

RINGKASAN

**DEPOSISI KALSIMUM PADA NEURON YANG BERASAL DARI SEL
PUNCA NEURON KULIT MANUSIA TERINOKULASI *TOXOPLASMA
GONDII* MELALUI SINYAL KALSIMUM, NEKROPTOSIS DAN
MENGEKSPRESIKAN Hsp70****(PENELITIAN *IN VITRO* LABORATORIK)****Anggraini Dwi S.**

Terjadinya deposisi kalsium pada neuron yang mengakibatkan kejadian kalsifikasi otak pada toksoplasmosis kongenital masih belum bisa dijelaskan. Diperkirakan mekanisme melalui sinyal kalsium, nekroptosis dan mengekspresikan protein alarmin Hsp70.

Dua puluh empat sampel kultur neuron berasal dari sel punca neuron dari kulit manusia berusia 2 bulan yang telah divalidasi dengan pengamatan imunofluoresen menggunakan CD 133 dan imunositokimia β III tubulin dibagi menjadi 6 kelompok, 3 kelompok kontrol tanpa inokulasi dan 3 kelompok dengan inokulasi *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Kelompok tanpa inokulasi dibagi menjadi 3, yaitu berdasarkan waktu 2 jam, 24 jam dan 48 jam, demikian juga kelompok dengan inokulasi *T. gondii* yang juga dipisahkan menjadi kelompok terinfeksi 2 jam, 24 jam dan 48 jam. Inokulasi *T. gondii* menggunakan galur Rh, dengan dosis infeksi 1 neuron diinfeksi dengan 5 *T. gondii* fase invasif (takizoit). Setelah kultur neuron diinokulasi 2 jam, 24 jam dan 48 jam, diamati intensitas kalsium, kejadian nekrosis dan ekspresi Hsp70 pada kelompok ini dan intensitas kalsium, kejadian nekrosis dan ekspresi Hsp 70 pada kelompok kontrol. Pengamatan kalsium menggunakan fluoresensi fura-2, nekrosis menggunakan TACS-Annexin-V yang mengandung propidium iodide yang dapat digunakan untuk mengevaluasi apoptosis maupun nekrosis, sedangkan untuk pengamatan Hsp70 menggunakan rabbit anti-Hsp70 polyclonal antibody primary antibody. Semua pengamatan ini menggunakan mikroskop konfokal yang dapat mengamati intensitas fluoresensi dari obyek yang diteliti, juga mengukur intensitasnya.

Uji normalitas data menggunakan one sample Kolmogorov Smirnov Test menunjukkan data dengan distribusi normal. Hasil uji beda kalsium antara kelompok kontrol dengan neuron terinfeksi menggunakan uji t sampel bebas menunjukkan perbedaan yang bermakna baik pada kelompok neuron terinokulasi 2 jam, 24 jam maupun 48 jam. Sedangkan hasil uji beda kalsium neuron dengan kalsium *T. gondii* menggunakan uji t 2 sampel bebas berbeda bermakna pada pasca inokulasi 24 jam dan 48 jam, sedangkan pada 2 jam tidak berbeda bermakna. Hasil uji korelasi antara intensitas kalsium neuron dengan kejadian

nekrosis menggunakan uji korelasi Pearson menunjukkan tidak ada korelasi yang bermakna, namun pada uji kalsium *T. gondii* dan neuron dengan kejadian nekrosis menunjukkan kemaknaannya pada pasca infeksi 2 jam. Ekspresi Hsp 70 juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna baik pada 2 jam, 24 jam maupun 48 jam. Untuk uji korelasi antara nekrosis dengan terekspresinya Hsp70 menunjukkan kemaknaan pada pasac infeksi 2 jam, sedangkan pasca 24 jam dan 48 jam tidak ada korelasi bermakna.

Invasi *T. gondii* pada induk semang diselesaikan dalam waktu kurang dari 20 detik. Dengan rasio 1 neuron diinfeksi dengan 5 takizoit, kemungkinan nekrosis sudah terjadi dalam waktu yang singkat sebelum 2 jam pengamatan, dan sesudah 2 jam *T. gondii* dapat mengatasi pengaruh nekrosis, sehingga saat pengamatan yang menunjukkan korelasi antara kalsium dengan nekrosis hanya terjadi pada 2 jam saja. Bukti bahwa ada sinyal kalsium ditunjukkan dengan perbedaan yang bermakna antara intensitas kalsium kelompok kontrol dan kelompok terinfeksi baik 2 jam, 24 jam maupun 48 jam. Intensitas kalsium pada *T. gondii* lebih tinggi dibanding pada sitosol neuron, ini menunjukkan adanya mekanisme *scavenging* kalsium setelah masuknya *T. gondii*. Kalsium sangat diperlukan *T. gondii* baik untuk motilitas, ekstrusi konoid maupun untuk diferensiasi.

Terjadinya nekrosis neuron tampaknya dikendalikan oleh kalsium pada neuron dan *T. gondii*. Pengamatan menggunakan mikroskop konfokal menunjukkan adanya nekrosis pada pasca inokulasi 2 jam, 24 jam dan 48 jam. Tampak nekrosis tinggi pada 2 jam, kemudian menurun pada 24 jam dan naik kembali pada 48 jam. Ini sesuai dengan kemampuan *T. gondii* yang dapat mencegah kematian induk semang. Nekrosis pada infeksi *T. gondii* kemungkinan adalah nekroptosis terbukti ditunjukkannya apoptosis simultan dengan nekrosis.

Protein alarmin Hsp 70 terekspresi pada sel yang mengalami stres, dalam hal ini neuron yang mengalami nekrosis. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa intensitas nekrosis yang terus meningkat dari 2 jam ke 24 jam dan 48 jam, namun dari uji korelasi hanya yang 2 jam saja yang menunjukkan korelasinya. Ini berkaitan dengan tingginya nekrosis pada pasca inokulasi 2 jam.

Inokulasi *T. gondii* pada neuron menyebabkan terjadinya perubahan intensitas kalsium pada sitosol dan *T. gondii*, selanjutnya sinyal kalsium ini dapat menimbulkan terjadinya nekrosis (nekroptosis) dengan akibat terjadinya deposisi kalsium. Mekanisme deposisi kalsium pada neuron yang diinokulasi *T. gondii* melalui sinyal kalsium yang menyebabkan terjadinya nekrosis dan mengekspresikan Hsp 70.

Dari penelitian ini telah dibuktikan adanya kejadian simultan antara apoptosis dan nekrosis setelah neuron diinokulasi dengan *T. gondii*, dengan melibatkan kalsium sebagai mediator. Pada masa yang tidak lama lagi perlu diteliti mediator lain yang terlibat pada terjadinya nekroptosis, sehingga jalur kaskade nekroptosis menjadi lebih jelas.