

RESEARCH ARTICLE

PENGARUH INFEKSI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAIN H37Rv TERHADAP APOPTOSIS SEL NEURON OTAK MENCIT (*MUS MUSCULUS*)

THE INFECTION EFFECT OF STRAIN H37Rv MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ON APOPTOSIS OF MICE'S NEURON CELL BRAIN (MUS MUSCULUS)

Rima Nor Kaspia*, Dwi Yuni Nur Hidayati**, Aris Widayati***

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

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

***Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2016.002.02.2> • MNJ.2016;2(2):52-59

• Received 16 November 2015 • Reviewed 16 December 2015 • Accepted 16 January 2016

ABSTRAK

Latar belakang. Terjadinya iskemia pada sel dan kurangnya pasokan glukosa, akan memicu terjadinya influx Ca^{2+} ke dalam sel dan ekspresi glutamat yang meningkat. Influx Ca^{2+} berakibat mitokondria menjadi "overloaded". Metabolisme glukosa kemudian beralih ke proses yang anaerobik sehingga membuat ATP semakin terkuras dan terjadilah asidosis. Keadaan ini membuat sel neuron terpicu untuk terjadi apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*). Apoptosis sel neuron diduga memiliki hubungan yang kuat pada infeksi tuberkulosis di otak.

Tujuan. Mengetahui jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis pada jaringan otak mencit.

Metode. Bersifat semikuantitatif dengan membandingkan jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis pada 3 kelompok sampel. Pengamatan apoptosis sel neuron pada jaringan otak mencit dilakukan dengan metode pewarnaan tehnik TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) yang dilihat pada mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Hasil. Sel neuron mengalami apoptosis pada jaringan otak yang terinfeksi *M.tb* selama 8 dan 16 minggu yang ditandai dengan warna coklat pada inti selnya. Apoptosis sel neuron terbanyak ditemukan pada jaringan otak yang terinfeksi *M.tb* selama 16 minggu.

Simpulan. Semakin lama infeksi *M.tb* dapat berpengaruh pada peningkatan jumlah apoptosis sel neuron.

Kata kunci: TUNEL, Apoptosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Sel Neuron

ABSTRACT

Background. Ischemia on the cells and the lack of supply of glucose, will trigger a Ca^{2+} influx into the cell and increased expression of glutamate. Result in mitochondrial Ca^{2+} Influx be "overloaded". Glucose metabolism then switched to the anaerobic process that makes ATP increasingly depleted and there acidosis. This situation makes the neuron cell apoptosis triggered to occur. Apoptosis is programmed cell death. Neuron cell apoptosis is thought to have a strong connection to the tuberculosis infection in the brain.

Objective. To determine the number of cells undergoing apoptosis neurons in brain tissue of mice.

Methods. This study is a semiquantitative by comparing the number of cells undergoing apoptosis neurons in the three groups of samples. Observations apoptosis of neuronal cells in the brain tissue of mice was conducted using TUNEL staining technique (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) are seen in a microscope with a magnification of 1000x.

Results. The results showed that neuronal cells undergo apoptosis in brain tissue infected with *M.tb* for 8 and 16 weeks were marked with brown color in the cell nucleus. Neuron cell apoptosis were observed at *M.tb*-infected brain tissue for 16 weeks.

Conclusion. The longer the *M.tb* infection can affect the increase in the number of neuronal cell apoptosis.

Keywords: TUNEL, Apoptosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Neuron Cell

Korespondensi: rimanurkaspia@yahoo.com

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan utama di dunia, dari laporan WHO tahun 2012 diperkirakan sekitar 8,7 juta penduduk dunia mengidap infeksi tuberkulosis. Kasus TB melibatkan sistem saraf pusat (SSP) tercatat hanya 1% dari kasus TB keseluruhan. Walaupun angka kejadian TB melibatkan SSP jarang terjadi, namun memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Di amerika serikat pada tahun 2005, tercatat 6,3 % pasien TB di luar paru melibatkan SSP (meningitis tuberkulosis).¹

Tuberkulosis SSP disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) yang menyebar dan belum dapat dihancurkan dengan sempurna oleh makrofag alveolar.² Diyakini *M.tb* menyebar dalam bentuk penyebaran hematogenik tersamar (*occult hematogenic spread*). Berawal dari perkembangan *M.tb* yang menembus sawar darah otak yang tersusun atas sel *endothelial mikrovascular monolayer*.³

Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv memiliki kemampuan invasi serta merubah struktur dari kompleks sel endotel di otak manusia. Kemampuan invasi pada kompleks sel endotel otak manusia ditengarai karena adanya tonjolan-tonjolan mikrovili pada pintu masuk, yang mendorong keterlibatan sel aktin pada sitoskeleton inang untuk melakukan penyusunan ulang. Kondensasi F-aktin juga terjadi selama serangan *mycobacterium* dan invasi *M.tb* pada kompleks sel endothelial di otak yang dihambat oleh *cytochalasin D*. Selain itu, gen *Rv0986* dan *Rv0987* yang dimiliki oleh *M.tb* memiliki potensi untuk meningkatkan virulensi dan adhesi pada sel inang.²

Masuknya *M.tb* menembus *Blood Brain Barrier* memicu terbentuknya fokus kecil lesi kaseosa (*Rich* fokus) pada korteks dan meningen otak. Seiring berjalannya waktu, lesi *Rich* fokus akan membesar dan ruptur, sehingga menyebabkan *M.tb* menyebar ke ruang subarachnoid dan menyebabkan meningitis. Inflamasi yang terjadi pada cairan serebrospinal (CSF) menyebabkan obstruksi bahkan infark. Selain itu, dinding pembuluh darah kortikomeningeal juga mengalami peradangan (vasculitis) yang menyebabkan menurunnya aliran darah ke jaringan otak (iskemia) dan menyebabkan sel-sel neuron kekurangan oksigen dan faktor pertumbuhan.³

Terjadinya iskemia dan berkurangnya pasokan glukosa, memicu terjadinya influx Ca^{2+} ke dalam sel neuron dan ekspresi glutamat yang meningkat. Metabolisme glukosa pun beralih ke proses yang anaerobik sehingga membuat ATP semakin terkuras dan terjadilah asidosis. Influx Ca^{2+} mengakibatkan mitokondria menjadi "overloaded", sehingga terjadi kegagalan metabolik mitokondria. Hal ini mengakibatkan sel neuron terpicu untuk melakukan program kematian sel via apoptosis.⁴

Apoptosis merupakan program kematian sel (*programmed cell death*) yang dapat terjadi secara intraseluler dan ekstraseluler dengan melibatkan *caspase* dalam prosesnya atau melalui jalur yang tidak melibatkan *caspase*, yang dinamakan *Caspase - Independent Pathways*.^{4,5} Sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA kromosomal.⁶ Sekilas proses apoptosis memiliki kemiripan dengan nekrosis, namun pada apoptosis tidak terjadi ruptur membran plasma.⁷ Proses apoptosis tidak menginduksi terjadinya reaksi inflamasi, namun prosesnya diinduksi oleh reaksi inflamasi sebelumnya.⁸

Permasalahan dalam penelitian ini adalah apakah infeksi *M. tuberculosis strain H37Rv di otak* dapat mengakibatkan apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*), apakah terjadi peningkatan jumlah apoptosis sel neuron pada otak mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv selama selama 8 dan 16 minggu dan bagaimana hubungan antara lama infeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv di otak dengan jumlah apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*). Berdasarkan permasalahan tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui bahwa infeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv di otak dapat mengakibatkan apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*) dan mengetahui adanya peningkatan jumlah apoptosis sel neuron pada otak mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv selama 8 dan 16 minggu serta mengetahui hubungan antara lama infeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv di otak dengan jumlah apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*).

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai dasar informasi bagi pengembangan dan penelitian berikutnya mengenai apoptosis sel neuron pada infeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv dan sebagai

dasar informasi untuk pencegahan apoptosis sel neuron pada infeksi *M.tuberculosis* strain H37Rv di sistem saraf pusat.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental-post test only control group design*).

Sampel Penelitian dan Kriteria Inklusi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c*. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan memilih secara random dari populasi mencit *Mus musculus Balb/c* yang homogen di institusi penyedia hewan coba yang memiliki standar dan reputasi baik dan sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit yang sesuai kriteria inklusi adalah mencit jantan yang berusia 8-12 minggu dengan berat badan 16-20 gram.

Besar Sampel. Penelitian ini menggunakan tiga kelompok perlakuan yaitu mencit yang mengalami perlakuan infeksi *M.tuberculosis* selama 8 dan 16 minggu serta kelompok tanpa infeksi sebagai kontrol. Berdasarkan rumus Federrer diperoleh perhitungan besar sampel minimal 9 sampel untuk masing-masing kelompok sehingga besar sampel total adalah $3 \times 9 = 27$ mencit.

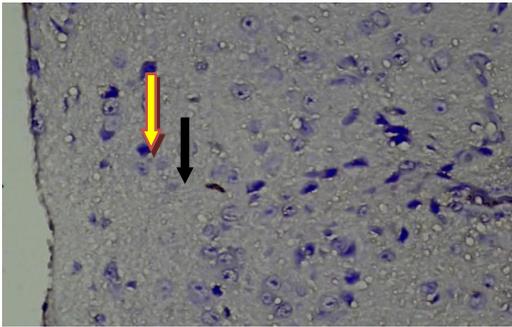
Variabel Penelitian. Variabel bebas pada penelitian ini adalah infeksi *M.tuberculosis* dengan masa inkubasi 8 dan 16 minggu. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah apoptosis sel neuron yang dikuantifikasi pada jaringan otak mencit dengan infeksi *M.tuberculosis* selama 8 dan 16 minggu,

Pembuatan Teknik TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*). Pengamatan sel neuron yang apoptosis menggunakan tehnik TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) untuk melihat fragmentasi DNA. Tahap pertama adalah deparafinisasi jaringan, yaitu preparat slide dicuci menggunakan *Xylene* sebanyak tiga kali, masing-masing didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, rendam dua kali dalam etanol absolut masing-masing 5 menit. Kemudian pindahkan satu kali dalam etanol 95% dan pindahkan lagi dalam etanol 70% masing-masing 3 menit. Selanjutnya cuci dengan PBS selama 5 menit. Tahap selanjutnya adalah *Antigen retrieval*, yaitu dengan memberikan proteinase K selama 15 menit. Setelah itu, dicuci dua kali dengan H₂O

dalam *coplin jar* masing-masing 2 menit. Kemudian hilangkan *endogenous peroxidase* dengan meneteskan 3% H₂O₂ PBS dan biarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Kemudian cuci dua kali dengan PBS masing-masing 2 menit dalam *coplin jar*. Tetesi jaringan dengan 75 µl *equibration buffer* dan diinkubasi 10 menit pada suhu kamar. Lalu teteskan 55µl/5cm² *working strength TdT enzyme* pada jaringan dan diinkubasi pada 37°C dalam wadah yang lembab selama 1 jam. Kemudian letakkan sediaan dalam *coplin jar* yang berisi *working strength stop/wash buffer*, inkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar. Cuci sediaan empat kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing dua menit pada suhu kamar. Teteskan *anti-digoxigenin conjugate* pada permukaan jaringan sebanyak 65µl/5cm², inkubasikan selama 30 menit pada suhu kamar dalam tempat yang lembab. Cuci sediaan 4 kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing 2 menit pada suhu kamar. Berikan warna dengan meneteskan peroksidase substrat 75µl/5cm² pada permukaan jaringan dan biarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Cuci 3 kali sediaan dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing 1 menit, lalu diinkubasi dengan dH₂O dalam *coplin jar* 5 menit pada suhu kamar. Counterstain dengan *methyl green* selama 30 detik pada suhu kamar. Cuci 3 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing 1 menit. Bersihkan dengan *xylene* lalu cairan di sekitar potongan jaringan dikeringkan dengan kertas pengering. Kemudian sediaan slide dapat diamati dengan mikroskop perbesaran 1000 kali.

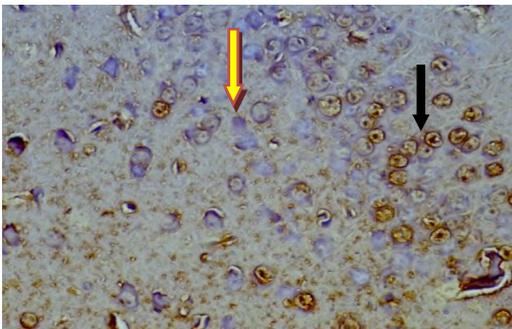
HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 3 kelompok pemeriksaan yang diambil dari otak mencit (*Mus musculus*) jenis *Balb/c*. Hasil penelitian diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus CX-21 dengan perbesaran 1000x per dua puluh lapang pandang, kemudian dicari sel neuron yang mengalami apoptosis yakni ditandai dengan adanya warna coklat pada bagian inti sel neuron.



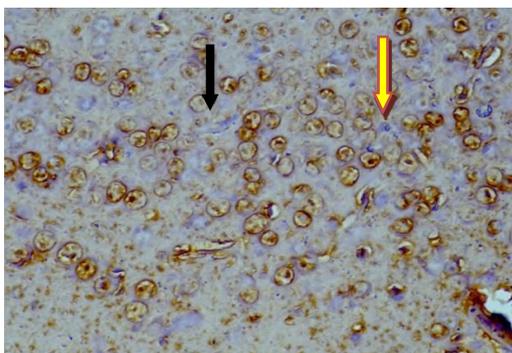
Gambar 1. Apoptosis sel neuron pada otak mencit yang tidak terinfeksi (kontrol) ditandai dengan panah warna hitam, sedangkan sel neuron yang normal ditandai dengan panah warna kuning.

Pada kelompok kontrol (tanpa infeksi) pada gambar 1 menunjukkan gambaran sel neuron otak mencit yang sebagian besar normal. Namun, hanya satu sel neuron yang mengalami apoptosis.



Gambar 2. Apoptosis sel neuron otak mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu ditandai dengan panah warna hitam, sedangkan sel neuron yang normal ditandai dengan panah warna kuning.

Pada gambar 2 menunjukkan gambaran sel neuron otak mencit yang telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 8 minggu. Dari gambar tersebut memperlihatkan sebagian dari sel neuron telah mengalami apoptosis dan sebagian sel neuron lainnya masih normal.



Kode kelompok kontrol	Jumlah apoptosis sel neuron	Kode Kelompok 8 minggu	Jumlah apoptosis sel neuron	Kode Kelompok 16 minggu	Jumlah apoptosis sel neuron
1.1	1	2.1	9	3.1	19
1.2	1	2.2	12	3.2	20
1.3	2	2.3	10	3.3	19
1.4	1	2.4	11	3.4	12
1.5	3	2.5	13	3.5	19
1.6	1	2.6	12	3.6	17
1.7	1	2.7	15	3.7	21
1.8	2	2.8	11	3.8	20
1.9	1	2.9	9	3.9	19

Gambar 3. Apoptosis sel neuron otak mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* 16 minggu ditandai dengan panah warna hitam, sedangkan sel neuron yang normal ditandai dengan panah warna kuning.

Pada gambar 3 memperlihatkan gambaran sel neuron otak mencit yang telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* selama 16 minggu. Dari gambar tersebut memperlihatkan hampir semua sel neuron telah mengalami apoptosis dan hanya sebagian kecil sel neuron yang masih normal.

Pengumpulan Data. Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi preparat jaringan otak mencit berdasarkan penghitungan sel apoptosis setelah dilakukan pewarnaan TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*) yang diberi per 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x. Pemeriksaan dan penghitungan sel neuron yang apoptosis diamati dengan melihat adanya warna coklat pada inti sel neuron otak mencit.

Data Jumlah Apoptosis Sel Neuron

Rerata Jumlah Apoptosis Sel Neuron

Kelompok	Rerata (%)	± SD	± SE
Kontrol	1.44	.726	.242
Tb 8 Minggu	11.33	1.936	.645
Tb 16 Minggu	18.44	2.651	.884

Berdasarkan tabel, nilai rata-rata dan standar deviasi kelompok pertama yakni 0 minggu (tanpa infeksi) adalah $1,44 \pm 0,726$, kelompok kedua yakni 8 minggu perlakuan adalah $11,33 \pm 1,936$, dan kelompok ketiga yakni 16 minggu perlakuan adalah $18,44 \pm 2,651$.

Analisis Data. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS for windows versi 16.0. Untuk menentukan jenis analisis yang akan digunakan dalam menguji data ini secara statistik, maka data-data ini harus melalui beberapa uji terlebih dahulu untuk bisa menentukan metode statistik yang sesuai. Data yang diperoleh dari setiap perlakuan dianalisis kehomogenan ragamnya dengan menggunakan uji *homogeneity of variance* yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang digunakan mempunyai ragam yang sama. Dilakukan juga uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Setelah didapatkan bahwa data dalam penelitian ini normal dan homogen, maka selanjutnya analisis data menggunakan uji *One-Way ANOVA*, *Post Hoc* Tukey dan uji korelasi.

Uji Normalitas Data

Test distribution is Normal

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		APOPTOSIS
N		27
Normal Parameters ^a	Mean	10.41
	Std. Deviation	7.345
Most Extreme Absolute Differences	Absolute	.177
	Positive	.177
	Negative	-.138
Kolmogorov-Smirnov Z		.918
Asymp. Sig. (2-tailed)		.368

Berdasarkan pengujian normalitas data dengan menggunakan Uji Kolmogorov – Smirnov, terlihat bahwa data apoptosis sel neuron dari hasil pengamatan menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.918 yang lebih besar dari alpha 0.05, sehingga dapat disimpulkan bahwa data variabel tersebut menyebar mengikuti sebaran normal.

Uji Homogenitas Ragam Data

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.996	2	24	.158

Oleh karena nilai signifikansi (p) dari uji levene sebesar 0.158 dan lebih besar dari alpha 0.05, maka dapat disimpulkan bahwa data yang diamati memiliki ragam yang homogen.

Uji One-way ANOVA

APOPTOSIS					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1312.074	2	656.037	174.084	.000
Within Groups	90.444	24	3.769		
Total	1402.519	26			

Berdasarkan hasil uji tersebut yaitu p = 0.000 (p <0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara penambahan waktu infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan apoptosis sel neuron.

Uji Post Hoc Tukey

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
K	MPOK				Lower Bound	Upper Bound
KONT	TB 8					
	ROL	-9.889*	.915	.000	-12.17	-7.60
	GU					
TB 16	MING	-17.000*	.915	.000	-19.29	-14.71
	GU					
TB 8	KONT	9.889*	.915	.000	7.60	12.17
	MING					
	GU					
GU	TB 16					
	MING	-7.111*	.915	.000	-9.40	-4.83
	GU					
TB 16	KONT	17.000*	.915	.000	14.71	19.29
	MING					
	GU					
GU	TB 8					
	MING	7.111*	.915	.000	4.83	9.40
	GU					

The mean difference is significant at the 0.05

Untuk mengetahui kelompok manakah yang memiliki perbedaan paling signifikan, maka dilakukan uji *post hoc*. Berdasarkan hasil uji *post hoc* Tukey tersebut, terdapat perbedaan yang signifikan antara minggu ke 0 (tanpa perlakuan/kontrol) dengan kelompok perlakuan minggu ke-16.

Uji Korelasi Pearson

		KELOMPOK APOPTOSIS	
KELOMPOK	Pearson Correlation	1	.963**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	27	27
APOPTOSIS	Pearson Correlation	.963**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Uji statistik *linear correlation Pearson* digunakan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara apoptosis sel neuron pada otak mencit tanpa perlakuan, dengan perlakuan selama 8 minggu, dan 16 minggu.

Berdasarkan hasil pada tabel, diketahui koefisien *Pearson Correlation* adalah 0,963 sehingga dapat disimpulkan bahwa kedua variabel memiliki korelasi yang kuat. Karena nilai koefisien positif mengartikan hubungan antara variabel adalah searah, yakni seiring penambahan masa infeksi maka apoptosis sel neuron juga akan semakin meningkat.

DISKUSI

Pada kelompok kontrol (tanpa infeksi) terdapat apoptosis pada salah satu sel neuron, yaitu dengan rata-rata sekitar 1.44 sel per lapang pandang. Hal ini kemungkinan dikarenakan apoptosis yang normal terjadi pada beberapa sel dalam suatu jaringan. Apoptosis ini terjadi kemungkinan untuk menjaga homeostasis pada diferensiasi dan proliferasi sel neuron. Sehingga dapat disimpulkan bahwa apoptosis juga dapat terjadi pada kondisi non-patologis melainkan karena kondisi fisiologis.

Pada kelompok 8 minggu terdapat peningkatan jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis dengan rerata sekitar 11.33 sel per per lapang pandang dan hal ini merupakan peningkatan yang signifikan dibandingkan dengan rerata dari kelompok kontrol (0minggu) yaitu 1.44 sel per lapang pandang. Hal ini disebabkan karena respon *pro-apoptotic* sel neuron terhadap infeksi untuk melakukan apoptosis. Respon inflamasi yang

terjadi mengakibatkan peradangan pada dinding pembuluh darah kortikomeningeal yang menyebabkan berkurangnya aliran darah ke jaringan otak (iskemia) sehingga sel neuron kekurangan oksigen dan faktor pertumbuhan. Sel neuron akan terpicu untuk melakukan program apoptosis karena adanya gangguan metabolisme pada mitokondria.

Pada kelompok 16 minggu terjadi peningkatan jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis dengan rerata sekitar 18.44 sel per lapang pandang. Hal ini merupakan peningkatan yang sangat signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (0 minggu) dan kelompok 8 minggu. Hal ini disebabkan karena infeksi yang terjadi lebih lama dibandingkan dengan kelompok sebelumnya. Sehingga peradangan pembuluh darah kortikomeningeal terjadi lebih luas dan kondisi iskemia yang terjadi lebih lama mengakibatkan sel-sel neuron semakin banyak yang mengekspresikan respon *pro-apoptotic* untuk melakukan program apoptosis.

Berdasarkan hasil Uji statistik *linear correlation* didapatkan adanya hubungan yang kuat antara apoptosis sel neuron dan lamanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Berdasarkan hasil penelitian ini, hubungan jumlah apoptosis sel neuron dengan lamanya infeksi *M.tuberculosis* pada *host* memiliki korelasi yang kuat artinya semakin lama infeksi yang terjadi maka semakin banyak pula apoptosis sel neuron yang terjadi. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena lamanya infeksi dan proses inflamasi yang terus terjadi menyebabkan semakin meluasnya peradangan sehingga iskemia yang terjadi lebih lama atau lebih luas dapat memicu peningkatan respon *pro-apoptotic* dan program apoptosis sel neuron.

Proses apoptosis sel neuron tersebut dimungkinkan dapat terjadi dengan melalui beberapa jalur (*pathways*), yaitu:

Jalur ekstrinsik/ekstraseluler

Peristiwa apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari adanya pelepasan molekul signal yang disebut Fas ligan oleh sel lain tetapi bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis. Ligan tersebut berikatan dengan *cell death receptor* Fas (CD 95) yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. Fas ligan yang berikatan dengan reseptor Fas (CD 95) akan mengakibatkan terbentuknya *caspase inisiator 8* setelah

membentuk trimer dengan adaptor FADD (*Fas Associated Death Domain*). Kompleks yang terbentuk antara ligan-reseptor dan FADD disebut DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). Kompleks ini mengaktivasi *pro-caspase 8* menjadi *caspase-8*. *Caspase-8* termasuk *caspase inisiator* yang akan mengaktivasi *caspase* eksekutor terutama melalui *pro-caspase 3*.⁹

Protein *caspase-8* akan memotong anggota family Bcl-2 yaitu Bid (*BCL-2 Interacting Domain*). Kemudian Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax ke dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul pro-apoptotik sitokrom-c.⁹ Sitokrom-c yang bocor dari ruang intermembran mitokondria berikatan membentuk suatu kompleks dengan APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor*) membentuk CARD (*Caspase Recruitment domain*) dan kemudian mengikat *pro-caspase 9* yang disebut sebagai "Apoptosome". Apoptosome mengaktifkan *pro-caspase 9* menjadi *caspase-9*, selanjutnya *caspase-9* mengaktifkan *pro-caspase 3* menjadi *caspase-3* yang merupakan *caspase* efektor dalam melaksanakan apoptosis.¹⁰ *Caspase 3* membelah berbagai protein sel termasuk ICAD sehingga CAD dilepaskan dari ICAD lalu mendegradasi kromosom DNA.⁵

Jalur intrinsik/intraseluler

Stress mitokondria yang menginduksi apoptosis jalur intrinsik disebabkan oleh karena sel telah kehilangan faktor pertumbuhan, sehingga menyebabkan gangguan metabolisme pada mitokondria. Terjadinya iskemia pada sel dan kurangnya pasokan glukosa akan memicu ekspresi glutamat yang meningkat dan terjadinya influx Ca^{2+} ke dalam sel. Influx Ca^{2+} mengakibatkan mitokondria menjadi "overloaded", sehingga terjadi kegagalan metabolik pada mitokondria dan sitokrom-c bocor dari intermembran mitokondria ke sitosol.⁴

Sitokrom-c yang bocor dari ruang intermembran mitokondria berikatan membentuk suatu kompleks dengan APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor*) membentuk CARD (*Caspase Recruitment Domain*) dan kemudian mengikat *pro-caspase 9* yang disebut sebagai "Apoptosome". Apoptosome mengaktifkan *pro-caspase 9* menjadi *caspase-9*, selanjutnya *caspase-9* mengaktifkan *pro-caspase 3* menjadi *caspase-3* yang merupakan *caspase* efektor dalam melaksanakan apoptosis.¹⁰

Caspase-Independent Pathways

Apoptosis melalui jalur ini tidak melibatkan *caspase* dalam prosesnya sehingga dinamakan *Caspase-Independent Pathways*. AIF dikodekan sebagai protein kDa 67 yang berisi *mitochondria localization signal* (MLS) di N-terminus.¹⁰ Kerusakan DNA dapat terjadi karena faktor AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) yang terletak di intermembran mitokondria, bocor keluar oleh karena pecahnya membran mitokondria. AIF kemudian memasuki nukleus dan menimbulkan kerusakan, membuat aktifnya berbagai *endonuclease*. *Endonuclease* yang terlibat antara lain *endonuclease G*, PARP (*Poly-ADP Ribose Polimerase*) yang memicu kematian sel via apoptosis.⁴

Saran-saran yang dapat dipergunakan dalam mengadakan perbaikan di masa yang akan datang yaitu sebagai berikut:

Penelitian lanjutan untuk mengetahui gen, senyawa dan faktor lain yang terlibat pada proses apoptosis sel neuron di otak.

Penelitian lanjutan untuk mengetahui adanya apoptosis sel pada infeksi sekunder lain oleh *M. tuberculosis*.

Penelitian lanjutan untuk mengetahui keefektifan pemberian anti *apoptotic cell* pada infeksi *M. tuberculosis*.

SIMPULAN

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv di otak dapat mengakibatkan apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*).

Terdapat peningkatan jumlah apoptosis sel neuron pada otak mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi *M. tuberculosis* selama 8 dan 16 minggu.

Semakin lama infeksi *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv di otak dapat berpengaruh terhadap peningkatan jumlah apoptosis sel neuron otak mencit (*Mus musculus*).

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organisation. *Global Tuberculosis Report*, 2012:1 - 306.
2. Rock RB, Michael O, Cristina A. Baker, et al. Central Nervous System Tuberculosis: Pathogenesis and Clinical Aspects. *Clinical Microbiology Review*, Apr 2008; 21 (1): 243.

3. Tarakad SR. 2013. *Tuberculosis Meningitis.*, Chief Edited by Niranjan NS, Medscape, <http://emedicine.medscape.com/article/1166190-overview>.
4. Husada, JJ. *The Role of Apoptosis in Brain Injury*. Simposium Neuro Intensif Quality Hotel, Solo. 9 - 10 Oktober 2004.
5. Kumar V, Cotran R, Robbins S. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins*, Ed.7, Vol.1., Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 1 - 34.
6. Sudoyo A, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata MK, Setiati S. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Ed.5, Jilid.3., Interna Publishing, Jakarta, 2009 hal. 2416-2418.
7. Gauthier, Eric. Cell Death: The Basic Mechanism. *Apo Review Journal*, 2004;(3): 82.
8. Krijnen PAJ, Nijmeijer R, Meijer CLJM, Veisser CA, Hack CE, Niessen HWM. Apoptosis in Myocardial Ischemia and Infarction. *Journal of Clinical Pathology*, 2002; 55: 801 - 811.
9. Arcila M, Sanchez M, Ortiz B, Barrera L, Garcia L, Rojas M. *Activation of Apoptosis, but not Necrosis During Mycobacterium tuberculosis Infection Correlated With Decreased Bacterial Growth: Role of TNF- α , IL-10, Caspases and Phospholipase A2*. Elsevier, Columbia, 2007: 80 - 93.
10. Otera H *et al*. Export of Mitochondrial AIF in Response to Proapoptotic Stimuli Depends on Processing at The Intermembrane Space. *EMBO Journal*, 2005; 24: 1375 - 1386.