

## ARTIKEL PENELITIAN

### INFEKSI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAIN H37RV TERHADAP EKSPRESI MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP)-2 PADA OTAK

#### *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAIN H37RV INFECTION TOWARDS MATRIX METALLOPROTEINASE (MMP)-2 IN BRAIN*

*Kevin Hartono\**, *Prasetyo Adi\*\**, *Dwi Yuni Nur Hidayati\*\*\**

\*Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*\*Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2017.003.02.2> • MNJ.2017;3(2):55-60

• Received 7 April 2017 • Reviewed 21 Juni 2017 • Accepted 3 July 2017

#### ABSTRAK

**Latar belakang.** Infeksi tuberkulosis di otak dapat menyebabkan mikroglia mengeluarkan faktor-faktor inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin 1 beta* (IL-1 $\beta$ ) muncul sebagai respon imun tubuh. Faktor-faktor inflamasi tadi nantinya dapat memicu mikroglia untuk mengeluarkan *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) agar dapat meregenerasi sel yang nekrosis atau apoptosis karena inflamasi. MMP-2 terbukti memiliki peranan penting dalam infeksi tuberkulosis di otak.

**Tujuan.** Mengetahui bagaimana ekspresi MMP-2 pada jaringan otak mencit yang tidak terinfeksi tuberkulosis, terinfeksi tuberkulosis dengan masa inkubasi 8 minggu, dan 16 minggu.

**Metode.** Penelitian ini bersifat semikuantitatif dengan membandingkan jumlah ekspresi MMP-2 pada 3 kelompok sampel. Pengamatan ekspresi MMP-2 pada jaringan sel otak mencit dilakukan dengan metode pewarnaan imunohistokimia yang dilihat pada mikroskop dengan perbesaran 400x. Sel otak yang mengekspresikan MMP-2 akan berwarna coklat pada inti, sitoplasma, dan dinding sel.

**Hasil.** Ekspresi MMP-2 semakin menurun apabila masa inkubasi infeksi tuberkulosis semakin lama.

**Simpulan.** Ekspresi MMP-2 tidak menurun setelah masa inkubasi bakteri tuberkulosis lebih dari 8 minggu.

**Kata kunci:** Imunohistokimia, MMP-2, *Mycobacterium tuberculosis*

#### ABSTRACT

**Background.** Tuberculous infection in brain can cause microglia to secrete inflammatory factors like *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) and *Interleukin 1 beta* (IL-1 $\beta$ ) which will be shown as body immune respons. Those inflammatory factors eventually can trigger microglia to secrete *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) which will regenerate necrotic or apoptosis cells because of inflammation process. MMP-2 has been proven to have important role in brain tuberculous infection.

**Objective.** To ascertain MMP-2 expression in *mus musculus* brain tissue with no infection, infection for 8 weeks, and infection for 16 weeks.

**Methods.** This research used semiquantitative method to compare MMP-2 expression in 3 samples group. Observation of MMP-2 expression in *mus musculus* brain tissue were made by using immunohistochemistry colouration method which then would be observed in microscope with 400x magnification. Brain cell which express MMP-2 will become brown in cell nucleus, cytoplasm, and wall.

**Results.** The result which had be obtained was overtime reduction of MMP-2 expression.

**Conclusion.** MMP-2 expression didn't decrease after 8 weeks time of infection.

**Keywords:** Immunohistochemistry, MMP-2, *Mycobacterium tuberculosis*

---

Korespondensi: kevin.007.hartono@gmail.com

## PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang memiliki peranan penting di dunia ini. Insiden TB bervariasi dari 9 kasus per 100.000 penduduk dalam satu tahun di Amerika Serikat dan 110-165 kasus per 100.000 penduduk dalam satu tahun di negara-negara berkembang seperti Asia dan Afrika. Indonesia pada tahun 2012 juga telah ditetapkan oleh WHO sebagai negara urutan nomor 4 dengan penderita TB terbanyak setelah India, Cina, dan Afrika Selatan.<sup>1</sup>

Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini bersifat aerob sehingga membutuhkan oksigen agar dapat hidup. Penyakit Tuberkulosis dapat terjadi apabila seseorang menghirup udara yang terkontaminasi droplet dengan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* di dalamnya. Bakteri TB tadi kemudian membentuk fokus primer/*Ghon focus* di jaringan paru-paru. Fokus primer dapat menimbulkan peradangan di saluran getah bening yang dapat menjalar ke hilus (limfadenitis regional). Peradangan tersebut diikuti oleh pembesaran kelenjar getah bening di hilus (limfadenitis regional). Fokus primer bersama-sama dengan limfadenitis regional dikenal sebagai kompleks primer. Kompleks primer nantinya bisa sembuh tanpa meninggalkan bekas, sembuh dengan meninggalkan bekas (Fokus Rich), atau menyebar ke jaringan atau organ lain.<sup>2</sup>

*Mycobacterium tuberculosis* nantinya juga dapat menyebar ke organ lain kemungkinan melalui monosit yang terinfeksi. *Mycobacterium tuberculosis* dapat tersebar ke seluruh organ terutama otak yang mengandung banyak oksigen setelah paru-paru.<sup>2</sup> *Mycobacterium tuberculosis* bersama makrofag dapat menuju ke sistem saraf pusat (SSP) melalui jalur limfohematogen. Mikroglia, yakni jenis makrofag yang ada di SSP, bertugas untuk memfagositosis atau membunuh bakteri tuberkulosis di otak. Apabila bakteri tuberkulosis masih dapat hidup dalam mikroglia, mikroglia akan bertindak sebagai *antigen presenting cell* (APC) yang akan mempresentasikan antigen bakteri tuberkulosis yang diingesti dan mengeluarkan *interleukin-12* (IL-12) ke sel T CD4<sup>+</sup> naif. Sel T CD4<sup>+</sup> naif nantinya akan teraktivasi dan mengeluarkan *interferon gamma* (IFN  $\gamma$ ) yang berfungsi untuk mengaktivasi mikroglia agar dapat

membunuh bakteri tuberkulosis yang ada di dalamnya.<sup>1</sup>

Makrofag atau mikroglia yang teraktivasi tadi nantinya juga akan mengeluarkan Matrix Metalloproteinase (MMP) karena MMP disekresi saat terjadi infeksi sistem saraf pusat, kelainan saraf degeneratif/ inflamasi, trauma, hipoksia/ kekurangan oksigen, atau keracunan. Infeksi dan inflamasi pada sistem saraf pusat mengeluarkan respon proinflammatory seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *interleukin 1 beta* (IL-1 $\beta$ ) yang dapat mempengaruhi pengeluaran MMP. MMP yang dihasilkan biasanya MMP-2, -3, dan -9<sup>3</sup>. Tujuan dari penelitian ini secara umum adalah untuk membuktikan bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang telah menyebar ke otak dapat membuat perubahan jumlah ekspresi MMP-2 di otak. Harapan dari penelitian ini adalah untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan tentang kegunaan MMP-2 dalam proses infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang telah menyebar ke otak.

## METODE PENELITIAN

### Desain Penelitian

Penelitian menggunakan mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c* yang di dipaparkan pada *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37RV secara inhalasi menggunakan modifikasi *nose only inhalation system* atau *Middlebrook Inhalation Exposure System* (Glas-Col). Pewarnaan kemudian akan dilakukan pada jaringan otak mencit. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan yaitu:

1. Tanpa infeksi (kelompok kontrol)
2. Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 8 minggu
3. Infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* 16 minggu

### Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c* yang terpilih secara random sesuai kriteria inklusi dan eksklusi dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur. Kriteria inklusi penelitian ini adalah mencit jantan, usia 8 -12

minggu, dan berat badan 16 - 20 gram. Kriteria eksklusi penelitian ini adalah mencit dinyatakan oleh dokter hewan konsultan terbukti berpenyakit atau cedera fisik dalam kurun waktu evaluasi klinis dalam kondisi lingkungan yang sesuai (selama 7 x 24 jam) dan mencit berperilaku agresif / sering menyerang anggota kelompok mencit yang lain dalam kurun waktu evaluasi klinis.

#### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian direncanakan selama 4 (empat) bulan, tercatat mulai bulan Juni hingga September 2014. Lokasi penelitian adalah Laboratorium Biokimia-Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### Pemeriksaan Imunohistokimia

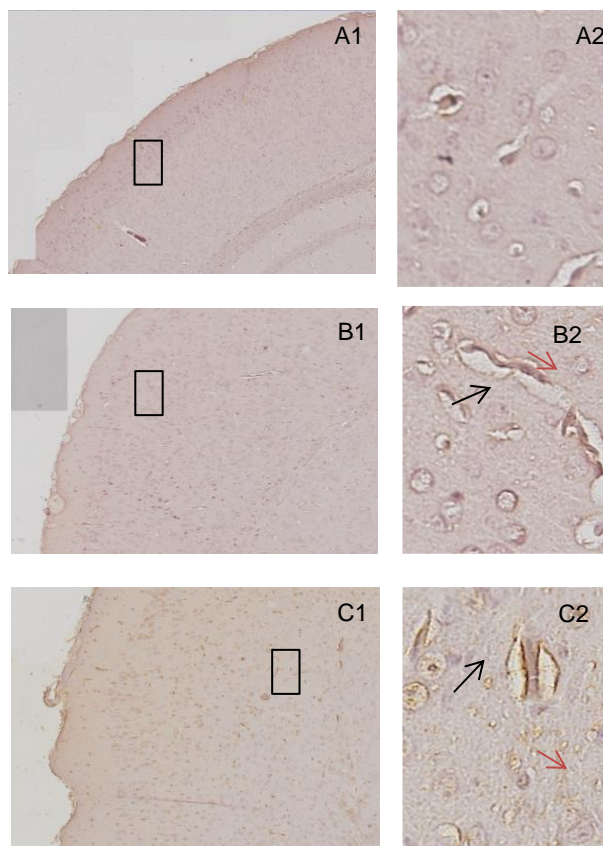
Pemeriksaan ekspresi MMP-2 pada sel otak mencit diamati dengan teknik imunohistokimia menggunakan *Novolink Polymer detection system* (Leica Microsystem). Antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal terhadap MMP-2. Visualisasi dilakukan dengan DAB dan

*counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen*. Perhitungan ekspresi MMP-2 pada sel otak dilakukan per 20 lapang pandang pada mikroskop dengan perbesaran 400x berdasarkan teknik yang dikembangkan oleh Soini<sup>9</sup> dan Pizem<sup>8</sup>.

#### HASIL PENELITIAN

Hasil evaluasi preparat jaringan otak mencit yang didasarkan dari penghitungan jumlah sel otak dengan ekspresi MMP-2 kemudian ditabulasikan sebagai data selanjutnya untuk dianalisis. Ekspresi sel otak yang mengandung MMP-2 diamati dari munculnya warna coklat pada inti, sitoplasma, dan dinding sel. Sel di otak yang mengekspresikan MMP-2 adalah sel endotel, sel glia, dan neuron.

Pada penelitian ini, peneliti menghitung sel yang diperkirakan sebagai mikroglia karena fungsinya dalam melawan infeksi sehingga peneliti mengamati tempat mikroglia banyak ditemukan yaitu, bagian korteks serebral.



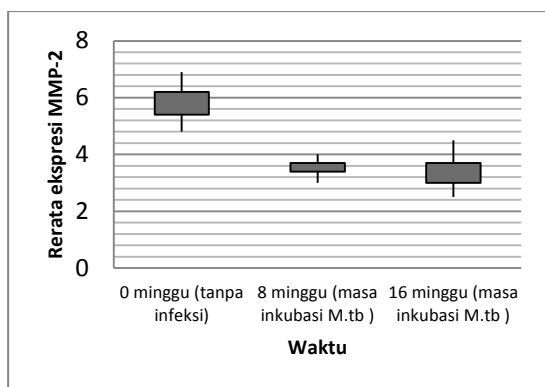
**Gambar 1.** Ekspresi MMP-2 pada sel otak mencit

Keterangan:

- A1** : Kelompok sel otak normal tanpa infeksi dengan perbesaran mikroskop 40x.
- A2** : Kelompok sel otak normal tanpa infeksi dengan perbesaran mikroskop 400x.
- B1** : Kelompok sel otak yang telah terinfeksi tuberkulosis selama 8 minggu dengan perbesaran mikroskop 40x.
- B2** : Kelompok sel otak yang telah terinfeksi tuberkulosis selama 8 minggu dengan perbesaran mikroskop 400x.
- C1** : Kelompok sel otak yang telah terinfeksi tuberkulosis selama 16 minggu dengan perbesaran mikroskop 40x.
- C2** : Kelompok sel otak yang telah terinfeksi tuberkulosis selama 16 minggu dengan perbesaran mikroskop 400x.
- : Sel otak yang mengekspresikan MMP-2 yang ditandai dengan warna coklat pada inti, sitoplasma, dan dinding selnya.
- : Sel otak yang tidak mengekspresikan MMP-2 yang ditandai dengan warna ungu pada inti, sitoplasma, dan dinding selnya.

**Tabel 1.** Rerata jumlah ekspresi MMP-2 dari 20 lapang pandang

No. Slide	Rerata ekspresi MMP-2	No. Slide	Rerata ekspresi MMP-2	No. Slide	Rerata ekspresi MMP-2
1.1	4,85	2.1	3,65	3.1	3,75
1.2	7,9	2.2	3,2	3.2	2,45
1.3	5,85	2.3	3,3	3.3	4,1
1.4	6,8	2.4	3,5	3.4	3,1
1.5	5,6	2.5	3,7	3.5	4,55
1.6	5,3	2.6	3,9	3.6	3,05
1.7	6,2	2.7	3,5	3.7	3,5
1.8	5,35	2.8	3,45	3.8	3,65
1.9	5,65	2.9	4,05	3.9	3,15



**Gambar 2.** Grafik rerata jumlah ekspresi MMP-2 pada sel otak

**Analisis Data**

Semua data penelitian dianalisis menggunakan perhitungan statistik dengan program komputer SPSS-17.0 untuk Windows 7.

*Uji Normalitas, Homogenitas, dan One-Way ANOVA*

Analisis yang dilakukan setelah mendapatkan data yang dibutuhkan adalah uji normalitas. Uji normalitas data dimaksudkan untuk memperlihatkan bahwa data sampel berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Data penelitian ini terdistribusi dengan nilai  $p = 1.040$ . Oleh karena itu, data penelitian ini dianggap normal karena  $p > 0.05$ .

Data penelitian yang diketahui memiliki distribusi normal kemudian akan dilakukan uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah sebaran data dari masing-masing kelompok mempunyai varians yang homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas data pada penelitian ini memiliki nilai  $p = 0.065$  yang memiliki arti bahwa data penelitian ini bersifat homogen karena  $p > 0.05$ .

Data yang telah dipastikan normal dan homogen akan dianalisis dengan uji one-way ANOVA. Uji one-way ANOVA digunakan untuk menguji sebuah rancangan eksperimen dengan rancangan lebih dari 2. Uji ini termasuk dalam uji parametrik sehingga asumsi penggunaan uji parametrik harus dipenuhi yaitu data berdistribusi normal, varian homogen, dan data diambil dari sampel yang acak. Uji one-way ANOVA umumnya digunakan untuk menguji efektifitas suatu rancangan eksperimen yang akan digunakan. Hasil uji one-way ANOVA data penelitian ini memiliki nilai  $p = 0.000$  sehingga

dapat disimpulkan bahwa data penelitian ini memiliki perbedaan yang signifikan antara masa inkubasi bakteri tuberkulosis dengan ekspresi MMP-2 di sel otak karena  $p < 0.05$ .

#### *Uji Post Hoc dan Korelasi*

Uji analisis kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.

Hasil uji *post hoc test* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang terinfeksi tuberkulosis dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu. Namun, kelompok yang terinfeksi tuberkulosis dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

Uji statistik korelasi linier kemudian dilakukan setelah diketahui bahwa data penelitian memiliki sifat yang signifikan. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui tingkat korelasi antar dua variabel dengan skala data interval atau rasio. Uji statistik korelasi linier *Pearson* digunakan untuk mengetahui apakah hubungan antara ekspresi MMP-2 pada sel neuron otak dengan jumlah masa inkubasi infeksi tuberkulosis. Berdasarkan hasil uji korelasi penelitian pada lampiran, koefisien uji korelasi *Pearson* pada penelitian ini adalah 0,775 sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua variabel memiliki korelasi yang kuat. Nilai koefisien negatif pada uji korelasi menunjukkan bahwa kedua variabel memiliki hubungan yang berlawanan sehingga ekspresi MMP-2 semakin menurun seiring masa inkubasi yang semakin lama.

#### **DISKUSI**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi MMP-2 menurun sekali dan menetap setelah masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak lebih dari 8 minggu. Supresi MMP-2 memiliki hubungan sebab akibat dengan proses apoptosis sel. Jumlah MMP-2 yang menurun dapat menyebabkan apoptosis dengan berbagai cara, seperti mengganggu aktivasi jalur *Nuclear Factor-kappa Beta* (NF- $\kappa$ B) oleh *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ )<sup>6</sup>. Proses apoptosis sel karena reaksi iskemia, infeksi kronis, dan inflamasi juga dapat menurunkan jumlah ekspresi MMP-2. Proses apoptosis pada penelitian ini juga dapat terjadi karena respon inflamasi infeksi tuberkulosis

otak yang salah satunya disebabkan oleh TNF- $\alpha$  sebagai faktor inflamasi<sup>4</sup>.

TNF- $\alpha$  dapat menginduksi dua respon biologis yaitu, aktivasi jalur NF- $\kappa$ B dan MAPK/*Mitogen-Activated Protein Kinases*. Aktivasi NF- $\kappa$ B dapat menghasilkan ekspresi sitokin, molekul adhesi endothelial, faktor pertumbuhan, dan enzim efektor untuk imunitas<sup>5</sup>. NF- $\kappa$ B juga menghasilkan protein anti apoptosis, termasuk *cellular inhibitor of apoptosis proteins/cIAP 1*, *cIAP2*, dan *c-FLIP/cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein*. C-FLIP akan menggagalkan apoptosis sehingga sel dapat tetap hidup karena NF- $\kappa$ B teraktivasi. Apabila aktivasi NF- $\kappa$ B gagal, maka kaspase 8 akan aktif dan terjadi proses apoptosis untuk membunuh sel<sup>7</sup>.

TNF- $\alpha$  juga mengaktifkan jalur MAPK/*Mitogen-Activated Protein Kinases* setelah jalur NF- $\kappa$ B. Hasil dari jalur MAPK adalah ERK/Extracellular Signal-Regulated, p38 MAPK, dan JNK/cJun N-terminal kinase. JNK dan p38 MAPK berpengaruh pada proses apoptosis sel sedangkan ERK bersifat anti apoptosis<sup>10</sup>.

Ekspresi MMP-2 diduga menurun satu kali lalu menetap saat masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak semakin lama karena proses apoptosis sel. Proses apoptosis dapat disebabkan oleh produksi TNF- $\alpha$  yang berlebihan sehingga mengaktifkan jalur kaspase 8 dan berefek pada aktivasi jalur MAPK sehingga menghasilkan p38MAPK. Ekspresi kaspase 8 dan p38 MAPK muncul karena dipicu ekspresi TNF- $\alpha$  yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B. Apoptosis juga dapat terjadi karena replikasi *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak terkontrol sehingga mengurangi suplai oksigen otak<sup>4</sup>.

Jumlah ekspresi MMP-2 yang menurun satu kali lalu menetap saat masa inkubasi infeksi tuberkulosis otak lebih dari 8 minggu diduga disebabkan oleh ketidakmampuan TNF- $\alpha$  yang merupakan faktor penting untuk menginduksi supresi MMP-2 dalam mensupresi seluruh ekspresi MMP-2<sup>4</sup>.

#### **SIMPULAN**

Peneliti mengambil kesimpulan bahwa terjadi penurunan ekspresi *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) pada jaringan otak mencit sejak diinfeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* hingga 8 dan 16 minggu setelah waktu diinfeksi. Namun, jumlah

ekspresi MMP-2 pada jaringan otak mencit hanya akan turun sekali lalu menetap. Peneliti juga menduga adanya hubungan sebab akibat antara proses apoptosis sel otak dengan penurunan ekspresi *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2) pada jaringan otak yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas, K. Abul and Andrew H.H. Lichtman Basic Immunology Updated Edition: Functions and Disorders of the Immune System. Philadelphia: Saunders; 2010.
2. CDC. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know Sixth Edition. U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2013.
3. Gill S.E., Kassim S.Y., Birkland T.P., Parks W.C. Mouse Models of MMP and TIMP Function. In: I.M. Clark, D.A. Young, A.D. Rowan. Matrix Metalloproteinase Protocols. Methods in Molecular Biology Springer Science & Business Media; 2010. P:30-52.
4. Green, J.A, et al. Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes down-regulate microglial MMP-2 secretion in CNS tuberculosis via TNF- $\alpha$ , NF-kB, p38 and caspase 8 dependent pathways. Journal Of Neuroinflammation; 2011. 8:46.
5. Hayden, Mathhew S and Ghosh, Sankar. Signalling to NF-kB. Genes & Development. 18: 2004. 2195-2224.
6. Kesanakurti D, Chetty C, Bhoopathi P, Lakka SS, Gorantla B, et al. Suppression of MMP-2 Attenuates TNF-a Induced NF-kB Activation and Leads to JNK Mediated Cell Death in Glioma. PLoS ONE; 2011.6(5): e19341.
7. Micheau, O., and Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell 11; 2003. 181-190.
8. Pizem, J., Cor,A., Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section, Radiol. Oncol; 2003. 37(4): 225-232.
9. Soini, Y., Paakko, P. and Lehto, V-P. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer, American Journal of Pathology; 1997. 153(4): 1041-1048.
10. Wada, Teiji and Joef M. Penninger. Mitogen-activated Protein Kinases in Apoptosis Regulation. Oncogene 23, 2004. 2838 – 2849.
11. WHO. Global Tuberculosis Control 2012: Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Report; 2012.