

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan untuk mengetahui apakah pemberian kadmium meningkatkan ekspresi sitokin IL-1 β stroma endometrium tikus (*Rattus norvegicus*) wistar betina. Peningkatan interleukin 1 β (IL-1 β) akan meningkatkan produksi prostaglandin F2 α (PGF2 α) yang merupakan biomarker dismenore primer pada wanita (French, 2005; Proctor dan Farquhar, 2006).

Kadmium merupakan unsur logam golongan IIB yang bersifat karsinogenik dan sitotoksik berdasarkan penelitian-penelitian observasional maupun eksperimental yang dilakukan secara *in vitro* pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *in vivo* pada manusia dan hewan coba (Sochor *et al.*, 2011; Haase *et al.* 2010).

Efek kadmium terhadap aktivitas imun dan inflamasi tubuh dilaporkan bersifat kontradiktif apabila mengacu pada jumlah produksi sitokin yang dihasilkan. Perlakuan kadmium pada suatu penelitian terhadap tikus mengganggu aktivitas imun seluler yang ditandai dengan peningkatan kadar sitokin TNF- α dan IL-6 plasma (Alghasham *et al.*, 2013). Hasil analisis RT-PCR kultur peripheral blood mononuclear cell (PBMC) pada manusia dengan riwayat terpapar kadmium menunjukkan peningkatan ekspresi gen IL-1 α , TNF- α , IFN- γ , dan IL-6 (Haase *et al.*, 2012).

Kadmium diberikan secara oral dalam bentuk larutan kadmium asetat (CdCH₃COO) kepada 3 kelompok perlakuan dengan dosis masing-masing kelompok 0,03 ppM/hari, 0,06 ppM/hari, dan 0,09 ppM/hari. Subjek kelompok ditambah 1 kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan kadmium sebagai pembanding.

IL-1 β merupakan sitokin proinflamasi penting yang dibutuhkan dalam fisiologi endometrium. IL-1 β berperan mengontrol proliferasi, pertumbuhan, dan apoptosis sel sepanjang siklus menstruasi, sedangkan pada proses implantasi, interaksi IL-1 β dan reseptornya dibutuhkan dalam penempelan janin dan sel desidua endometrium. IL-1 β juga berperan dalam perkembangan plasenta dan janin dengan meningkatkan produksi *growth factor CSF2* yang merangsang pertumbuhan sel trofoblas (Rossi *et al.*, 2005).

Sitokin IL-1 β berkaitan dengan kondisi patologis yang di antaranya berkaitan dengan infeksi, kerusakan sel, dan stress oksidatif. Antigen yang diterima baik melalui reseptor *Toll-like receptor (TLR)* maupun melalui endositososis akan meningkatkan produksi sitokin dengan meningkatkan transkripsi gen pengodonya dan dengan meningkatkan aktivitas kaspase-1 yang berfungsi mengubah pro-IL-1 β menjadi IL-1 β matur. IL-1 β matur meningkatkan aktivitas inflamasi dengan meningkatkan sintesis sitokin-sitokin proinflamasi lain seperti IL-6 dan IL-8, menginduksi respon imun adaptif dengan mengaktifkan sel Th, dan meningkatkan produksi enzim COX-2 melalui induksi faktor transkripsi NF κ B. IL-1 β juga mentranslokasikan COX-2 dari nukleus ke sitoplasma sehingga COX-2 menjadi aktif bekerja mengatalisis pembentukan prostaglandin.

Dismenore primer menjadi permasalahan kesehatan yang dialami hampir 50% wanita usia subur baik pelajar, mahasiswi, maupun wanita pekerja di Amerika Serikat. Wanita dengan penyakit tersebut ditandai adanya peningkatan ekspresi PGF2 α yang menginduksi hiperkontraktilitas miometrium uterus dan iskemia akibat vasokonstriksi pada vaskularisasi organ uterus. Kedua kondisi tersebut menjadi penyebab keluhan nyeri pada dismenore primer.

Konsumsi kadmium berkaitan dengan terjadinya dismenore primer. Pada penelitian Corniawati (2014), pemberian kadmium meningkatkan produksi PGF2 α sebagai biomarker dismenore primer pada hewan coba tikus wistar betina. Peningkatan PGF2 α didasari oleh adanya penurunan kadar progesterone akibat kadmium yang menyebabkan enzim yang menginaktivasi PG tersebut berkurang. Selain itu, kadmium masuk ke dalam sel dengan kemampuan mimikri ionnya terhadap kalsium dan menjadi penginduksi kontraksi.

Penelitian ini dilakukan untuk menguji hipotesis apakah peningkatan PGF2 α pada endometrium tikus wistar betina yang diberi kadmium ada hubungannya dengan peningkatan IL-1 β . Ekspresi sitokin IL-1 β pada jaringan stroma endometrium dianalisa menggunakan metode imunohistokimia (IHK). Hasil pengecatan IHK kemudian dianalisis intensitas resiprokalnya untuk mengetahui ekspresi sitokin dan menggambarkan jumlah sitokin yang diproduksi pada jaringan tersebut. Berdasarkan hasil analisa ekspresi sitokin tersebut, didapatkan hasil bahwa pemberian kadmium tidak meningkatkan IL-1 β secara signifikan ($p=0,12$) pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian kadmium selama 45 hari yang dilakukan pada penelitian secara statistik tidak meningkatkan ekspresi sitokin IL-1 β . Hal ini mungkin berkaitan dengan dosis dan lama pemberian yang belum adekuat menginduksi peningkatan sitokin tersebut (Alghasham *et al.*, 2013). Selain itu, kadmium juga mungkin bukan merupakan induktor sintesis dan maturitas protein IL-1 β sebagaimana beberapa bahan *pathogen-associated molecular pattern (PAMP)* dan *danger-associated molecular pattern (DAMP)* (Netea *et al.*, 2010).

Faktor lain yang juga berpengaruh pada hasil analisa statistika tersebut adalah variasi imunitas individu. Eaton dan Gilbert dalam Klaassen(2008)

menyatakan adanya kesulitan untuk mengorelasikan antara dosis dan efek imunotoksisitas dikarenakan faktor tersebut. Namun, tidak dapat dipungkiri juga bahwa kadar IL-1 β yang kecil sudah mampu meningkatkan produksi protein-protein yang berperan dalam biosintesis maupun aktivitas PG (Rossi *et al.*, 2005; Olson dan Ammann, 2007).

Pada penelitian ini, pemberian kadmium dengan dosis 0,03 $\mu\text{g/L/kgBB/hari}$, 0,06 $\mu\text{g/L/kgBB/hari}$, dan 0,09 $\mu\text{g/L/kgBB/hari}$ dilakukan selama 45 hari. Metode ini berbeda dengan yang dilakukan Alghasham *et al.* (2013) yakni kadmium dalam senyawa kadmium klorida (CdCl_2) dicampurkan dalam air minum hewan coba dengan konsentrasi 40 mg/L namun dalam waktu yang lebih pendek yakni 6 minggu atau kira-kira 42 hari. Pada penelitian tersebut didapatkan adanya peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α dan IL-6 serta peningkatan stress oksidatif.

Kemungkinan lain yang menjelaskan hasil adalah bahwa kadmium tidak bersifat induktor terhadap sintesis sitokin dan maturasi IL-1 β . Kadmium mungkin bukan merupakan ligan bagi *Toll-like reseptor (TLR)*. *TLR* dimiliki oleh sel-sel imun dan epitel untuk merespon adanya benda asing yang berpotensi membahayakan tubuh. *TLR* distimulasi oleh bermacam jenis bahan yang dikelompokkan menjadi *pathogen-associated molecular pattern (PAMP)* atau *danger-associated molecular pattern (DAMP)*. *PAMP* merupakan molekul imunogenik yang dihasilkan oleh bakteri, virus, parasit, atau jamur yang menginfeksi tubuh manusia yang contohnya antara lain adalah lipopolisakarida, peptidoglikan, *muramyl dipeptide*, dan RNA bakteri. *DAMP* memiliki sifat imunogenik, sama seperti *PAMP*, hanya saja *DAMP* dihasilkan dari non-patogen bisa berasal dari endogen maupun eksogen tubuh yang antara lain adalah asam urat (residu metabolisme purin) dan amyloid- β (endogen) dan silica, aluminium,

dan asbestosis (eksogen). Bahan-bahan tersebut mampu menginduksi produksi IL-1 β baik melalui perannya mengaktifkan NF κ B dalam transkripsi gen IL-1 β maupun melalui maturasi IL-1 β dari pro-IL-1 β dengan mengaktifkan inflamason NLRP3 (Netea *et al.*, 2010). Meskipun kadmium berperan sebagai DAMP pada induksi sintesis sitokin proinflamasi lain seperti TNF- α , IL-6, dan IFN- γ , peran tersebut mungkin tidak berlaku pada induksi sintesis sitokin IL-1 β dengan tidak diketahui apakah ada hubungannya dengan dosis.

Penjelasan mengenai bagaimana penurunan kadar progesteron akibat pemberian kadmium yang berdampak pada peningkatan PGF2 α uterus pada penelitian Corniawati (2013) mungkin masih menjadi jawaban atas patomekanisme dismenore primer. Faktor lain yang berkaitan dengan adanya peningkatan PGF2 α bisa jadi akibat gangguan stress oksidatif pada jaringan endometrium akibat respon sel-sel imun terhadap toksik ion kadmium yang diterima. Selain itu, kadmium juga mungkin berperan langsung terhadap aktivitas NF κ B yang kemudian meningkatkan sintesis enzim COX-2 pada stroma dan epitel endometrium. PGF2 α dilaporkan disekresikan dengan kadar terbanyak oleh kedua jaringan tersebut dibandingkan jaringan uterus lain. PGF2 α bersifat parakrin terhadap jaringan miometrium dan arteriol spiralis mengakibatkan kontraksi dan vasokonstriksi (Proctor dan Farquhar, 2006; Maybin *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013)

Onset efek peningkatan IL-1 β yang diinduksi perlakuan juga mungkin berkaitan dengan faktor timing. Pada akhir periode perlakuan (45 hari), tubuh hewan coba melakukan homeostasis yang menyebabkan penurunan kembali IL-1 β yang mungkin pada respon terhadap kadmium bersifat akut. Oleh karena itu,

mungkin bisa dilakukan penelitian untuk mengetahui bagaimana ekspresi sitokin pada periode perlakuan yang lebih pendek.

Penelitian ini juga tidak terlepas dari adanya kekurangan dalam metodologi penelitiannya. Permasalahan yang dihadapi adalah kurangnya sampel penelitian dimana supaya dapat digeneralisasikan jumlah repetisi per kelompok penelitian seharusnya lebih dari sama dengan 5 ($r \geq 5$). Kekurangan didapati dalam teknis pengecatan IHK dimana pewarnaan dalam pengecatan sebaiknya didahului dengan *trial*. *Trial* ini berguna untuk mengetahui berapa lama waktu yang efektif untuk menginkubasi antibodi primer, antibodi sekunder, maupun kromogen *DAB* sehingga intensitas warna coklat yang menggambarkan ekspresi antigen yang diuji bisa tampak. Pada penelitian ini tidak dilakukan *trial*.

Selain itu dalam penentuan *range of interest (ROI)*, pengambilan lapang sampel untuk pengukuran intensitas bersifat subjektif berdasarkan pengamat. Mungkin ke depannya perlu suatu metode untuk menentukan lapang sampel yang objektif.

Metode semikuantifikasi ekspresi sitokin IL-1 β dengan menghitung intensitas resiprokal mungkin dapat dijadikan metode semikuantifikasi pada analisis dengan IHK. Kromogen *DAB* yang dipakai menunjukkan warna coklat gelap. Pada pengukuran intensitas, warna gelap akan mempresentasikan intensitas yang rendah. Penghitungan intensitas resiprokal dengan rumus $RI = 255 - color\ intensity$ menginversikan angka intensitas yang dihasilkan perangkat lunak pengolah gambar. Penggunaan metode semikuantifikasi intensitas resiprokal akan berkorelasi positif dengan jumlah ekspresi protein yang dihasilkan pada pewarnaan (Nguyen et al, 2013).

Pada pewarnaan IHC (sesuai gambar 5.1), warna coklat kromogen DAB terlokalisasi pada beberapa bagian potongan jaringan uterus menunjukkan lokalisasi IL-1 β . Lokalisasi IL-1 β pada sitoplasma yang terletak pada stroma endometrium menunjukkan bahwa sitokin tersebut dihasilkan oleh sel-sel pada bagian tersebut. Pada hasil penelitian ini, tidak dapat diketahui apakah sel produsen adalah sel jaringan ikat atau sel imun (makrofag, sel dendrit, neutrofil) dikarenakan keterbatasan dalam pengamatan morfologi sel. Hanya saja, tidak didapati referensi ilmiah yang melaporkan produksi sitokin IL-1 β oleh sel selain sel imun dan sel epitel. Pada kelompok perlakuan didapati ekspresi IL-1 β pada membran sel dan relatif tidak ada pada sitoplasmanya. Ini menunjukkan bahwa mungkin sel epitel lumen memiliki reseptor (IL-1R) dan reseptor tersebut berikatan dengan IL-1 β yang bersifat parakrin dari sel lain (kemungkinan besar dari sel stroma) tetapi IL-1 β tersebut bisa jadi berasal dari eksogen karena tidak diketahui bagaimana mekanisme IL-1 β dari lapisan stroma endometrium dapat berikatan dengan reseptor yang berada pada apikal epitel lumen.

Fortier *et al.* (2008) menyebutkan bahwa PGE2 dihasilkan oleh stroma dan PGF2 α dihasilkan oleh epitel lumen. Apabila dikombinasikan dengan hasil penelitian ini, dapat dijelaskan bahwa IL-1 β yang dihasilkan dari stroma memengaruhi produksi kedua mediator inflamasi masing-masing secara parakrin atau autokrin.