

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya peningkatan kadar ROS pada kultur adiposit in vitro yang diberi paparan profilin *Toxoplasma gondii*. Pemberian profilin dilakukan secara manual menggunakan mikropipet sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pengukuran kadar ROS dilakukan dengan menggunakan *Abcam's DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* dan selanjutnya dihitung menggunakan *flowcytometer*.

Toxoplasma gondii memiliki *profilin-like protein* yang akan dikenali oleh TLR-11 sistem imun alami sel inang (Plattner, *et al.*, 2008). Profilin *Toxoplasma gondii* yang berikatan dengan TLR-11 akan menginduksi pelepasan sitokin inflamasi seperti IL-6 dan IL-12 yang merupakan petanda awal terjadinya disfungsi adiposit (Iskandar *et al.*, 2011). Disfungsi adiposit akan menginduksi terjadinya stres oksidatif (Furukawa, *et al.*, 2004). Stres oksidatif sendiri merupakan hasil dari ketidakseimbangan antara kadar ROS dengan anti-oksidan dalam tubuh (Agarwal *et al.*, 2005). ROS atau oksidan dapat di produksi dari jalur metabolik dan enzimatik, termasuk di dalamnya jalur fosforilasi oksidatif, jalur pembentukan NADPH dan *xanthine oxidase*. Teori yang lain menyebutkan, semua reaksi tranfer elektron pada protein dan sistem enzimatik dapat memproduksi ROS (Thannickal dan Fanburg, 2000). Sehingga dengan adanya infeksi *Toxoplasma gondii*, maka terjadi ikatan protein antara profilin-like protein *T.gondii* dengan TLR-11 yang menginduksi produksi ROS pada tubuh hospes.

Dari data hasil pengukuran ROS pada **Tabel 5.1** dapat diketahui bahwa kadar ROS mengalami peningkatan pada pemberian profilin 5 μg dan penurunan pada dosis 20 μg dan 40 μg . Hasil penelitian ini berlawanan dengan hipotesis penelitian. Hal ini bertentangan dengan landasan teori yang menyatakan bahwa kadar ROS akan mengalami kenaikan seiring dengan kenaikan dosis profilin.

Terdapat beberapa hal yang dapat menjelaskan alasan penurunan ROS pada penelitian ini. Sebelumnya di sebutkan bahwa stres oksidatif merupakan hasil dari ketidakseimbangan antara kadar ROS dengan anti-oksidan dalam tubuh (Agarwal et al.,2005). Anti-oksidan merupakan senyawa yang mampu menurunkan aktivitas stres oksidatif dalam tubuh dengan mendonorkan elektron kepada senyawa oksidan (Winarsi, 2007). Saat terjadi kerusakan sel adiposit, glutathion (GSH) yang merupakan anti-oksidan akan diproduksi sebagai pertahanan lini pertama untuk menjaga keadaan redoks yang seimbang sehingga dapat menghindari atau memperbaiki modifikasi oksidatif yang mengarah pada disfungsi atau kematian sel (Marí, et al., 2009). Teori ini juga didukung oleh Constantini (2009) dalam penelitiannya tentang hubungan kadar antioksidan tinggi dan stres oksidatif yang menyatakan bahwa kadar ROS yang tinggi dalam tubuh menyebabkan ekspresi berlebih anti-oksidan sebagai sistem imun tubuh dan menurunkan aktivitas radikal bebas. Sehingga disimpulkan jika kadar GSH dan anti-oksidan lain pada kultur meningkat maka akan terjadi penurunan kadar ROS.

Hasil penelitian pada **gambar 5.3** menunjukkan ada peningkatan dan penurunan kadar ROS seiring peningkatan dosis profilin. Dari hasil penelitian didapatkan kadar ROS mengalami peningkatan pada dosis profilin 5 μg dan penurunan pada dosis profilin 20 μg dan 40 μg . Ada kemungkinan bahwa kadar

ROS sangat ditentukan oleh dosis profilin yang diberikan. Teori ini didukung oleh Poljsak (2013) dalam penelitiannya tentang keseimbangan antara ROS dan antioksidan yang menyatakan bahwa keseimbangan antara anti-oksidan dan oksidan dipengaruhi oleh dosis. Di dalam penelitiannya disebutkan juga bahwa belum ditemukan nilai normal dari oksidan dan anti-oksidan yang dapat digunakan sebagai patokan dalam pengukuran. Hal ini menjelaskan hasil penelitian pada **gambar 5.3** dimana kadar ROS mengalami peningkatan pada dosis profilin 5 µg dan penurunan pada dosis 20 µg dan 40 µg. Ada kemungkinan bahwa dosis maksimal peningkatan ROS pada kultur adiposit ada antara 5 µg sampai 20 µg.

Penyebab berikutnya merujuk pada penelitian oleh Armstrong (2002) tentang peran deplesi GSH dan generasi ROS terhadap apoptosis sel menyebutkan bahwa selama 24 jam awal kerusakan sel, didapatkan penurunan GSH sebesar 95% tanpa kenaikan ROS yang signifikan. Penelitian tersebut mendukung dugaan bahwa pada kultur adiposit yang diinduksi profilin *T.gondii* selama 24 jam belum dapat menunjukkan peningkatan ROS.

Penurunan kadar ROS pada penelitian ini dapat pula disebabkan karena metode pengukuran ROS yang digunakan kurang sesuai. Menurut Poljsak (2010) dalam penelitiannya tentang metodologi untuk mendeteksi fase oksidatif dalam sistem biologi menyatakan bahwa waktu paruh ROS dalam tubuh sangat pendek, sehingga mempersulit pengukuran kadar ROS di laboratorium. Dalam penelitian tersebut dituliskan bahwa untuk mengukur kadar ROS secara langsung disarankan menggunakan *electron paramagnetic resonance* (EPR). Pada penelitian berikutnya disarankan untuk menggunakan EPR sehingga hasil lebih representatif.

Dalam pembuatan kultur adiposit, peneliti menambahkan EDTA, hal ini memungkinkan menurunnya produksi ROS sejak sebelum diberikan perlakuan. Dugaan ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Guérin (2001) tentang oksidatif stress dan proteksi terhadap ROS dalam pra-implantasi embrio dan sekitarnya menyebutkan bahwa pemberian *Ethyldiaminetetraacetic Acid* (EDTA) dapat menghambat produksi ROS. EDTA dapat menghambat reaksi oksidasi enzimatis dan non enzimatis, EDTA juga menghambat produksi *xanthine oxidase* yang merupakan sumber produksi ROS pada kultur in vitro dari tikus.

Kondisi medium yang digunakan juga berpengaruh pada kadar ROS. Selivanov (2010) meneliti tentang peran pH dalam produksi ROS oleh mitokondria. Penelitian tersebut menggunakan media dengan pH 6-8 dan ditambahkan glutamat dan malat agar sesuai dengan kondisi fisiologis tubuh. Untuk memanipulasi pH digunakan fosfat inorganik, *nigericine* dan *valinomycin*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pH lebih dari 7 dapat meningkatkan produksi ROS. Kondisi yang terlalu asam menyebabkan kerusakan di dalam mitokondria sel, sehingga produksi ROS terganggu. Sedangkan, peneliti mengganti medium kultur adiposit dan menetralkan pH dengan HCl setiap 2 hari. Hal ini memungkinkan saat diberi perlakuan, kondisi kultur adiposit terlalu asam sehingga produksi ROS menurun.

Dari hasil penelitian ini dan beberapa hal di atas, maka dapat disimpulkan bahwa kemungkinan terbesar penyebab dari penurunan kadar ROS adalah produksi ROS sangat dipengaruhi dosis profilin dan sekresi berlebih dari antioksidan, sehingga terjadi penurunan kadar ROS pada kultur.

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan tentang hubungan infeksi *T.gondii* dengan disfungsi adiposit sebagai awal dari sindroma metabolik melalui pengukuran kadar ROS pada kultur yang diberi paparan profilin *T.gondii*. Peningkatan ROS pada infeksi *T.gondii* dapat menginduksi stres oksidatif dan berujung pada disfungsi adiposit, namun dalam penelitian ini belum dapat di konfirmasi.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini menggunakan kultur adiposit in vitro, dimana kondisi kultur tidak 100% fisiologis. Sehingga untuk dapat dikonfirmasi lebih lanjut mengenai efek dari infeksi *T.gondii* terhadap kadar ROS pada sel adiposit, perlu untuk dilakukan penelitian secara in vivo.

Penelitian ini menggunakan 1 sampel kultur adiposit dengan 4 perlakuan dan 4 kali pengulangan pada setiap perlakuan. Namun penggunaan hanya 1 sampel dirasa kurang representatif. Disarankan untuk peneliti selanjutnya agar menggunakan minimal 3 sampel agar dapat dibandingkan.

Pada penelitian ini, kultur adiposit yang digunakan diputuskan siap untuk diberi perlakuan didasari oleh penampakan mikroskopis kultur saja. Dimana hasil foto mikroskopis dari kultur adiposit tidak jelas dikarenakan warna yang transparan dan tipis. Sehingga terdapat kemungkinan belum sepenuhnya perubahan sel preadiposit menjadi sel adiposit yang matur saat diberi perlakuan. Hal ini menyebabkan hasil penelitian kurang representatif.

Kondisi medium DMEM yang digunakan dalam kultur juga berubah pHnya seiring waktu. Pemberian HCl dilakukan setiap 2 hari saat mengganti medium.

Namun kadar HCl yang diberikan tidak diberi ketentuan, kadar pH normal hanya ditentukan dengan melihat perubahan warna dari medium saja. Ada kemungkinan saat diberi perlakuan, pH kultur terlalu asam sehingga produksi ROS mengalami penurunan. Untuk peneliti selanjutnya, disarankan untuk pemberian HCl sebagai kontrol pH ditentukan dosisnya, dan pengukuran dapat menggunakan instrumen yang lebih tepat.

Peneliti menggunakan dosis 5 μg , 20 μg dan 40 μg untuk profilin yang diberikan. Berdasar hasil penelitian, di dapatkan peningkatan ROS yang signifikan pada pemberian profilin dosis 5 μg dan penurunan ROS pada pemberian profilin dosis 20 μg . Namun dalam penelitian ini belum dapat ditentukan dosis pemberian profilin yang dapat meningkatkan kadar ROS dengan maksimal. Untuk mengkonfirmasi dosis profilin yang dapat meningkatkan kadar ROS, perlu diadakan penelitian dengan dosis profilin antara 5 μg sebagai batas bawah adanya peningkatan kadar ROS dan 20 μg sebagai batas atas karena didapatkan penurunan kadar ROS.