

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Analisis Hasil

Penelitian ini dilakukan karena peneliti ingin mengetahui adakah perubahan ekspresi MMP-2 pada infeksi sekuensial *M. tuberculosis* dengan masa inkubasi selama 8 minggu dan 16 minggu. Evaluasi ekspresi MMP-2 dilakukan dengan menghitung jumlah sel otak yang memiliki inti, sitoplasma, dan dinding sel otak yang berwarna coklat pada preparat otak mencit yang telah terinfeksi tuberkulosis di mikroskop.

Penghitungan dilakukan pada tiap preparat otak mencit sebanyak 20 lapang pandang dengan perbesaran mikroskop 400x. Rerata jumlah sel otak yang mengekspresikan MMP-2 dari 20 lapang pandang tiap slide kemudian dianalisis untuk mengetahui hubungan jumlah sel otak dengan ekspresi MMP-2 dengan waktu inkubasi infeksi *M. tuberculosis*. Variabel yang dianalisis dalam penelitian ini adalah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu sebagai variabel bebas dan ekspresi MMP-2 yang dikuantifikasi pada jaringan otak mencit normal sebagai kelompok kontrol serta jaringan otak mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu dan 16 minggu dengan menggunakan teknik imunohistokimia sebagai variabel terikat.

Berdasarkan hasil uji analisis yang menggunakan program SPSS, data penelitian ini bersifat normal dan homogen. Hasil analisis dari uji korelasi juga menunjukkan bahwa semakin lama masa inkubasi infeksi tuberkulosis di otak maka ekspresi MMP-2 di otak juga semakin menurun.

6.2 Penjelasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi MMP-2 menurun sekali dan menetap setelah masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak lebih dari 8 minggu. Supresi MMP-2 memiliki hubungan sebab akibat dengan proses apoptosis sel. Jumlah MMP-2 yang menurun dapat menyebabkan apoptosis dengan berbagai cara, seperti mengganggu aktivasi jalur *Nuclear Factor-kappa Beta* (NF- κ B) oleh *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) (Kesanakurti *et al.*, 2011). Proses apoptosis sel karena reaksi iskemia, infeksi kronis, dan inflamasi juga dapat menurunkan jumlah ekspresi MMP-2. Proses apoptosis pada penelitian ini juga dapat terjadi karena respon inflamasi infeksi tuberkulosis otak yang salah satunya disebabkan oleh TNF- α sebagai faktor inflamasi (Green, 2011).

TNF- α dapat menginduksi dua respon biologis yaitu, aktivasi jalur NF- κ B dan MAPK/*Mitogen-Activated Protein Kinases*. TNF- α pertama-tama berikatan dengan reseptornya yaitu TNF-R1/*Tumor Necrosis Factor Receptor 1* untuk memberi sinyal aktivasi jalur NF- κ B. Setelah berikatan dengan TNF- α , domain "death" pada ekor TNF-R1 dengan cepat merekrut sebuah protein adaptor yaitu TRADD/*TNF receptor associated-protein with death domain*. TRADD nantinya secara subsekuen merekrut protein signal yang lain termasuk TRAF2/*TNF receptor associated factor 2* dan RIPK1/*Receptor associated protein kinase* untuk membentuk kompleks I. TRAF2 kemudian merekrut kompleks I κ B kinase/IKK melalui rantai poliubiquitin spesifik-K63 pada RIPK1 sehingga terjadi aktivasi NF- κ B. Aktivasi NF- κ B dapat menghasilkan ekspresi sitokin, molekul adhesi endothelial, faktor pertumbuhan, dan enzim efektor untuk imunitas (Hayden *et al.*, 2004).

NF- κ B juga menghasilkan protein anti apoptosis, termasuk *cellular inhibitor of apoptosis proteins*/cIAP 1, cIAP2, dan c-FLIP/*cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein*. TRADD dan RIP1 juga berhubungan dengan FADD/*Fas associated protein with death domain* dan kaspase 8 untuk membentuk kompleks II. Saat NF- κ B diaktivasi kompleks I, kompleks II mendapat c-FLIP karena NF- κ B teraktivasi sehingga tidak ada apoptosis dan sel hidup. Apabila kompleks I gagal mengaktivasi NF- κ B, maka kompleks II akan mengaktifkan proses apoptosis untuk membunuh sel (Micheau *et al.*, 2003).

TNF- α juga mengaktifkan jalur MAPK/*Mitogen-Activated Protein Kinases* setelah jalur NF- κ B. Jalur ini dimulai dengan ikatan TNF- α dengan TNF-R1. TNF-R1 akan merekrut TRADD. TRADD akan merekrut TRAF2. TRAF 2 kemudian akan mengaktifkan MAP3K/*MAPK kinase kinase*. Contoh-contoh MAP3K adalah ASK-1/*Apoptosis Signal-regulating Kinase-1*, TAK-1/*TGF- β Activated Kinase-1*, TPL-2/*Tumour Progression Loci-2*, MLK-3/*Mixed Lineage Kinase-3*, MEKK (*MAPK/ERK kinase*) 1 dan 4. MAP3K akan memfosforilasi dan mengaktivasi MAP2K/*MAPK kinase/MKK*. TPL-2 mengaktivasi MKK-1 dan MKK-2. TAK-1, ASK-1, MEKK-1, MEKK-4, dan MLK-3 mengaktivasi MKK-3, -4, -6, dan -7. MAP2K kemudian akan memfosforilasi dan mengaktivasi MAPK/*MAPK kinase*. MKK-1 dan -2 memfosforilasi dan mengaktivasi ERK/*Extracellular Signal-Regulated*, MKK-3 dan -6 memfosforilasi dan mengaktivasi p38 MAPK, dan MKK-4 dan -7 memfosforilasi dan mengaktivasi JNK/cJun N-terminal kinase (Kant *et al.*, 2011). JNK dan p38 MAPK berpengaruh pada proses apoptosis sel sedangkan ERK bersifat anti apoptosis (Wada *et al.*, 2004).

Ekspresi TNF- α di otak diketahui semakin meningkat saat masa inkubasi infeksi tuberkulosis semakin lama pada penelitian infeksi tuberkulosis otak ini (Santoso, 2014). Peningkatan ekspresi TNF- α terjadi karena TNF- α adalah sitokin yang penting dalam neuropatogenesis *Mycobacterium tuberculosis* (Tsenova *et al.*, 1999). Meskipun TNF- α memiliki peran definitif dalam pembentukan granuloma dan menghambat infeksi tuberkulosis, produksi lokal TNF- α di sistem saraf pusat dapat menyebabkan perubahan permeabilitas sawar darah otak/*Blood Brain Barrier* dan leukositosis pada cairan serebrospinal serta meningkatkan progresivitas tuberkulosis di otak (Rock *et al.*, 2008). Produksi TNF- α sebagai sitokin proinflamasi yang terlalu banyak pada kasus ini nantinya akan mengaktifasi jalur JNK, p38-MAPK, dan kaspase 8 sehingga terjadi apoptosis sel yang mengakibatkan penekanan produksi ekspresi MMP-2 (Green *et al.*, 2011).

Ekspresi MMP-2 diduga menurun satu kali lalu menetap saat masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak semakin lama karena proses apoptosis sel. Proses apoptosis dapat disebabkan oleh produksi TNF- α yang berlebihan sehingga mengaktifkan jalur kaspase 8 dan berefek pada aktivasi jalur MAPK sehingga menghasilkan p38MAPK. Ekspresi kaspase 8 dan p38 MAPK muncul karena dipicu ekspresi TNF- α yang mengaktifasi NF κ B. Apoptosis juga dapat terjadi karena replikasi *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak terkontrol sehingga mengurangi suplai oksigen otak (Green, 2011).

Jumlah ekspresi MMP-2 yang menurun satu kali lalu menetap saat masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak lebih dari 8 minggu diduga disebabkan oleh ketidakmampuan TNF- α yang merupakan faktor penting untuk menginduksi supresi MMP-2 dalam mensupresi seluruh ekspresi MMP-2 (Green *et al.*, 2011).

Dari fakta di atas, peneliti mengambil kesimpulan bahwa TNF- α dapat menginduksi supresi MMP-2. Namun, jumlah ekspresi MMP-2 pada penelitian ini menjadi tetap pada minggu ke 16 setelah jumlah ekspresi MMP-2 menurun pada saat minggu ke 8.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pertama pada penelitian ini adalah tidak ada orang yang pernah melakukan penghitungan ekspresi MMP-2 di organ lain yang terinfeksi M. tuberculosis dengan masa inkubasi infeksi yang sama. Hal ini menyebabkan peneliti tidak dapat mengetahui apakah penurunan ekspresi MMP-2 hanya terjadi pada otak atau tidak. Peneliti juga tidak mengetahui apakah jumlah penurunan ekspresi MMP-2 sama di setiap organ.

Keterbatasan kedua pada penelitian ini adalah peneliti belum pernah meneliti penurunan ekspresi MMP-2 karena infeksi atau penyebab lain. Hal ini dikarenakan sekresi MMP bisa terjadi pada infeksi sistem saraf pusat, kelainan saraf degeneratif/inflamasi, trauma, hipoksia/kekurangan oksigen, atau keracunan. Oleh sebab itu, penurunan ekspresi MMP-2 adalah tes yang bersifat sensitif tapi tidak spesifik.

Keterbatasan ketiga pada penelitian ini adalah pewarnaan imunohistokimia adalah satu-satunya pewarnaan yang dilakukan. Penelitian ini tidak menggunakan *double staining* sehingga tidak dapat diketahui apakah sel yang mengekspresikan MMP-2 adalah mikroglia atau adakah sel lain yang mampu mensekresi MMP-2.