-mula mengalami peningkatan sampai puncak tertentu, dan setelah itu mengalami penurunan, dapat dilihat pada Gambar 4 sebagai berikut.



Gambar 4. A. Rata-rata jumlah latex yang difagositosis oleh tiap makrofag pada kelompok PO



Gambar 4. B. Rata-rata jumlah latex yang difagositosis oleh tiap makrofag pada kelompok IP



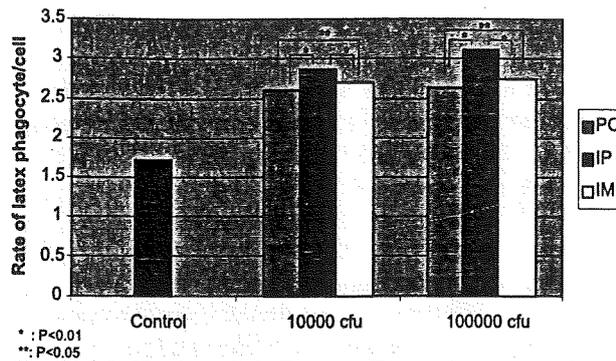
Gambar 4. C. Rata-rata jumlah latex yang difagositosis oleh tiap makrofag pada kelompok IM

Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag peritonium kucing pada kelompok kontrol menunjukkan hasil sebagai berikut, berturut-turut dari minggu ke-1, 2, 12, dan 24 adalah sebagai berikut $13,7 \pm 2,1$; $14,3 \pm 3,1$; $13,0 \pm 4,0$; $14,7 \pm 3,1$.

Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag peritoneum kucing pada semua kelompok kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* menunjukkan jumlah rerata yang lebih tinggi dibanding dengan kelompok kontrol pada semua periode waktu pengukuran aktivitas makrofag. Semua kelompok perlakuan mencapai puncak aktivitas makrofag (rerata jumlah partikel latex per makrofag) pada minggu ke-2 setelah infeksi, hasil tersebut ternyata juga seirama dengan hasil penghitungan persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex yang juga mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah infeksi.

Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis tiap makrofag pada saat mencapai puncak aktivitas dibanding dengan kelompok kontrol adalah sebagai berikut. Kelompok kucing yang diinfeksi dengan peroral 10^4 cfu 1,97 kali dibanding kelompok kontrol, kelompok kucing yang diinfeksi dengan peroral 10^5 cfu 1,99 kali dibanding kelompok kontrol, kelompok yang diinfeksi intramuskuler 10^4 cfu 2,01 kali dibanding dengan kelompok kontrol, kelompok yang diinfeksi intramuskuler 10^5 cfu 2,03 kali dibanding dengan kelompok kontrol, kelompok yang diinfeksi intraperitoneal 10^4 cfu 2,07 kali dibanding dengan kelompok kontrol, kelompok yang diinfeksi intraperitoneal 10^5 cfu 2,25 kali dibanding dengan kelompok kontrol. Meningkatnya jumlah rerata partikel latex yang difagositosis tiap makrofag setelah dilakukannya infeksi dengan *M. tuberculosis* dibanding dengan kelompok kontrol, menunjukkan bahwa adanya infeksi kuman *M. tuberculosis* pada kucing, menyebabkan adanya peningkatan respons imun non spesifik yaitu aktivitas fagositosis makrofag.

Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag pada semua kelompok kucing pada semua periode pengamatan, 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 Duncan test menunjukkan bahwa urutan rerata jumlah partikel latex tiap makrofag (aktivitas makrofag) kelompok perlakuan dari yang tertinggi adalah infeksi intraperitoneal 10^5 cfu, intraperitoneal 10^4 cfu, intramuskuler 10^5 cfu, intramuskuler 10^4 cfu, dan peroral 10^5 cfu, peroral 10^4 cfu. Hasil analisis dengan Dun'can Test untuk membandingkan rerata rata-rata latex yang difagositosis oleh tiap makrofag karena pengaruh rute infeksi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil analisis Duncan Test pada rata-rata latex yang difagositosis oleh tiap makrofag (pengaruh rute infeksi)

Dari hasil tersebut diatas dapat terlihat bahwa peningkatan persentase makrofag untuk memfagositosis partikel latex pada masing-masing kelompok yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* juga seiring dengan gambaran peningkatan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag. Hasil ini mendukung hasil gambaran yang telah diperoleh bahwa adanya peningkatan aktivitas makrofag kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* selain ditunjukkan dengan adanya peningkatan persentase fagositosis, juga didukung dengan adanya peningkatan rata-rata jumlah latex yang difagositosis oleh tiap makrofag.

Penelitian terdahulu mengenai aktivitas makrofag dalam sekresi reactive oxygen intermediate (ROI) selama infeksi *M. tuberculosis* (Tjahajati dkk., 2004) menunjukkan bahwa makrofag kucing yang diinfeksi *M. tuberculosis* terjadi peningkatan aktivitas sekresi ROI yang berlipat dibanding dengan kelompok kontrol. Hasil ini saling mendukung bahwa aktivitas makrofag pada kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* tidak hanya menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis tetapi juga terjadi peningkatan dalam sekresi ROI yang telah diketahui merupakan oksigen reaktif yang berperan penting dalam pemusnahan *M. tuberculosis* (Akaki dkk., 2000). Telah dibuktikan oleh Edward dkk. (2001) bahwa produksi reactive nitrogen intermediate (RNI) dan ROI oleh makrofag (innate immune cell) merupakan mekanisme pertahanan yang efektif dalam pemusnahan patogen intraselular seperti *M. tuberculosis*. Hasil peningkatan aktivitas makrofag yang saling mendukung yaitu aktivitas fagositosis dan sekresi ROI oleh makrofag, memperkuat bukti untuk menjelaskan mengapa kucing lebih resisten dibanding dengan hewan yang lain. Tingginya aktivitas fagositosis dan sekresi ROI oleh makrofag memungkinkan pemusnahan *M. tuberculosis* dalam tubuh kucing yang lebih efektif, sehingga memungkinkan kuman dapat tereliminasi atau

terbunuh pada awal infeksi, dan sebagai akibatnya ada kemungkinan kucing akan lebih dapat mengatasi infeksi (lebih resisten) oleh infeksi kuman tersebut.

Didasarkan hasil tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa kucing yang terinfeksi dengan *M. tuberculosis*, dapat memacu peningkatan respon imun selular non spesifik yang berupa peningkatan aktivitas makrofag yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah persentase makrofag yang memfagositosis latex dan peningkatan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh tiap makrofag. Peningkatan aktivitas makrofag peritoneum dalam fagositosis, juga didukung dengan sekresi ROI yang tinggi (Tjahajati dkk., 2004) saling melengkapi untuk dapat menjelaskan kemungkinan terjadinya resistensi terhadap infeksi *M. tuberculosis* pada kucing.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat Prof. Marsetyawan HNE, Prof. Supargiono, dan Dr. Mahardika, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 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. Juga penulis 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.
- Akaki, T., Tomioka, H., Shimizu, Dekio, S., dan Satō, K., 2000. Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the anti-microbial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & Experimental Immunology*, 121: 320-332.
- 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.
- Chan, E.D., Chan, J., and Schluger, 2001. What is the role of Nitric Oxide in murine and human host defense against tuberculosis? *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* 25:5: 606-612.
- 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.
- Guun-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. *Vet. Rec.* 146: 407-408.
- Montali, R.J., Mikota, S.K., and Cheng, I.I., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev. sci Tech.*, 20(10): 291-303.
- Mosmann, T.R., dan Sad, S., 1996. The expanding universe of T-cell subset: Th1, Th2 and more. *Immunol today* 17: 138-146.
- Romagnani, S., 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Allergy Asthma Immunol.* 85(1):9-18.
- Ryan, J.L., 1997. *Bacterial Disease in Medical Immunology*, 9th Ed. Stites, D.P., Terr, A.I., Parslow, T.G. Prentice-Hall International Inc. London. Hal.690-691.
- Seder, R.A. and Mosmann, T.M., 1999. Differentiation of effector phenotypes of CD4⁺ 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.
- Tjahajati, I., Projoharjono, S., Soebono, H., Asmara, W., Harada, N., dan Higuchi, K., 2004. Aktivitas sekresi reactive oxygen intermediate (ROI) pada makrofag peritoneum kucing yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. *Journal Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*. Vol XXII (1):46-53.
- Wilesmith, J.W., 1994. Tuberculosis in Cat. *Vet. Rec.* 134:359.