

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

#### **6.1 Analisis Hasil**

Pemeriksaan dan perhitungan jumlah sel neuron yang telah apoptosis diamati dengan menghitung adanya warna kecoklatan pada inti sel neuron. Masing-masing slide pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang. Hasil dari penghitungan data kasarnya kemudian dianalisis untuk mengetahui hubungan antara kedua variabel.

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.

Sedangkan pada kelompok 8 dan 16 minggu terdapat peningkatan jumlah apoptosis yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol (0 minggu), yaitu sekitar 11.33 dan 18.44 sel per lapang pandang. Hal ini dapat terjadi dikarenakan adanya respon pro-apoptotic akibat adanya infeksi, sehingga terjadi peningkatan jumlah apoptosis sel neuron. Selain itu, lamanya masa infeksi juga berpengaruh dalam peningkatan dan meluasnya apoptosis pada sel neuron.

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.

### **6.1.1 Apoptosis Sel Neuron Otak *Mus musculus* yang Terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* STRAIN H37RV**

Dari hasil penelitian, pada kelompok 8 minggu terdapat peningkatan jumlah sel neuron yang mengalami apoptosis dengan rerata sekitar 11.33 sel 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. Sel neuron yang mengalami apoptosis menampilkan warna kecoklatan pada inti selnya saat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

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. Dalam pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x terlihat hampir seluruh sel neuron mengalami apoptosis yang ditandai dengan warna kecoklatan pada inti selnya.

Dari penjelasan di atas, dapat disimpulkan bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv pada jaringan otak dapat menyebabkan apoptosis sel neuron. Peningkatan apoptosis sel neuron terjadi paling banyak ditemukan pada kelompok 16 minggu. 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:

1. 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* (Arcila *et al.*, 2007).

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* (Arcila *et al.*, 2007). 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 (Otera *et al.*, 2005). *Caspase 3* membelah berbagai protein sel termasuk ICAD sehingga CAD dilepaskan dari ICAD lalu mendegradasi kromosom DNA (Kumar *dkk.*, 2007).

## 2. Jalur intrinsik/intraseluler

Stress mitokondria yang menginduksi apoptosis jalur intrinsik disebabkan oleh karena sel kehilangan faktor pertumbuhan, sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria. Terjadinya iskemia pada sel dan kurangnya pasokan glukosa akan memicu ekspresi glutamat yang meningkat dan terjadinya influx  $\text{Ca}^{2+}$  ke dalam sel. Influx  $\text{Ca}^{2+}$  berakibat mitokondria menjadi “*overloaded*” sehingga terjadi kegagalan metabolik mitokondria dan sitokrom-c bocor dari intermembran mitokondria ke sitosol (Husada, 2004).

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 (Otera *et al.*, 2005).

### 3. *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 (Otera *et al.*, 2005). 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 (Husada, 2004).

## 6.2 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pertama pada penelitian ini adalah belum ada peneliti yang melakukan penghitungan apoptosis sel di organ lain yang terinfeksi *M.tuberculosis* dengan masa infeksi yang sama. Sehingga tidak diketahui apakah apoptosis sel hanya terjadi pada otak atau relatif sama dengan apoptosis sel neuron di otak.

Keterbatasan kedua pada penelitian ini adalah rentang waktu yang digunakan hanya 0, 8 dan 16 minggu sehingga tidak diketahui waktu yang pasti untuk penyebaran *Mycobacterium tuberculosis* ke sistem saraf pusat.

Keterbatasan ketiga pada penelitian ini adalah tidak dilakukannya pemeriksaan klinis pada mencit sehingga tidak diketahui gejala klinis apa saja yang terdapat pada mencit yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.