

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Efek Pemberian Ekstrak Ketela Rambat Ungu terhadap Prosentase Sel Treg, Prosentase Sel Th17 dan Rasio Sel Treg/Sel Th17

Sel Th17 merupakan subset sel T CD4⁺ yang memproduksi IL-17 yang bersifat proinflamasi. Banyak penelitian yang menunjukkan terjadi peningkatan persentase sel Th17 dan sitokin IL-17 pada pasien LES (Wong *et al.*, 2008; Nalbandian *et al.*, 2009). Dari beberapa penelitian diketahui bahwa pada kasus autoimunitas terjadi penurunan rasio sel Treg/sel Th17 yang disebabkan oleh prosentase sel Treg berkurang sedangkan prosentase sel Th17 bertambah (Ma *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2010; Dolff *et al.*, 2011) termasuk pada kasus LES (Elias *et al.*, 2008; Alunno *et al.*, 2012).

Sel T CD4 naif diaktivasi menjadi sel Th17 oleh IL-6 dan mensekresikan IL-21 melalui Stat3. Bersama TGF- β , IL-21 menginduksi ekspresi ROR γ t dan IL-17. IL-21 bersifat autokrin dan meningkatkan produksinya dengan umpan balik positif. Sitokin ini juga bekerja pada upstream ROR γ t untuk merangsang pembentukan IL-23R melalui Stat3. Sinyal yang berasal dari ikatan IL-23 dengan reseptor IL-23R menginduksi ROR γ t dan menstabilkan diferensiasi sel Th17 (Betteli *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2007; McGeachy *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Veldhoen *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2006; Betteli *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2005).

Selain menjadi sel Th17, diferensiasi sel T CD4 naif juga berpotensi menjadi sel Treg dengan pengaruh TGF- β . Sel Treg merupakan subset sel T supresor yang secara aktif mensupresi proliferasi limfosit autoreaktif yang lolos dari toleransi sentral dan dapat menginduksi toleransi perifer serta mencegah autoimunitas (La Cava, 2009; Mercer *et al.*, 2010). TGF- β mengaktivasi faktor transkripsi FoxP3 yang merupakan kontrol gen utama dalam perkembangan dan fungsi supresi sel Treg (Wang *et al.*, 2007; Huehn *et al.*, 2009).

Disamping TGF- β dan IL-6, arah diferensiasi sel T CD4 naif dipengaruhi dengan keberadaan retinoic acid (RA), suatu bentuk metabolit vitamin A. RA mengarahkan diferensiasi ke arah sel *Treg* dengan meningkatkan ekspresi FoxP3 dan menekan mekanisme yang mengarah ke sel Th17 (Elias *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2008).

Pada studi ini, sel T CD4 naif dikultur dalam medium stimulan yang mengandung TGF- β dan IL-6 untuk mengarahkan diferensiasi menjadi sel Th17. Namun medium juga diberi ekstrak ketela rambat untuk melihat potensi pembelokan diferensiasi menjadi sel *Treg*. Berdasarkan literatur, ketela rambat memiliki kandungan vitamin yang tinggi. Kadar vitamin A yang terkandung di ketela rambat ungu berkisar 100 μ g hingga lebih dari 26600 μ g dari tiap 100g (Van Jaarsveld *et al.*, 2005; Van Jaarsvel *et al.*, 2006). Vitamin A inilah yang diduga memiliki peran penting dalam menekan aktivasi sel Th17 pada kultur sel T CD4 naif dan merangsang aktivasi sel *Treg* sehingga meningkatkan rasio sel *Treg*/sel Th17.

Pemberian ketela rambat diharapkan dapat meningkatkan ekspresi FoxP3 sehingga aktivasi sel *Treg* bertambah yang ditunjukkan dengan peningkatan persentasenya seiring kenaikan dosis. Namun pada studi ini prosentase sel *Treg* cenderung berkurang pada kelompok yang diberi ekstrak ketela rambat dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 5.2) meski secara statistik tidak bermakna. Berdasarkan studi literatur, penulis menduga ada perbedaan karakteristik pasien LES di Indonesia dengan pasien LES di negara lain. Perbedaan karakter ini yang dicurigai menyebabkan prosentase sel *Treg* cenderung turun. Sebelumnya dikatakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas sel Th17 dan penurunan aktivitas sel *Treg* pada pasien LES (Alunno *et al.*, 2012). Namun studi yang dilakukan oleh Handono *et al* (2013) menemukan terjadi peningkatan jumlah baik sel Th17 maupun sel *Treg* pada pasien LES di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang, rumah sakit dimana penulis melakukan penelitian. Ini mengindikasikan prosentase sel *Treg* berbanding lurus dengan sel Th17. Variasi karakter yang diharapkan menjelaskan keunikan pasien LES di Indonesia adalah peranan *tumor necrosis factor* (TNF) yang disintesis oleh sel Th17. Chen *et al* (2007; 2008) mengungkapkan bahwa TNF yang berikatan dengan *tumor necrosis*

factor receptor type 2 (TNFR2) akan memaksimalkan fungsi supresi sel *Treg*. Sehingga prosentase sel *Treg* akan mengikuti prosentase sel Th17.

Serupa dengan sel *Treg*, efek pemberian ekstrak ketela rambat cenderung menyebabkan prosentase sel Th17 berkurang seperti yang ditunjukkan gambar 5.3. namun perbedaan prosentase antar kelompok tidak mempunyai perbedaan yang bermakna secara statistik. Mekanisme yang disangka berperan dalam tren penurunan ini adalah karena berkurangnya ekspresi ROR γ t yang dibutuhkan dalam diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel Th17.

Dari aspek rasio, perbandingan sel *Treg*/sel Th17 terbukti meningkat dengan pemberian ekstrak ketela rambat 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, dan 100 μ g/ml. Meski prosentase sel *Treg* dan sel Th17 sama-sama berkurang, selisih penurunan sel Th17 lebih besar daripada sel *Treg* sehingga menaikkan rasio sel *Treg*/sel Th17. Prosentase sel Th17 menurun diduga karena kandungan vitamin A pada ketela rambat. Kadar vitamin A yang terkandung di ketela rambat ungu berkisar 100 μ g hingga lebih dari 26600 μ g dari tiap 100g (Van Jaarsveld *et al.*, 2005; Van Jaarsvel *et al.*, 2006). Vitamin A pada ketela rambat diduga dapat meningkatkan ekspresi FoxP3. Konsentrasi FoxP3 yang tinggi menghambat ekspresi IL-23R pada kultur. Padahal IL-23R berperan penting untuk menstabilkan diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel Th17.

Gambar 5.4 menunjukkan seluruh kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak ketela rambat memiliki rasio yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol yang tidak dipapar ekstrak ketela rambat ungu ($p < 0,05$). Dosis 50 μ g/ml memiliki rasio yang paling tinggi disusul dosis 25 μ g/ml lalu dosis 100 μ g/ml. Pada studi ini diketahui pemberian ekstrak ketela rambat dapat meningkatkan rasio namun terdapat perbedaan antar kelompok yang nilainya tidak bermakna ketika diuji *post hoc LSD* (Tabel 5). Hasil tidak signifikan terjadi pada perbandingan kelompok 25 μ g/ml terhadap kelompok 50 μ g/ml dan kelompok 100 μ g/ml. Dosis ternilai bermakna kembali pada perbandingan dosis 50 μ g/ml terhadap 100 μ g/ml. Dari hasil ini penulis menyimpulkan bahwa dosis ekstrak ketela rambat yang optimal dalam meningkatkan rasio sel *Treg*/sel Th17 adalah 50 μ g/ml. Ji *et al* (2012) membuktikan korelasi

rasio sel Treg/sel Th17 pada kasus *primary immune thrombocytopenia* (ITP) dan menyatakan terdapat peranan rasio sel Treg/sel Th17 dalam prognosis penyakit autoimun. Pemberian ekstrak ketela rambat terbukti optimal meningkatkan rasio pada dosis 50µg/ml. Peningkatan rasio ini diharapkan dapat menurunkan aktivitas LES secara *in vitro*.

Hasil ini sesuai dengan penelitian tentang peran ketela rambat dalam sistem imunitas sebagai imunomodulator. Ketela rambat memiliki aktivitas anti inflamasi (Fan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010). Fungsi imunomodulator pada ketela rambat diduga diperantarai oleh beta karoten yang diketahui bersifat imunomodulator (Wang dan Russel, 1999). Beta karoten akan dimetabolisme oleh *alcohol dehydrogenase* dan *aldehid dehydrogenase* (Duester, 2000) menjadi *retinoic acid* (RA) sehingga meningkatkan ekspresi FoxP3 dan menurunkan ekspresi IL-23R. Selain beta karoten, ketela rambat juga mengandung antosianin yang berfungsi sebagai anti radikal bebas (Piccolella *et al.*, 2008; Peteros dan Uy, 2010), anti inflamasi (Mulabagal *et al.*, 2009), dan anti tumor (Shih *et al.*, 2005).

6.2 Keterbatasan dalam Penelitian

Penulis menduga banyak faktor yang terlibat dalam proses penelitian sehingga menghasilkan data telah ditampilkan di atas. Diantaranya adalah vitamin A yang terkandung di dalam ketela rambat ungu dan kadar TNF. Namun dalam penelitian ini tidak dilakukan mengukur kandungan vitamin A di dalam ekstrak yang digunakan dan kandungan lainnya sehingga tidak dapat dipastikan hasil yang diperoleh merupakan efek dari vitamin A dari ketela rambat. Pada studi ini tidak dilakukan pemeriksaan kadar TNF yang dihasilkan oleh sel Th17 pada kultur sel T CD4 naif. Analisis reseptor TNF tipe 2 (TNFR2) juga tidak dilakukan padahal itu dapat mendukung dugaan variasi karakter pasien LES di Indonesia dibanding pasien LES di luar negeri. Penulis juga tidak membuat kontrol positif dengan pemaparan kultur sel T CD4 naif terhadap bentuk metabolit aktif vitamin A untuk membandingkan pemberian ekstrak ketela rambat ungu dengan vitamin A murni.

Hasil penelitian ini juga dipengaruhi oleh prosedur teknis pelaksanaan. Pemberian ekstrak ketela rambat ungu dengan dosis 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml mikropipet menyulitkan penulis untuk memastikan ekstrak telah berhasil dimasukkan ke dalam kultur.

