

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian yang bersifat eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui adanya hubungan antara paparan profilin *Toxoplasma gondii* terhadap kadar NF- κ B pada kultur adiposit. Metode yang digunakan untuk memberi profilin kepada kultur adiposit bersifat manual dengan menggunakan mikropipet menyesuaikan dengan dosis yang ingin diberikan. Pengukuran kadar NF- κ B secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan teknik ELISA sehingga dapat diketahui adanya kenaikan atau penurunan dari kadar NF- κ B terhadap pemberian profilin *Toxoplasma gondii*.

Kultur adiposit ditumbuhkan di Lab Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dari lemak subkutan tikus wistar yang berumur 1 bulan yang juga dipilih di Lab Parasit. Kultur adiposit yang digunakan telah memenuhi kriteria inklusi dan tidak terdapat kriteria eksklusi yang dinilai secara kualitatif dengan cara dilihat ada tidaknya bakteri atau jamur (tanda kontaminasi) melalui mikroskop di Lab Fisiologi Fakultas Kedokteran FKUB. Kultur adiposit yang telah berusia 5 minggu dan diperiksa secara kualitatif dengan kriteria memiliki banyak sel adiposit dan berjarak rapat mengindikasikan siap untuk diberi perlakuan.

Profilin *Toxoplasma gondii* yang digunakan merupakan ekstrak dari takizoid *T. gondii* dengan strain tertentu yang RNA profilinnya dipecah dan diligasi ke dalam vector pET30a(+) serta diubah menjadi *Escherichia coli* DH5 α yang akan diambil plasmidnya dan diperbanyak (Yuan, *et al.*, 2015). Proses di atas dilakukan di Amerika dan hasilnya profilin rekombinannya diimpor ke Indonesia. Cara ekstraksi yang bersifat molekuler ini dipakai karena hasilnya

reaktif terhadap antibodi telah dibuktikan pada hewan coba kelinci dan gen yang dikode spesifik gen profilin *Toxoplasma gondii* sehingga dapat menunjang hipotesis lebih kuat.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah dosis profilin *Toxoplasma gondii* dengan variasi 5 μ g, 20 μ g dan 40 μ g serta 1 kelompok kontrol tanpa diberi profilin. Satu kelompok lagi yaitu kelompok kontrol positif yang diberi stimulan IBMX Dexamethasone yang berguna untuk menstimulasi diferensiasi perkembangan sel-sel adiposit sehingga dapat diketahui bahwa hipertrofi dari sel adiposit benar-benar disebabkan oleh profilin *T.gondii*. Besarnya dosis tersebut ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelum memulai teknik ELISA.

Kadar NF- κ B diukur dari sel adiposit yang telah dipisahkan dari medianya. Teknik yang digunakan yaitu ELISA menggunakan proses antigen antibodi disertai enzim yang nantinya mengikat sel adiposit yang ingin diukur kadar NF- κ B nya. Enzim yang mengikat bersifat chromogenik akan memancarkan spektrum cahaya yang menampilkan banyaknya ikatan Ab-Ag yang merupakan kadar NF- κ B di sel adiposit tersebut. Spektrum tersebut akan ditangkap oleh spectrophotometri dan ditampilkan dalam bentuk bilangan nominal dengan satuan ng/mL.

NF- κ B dipilih untuk diukur karena sebagai master regulasi imun dan proses inflamasi yang dikarenakan respon imun atau infeksi. Selain itu, untuk mengaktifkan NF- κ B diperlukan suatu reseptor yang salah satunya merupakan *Toll Like Receptor* (Napetschnig *et al.*, 2013). Profilin adalah ligan spesifik terhadap TLR-11 (Yarovinsky *et al.*, 2005). Apabila terjadi inflamasi dari sel adiposit yang diinduksi oleh sitokin pro inflamasi seperti IL-6 yang diregulasi oleh

NF- κ B maka FFA (Free Fatty Acid) akan dilepas dalam jumlah besar dari jaringan lemak yang menumpuk. Pelepasan FFA akan menimbulkan peningkatan produksi glukosa, trigliserida, VLDL dan LDL disertai dengan penurunan dari HDL. *Free Fatty Acid* juga menurunkan sensitivitas insulin dan menyebabkan hiperinsulinemia yang juga disebabkan peningkatan glukosa dalam tahap tertentu. Hiperinsulinemia dapat meningkatkan reabsorpsi natrium dan peningkatan aktivitas saraf simpatis yang dapat menimbulkan hipertensi. Inflamasi yang terus menerus akan memperberat resistensi insulin yang disebabkan oleh FFA (Eckel *et al.*, 2005). Trigliserida yang meningkat >150 mg/dL, HDL dengan kadar <40 mg/dL untuk laki-laki dan <50 mg/dL untuk perempuan, tekanan darah >130/85 mmHg serta gula darah puasa >110 mg/dL merupakan kriteria sindrom metabolik menurut NCEP:ATP III tahun 2002. Maka dari itu diduga apabila adanya inflamasi yang berlebihan pada sel adiposit yang dapat meningkatkan kadar FFA dalam darah maka dapat mengakibatkan sindrom metabolik.

Kadar NF- κ B yang diukur dari kultur adiposit yang telah diberi profilin *Toxoplasma gondii* menunjukkan adanya peningkatan seiring dengan kenaikan dosis pemberian profilin. Dosis profilin 5 μ g hanya membuat kadar NF- κ B meningkat dengan selisih 0,215 ng/mL dengan kelompok kontrol tanpa stimulan dan tidak meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi stimulan. Dosis profilin 20 μ g membuat kadar NF- κ B meningkat dengan selisih 0,96 ng/mL dengan kelompok kontrol tanpa stimulan dan hanya memiliki selisih 0,652 ng/mL dengan kelompok kontrol yang diberi stimulan. Dosis tertinggi profilin yaitu 40 μ g membuat kadar NF- κ B mencapai rata-rata 3,756 ng/mL dibandingkan dengan kultur adiposit yang tidak diberi profilin dengan kadar NF- κ B hanya sebesar

0,298 ng/mL. Pada Kruskal Wallis didapatkan hasil dengan perbedaan yang bermakna dan *post hoc*nya didapatkan dosis profilin yang memberikan perbedaan bermakna yaitu 40 µg dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi stimulan, kelompok yang diberi profilin dosis 5 µg dan dosis 20 µg. Hubungan yang kuat antara pemberian profilin terhadap kadar NF-κB juga dinilai bermakna yang menandakan kenaikan dari kadar NF-κB dipengaruhi oleh profilin *Toxoplasma gondii* yang dipaparkan. Hal ini menunjukkan adanya suatu *cascade* dalam sel adiposit yang dapat meningkatkan kadar NF-κB saat dipapar profilin. Profilin merupakan ligan dari TLR-11 yang dimana *Toll Like Receptor* akan memulai suatu *cascade* yang berujung pada pembentukan dari NF-κB. Jalur *canonic* adalah jalur pembentukan NF-κB yang distimulasi oleh *Toll Like Receptor* dan sitokin proinflamasi seperti TNF-α dan IL-1. Jalur ini yang akan distimulasi oleh profilin sehingga TLR-11 mengaktifkan kompleks IKK untuk melepas segmen β yang akan menginduksi fosforilasi dari IκB. NF-κB yang terdiri dari *RelA* dan *p50* akan dilepaskan dari IκB saat terjadi fosforilasi (Yarovinsky *et al.*, 2005; Napetschnig *et al.*, 2013; Lawrance, 2009). Proses ini yang menimbulkan peningkatan dari kadar NF-κB yang terdapat pada kultur adiposit yang diberi profilin *Toxoplasma gondii*.

Selanjutnya untuk dapat menimbulkan hipertrofi dan hiperproliferasi dari sel adiposit serta resistensi insulin diperlukan sitokin IL-6 yang ditranskripsi oleh sel yang diatur oleh NF-κB. Peningkatan sekresi dari IL-6 yang dihasilkan oleh adiposit dan makrofag yang juga diinduksi oleh NF-κB akan menyebabkan resistensi insulin dan trigliserida hasil dari lipolisis jaringan lemak yang disimpan dalam *Free Fatty Acid* darah. IL-6 juga menghambat *Reversed CA-IKKβ* yang seharusnya menurunkan produksi dari NF-κB sehingga inflamasi pada adiposit,

liver dan otot tidak berhenti (Baker, *et al.*, 2012; Eckel, *et al.*, 2005). Hal ini membuat IL-6 menjadi kunci penting untuk mengetahui terjadinya hipertrofi adiposit dan resistensi insulin. Menurut penelitian Susanto *et al* tentang efek profilin *T.gondii* terhadap kadar TLR-11, IL-6 dan TNF- α pada tahun 2010, kadar IL-6 mengalami peningkatan seiring dengan penambahan dosis profilin. Hal ini menunjukkan bahwa IL-6 memang diproduksi melalui jalur *canonic* NF- κ B yang diinduksi oleh TLR-11. Selain itu, kemungkinan dari *Toxoplasma gondii* untuk menginfeksi dalam jangka waktu lama (kronis) pada jaringan adiposit belum diketahui pasti walaupun dalam penelitian Cristina *et al* pada tahun 2008 menunjukkan bahwa bradizoid membentuk kista selama beberapa hari pada jaringan adiposit dan hari-hari berikutnya konversi kembali dalam bentuk takizoid untuk menginfeksi otak yang merupakan organ utama tempat infeksi dari *T.gondii* sehingga dapat mempengaruhi hasil regresi linier dan menjadi variabel lain yang harus diteliti lebih lanjut.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan diantaranya tidak diketahui secara pasti sitokin lain seperti IL-1 atau TNF- α dapat lebih menginduksi terjadinya hipertrofi dan hiperproliferasi sel adiposit dibandingkan dengan NF- κ B yang memerlukan dosis profilin 40 μ g untuk menghasilkan perbedaan yang bermakna. Keterbatasan lainnya adalah belum dapat dipastikan terjadinya hipertrofi dan hiperproliferasi dari sel adiposit karena tujuan penelitian ini hanya untuk mengetahui hubungan antara profilin *Toxoplasma gondii* dengan kadar NF- κ B.

Uji lanjutan mengenai durasi yang diperlukan untuk mencapai hipertrofi dari sel adiposit dan peningkatan dari zat lain seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) untuk menilai adanya hipertrofi dan hiperproliferasi dari sel adiposit masih

diperlukan. Masih diperlukan penelitian yang lebih dalam dari penelitian ini agar nantinya dapat diaplikasikan pada hewan coba dalam jangka waktu yang lebih panjang untuk menilai apakah infeksi akut atau kronis *Toxoplasma gondii* yang dapat menyebabkan disfungsi adiposit.

