

## RESEARCH ARTICLE

### PENGARUH INFEKSI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAIN H37RV TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$ PADA JARINGAN OTAK

#### ***THE EFFECT OF INFECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAIN H37RV TOWARDS THE EXPRESSION OF TNF- $\alpha$ IN THE BRAIN***

*Giovani Anggasta Santoso\**, *Hidayat Sujuti\*\**, *Dwi Yuni Nur Hidayati\*\*\**

\*Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*\*Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

• pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2017.003.01.3> • MNJ.2017;3(1):12-16

• Received 23 February 2017 • Reviewed 1 March 2017 • Accepted 9 March 2017

#### ABSTRAK

**Latar belakang.** Tuberkulosis (TB) disebabkan *Mycobacterium tuberculosis*. Keterlibatan faktor-faktor inflamasi yang terkandung di dalam fokus ini diduga menentukan prognosis TB pada SSP. Salah satu faktor inflamasi yang berperan adalah TNF- $\alpha$ .

**Tujuan.** Mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  jaringan otak mencit yang terinfeksi *M. tuberculosis*.

**Metode.** Penelitian eksperimental pada mencit (*Mus musculus*) jenis *wild type* untuk membandingkan antara kelompok mencit yang mengalami perlakuan infeksi TB (*Mycobacterium tuberculosis*) yang sebelumnya telah dilakukan oleh Laksmi Wulandari. Pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan sel otak tikus dilakukan dengan metode imunohistokimia ditandai dengan warna coklat pada inti, sitoplasma, dan dinding selnya pada perbesaran 100x per 20 lapang pandang.

**Hasil.** Terdapat korelasi yang signifikan ( $P = 0.000$ ) antara variabel independen (Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu) dan variabel dependen (Ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak tikus dengan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu, dengan menggunakan teknik imunohistokimia).

**Simpulan.** Terdapat hubungan antara ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak dan infeksi *M. Tuberculosis*.

**Kata kunci:** TNF- $\alpha$ , *Mycobacterium tuberculosis*, otak, imunohistokimia

#### ABSTRACT

**Background.** Tuberculosis caused by *mycobacterium tuberculosis*. The support of these inflamated factors contained in this focus determine the prognosis of TB towards Central Nervous System. One of the inflammation factors is TNF- $\alpha$ .

**Objective.** To find the expression of TNF- $\alpha$  on the brain which are infected by *M. tuberculosis*.

**Methods.** Experimental study, Wild *Mus musculus* to compare the group which has got infected before. The similiar study has been conducted by Laksmi Wulandari, pulmonologist. The observation towards the expression of TNF- $\alpha$  into a mouse's brain was done by using the imunohistokimia method. It is marked by the brown color in the core, sitoplasma and the cell with upgrading size 100x times 20.

**Results.** This is evident that significantly corelation ( $P = 0.000$ ) between independent *Mycobacterium tuberculosis* infection at incubation periode 8 and 16 weeks) and dependent variabel (TNF- $\alpha$  expression on brain winstar tissue that infected by *Mycobacterium tuberculosis* for 8 and 16 weeks).

**Conclusion.** Strong relationship between expression of TNF- $\alpha$  and the *M. Tuberculosis*' infection.

**Keywords:** TNF- $\alpha$ , *Mycobacterium tuberculosis*, brain, imunohistokimia

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah suatu penyakit infeksi yang disebabkan bakteri berbentuk batang (basil) yang dikenal dengan nama *Mycobacterium tuberculosis*. Merupakan penyakit dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi terutama di negara berkembang.<sup>1</sup>

Tuberkulosis merupakan masalah penyakit infeksi kronis yang utama di dunia, khususnya di negara yang berkembang. WHO melaporkan pada tahun 2012 sekitar 8,7 juta penduduk dunia. Indonesia menduduki peringkat ke-4 setelah Cina, Afrika Selatan, dan India. Tuberkulosis pada sistem saraf pusat (SSP) tercatat hanya 1% dari seluruh kasus tuberkulosis, namun memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Di Amerika Serikat angka kejadian tuberkulosis pada sistem saraf pusat tercatat 5 – 10% dari keseluruhan kasus tuberkulosis ekstrapulmonal. *Mycobacterium tuberculosis* merupakan kuman yang bersifat aerob, *non motile*, *non-spore-forming*, dan bersifat tahan asam.<sup>2,5</sup>

Penyebaran Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* diketahui melalui proses inhalasi dari *droplet nuclei* yang banyak mengandung basil tersebut dan menyebabkan kuman tersebut hidup di alveoli paru. Masuknya *Mycobacterium tuberculosis* sampai ke alveoli paru akan menimbulkan aktivasi makrofag. Rangsangan kuman ini mengaktifkan *innate immunity system* sehingga didatangkan beberapa sitokin untuk memerangi kuman ini. Dalam prosesnya, sistem imun kita akan membentuk granuloma di paru sebagai fokus primer, yang salah satu bahan pembentuknya adalah sitokin TNF- $\alpha$ . Penyebaran secara hematogen akan menyebabkan penyebaran kuman ini, terutama pada organ tubuh yang kaya oksigen seperti otak. *Mycobacterium tuberculosis* memiliki kemampuan untuk mempertahankan dirinya dari makrofag karena memiliki dinding yang tebal, sehingga kuman ini menggunakan makrofag untuk media berkembang biak sampai makrofag tersebut lisis. Proses ini juga terjadi pada makrofag di otak yakni mikroglia.<sup>5</sup>

TNF- $\alpha$  adalah sitokin pro-inflamatori yang dihasilkan paling banyak oleh makrofag/mikroglia melalui beberapa mekanisme.<sup>2,6,7</sup> Secara imunologi, TNF- $\alpha$  dihasilkan melalui presentasi makrofag kepada *Antigen-Presenting Cell* (APC) yang kemudian APC akan memerintahkan *T-helper 1* berproliferasi menjadi *IL-12* dan *IFN- $\gamma$*  dimana

*IFN- $\gamma$*  akan menghasilkan TNF- $\alpha$  sebagai antimikobakterium. Sementara secara biokimia, produksi TNF- $\alpha$  terjadi ketika ada transkripsi NF- $\kappa$ B yang diinduksi pada awalnya oleh aktivasi reseptor di mikroglia yang spesifik terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yaitu *toll like receptor* (TLR2 dan TLR4). TLR2 dan TLR4 akan menjadi aktif ketika mikroglia menangkap *Mycobacterium tuberculosis* dalam bentuk kumannya itu sendiri atau hanya mengenali antigen mt-38, yakni antigen yang ada di dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*. Setelah TLR2/TLR4 ini aktif, dia akan membuat fosforilasi dan konjugasi dari beberapa protein seperti IRAK1 dan IRAK4 yang akan saling berfosforilasi lalu berikatan dengan TRAF6 dan dibawa ke dinding sel. Ikatan ini akan dilepaskan, sehingga TRAF6 akan berikatan dengan protein lain yaitu TAK1, TAB1, dan TAB2 yang akan membawa TRAF6 ini masuk ke sitoplasma sel. Di sitoplasma, TRAF6 akan dilepaskan ikatannya dari ketiga protein itu, dan kembali berikatan dengan Ubc13 dan Uev1A. Kompleks Ubc13 dan Uev1A berfungsi untuk mengkatalisa sintesis rantai *Lys63 polyubiquitin* yang dimiliki oleh TRAF6 sehingga menghasilkan NF- $\kappa$ B. Penelitian ini mencoba mengkaji paparan *Mycobacterium tuberculosis* secara inhalasi menggunakan modifikasi *nose only inhalation system* atau *Middle brook Inhalation Exposure System* (Glas-Col) dalam kaitannya dengan ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak.

## METODE PENELITIAN

Penelitian menggunakan mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c* yang di dipaparkan pada *Mycobacterium tuberculosis* secara inhalasi menggunakan modifikasi *nose only inhalation system* atau *Middlebrook Inhalation Exposure System* (Glas-Col).

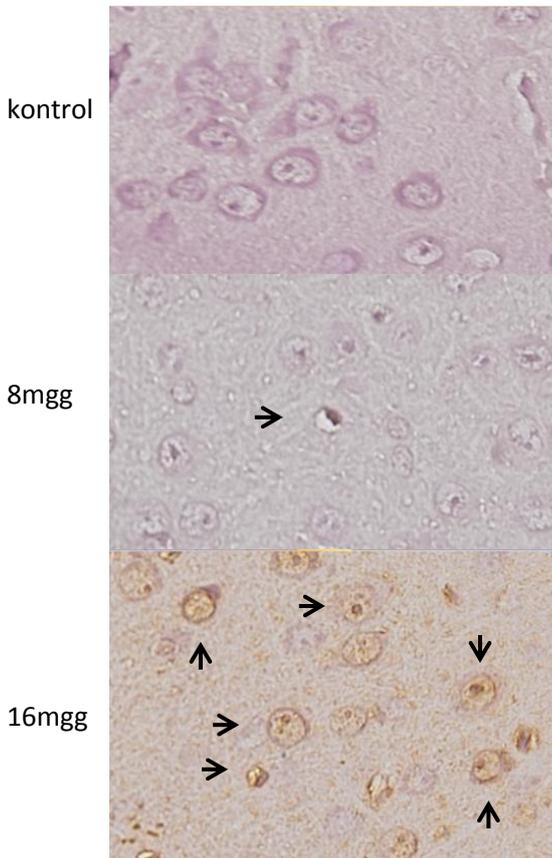
Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan yaitu: Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 8 minggu, Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 16 minggu, dan Tanpa infeksi (kelompok kontrol).

**Pemeriksaan Immunohistokimia.** Pemeriksaan ekspresi TNF- $\alpha$  diamati dengan teknik imunohistokimia menggunakan Novolink Polymer detection system (Leica Microsystem). Antibodi monoklonal terhadap TNF- $\alpha$  disediakan oleh Santa Cruz Biotech. Visualisasi dilakukan dengan DAB dan counterstaining menggunakan Mayer Hematoxylin. Perhitungan hasil imunohistokimia

berdasarkan teknik yang dikembangkan oleh Soini et al, 1998; Pizem and Cor, 2003.

**HASIL PENELITIAN**

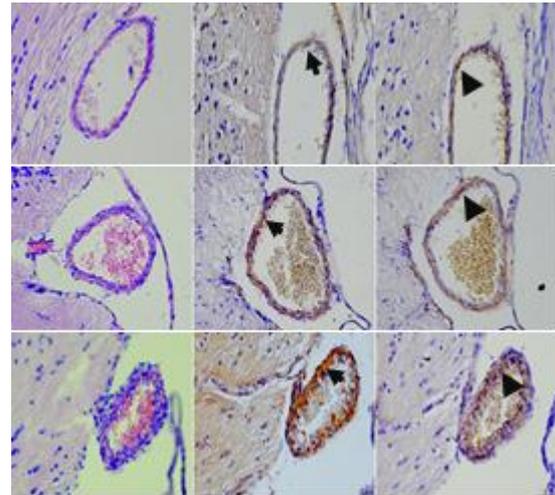
DISTRIBUSI: ekspresi TNF- $\alpha$  (anak panah) *Mycobacterium tuberculosis* Jaringan Otak Model *Aerosolized Droplets Inhaled* pada *Musmusculus*).



**Gambar 1.** ekspresi TNF- $\alpha$ .

Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov Test menunjukkan data penelitian ini terdistribusi normal atau signifikan. Nilai bermakna atau berdistribusi normal bila  $p > 0.05$ . Nilai signifikan penelitian ini menunjukkan 0.562 ( $p > 0.05$ ). Uji homogenitas varians dikatakan normal jika nilai signifikan  $p > 0,05$ , nilai signifikan penelitian ini 0.082 ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya hasil uji One Way disebut signifikan jika nilai signifikan kurang dari 0.05 [ $(p) < 0.05$ ]. Jadi, dari uji One-way ANOVA dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara penambahan waktu infeksi TB dengan ekspresi TNF- $\alpha$ .

Untuk mengetahui lebih lanjut dari perbedaan perlakuan, dilanjutkan *uji post hoc test*.



**Gambar 2.** ekspresi TNF- $\alpha$ .

**Tabel 1.** Hasil Uji Post Hoc

	Kontrol	8mg	16mg
Kontrol	-	0.070	0.000
8mg	0.070	-	0.074
16mg	0.000	0.074	-

Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi (P-value) = 0.000 ( $p < 0.05$ ) dan correlation coefficient (r-value) = -0.688. Hal ini berarti terdapat korelasi yang signifikan ( $P = 0.000$ ) antara variabel independen (Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu) dan variabel dependen (Ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak tikus dengan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu, dengan menggunakan teknik imunohistokimia).

Pearson correlation coefficient (r) bernilai negatif (+) berarti korelasinya berbanding lurus, yang artinya semakin lama paparan infeksi, maka semakin tinggi ekspresi TNF- $\alpha$ , serta menunjukkan korelasi yang kuat ( $r > 0.688$ ).

**DISKUSI**

Proses peradangan yang terjadi mengakibatkan aktivasi makrofag jaringan dan infiltrasi monosit. Jika proses peradangan tersebut terjadi pada otak maka mikroglia akan teraktivasi. Dalam penelitian ini, *M. tuberculosis* yang fokus primernya terbentuk di paru-paru kemudian pecah dan menyebar melalui peredaran darah dan limfe sehingga sampai di otak sebagai lokasi infeksi sekunder *M. tuberculosis* yang paling sering terjadi. Masuknya *M.tuberculosis* ke ruang

subaraknoid mendorong produksi T CD4<sup>+</sup> lokal sehingga berdiferensiasi menjadi Th1 (*T-helper 1*) dan Th2 (*T-helper 2*). Th1 akan bekerja untuk memproduksi IL-12 (*Interleukin 12*) dan IFN-g (*Interferon g*) yang pada awalnya akan memberikan respon imunoprotektif terhadap *M. tuberculosis*. Sementara Th2 menghasilkan IL-4 (*Interleukin 4*) dan IL-5 (*Interleukin 5*) yang berfungsi sebagai neuroprotektor dengan menekan aktivasi Th1 yang berlebihan serta menginduksi terjadinya proses inflamasi lebih hebat lagi. Kalau ditinjau dari dasar imunologi, aktivasi mikroglia membutuhkan dukungan sitokin tertentu, terutama IFN-g. IFN-g dihasilkan oleh sel NK (*Natural Killer*) dan limfosit T CD1-restricted sebelum imunitas adaptif diaktifkan, tapi setelah imunitas adaptif diaktifkan, sumber utama IFN-g adalah Th1. Sama seperti yang dijelaskan di atas setelah *M. tuberculosis* ditangkap mikroglia, maka mikroglia akan memproduksi beberapa sitokin termasuk diantaranya adalah TNF- $\alpha$ . Sementara itu, MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), ROS (*Reactive Oxygen Species*), NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) memainkan perannya sebagai anti-*M. tuberculosis* serta meningkatkan produksi sitokin seperti TNF- $\alpha$ .

Ketika terjadi aktivasi mikroglia di otak maka *M. tuberculosis* mulai dikenali oleh TLR (*Toll Like Receptor*) yakni gen pencetus inflamasi yang diekspresikan oleh sel mikroglia dan sel glia lainnya ketika terinfeksi *M. tuberculosis*. Tercetusnya TLR akan mengaktifkan jalur MyD88-dependent (*Myeloid Differentiation Protein 88*) dan IRAK (*IL-1 R-Associated Kinase*), mengaktifkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan memicu produksi sitokin proinflamatori, antara lain IL-12 dan TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  akan mengerahkan lebih banyak lagi sel radang untuk menuju ke lokasi infeksi. Subfamili IRAK ada beberapa macam, tapi yang berperan besar dalam peningkatan sitokin adalah IRAK-1 dan IRAK-4. Keduanya akan berfosforilasi dan berikatan dengan TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) melalui reseptor TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*). TRAF6 dipisahkan dari reseptornya dan berikatan dengan TAK1, TAB1, dan TAB2 di membran sel, sehingga menghasilkan NF- $\kappa$ B. Peningkatan produksi TNF- $\alpha$  juga dibuktikan akan meningkatkan permeabilitas sawar darah otak sehingga lebih mudah ditembus oleh makrofag.

Lokasi yang dominan mengekspresikan TNF- $\alpha$  adalah daerah parenkim otak. Diduga karena TNF- $\alpha$  dihasilkan oleh mikroglia dan beberapa sel glia

lain, di mana sel-sel ini berdistribusi banyak di bagian parenkim otak. Sehingga ekspresi TNF- $\alpha$  paling banyak terjadi di situ.<sup>4</sup> Pada penelitian ini, morfologi sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  tidak nampak seperti mikroglia. Morfologi mikroglia adalah memiliki inti sel kecil dan bulat dikelilingi dengan banyak penjurulan berukuran kecil.<sup>3</sup> Sel yang terlihat di mikroskop pada penelitian ini berbentuk bulat atau lonjong dan tidak nampak ada penjurulan berukuran kecil. Diduga bentuk sel ini adalah pembuluh darah, yakni arteriol serta venule. Pada penelitian ini nampak banyak sekali morfologi sel yang tercatat yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ . Selain itu jika diperhatikan, seharusnya yang tercatat adalah sitoplasmanya, karena TNF- $\alpha$  diproduksi di sitoplasma, tapi pada penelitian ini, inti sel juga berwarna coklat.

Terdapat perbedaan yang jelas nampak dari segi waktu, jika hewan coba diinfeksi langsung pada otaknya dengan yang merupakan infeksi sekunder. Beberapa penelitian lain dengan hewan coba kelinci menunjukkan reaksi berbeda pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. 5 hari setelah infeksi terjadi, ekspresi TNF- $\alpha$  sudah nampak pada parenkim otak dan kadar TNF- $\alpha$  juga sangat tinggi pada cairan serebrospinal.<sup>8</sup> Sedangkan pada penelitian ini, nampak ekspresi TNF- $\alpha$  baru muncul pada minggu ke 8 dan sangat tinggi pada minggu ke 16. Wallgreen (2002) mengutarakan bahwa perjalanan penyakit TB dimulai dari adanya infeksi/fokus primer yang terbentuk 3 – 8 minggu post infeksi. 1 – 6 bulan berikutnya dapat terjadi TB miliar dan TB otak. Selanjutnya 1 – 12 bulan, akan menyebar ke pleura. Terakhir, 3 – 6 tahun post infeksi akan menyebar menjadi TB tulang, termasuk TB tulang belakang walaupun fokus dan kompleks primer telah hilang. Sehingga, dari acuan ini bisa disimpulkan bahwa hasil penelitian mendekati teori yang ada bahwa 1 – 6 bulan pertama post infeksi akan didapatkan TB otak (tentu saja jika tidak dilakukan terapi), sedangkan pada penelitian ini waktu yang digunakan adalah 8 minggu atau 2 bulan dan 16 minggu atau 4 bulan.

Adapun saran dari penelitian ini antara lain adanya penelitian lanjutan untuk mengetahui sitokin apa saja yang meningkat pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis* di otak, untuk mengetahui ekspresi TNF- $\alpha$  pada infeksi sekunder lain pada *Mycobacterium tuberculosis*, dan untuk mengetahui tingkat efektifitas pemberian anti TNF- $\alpha$  pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 dan 16 minggu. Juga terdapat hubungan antara ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan otak dan lamanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Hubungan yang terbentuk sifatnya positif kuat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Handayani, S. Respon Imunitas Seluler pada Infeksi Tuberkulosis Paru. 2008. Cermin Dunia Kedokteran dalam [www.\\_kalbe\\_com](http://www.kalbe.com).
2. Coppack, S.W. Pro-Inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proceedings of Nutrition Society*. 2001. 60:349-356.
3. Djuwita, Ita. Induksi Ekstrak Pegagan Secara in vitro terhadap Proliferasi dan Diferensiasi Sel-Sel Otak Besar Anak Tikus. *Jurnal Veteriner* Juni 2013 Vol. 14 No. 2: 138-144
4. Gary, Davin S, Annadora J Bruce-Keller, Mark S Kindy and Mark P Mattson. Ischemic and Excitotoxic Brain Injury Is Enhanced in Mice Lacking the p55 Tumor Necrosis Factor Receptor. 2000.
5. Rock R. Bryan., et.all. Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis and Clinical Aspects, *CLIN. MICROBIOL* 2008. (21). 2.P:243-361.
6. Skoog, T., Dichtl, W.,Boquist, S., Andersson, S.,Karpe, F.,Tang, R.,Bond, M.G.,Faire, U., Nilsson, J., Eriksson, P dan Hamsten, A. Plasma Tumour Necrosis Factor and Early Carotid Atherosclerosis in Healthy Middle Aged Men. *Eur Heart J*. 2002. 23:376-383.
7. Sukhanov, S.,Higashi, Y., Yung Shai, S., Vaughn, C., Mohler, J., Li,Y., Hua Song, Y.,Titterington, P. IGF-1 Reduces Inflammatory Responses, suppresses Oxidative Stress, and Decreases Atherosclerosis Progression in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27:84-2690.
8. Tsenova, Liana, Amy Bergtold, Victoria H. Freedman, Richard A. Young, and Gilla Kaplan. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a determinant of pathogenesis and disease progression in mycobacterial infection in the central nervous system. 2000.
9. World Health Organization. Global tuberculosis control. In: World Health Organization report 2012. Geneva: World Health Organisation; 2011. p.1–258.