

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Hubungan Jumlah Subkultur dengan Tingkat Ekspresi $\alpha$ -SMA

Pada perjalanan penyakit soket kontraktur orbita, proses fibrosis merupakan kunci utama terjadinya *scarring*, di mana *scarring* ini salah satunya merupakan hasil dari kegagalan apoptosis sel myofibroblas (Poonyathalang *et.al.*, 2005 dan Darby *et.al.*, 2014). Munculnya ekspresi  $\alpha$ -SMA pada jaringan merupakan cerminan atau marker dari adanya sel myofibroblas (Falke *et.al.*, 2015). Pada penelitian ini, subkultur dilakukan sebanyak tiga kali, dengan alasan bahwa penelitian-penelitian yang dilakukan sebelumnya terbatas pada subkultur 4-8, sehingga belum ada penelitian yang melakukan tiga kali subkultur dari kultur primer (Hinz *et.al.*, 2001, Kinner *et.al.*, 2001, Kinnman *et.al.*, 2003, dan Walker *et.al.*, 2004).

Dari data hasil penelitian yang didapat, jumlah satu kali subkultur ternyata masih belum memberikan perubahan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA yang signifikan, meskipun terdapat sedikit kenaikan (Tabel 5.3). Namun ketika sampai pada subkultur ketiga, tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA mengalami kenaikan yang bermakna dari subkultur pertama ( $p < 0.05$ ). Hal ini juga dibuktikan oleh penelitian Kinner *et.al.* pada tahun 2001 yang mengamati kadar  $\alpha$ -SMA menggunakan *Western blot analysis*, dengan hasil yaitu kadar  $\alpha$ -SMA yang mengalami peningkatan mengikuti jumlah subkultur atau *passage* yang dilakukan. Penelitian ini menunjukkan bahwa sifat dan karakter myofibroblas pada jaringan soket kontraktur mirip dengan myofibroblas dari kondrosit sendi manusia seperti pada penelitian Kinner *et.al.*

tahun 2001, yaitu peningkatan jumlah sel seiring dengan peningkatan jumlah subkultur.

Perlu diingat bahwa salah satu faktor utama perubahan fisiologis dari fibroblas menjadi myofibroblas yaitu dibutuhkan adanya *mechanical tension*. Ternyata, penelitian terbaru menunjukkan adanya peningkatan kekakuan matriks yang progresif seiring berjalannya waktu jika jaringan sejak mula sudah mengalami *tension* (Wakatsuki *et.al.*, 2000). Mengingat bahwa proses subkultur pada penelitian ini memerlukan waktu tiga minggu untuk menunggu sel fibroblas mengalami adhesi pada dasar sumuran, maka peningkatan kekakuan jaringan ini dapat menjadi penyebab peningkatan jumlah sel myofibroblas seiring meningkatnya jumlah subkultur, yang ditandai dengan peningkatan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA.

## **6.2 Hubungan Jumlah Subkultur dengan Perubahan Myofibroblas menjadi Bentuk Inaktifnya (Fibroblas)**

Di akhir proses *wound healing* fisiologis, myofibroblas mengalami apoptosis agar tidak lagi memproduksi ECM (Tomasek *et.al.*, 2002 dan Darby *et.al.*, 2014). Namun pada penelitian-penelitian sebelumnya, masih belum terdapat data mengenai perubahan langsung dari myofibroblas aktif (terdiferensiasi) menjadi tahap inaktifnya (yaitu fibroblas biasa) (Gambar 2.9). Penelitian ini menunjukkan bahwa setelah dilakukan subkultur atau *passage*, myofibroblas terdiferensiasi ternyata tidak mengalami perubahan menjadi bentuk inaktifnya, yang ditandai dengan tidak terjadinya penurunan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA.

Pada tahun 2005, Manapov *et.al.* melakukan penelitian pada myofibroblas dari pankreas. Dari penelitian ini ditemukan bahwa myofibroblas dari jaringan pankreas yang mengalami *wound healing* tersebut memiliki sifat sementara.

Perubahan fenotip ini ternyata berhubungan dengan translokasi p21<sup>Cip1/WAF1</sup> dari nukleus ke dalam sitoplasma.

### 6.3 Hubungan Pemberian TGF- $\beta$ dengan Tingkat Ekspresi $\alpha$ -SMA

Sebelum dilakukan penelitian, peneliti membuat hipotesis bahwa pemberian TGF- $\beta$  dengan kadar 10ng/mL pada tiap subkultur akan menjadi kontrol dengan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA yang sama pada tiap kelompoknya. Dosis TGF- $\beta$  yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10ng/mL, dengan dasar teori bahwa penelitian-penelitian sebelumnya dengan menggunakan dosis TGF- $\beta$  sebesar 10ng/mL mampu menunjukkan respon yang baik terhadap diferensiasi fibroblas yang diteliti (Serpero *et.al.*, 2006, Caraci *et.al.*, 2008, dan Dodi *et.al.*, 2015).

Penelitian ini menunjukkan bahwa dengan pemberian TGF- $\beta$  dosis yang sama pada tingkatan subkultur yang berbeda memberikan angka tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA yang berbeda pula (Gambar 5.2). Maka itu, perbedaan ini semakin menunjukkan peran subkultur dalam meregulasi perubahan (peningkatan) tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA. Pada penelitian ini pula ternyata subkultur III menunjukkan respon yang berbeda terhadap pemberian TGF- $\beta$  jika dibandingkan dengan subkultur I dan II. Meskipun pada penelitian-penelitian sebelumnya didapatkan bahwa TGF- $\beta$  merupakan *growth factor* utama dalam diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas (Vaughan *et.al.*, 2000, Walker *et.al.*, 2004, dan Untergasser *et.al.*, 2005), melalui penelitian ini dapat dilihat minimnya peran TGF- $\beta$  terhadap perubahan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA pada jaringan soket kontraktur orbita.

Selama ini, penelitian-penelitian yang dilakukan menunjukkan hubungan sebab-akibat yang jelas antara pemberian TGF- $\beta$  dengan diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas (Ji *et.al.*, 2014 dan Martin *et.al.*, 2015). Namun, peran dari

*growth factor* lainnya belum diteliti secara lebih lanjut. Salah satu penelitian yang melihat peran *growth factor* lain dilakukan oleh Svystonyuk *et.al.* pada tahun 2015, yaitu melihat peran *Fibroblast growth factor-2*, yang ternyata justru menunjukkan penurunan remodeling myofibroblas yang diinduksi oleh TGF- $\beta$ . Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Tumelty tahun 2014 menunjukkan sebuah *signaling* di luar pengaruh TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ -*independent pathway*) pada proses diferensiasi myofibroblas, namun bukan dilihat dari tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA nya, melainkan dari produksi kolagennya. Dapat disimpulkan bahwa dari penelitian-penelitian yang sudah dilakukan, peran TGF- $\beta$  cukup besar dalam menginduksi diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas, namun masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut yang perlu dilakukan pada jaringan soket kontraktur orbita.

#### **6.4 Hubungan Tingkat Ekspresi $\alpha$ -SMA antara Subkultur tanpa *Growth Factor* dengan Subkultur dengan TGF- $\beta$ 10ng/mL**

Hipotesis awal dari peneliti yaitu ingin mengamati penurunan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA akibat subkultur, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol yang akan memberikan gambaran tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA yang sama pada tiap-tiap subkulturnya. Pemberian TGF- $\beta$  dengan dosis 10ng/mL mengacu pada penelitian-penelitian sebelumnya untuk menginduksi peningkatan tingkat ekspresi atau kadar  $\alpha$ -SMA, meskipun belum ada dosis terstandarisasi yang dijadikan patokan dalam menginduksi perubahan fibroblas menjadi myofibroblas (yang ditandai peningkatan tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA) (Hinz *et.al.*, 2001, Walker *et.al.*, 2001, dan Untergasser *et.al.*, 2005). Mengacu pada Grafik 5.2, ternyata dapat dilihat bahwa pemberian TGF- $\beta$  10ng/mL tidak mampu menjaga kondisi (*environment*) pro-fibrotik pada jaringan yang dilakukan subkultur. Ternyata ditemukan pula bahwa TGF- $\beta$ 1 konsentrasi tinggi (10ng/mL) mampu

meningkatkan jumlah apoptosis sel katup jantung *in vitro* (Walker *et.al.*, 2004). Hal ini dapat menjelaskan penurunan kadar  $\alpha$ -SMA pada kelompok subkultur III.

### **6.5 Keterbatasan Penelitian**

Kekurangan penelitian ini yaitu tidak adanya pengamatan morfologi myofibroblas maupun pengukuran tingkat ekspresi  $\alpha$ -SMA pada jaringan kultur primer sebelum dilakukan subkultur, sehingga tidak bisa dilakukan perbandingan antara sebelum dan setelah dilakukan subkultur.