

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2013



**PERAN TNF- α PADA APOPTOSIS TULANG MENCIT
YANG DIINFEKSI *TOXOPLASMA GONDII***

Dr. Lucia Tri Suwanti, MP, drh (0028086208)
Dr. Mufasirin, MSi, drh (0011076705)

Dibiayai oleh DANA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga Tentang kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Nomor: 7673/UN3/KR/2013, tanggal 2 Mei 2013

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Nopember 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Peran TNF- α pada Apoptosis Tulang Mencit yang Diinfeksi *Toxoplasma gondii*

Peneliti Pelaksana :
Nama Lengkap : Dr. Lucia Tri Suwanti, MP, drh
NIDN : 0028086208
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala.
Program Studi : Kedokteran Hewan
Nomer HP : 0817310284
Alamat Surat (email) : Jl Pandugo Baru 13/115 (U-27) Surabaya 60297
: tswant@gmail.com

Anggota Peneliti :
Nama Lengkap : Dr. Mufasirin, drh., M.Si.
NIDN : 00-1107-6705
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra : -

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

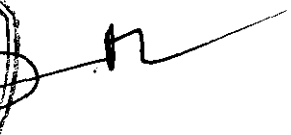
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,-
Biaya Keseluruhan : Rp.100.000.000,-

Surabaya, 1 Nopember 2013

Ketua Peneliti,


(Dr. Lucia Tri Suwanti, MP, drh)
NIP. 196208281989032001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan


(Prof. Hji. Romziah Sidik, drh., Ph.D)
NIP.195312161978062001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat


(Dr. Dieko Agus Purwanto, Apt., M.Si.)
NIP. 195908051987011001

RINGKASAN

Toksoplasmosis adalah penyakit yang bersifat zoonosis, disebabkan oleh *Toxoplasma gondii*. Infeksi *T. gondii* pada induk semang menimbulkan manifestasi termasuk kecacatan pada anak yang dilahirkan. Salah satu kecacatan yang timbul pada anak dengan kongenital toksoplasmosis adalah tidak mempunyai batok kepala atau kepala kecil. Manifestasi yang terjadi pada induk semang yang terinfeksi melibatkan respons imun baik respons seluler maupun humoral. *Toxoplasma gondii* adalah parasit intraseluler sehingga respons imun seluler merupakan respons yang dominan. TNF- α adalah sitokin yang dilepaskan makrofag ketika tubuh terinfeksi *T. gondii* yang berfungsi untuk mengelimir parasit. Di lain pihak sitokin tersebut juga berpengaruh terhadap sel lain yang tidak terinfeksi, antara lain apoptosis termasuk pada tulang.

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan peranan TNF- α pada mekanisme apoptosis tulang pada individu yang terinfeksi *T. gondii*. Diharapkan dengan dibuktikan mekanisme apoptosis pada tulang pada individu yang terinfeksi *T. gondii* dapat digunakan untuk penanganan lebih lanjut toksoplasmosis.

Penelitian dilaksanakan 2 tahun. Tahun 1 meliputi kultivasi parasit, perlakuan infeksi pada mencit dewasa, uji apoptosis dan imunohistokimia. Tiga puluh dua ekor mencit jantan dewasa dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol, mencit tidak diinfeksi. Kelompok kedua, kelompok mencit yang diinfeksi dengan 10 takizoit *T. gondii*. Enam hari setelah infeksi semua mencit dikurbaankan dan diambil tulang femur untuk dilakukan pembuatan preparat histologi dengan pengecatan IHC dan TUNEL. Pada tahun kedua, perlakuan infeksi pada mencit bunting, anak mencit yang dilahirkan diambil tulang batok kepala dan diuji apoptosis serta imunohistokimia. Variabel yang diamati persentase jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α dan Indeks apoptosis tulang. Data dianalisis dengan uji t dan regresi linear.

Hasil pada tahun pertama menunjukkan bahwa persentase jumlah sel tulang femur yang mengekspresikan TNF- α pada kelompok mencit yang diinfeksi *T. gondii* berbeda sangat nyata ($p < 0,005$) dibandingkan dengan kelompok kontrol (tidak diinfeksi), yaitu masing-masing $27,04 \pm 6,92\%$ berbanding dengan $11,42 \pm 3,92\%$. Indeks apoptosis tulang femur pada kelompok mencit yang diinfeksi sangat berbeda

nyata dibanding kelompok kontrol, yaitu $16,28 \pm 3,37$ (perlakuan) dan $9,17 \pm 3,04$ (kontrol). Setelah dilakukan dengan uji Regresi ternyata peningkatan TNF- α berpengaruh terhadap terjadinya apoptosis.

Kesimpulan penelitian ini yaitu bahwa diinfeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α dan indeks apoptosis tulang. Peningkatan apoptosis tulang femur akibat infeksi *T. gondii* melalui peningkatan TNF- α .

SUMMARY

Toxoplasmosis is a zoonotic disease, caused by *Toxoplasma gondii*. It cause congenital toxoplasmosis. One of disability arising in children with congenital toxoplasmosis is microcephaly. *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite that cellular immune is the dominant response. TNF - α is a cytokine that is released when the macrophages infected with *T. gondii* which serves to eliminate parasite. On the other hand these cytokines also affect apoptosis the other cells that are not infected, including the bones cells.

The purpose of this study to prove the role of TNF- α on apoptosis mechanisms of bone in individuals infected with *T. gondii*. Expected with proven mechanisms of apoptosis in the bone in individuals infected with *T. gondii* can be used for further treatment of congenital toxoplasmosis.

The experiment was conducted 2 years. The first year, was treated the adult mice. The activities were includes the cultivation of parasites , treatment of infection in adult mice, apoptosis and immunohistochemistry test. Thirty-two adult male mice were divided into two groups. The first group was the control group, the mice were not infected. The second group. Mice in this group were infected with 10 tachizoites *T. gondii*. Six days after infection, all mice were sacrificed and the femur bone was removed to make histology slides with IHC and TUNEL staining. In the second year, was treated pregnant mice. Pregnant mice will be infected with *T. gondii* and skull bones puppies which born from *T.gondii*-infected pregnant mice were taken and assayed apoptosis and immunohistochemistry. The variables were the percentage of cells expressing TNF- α and apoptotic index of bone. Data were analyzed by t test and linear regression.

Results in the first year showed that the percentage of the femur bone cells which expresses TNF- α in the group of mice infected *T. gondii* increased significantly ($p < 0.005$) compared with the control group (not infected), respectively $27.04 \pm 6.92\%$ versus $11.42 \pm 3.92\%$. Apoptotic index femur bone cell in mice infected group were significantly different than the control group, ie 16.28 ± 3.37 (treatment) and 9.17 ± 3.04 (control). Once done with the regression test apparently increased of TNF- α effect on bone cell apoptosis.

The conclusion of this study is that infected *T. gondii* increased the number of cells expressing TNF- α and apoptosis indices of bone. Increased apoptosis on femur bone cells due to infection *T. gondii* through TNF- α .

PRAKATA

Penelitian dengan judul: **"Peran TNF- α pada Apoptosis Tulang Mencit yang Diinfeksi *Toxoplasma gondii*, dengan pendanaan lewat skim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2013 telah selesai dilakukan, oleh karenanya puji syukur kami haturkan ke Hadirat Yang Kuasa, karena keberhasilan penelitian ini tidak lepas campur tanganNya.**

Kami juga tidak menutup mata, bahwa penyelesaian penelitian ini tidak lepas dari jasa berbagai pihak, maka pada kesempatan ini kami juga mengucapkan banyak terima kasih kepada

1. Prof. Dr. H. Fasich, Apt selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt. M.Si. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya yang telah mengikutkan seleksi dan Usulan Penelitian kami sehingga mendapatkan dana.
3. Prof. Hj . Romziah Sidik, Ph.D, drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang memberikan rekomendasi Usualan Penelitian Fundamental kami sehingga memenuhi persyaratan untuk mendapatkan dana.
4. Tim Reviewer yang telah dengan ketelitian menilai dan menyeleksi semua usulan penelitan yang masuk serta melakukan monitoring dan menilai kelayakan hasil penelitian.
5. Sejawat Dr. Hani Plumeriastuti, M. Kes, drh dan Drh Djoko Legowo yang telah meluangkan waktu untuk berdiskusi terkait dengan histopatologi tulang.

Kami berharap laporan penelitian ini dapat bermanfaat bagi penanggulangan toxoplasmosis baik pada manusia maupun hewan. Kami sadar akan keterbatasan kami, maka demi kesempurnaan hasil dan penyajian laporan ini, kami menampung saran yang konstruktif.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	v
PRAKATA	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.1.1 Rumusan Masalah	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tinjauan Penelitian Epidemiologi Toksoplasmosis	3
2.2 Pengaruh toksoplasmosis terhadap berat lahir anak ..	4
2.3 Sel Tulang.....	5
2.4 Respons Imun terhadap Infeksi . <i>gondii</i>	7
2.5 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	8
2.6 Apoptosis	10
2.7 Apoptosis pada Sel Tulang	14
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT	17
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Tempat dan waktu Penelitian	18
3.2 Rancangan penelitian	18
3.3 Prosedur Penelitian	18
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
5.1. Jumlah Sel Tulang Femur yang Mengekspresikan TNF- α	22
5.2. Apoptosis Pada Tulang akibat infeksi <i>T. gondii</i>	25
BAB VI. RENCANA TAHAP BERIKUTNYA	28
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1	Rerata dan Simpangan baku Persentase Jumlah Sel Tulang Femur yang mengekspresikan TNF- α	22
Tabel 5.2	Rerata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Tulang Femur Mencit	26

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Road Map Penelitian Toksoplasmosis 16
Gambar 3.1	Skema rancangan penelitian 18
Gambar 3.2	Kerangka operasional penelitian tahun ke-1 21
Gambar 5.1	Gambaran Histologi Tulang Femur dengan pengecatan IHC 23
Gambar 5.2	Osteoklas teraktivasi oleh TNF- α 24
Gambar 5.3	Osteoklas dengan Pengecatan HE 25
Gambar 5.4	Gambaran Sel Tulang Femur dengan pengecatan TUNEL .. 27
Gambar 6.1	Kerangka operasional penelitian tahun ke-2 32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Data	38
Lampiran 2 Penghitungan Statistik Peningkatan TNF- α	39
Lampiran 3 Perhitungan Statistik Indeks Apoptosis	40
Lampiran 4 Perhitungan Statistik Regresi Peningkatan NF- α terhadap Indeks Apoptosis	42

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Toksoplasmosis adalah penyakit yang bersifat zoonosis, disebabkan oleh *Toxoplasma gondii* menyerang manusia dan mamalia berdarah panas termasuk unggas. Maharana *et al.* (2010) melaporkan bahwa sepertiga populasi manusia sudah terinfeksi *T. gondii*. *Food Safety* (2011) melaporkan kerugian ekonomi akibat penyakit infeksi termasuk toksoplasmosis dilaporkan sebesar 1,5 *billion dollar USA*. Kerugian sosioekonomi akibat toksoplasmosis meliputi biaya yang besar untuk perawatan penderita, gangguan mental dan kebutaan pada anak. Pada manusia, toksoplasmosis dapat menyebabkan kerugian antara gejala penurunan berat badan (Paspalaki *et al.*, 2001) dan berat lahir rendah (BLR) (Rorman *et al.*, 2006; Mufasirin, 2011). Pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap perubahan molekuler tulang pada sampai sekarang belum banyak diteliti.

Infeksi *T. gondii* pada induk semang menimbulkan manifestasi termasuk kecacatan pada anak yang dilahirkan. Salah satu kecacatan yang timbul pada anak dengan kongenital toksoplasmosis adalah tidak mempunyai batok kepala atau kepala kecil. Manifestasi yang terjadi pada induk semang yang terinfeksi melibatkan respons imun baik respons seluler maupun humoral. *Toxoplasma gondii* adalah parasit intraseluler sehingga respons imun seluler merupakan respons yang dominan. TNF- α adalah sitokin yang dilepaskan makrofag ketika tubuh terinfeksi *T. gondii* yang berfungsi untuk mengeliminir parasit. Di lain pihak sitokin tersebut juga berpengaruh terhadap sel lain yang tidak terinfeksi, antara lain apoptosis termasuk pada tulang.

Infeksi *T. gondii* membangkitkan respons imun individu terinfeksi baik respons imun humoral maupun seluler (Ghaffar, 2001). Kemampuan *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler ditandai dengan respon Th1 dengan dilepaskannya *interferon- γ* (IFN-

γ) (Denkers *and* Gazzinelli, 1998; Lee *et al.*, 1999). Pada awal infeksi, IFN- γ diproduksi oleh sel *natural killer* (NK). Pada fase ini melibatkan sistem imun alami, sel NK dan makrofag. Sel NK merupakan sel utama penghasil IFN- γ dan akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan TNF- α sebagai mikrobisid. Pada fase kronis, limfosit T memproduksi IFN- γ dalam jumlah banyak (Sher *et al.*, 1995).

Prinsip apoptosis pada jaringan tulang secara umum sama dengan apoptosis yang terjadi di sel lain. Beberapa peneliti melaporkan bahwa peran glucocorticoid menginduksi hilangnya tulang (apoptosis) pada manusia dan tikus berhubungan dengan peningkatan sel osteosit yang mengalami apoptosis (Weinstein *et al.*, 2000). Apoptosis pada sel tulang secara khusus akibat infeksi belum pernah dilaporkan.

Mekanisme pengaruh toksoplasmosis pada individu dan ibu hamil atau hewan bunting khususnya peran TNF- α pada apoptosis tulang perlu dibuktikan. Penelitian ini mencoba mencari pengaruh TNF- α yang diekspresikan makrofag pada jaringan tulang akibat infeksi *T. gondii*. Hasil penelitian tersebut diharapkan dapat menjelaskan mekanisme apoptosis pada individu dengan toksoplasmosis dan anak yang lahir dengan kecacatan tulang dari induk dengan toksoplasmosis.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah terdapat peningkatan jumlah makrofag jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* ?
- 2) Apakah terdapat peningkatan indeks apoptosis sel tulang pada mencit yang diinfeksi *T. gondii* ?

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penelitian epidemiologik toksoplasmosis

Kejadian toksoplasmosis pada manusia sudah banyak dilaporkan. Di Victoria, Canada lebih dari 110 orang termasuk bayi telah terinfeksi *T. gondii* (Mullens, 1996). Di Norwegia, Jenum *et al.* (1998) melaporkan kejadian toksoplasmosis pada ibu hamil antara tahun 1992-1994 yang mencapai 35.940 orang. Di Amerika Serikat 30-60% orang dewasa menunjukkan seropositif terhadap *T. gondii* (Frenkel, 1990). Di Thailand dan Austria, kejadian toksoplasmosis pada ibu hamil masing-masing sebesar 21,7% dan 36,3% (Sukthana, 1999). Di Singapura, kasus toksoplasmosis pada ibu hamil antara tahun 1997-1998 sebesar 17,2% (Wong *et al.*, 2000). Di Indonesia, kejadian toksoplasmosis pada ibu hamil dilaporkan oleh Karkata dan Suwardewa (2006) yang meneliti ibu hamil yang berkunjung di poliklinik RSP Sanglah Denpasar didapatkan 21% ibu hamil positif toksoplasmosis dan 5% diantaranya toksoplasmosis aktif (IgM positif). Sanjaya (2006) melaporkan kejadian toksoplasmosis di Kota Surabaya sebanyak 37% (dari 100 sampel serum ibu hamil) positif IgG terhadap toksoplasmosis.

Kasus toksoplasmosis pada ternak dan hewan lain telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Di Amerika Serikat, kambing yang terinfeksi *T. gondii* sebesar 23-60%, domba 8-74% dan pada sapi bervariasi di beberapa negara bagian (Dubey, 1990). Zimmerman *et al.* (1990) melaporkan 50,96% babi di Iowa menunjukkan seropositif terhadap *T. gondii*. Di Panama, 32,1% babi seropositif terhadap *T. gondii* (Correa *et al.*, 2008). Di daerah timur laut Amerika Serikat, domba menunjukkan seropositif terhadap *T. gondii* sebesar 61% (Malik *et al.*, 1990). Di Hungaria, dari 62 kasus abortus pada kambing dan domba, dengan uji imunohistokimia 8% positif toksoplasmosis (Szeredi and Bacsadi, 2002) sedang di Italia dari 9639 serum darah dan 815 hasil abortus dari domba dan

kambing, dengan IFAT sebanyak 28,4% pada domba dan 5,6% pada kambing positif IgG sedang IgM sebesar 9,5% pada domba dan 5,6% pada kambing, dengan PCR didapatkan 11% pada domba dan 6,4% pada kambing positif toksoplasmosis (Masala *et al.*, 2003). Di Turki, kambing yang positif toksoplasmosis sebesar 80,16% (Karaca *et al.*, 2007). Sasmita dan Suprihati (1993a) melaporkan kasus toksoplasmosis pada kambing di daerah Tuban dan Kediri, Jawa Timur berturut-turut sebesar 20,6% dan 20%. Inoue *et al.* (2001) melaporkan toksoplasmosis pada babi di Bandar Lampung dan Ujung Pandang berturut-turut sebesar 3,6% dan 9,2%. Kasus toksoplasmosis juga terjadi di China pada ayam yang dipelihara secara ekstensif sebesar 34% dan intensif sebesar 2,8% (Zhu *et al.*, 2008).

2.2 Pengaruh toksoplasmosis terhadap berat lahir anak

Stuebe (2005) menyatakan bahwa berat lahir rendah adalah bayi yang lahirkan mempunyai berat di bawah 2,50 kg. Pada kehamilan umur 37 minggu, berat bayi adalah 2,50 kg. Pembatasan pertumbuhan di dalam uterus menyebabkan anak lahir dengan berat lahir rendah. Beberapa faktor penyebab gangguan pertumbuhan fetus adalah: kelainan kongenital atau kromosom dan gangguan pada plasenta yang menyebabkan gangguan aliran oksigen dan makanan. Disamping itu, infeksi seperti rubella, sitomegalovirus, toksoplasmosis dan sifilis dapat berpengaruh terhadap berat lahir. Faktor dari ibu yang mempengaruhi berat lahir rendah adalah nilai gizi makanan dikonsumsi rendah, gangguan jantung atau tekanan darah, merokok, memakai obat, peminum alkohol, paparan logam berat dan pemeliharaan prenatal yang tidak baik. Berat lahir rendah lebih sering terjadi pada ibu dengan kehamilan pertama, umur di bawah umur 17 tahun dan di atas 35 tahun. Rorman *et al.* (2006) melaporkan hasil penelitian multisenter dan didapatkan ada hubungan toksoplasmosis kongenital dengan kelahiran sebelum waktunya, berat lahir rendah dan fetus berukuran kecil. Banyaknya anak tidak normal yang dilahirkan dapat

terlihat apabila infeksi terjadi pada minggu ke-10 sampai 24 umur kehamilan. Gejala klinis toksoplasmosis menurun apabila infeksi pada akhir kehamilan.

Davitaia *et al.* (2002) meneliti 32 ibu hamil yang terinfeksi agen infeksi yang ditularkan dari ibu ke anak dan selama kehamilan tidak dilakukan pengobatan. Dari 32 ibu hamil, empat orang terinfeksi *T. gondii*. Setelah lahir, dengan mengacu pada *Apgar score*, bayi menunjukkan kemunduran perkembangan dengan berat lahir 2,10–2,32 kg dengan gejala hipotermi, miokarditis, pneumonitis dan sindroma nefritis. Morgan *et al.* (2006) meneliti 483 kelahiran dan didapatkan 8,6% lahir premature dan 5,8% lahir dengan berat badan rendah. Anak yang baru lahir 9,3% seropositif IgG dan 1% seropositif IgM terhadap *T. gondii*.

Penularan kongenital pada anak yang dilahirkan dari ibu yang terinfeksi akut pada trimester pertama sebesar 10-25% dan trimester ketiga sebesar 60-90% dengan rata-rata penularan selama kehamilan 20-50%. Salah satu manifestasi anak yang dikandung dengan toksoplasmosis kongenital adalah gangguan pertumbuhan selama kehamilan (Jones *et al.*, 2003).

2.3 Sel Tulang

Sel tulang terdiri dari osteoblas, osteosit dan osteoklas. Proses pembentukan tulang merupakan kaskade yang kompleks, dimulai dari proliferasi *primitive mesenchymal cell* yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel prekursor osteoblas atau osteoprogenitor. Osteoprogenitor adalah mesensimal multipoten sel stem yang juga membentuk sel stroma sumsum tulang, kondrosit, sel otot dan adiposa. Fase awal pembentukan tulang adalah pengerahan prekursor osteoblas ke tempat resorpsi tulang yang dimediasi oleh TGF- β , yang diikuti fase kedua yaitu prekursor osteoblas yang dimediasi PGF dan PDGF. Fase ketiga dari pembentukan tulang adalah diferensiasi prekursor osteoblas menjadi sel matur.

TRAPase yang dilepas de dalam lakuna tempat resorpsi tulang pada saat pembongkaran tulang (Siebel, 2005).

Setelah resorpsi tulang maksimum selesai, osteoklas mengalami apoptosis (kurang lebih 9 hari) merupakan fase *reversal*. Pada fase ini, osteoklas digantikan dengan makrofag yang melepaskan faktor inhibisi osteoklas dan menstimulasi osteoblas. Masa hidup osteoklas kurang lebih 2 minggu sedangkan osteoblas 3 bulan dan osteoblas mengalami apoptosis yang ditandai dengan kondensasi kromatin, degradasi DNA dan pembentukan bleb pada membran plasma dan nukleus. Mekanisme apoptosis pada osteoklas masih belum diketahui dengan jelas, tetapi pada umumnya faktor yang menghambat resorpsi tulang menginduksi apoptosis (Manolagas, 2000)

2.4 Respons imun terhadap infeksi *T. gondii*

Infeksi *T. gondii* dapat membangkitkan respons imun induk semang terinfeksi baik respons imun humoral maupun seluler (Ghaffar, 2001). Respons imun humoral ditunjukkan dengan pembentukan beberapa kelas antibodi spesifik terhadap *T. gondii* dalam serum. Pada manusia dan mamalia yang terinfeksi *T. gondii* terjadi peningkatan IgA dan IgM spesifik pada awal infeksi dan IgG pada keadaan kronis (Dupouy-Camet, 1997). Seperti parasit intraseluler yang lain, respons imun seluler lebih dominan dibandingkan dengan respons imun humoral (Denkers *and* Gazzinelli, 1998). Kemampuan *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler ditandai dengan respons ke arah sel Th1 dengan dilepaskan IFN- γ (Denkers *and* Gazzinelli, 1998; Lee *et al.*, 1999). Peranan IFN- γ sangat penting dalam pertahanan terhadap infeksi, hal ini dibuktikan mencit yang diberi antibodi terhadap IFN- γ atau mencit defisien terhadap gen IFN- γ akan mati bila diinfeksi *T. gondii* (Dupouy-Camet, 1997). Menurut Denkers *and* Gazzinelli (1998), induk semang mampu bertahan terhadap infeksi *T. gondii* melalui dua fase. Pertama adalah fase akut,

pertumbuhan stadium takizoit dihambat IFN- γ . Parasit menginduksi IFN- γ dalam jumlah yang tinggi pada awal infeksi. Sitokin tersebut diproduksi oleh sel *natural killer* (NK) dan sel T yang teraktivasi. Pada fase ini melibatkan sistem imun alami, sel NK dan makrofag. Sel NK merupakan sel utama penghasil IFN- γ . Makrofag memproduksi *interleukin-12* (IL-12) yang akan mendorong sel NK untuk mensintesis IFN- γ . Kemudian IFN- γ mengaktivasi makrofag menghasilkan TNF- α dan *nitric oxide* (NO) sebagai mikrobisid. Kedua adalah fase kronis, limfosit T memproduksi kadar IFN- γ dalam jumlah banyak, yang ditujukan untuk mencegah reaktivasi kista dan membersihkan takizoit jaringan. *Interleukin-12* yang dihasilkan makrofag mendorong diferensiasi sel Th dan reaksi ke arah sel Th1 untuk memproduksi IFN- γ . Menurut Dupouy-Camet (1997), sel yang pertama teraktivasi akibat infeksi *T. gondii* adalah sel NK dan monosit yang menghasilkan IFN- γ dan IL-12. *Interleukin-12* akan menginduksi populasi limfosit ke Th1 yang akan menghambat perkembangan *T. gondii*. Pada individu yang terinfeksi kronis, limfosit T akan memproduksi IFN- γ dalam jumlah tinggi apabila terpapar dengan antigen *T. gondii*. Hal ini dibuktikan oleh Fatoohi *et al.* (2002) yang mengkultur limfosit T ibu hamil dengan toksoplasmosis kronis yang dipaparkan dengan *soluble toxoplasma antigen* (ST-Ag), dan di dalam supernatan kultur didapatkan IFN- γ dalam kadar yang tinggi.

2.5 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) adalah sitokin yang dihasilkan oleh makrofag, monosit, limfosit T, mastosit dan basofil. Fungsi TNF- α digunakan pada proteksi awal dengan meningkatkan kapasitas mikrobisid makrofag dan menstimulasi sel NK untuk mensekresikan IFN- γ . *Tumor necrosis factor- α* juga dapat menginduksi sekresi protein

inflamasi fase akut lewat produksi IL-6. Pada toksoplasmosis, TNF- α mengaktifasi makrofag dan menghambat replikasi parasit, tetapi kerja ini hanya digunakan bersama-sama dengan IFN- γ (Filiseti *and* Candolfi, 2004). Bhopale (2003) menyatakan bahwa TNF- α dan IFN- γ bekerja sinergis dengan cara mengaktifkan makrofag dan menghasilkan radikal bebas dan NO untuk mengeliminir *T. gondii*.

Tumor necrosis factor- α digunakan pada pertahanan pada fase akut dan kronis dan seperti IL-12, TNF- α menstimulasi produksi IFN- γ oleh sel NK yang berperan pada respons tidak spesifik terhadap infeksi toksoplasmosis, tetapi peranan TNF- α masih diperdebatkan. Beberapa peneliti menghubungkan antara TNF- α dan infeksi yang fatal dan gangguan kerja hati dan otak. *Tumor necrosis factor- α* dapat membantu penyebaran intraserebral dan meningkatkan khororetinitis pada infeksi primer dengan *T. gondii* (Filiseti *and* Candolfi, 2004).

Tumor necrosis factor- α adalah salah satu sitokin yang banyak ditemukan pada *cachexia* akibat kanker. Peningkatan TNF- α terjadi pada *cachexia* yang disebabkan kanker seperti kehilangan berat badan, anoreksia, peningkatan termogenesis, perubahan metabolisme lemak, resistensi terhadap insulin dan kehilangan otot. *Wasting syndrome* dan gejala sistemik yang berhubungan dengan hal tersebut diduga disebabkan oleh produksi yang berlebih dari TNF- α . Pemberian antibodi terhadap TNF- α pada hewan dapat mengembalikan sebagian gejala anoreksia, kehilangan berat badan dan pengurangan lemak serta protein tubuh (Berger, 1999).

Aktivitas dan profil sitokin mencit yang terinfeksi *T. gondii* telah diteliti pada fase akut dan kronis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa: 1) Selama 1-7 hari setelah infeksi (fase akut), terjadi pengeluaran energi sebesar 30% dan peningkatan ekspresi TNF- α , IL-1, IL-5 dan IFN- γ ; 2) Fase akut akhir, terjadi keadaan hipermetabolik dengan keadaan

anoreksia dan mengarah terjadinya *cachexia* (peningkatan ekspresi mRNA TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IFN- γ ; dan 3) Pada fase kronis, sebagian kembali ke normal dan sebagian tidak. Pada mencit yang kembali ke normal, mRNA sitokin tersebut di atas mengalami penurunan kecuali TNF- α dan IL-10 yang tetap tinggi (Arsenijevic *et al.*, 1998).

Pada beberapa kejadian, TNF- α mempunyai peran pada keadaan perkembangan otot yang abnormal dengan hasil kehilangan masa dan kegagalan fungsi otot skelet (Li *and* Reid, 2001). Peningkatan TNF- α terjadi pada atrofi otot skelet dapat menyebabkan *cachexia* yang diinduksi oleh infeksi bakteri, HIV, gangguan jantung dan kanker (Spate *and* Schulze, 2004). Terjadinya kompleks ligan-reseptor TNF- α menyebabkan pengerahan protein spesifik reseptor dan menyebabkan peningkatan faktor transkripsi seperti *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan *activator protein-1* (AP-1) melalui aktivasi jalur kinase termasuk *I κ B kinase* (IKK), MAPKs dan Akt (Aggarwal, 2003; Chen *and* Goeddel, 2002).

2.6 Apoptosis

Apoptosis adalah kondisi kematian sel yang penting pada perkembangan normal dan homeostasis jaringan. Gambaran sel yang mengalami apoptosis adalah membran plasma menggelembung, inti pecah, fragmentasi kromosom dan adanya vesikel atau badan apoptotik sebagai penanda untuk proses fagositosis. Apoptosis dipicu oleh keadaan eksternal dan internal. Jalur eksternal melalui ligan yang memediasi aktivasi reseptor kematian plasma membran spesifik sedangkan jalur internal berasal dari mitokondria (Adhietty *and* Hood, 2003).

Apoptosis dapat diinduksi melalui interaksi ligan pada satu atau lebih reseptor superfamili TNFR (Baker *and* Reddy, 1998). Reseptor dari famili TNFR yang penting adalah TNF- α dan *Fas ligand* (FasL) yang didapatkan pada limfosit T sitotoksik dan sel

imun yang lain. Interaksi ligan pada reseptor selanjutnya mengaktivasi protease spesifik. Protease tersebut dikenal dengan caspase yang diaktivasi dengan pemecahan proteolitik. Caspase mempunyai kemampuan memecah dan mengaktifkan caspase lain dalam bentuk *cascade-like* dan merupakan mekanisme yang efisien dan penting untuk terjadinya sinyal kematian sel (Kumar, 1999). Aktivasi caspase selanjutnya menimbulkan kerusakan sitosol secara biokimia dan inti sel sehingga tampak gambaran apoptosis (Nicholson, 1999). Interaksi FasL-reseptor Fas selanjutnya mengaktifkan procaspase-8 pada membran sel dengan sebuah protein adaptor *fas associated death domain* (FADD) yang berhubungan dengan reseptor Fas (Baker and Reddy, 1998). Pengerahan procaspase-8 ke membran plasma menghasilkan pengerahan susulan procaspase yang lebih banyak (Salvesen and Dixit, 1999). Akumulasi caspase membentuk sebuah *death inducing signaling complex* (DISC) di membran plasma menghasilkan caspase yang aktif (Salvesen and Dixit, 1999). Caspase-8 yang aktif selanjutnya mengaktifkan caspase-3 sehingga terjadi proses apoptosis dengan cara memecah struktur protein membran plasma dan selubung inti yang menyebabkan pecahnya struktur sel (Nicholson, 1999). Enzim ini memediasi peran utama dalam inti sel. Caspase-3 yang aktif pindah dari sitosol ke inti sel dan memecah inti sel serta tidak mengaktifkan *inhibitor of caspase activated DNase* (ICAD) (Lechardeur et al., 2000). *Caspase activated DNase* (CAD) yang lepas yang merupakan endonuklease, kemudian memecah DNA genom. Fragmentasi DNA merupakan gambaran apoptosis. Caspase 3 menginaktivasi *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) dan *DNA dependent protein kinase* yang keduanya merupakan kunci enzim perbaikan DNA (Nicholson, 1999). Kombinasi aktivasi CAD dan hambatan perbaikan DNA menyebabkan degradasi DNA (Nicholson, 1999; Lechardeur et al., 2000).

Caspase-3 juga menyebabkan kematian sel melalui jalur lain dengan cara memecah protein kelompok Bcl-2, yaitu Bid menjadi protein yang lebih kecil 15 kDa yang dikenal

dengan *truncated Bid* (tBid). *Truncated Bid* kemudian pindah dari sitosol ke mitokondria dan melekat dengan Bax dan selanjutnya menginduksi sitokrom c (Desagher *et al.*, 1999), sehingga jalur ligan memediasi kematian sel melalui jalur yang tergantung atau tidak tergantung mitokondria (Adihetty *and* Hood, 2003). Mitokondria berhubungan erat dengan apoptosis karena mempunyai dua karakteristik. Pertama, bagian intermembran mitokondria mengandung protein proapoptotik yang dapat dilepas ke sitosol. Kedua, mitokondria merupakan produsen *reactive oxygen species* (ROS) yang secara langsung dan tidak langsung berpengaruh terhadap apoptosis (Adihetty *and* Hood, 2003).

Mitokondria disusun dari membran luar dan membran dalam yang dipisahkan sebuah ruang intermembran (*intermembrane space*). Membran dalam bersifat tidak permeabel terhadap molekul besar dan bentuk ini merupakan pertahanan pada matrik mitokondria bagian dalam. Membran mitokondria mempunyai tempat untuk komunikasi yang disusun *voltage dependent anion channel* (VDAC) di membran luar dan *adenine nucleotide translocase* (ANT) di membran bagian dalam. Gabungan ANT, VDAC, Bax dan cyclophilin D membentuk celah pada membran yang dikenal dengan *mitochondrial permeability transition pore* (mtPTP). *Mitochondrial permeability transition pore* ini akan memfasilitasi pelepasan faktor proapoptotik selama proses apoptosis. Pelepasan molekul dari intermembran terjadi hilangnya potensial membran. Perubahan permeabilitas membran digunakan sebagai indikasi pembentukan mtPTP. Kelompok protein Bcl-2 mengatur keadaan mtPTP. Sebagai proapoptotik adalah Bax, Bak dan Bok dan sebagai antiapoptotik adalah Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W;cf (Adams *and* Cory, 1998).

Proporsis protein proapoptotik dan antiapoptotik sangat penting dalam kontribusinya merespon stimulus apoptosis. Bcl-2 adalah protein antiapoptotik yang terletak di membran luar, dan ekspresi yang berlebih mencegah pembentukan mtPTP dan menghambat pelepasan sitokrom c sehingga jalur apoptosis tidak berlanjut. Bax dan Bak

kemudian bergabung dengan VDAC, adalah komponen utama mtPTP, untuk menginduksi pelepasan sitokrom c (Murphy *et al.*, 2000). Bcl-2 dan Bax juga berinteraksi dengan ANT, sebuah komponen membran dalam yang mengatur pelepasan sitokrom c (Brenner *et al.*, 2000). Gabungan kelompok Bcl-2 dengan membran dalam (mtPTP) terjadi untuk mengatur pembentukan *channel*. Setelah sitokrom c lepas dari mitokondria kemudian berikatan dengan *apoptotic activating factor-1* (APAF-1) (Li *et al.*, 1997). *Apoptotic activating factor-1* selanjutnya berubah konformasi untuk mengekspos *caspase recruitment domain* (CARD), menghasilkan pengerahan procaspase-9. Kompleks tersebut disebut dengan apoptosom dan memicu *caspase cascade*. Hasil akhir dari pemecahan proteolitik adalah aktivasi caspase-3 yang menyebabkan fragmentasi DNA genom dan kematian sel. Pelepasan sitokrom c tidak segera menimbulkan apoptosis karena sel mempunyai inhibitor endogenous terhadap caspase yang mampu menghentikan jalur *signaling* kematian sel. Inhibitor tersebut diekspresikan lebih tinggi pada sel otot skeletal dan otot jantung sehingga jaringan tersebut lebih resisten terhadap apoptosis (Deveraux *et al.*, 1998; Koseki *et al.*, 1998). Sebagai contoh *FLICE/caspase-8 inhibitory protein* (FLIP) adalah enzim yang homolog dengan caspase-8 yang berkompetisi dengan caspase-8 endogenous untuk melekat pada FADD, sehingga terjadi hambatan pembentukan DISC (Irmeler *et al.*, 1997). Inhibitor caspase lain yang dikenal dengan *apoptosis repressor caspase* (ARC) (Neuss *et al.*, 2001). *Apoptosis repressor caspase* menghambat kematian sel dengan cara menginduksi jalur Fas dengan berikatan dengan caspase-8 (Koseki *et al.*, 1998). Kelompok protein lain sebagai penghambat apoptosis adalah dikenal dengan *inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs) yang menghambat caspase-9 dan caspase-3. Pada manusia protein yang mirip IAP adalah *human IAP like protein* (hILP), mampu menghambat apoptosis secara langsung dengan berikatan pada caspase-9 dan caspase-3

(Deveraux *et al.*, 1998). *Human IAP like protein* terutama diekspresikan oleh sarcolemma sel otot skelet yang mampu menghambat jalur apoptosis pada jaringan ini.

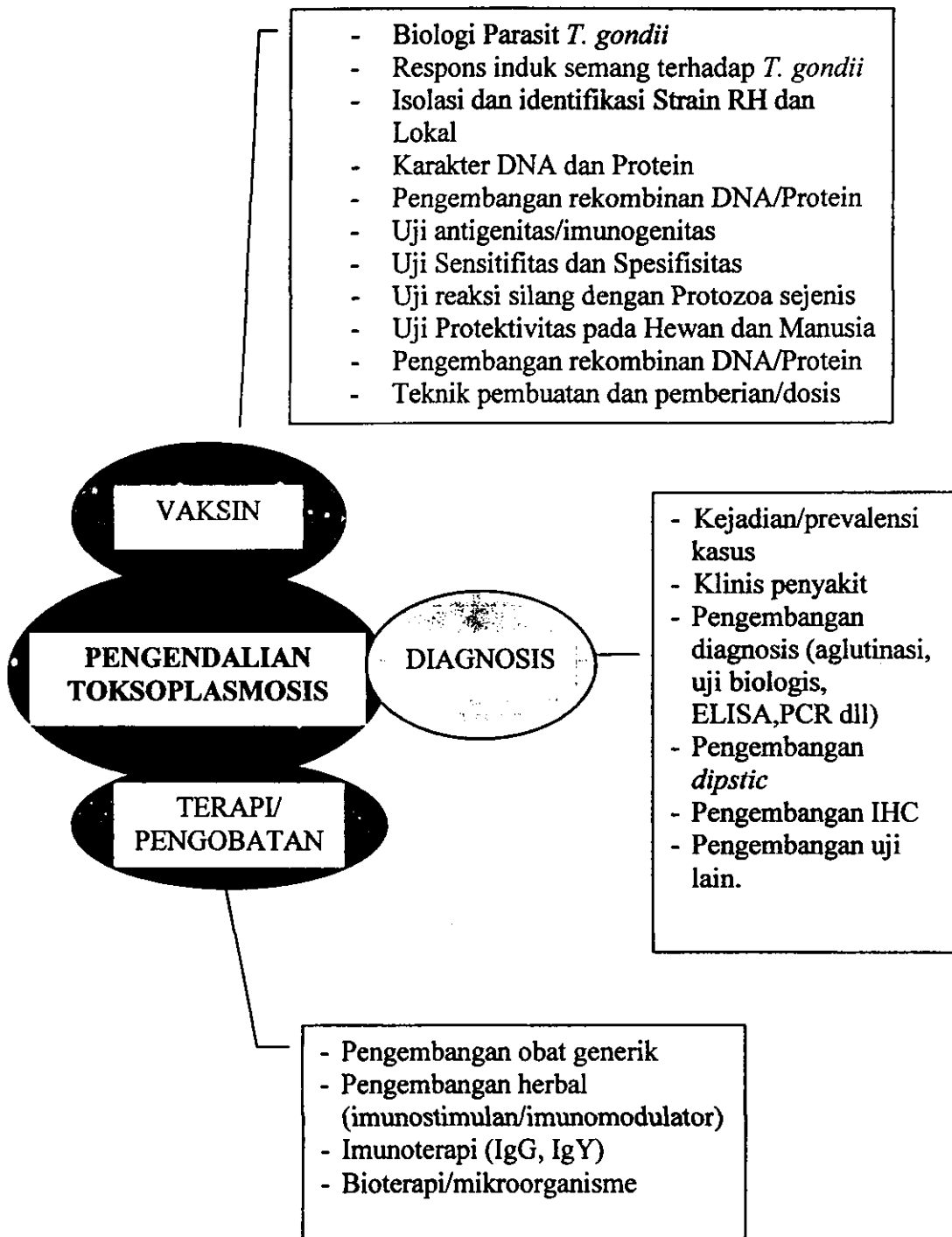
Apoptosis juga diinduksi oleh inhibitor IAPs sehingga protein tersebut tidak aktif seperti Smac/Diablo dan Htr2/Omi (Faccio *et al.*, 2000; Srinivasula *et al.*, 2000). Apoptosis juga terjadi karena dilepaskan faktor dari mitokondria baik yang tergantung caspase (cytokrom c, Smac/Diablo, HtrA2/Omi) atau yang tidak tergantung caspase (AIF, Endonuclease G). Caspase tidak hanya didapatkan di sitosol tetapi juga di dalam mitokondria (Qin *et al.*, 2001).

Proses respirasi di mitokondria meliputi pemindahan elektron melalui reaksi oksidasi reduksi (redok) yang melibatkan protein membran bagian dalam mitokondria. Gangguan transfer elektron dapat menghasilkan ketidakstabilan dan potensial terjadi kerusakan yaitu *reactive oxygen species* (ROS). Mitokondria menghasilkan ROS 5-10 kali lebih besar dibandingkan di sitosol (Cadenas and Davies, 2000). *Reactive oxygen species* memulai induksi jalur apoptosis dengan jalan melepaskan sitokrom c dari membran dalam mitokondria. Akumulasi ROS dengan matrik dikurangi dengan enzim antioksidan seperti *phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase* (PHGPx), *glutathione peroxidase* (GPx) dan *Mn-superoxide dismutase* (Mn-SOD) (Nomura *et al.*, 2000). *Reactive oxygen species* juga berpengaruh tidak langsung pada apoptosis dengan cara mengaktivasi *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) dan berbagai macam faktor transkripsi yang sensitif terhadap redok (Bogoyevitch *et al.*, 2000).

2.7. Apoptosis pada sel Tulang

Prinsip apoptosis pada jaringan tulang secara umum sama dengan apoptosis yang terjadi di sel lain. Hasil penelitian melaporkan bahwa glucocorticoid menginduksi hilangnya tulang pada manusia dan tikus yang berhubungan dengan peningkatan sel

osteosit yang mengalami apoptosis (Weinstein *et al.*, 2000). Terdapat *co-localisation* osteosit yang apoptosis dan resorpsi osteoklas. Pada tikus tulang yang dibebani, proporsi osteosit yang apoptosis terdapat pada tulang yang dekat dengan tempat resapan (Nobel *et al.*, 2003). Osteocyte apoptosis dan resapan dalam tulang terdapat pada daerah tulang yang sama. Apoptosis melibatkan *remodelling* dan khususnya resapan dalam. Osteosit yang mengalami apoptosis berperan dalam proses pergantian tulang normal. Estrogen merupakan faktor penentu apoptosis osteosit disamping tekanan (Lozupone *et al.*, 1996). Apoptosis melibatkan produksi molekul sitokin yang memulai terjadinya fagositosis. Mekanisme inisiasi apoptosis melalui *microdamage* yang mengarah pada kerusakan fisik pada baik sel maupun lakuna suatu sistem yang menyediakan gizi dan oksigen. Sel epitel dan sel cardio-myocyte bereaksi terhadap peregangan dengan mengalami apoptosis, menyebabkan induksi P53, ANGIOTENSIN II dan FAS-LIGAND (Wang *et al.*, 1999). Pada sisi lain, tegangan membran plasma dapat mendorong ke arah kematian sel. Sel yang mati ditandai dengan sel yang memajang dan peleburan gelembung lisosom. Mata rantai molekuler selanjutnya adalah aktivitas osteoklas untuk mengeliminir sel yang mati (Mcneill, 2002; Mcneill dan Steinhardt, 1997).



Gambar 2.1 Road Map Penelitian Toksoplasmosis

Keterangan: Respons induk semang terhadap *T. gondii* (pada aras Vaksin) merupakan bagian yang akan dilaksanakan dalam penelitian unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2013.

BAB III TUJUAN DAN MANFAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran TNF- α pada mekanisme apoptosis jaringan tulang pada mencit yang diinfeksi *T. gondii*.

3.1.2 Tujuan khusus

- 1) Membuktikan peningkatan jumlah makrofag jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α pada mencit yang diinfeksi *T. gondii*.
- 2) Membuktikan peningkatan indeks apoptosis sel osteosit pada mencit yang diinfeksi *T. gondii*.

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian diharapkan dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu, peningkatan publikasi nasional, dan pencegahan infeksi toxoplasmosis.

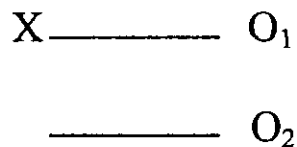
BAB IV. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Lab. Protozoologi dan Patologi Anatomi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Waktu penelitian dimulai Mei sampai dengan Oktober.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental (posttest only control groups design)* dan skema rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian. X= Perlakuan, infeksi *T.gondii*, O₁ dan O₂= Pengamatan meliputi Persentase sel mesenkimal jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α , indeks apoptosis sel tulang

3.3 Prosedur Penelitian

a) Perbanyak isolat *T. gondii*

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *strain* RH yang didapatkan dari Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Perbanyak isolat dilakukan pada mencit. Isolat diinjeksikan secara *intrapertoneal* sebanyak 1×10^6 takizoit, kemudian mencit dipelihara selama 3-4 hari. Mencit yang sudah menunjukkan gejala sakit kemudian dikorbankan dengan cara dilakukan dislokasi kapitis. Cairan *intrapertoneal* diambil dengan cara memasukkan 3 ml NaCl fisiologis ke dalam rongga peritoneum dan cairan diambil kembali. Keberadaan stadium takizoit dilihat di bawah mikroskop dan jumlah takizoit dihitung dengan *hemositometer improve Neubauer*.

b) Perlakuan

Sebanyak 32 ekor mencit Balb/c, jantan, umur 8 minggu digunakan untuk penelitian ini. Mencit kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) adalah kelompok yang diinfeksi dengan *T. gondii* dan kelompok kontrol (K) adalah mencit yang tidak diinfeksi *T. gondii*. Dosis infeksi adalah 10 takizoit setiap mencit secara *intrapertoneal* yang dilarutkan dalam 100 µl NaCl fisiologis. Kelompok kontrol hanya diinjeksi 100 µl NaCl fisiologis. Mencit dipelihara sampai hari ke-6 setelah infeksi. Mencit kemudian dikorbankan, jaringan tulang (femur) diambil dan digunakan untuk pemeriksaan. Jaringan tulang disimpan dalam bufer formalin 10% dan selanjutnya dilakukan proses untuk uji apoptosis (Uji TUNEL) dan uji imunohistokimia untuk melihat ekspresi TNF α

c) Penentuan apoptosis menggunakan uji TUNEL

Penentuan apoptosis dilakukan menggunakan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling* (TUNEL) yang diadopsi dari Runic *et al.* (1998) dengan ApopTag[®]Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon[®] International, S7101). Jaringan dalam *embedding paraffin* dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron. Sayatan jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sudah diberikan *poly-L-lysine*, kemudian dideparafinisasi selama 2 jam pada suhu 58°C, selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan xylene dan rehidrasi dengan ethanol. Sayatan jaringan kemudian ditambahkan 20 µg/ml proteinase K selama 25 menit pada temperatur kamar, dicuci dengan dH₂O, aktivitas peroksidase internal diblok dengan cara diinkubasi dengan 3% H₂O₂ dalam methanol absolut selama 5 menit. Sayatan jaringan kemudian dicuci dengan PBS dan diinkubasi dalam larutan yang mengandung *digoxigenin* yang dilabel *deoxy-UTP* dan *terminal deoxynucleotidyl transferase* selama 1 jam pada suhu 37°C. Jaringan kemudian

dicuci dengan PBS dan diinkubasi dalam larutan yang mengandung *antidigoxigenin antibody-peroxidase conjugated* selama 30 menit pada temperatur kamar, kemudian dicuci dengan PBS dan selanjutnya diinkubasi pada larutan *diaminobenzidine*, kemudian dilakukan *counterstain* dengan *methyl green* (Sigma).

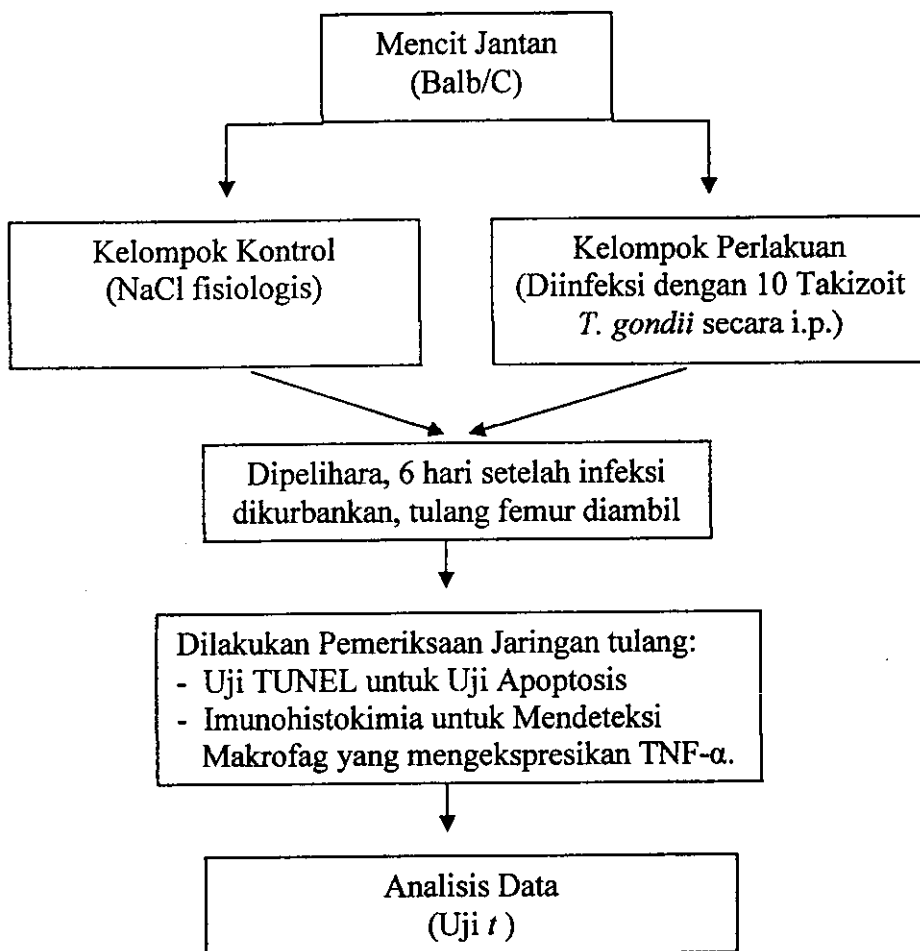
d) Pengecatan imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia menggunakan metode streptavidin dan biotin yang diadopsi dari Burnett and Hunt (2000). Jaringan dalam *embedding paraffin* dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron *Slide* dideparafinisasi dalam xylol 2 kali masing-masing 5 menit dan selanjutnya dimasukkan dalam ethanol absolut 2 kali selama 3 menit, ethanol 95% 2 kali selama 3 menit dan ethanol 70% selama 3 menit dan terakhir dicuci dengan aquabides. *Slide* ditetesi dengan proteinase K selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali, kemudian ditambahkan H₂O₂ 3% selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali dan setiap sayatan diinkubasi dengan antibodi monoklonal terhadap TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, Inc, TNF- α (52B83: sc-52746) selama 30 menit, kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder yang dilabel biotin selama 30 menit dan dicuci 2 kali dengan PBS. Preparat ditetesi dengan streptavidin peroxidase selama 15-30 menit dan dicuci 2 kali dengan PBS dan kemudian dimasukkan ke dalam larutan substrat selama 5-10 menit. Pewarnaan *counterstain*, *slide* dimasukkan dalam hematoxylin 30 detik pada suhu kamar dan dicuci 3 kali dengan dH₂O. Preparat dikeringkan, diberikan perekat dan ditutup dengan gelas penutup dan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X.

e) Analisis Data

Pengaruh infeksi terhadap jumlah persentase sel mesenkimal jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α dan sel tulang yang mengalami apoptotik dianalisis dengan uji *t* (dengan tingkat kemaknaan $\alpha= 0,05$).

Kerangka operasional penelitian tahun ke-1 dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Kerangka operasional penelitian tahun ke-1.

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Jumlah Sel Tulang Femur yang Mengekspresikan TNF- α

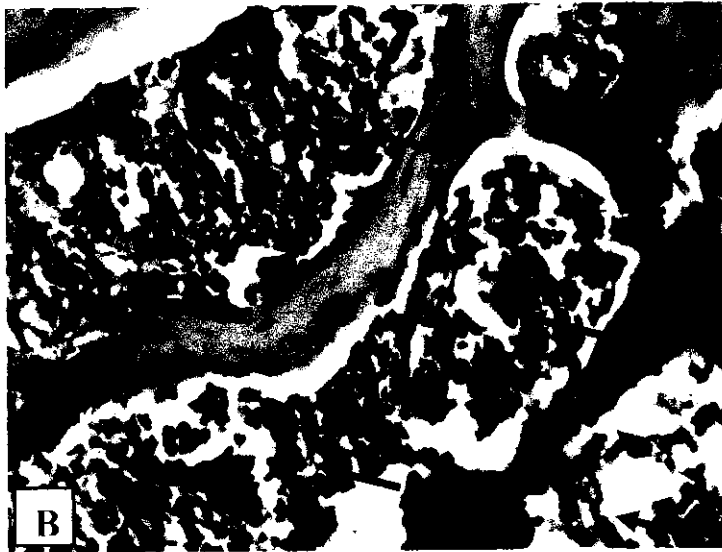
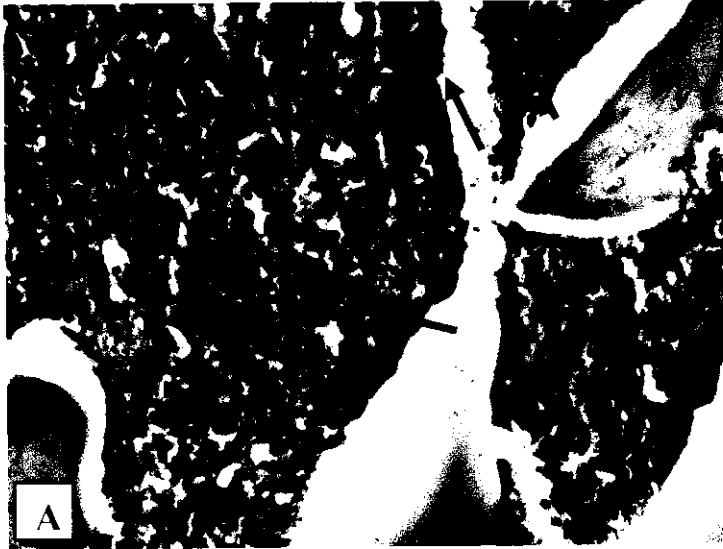
Hasil perhitungan persentase jumlah sel mesenkimal yang mengekspresikan TNF- α ternyata infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α . Hal ini tercermin dari hasil perhitungan jumlah sel tulang femur mencit yang diinfeksi *T. gondii* lebih tinggi lebih dari 2 kali lipat dibandingkan dengan kelompok mencit yang tidak diinfeksi yaitu 27,04% berbanding dengan 11,42%. Setelah dianalisis statistik menggunakan Uji t, kedua kelompok berbeda sangat nyata (Lihat Tabel 5.1 dan Gambar 5.1.).

Tabel 5.1. Rerata dan Simpangan baku Persentase Jumlah Sel Mesenkimal Tulang Femur yang mengekspresikan TNF- α

Perlakuan	Jumlah Sel Mesenkimal Tulang Femur yang mengekspresikan TNF- α (dalam %)
Tidak diinfeksi	11,42 \pm 3,92 ^a
Diinfeksi	27,04 \pm 6,92 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata

Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah makrofag desidua (jaringan plasenta) (Suwanti, 2008) dan sel otot (Mufasirin, 2010) yang mengekspresikan TNF- α . Peningkatan TNF- α pada infeksi *T. gondii* merupakan cascade respons imun tubuh penderita yang dimaksudkan untuk mengeliminasi parasit.

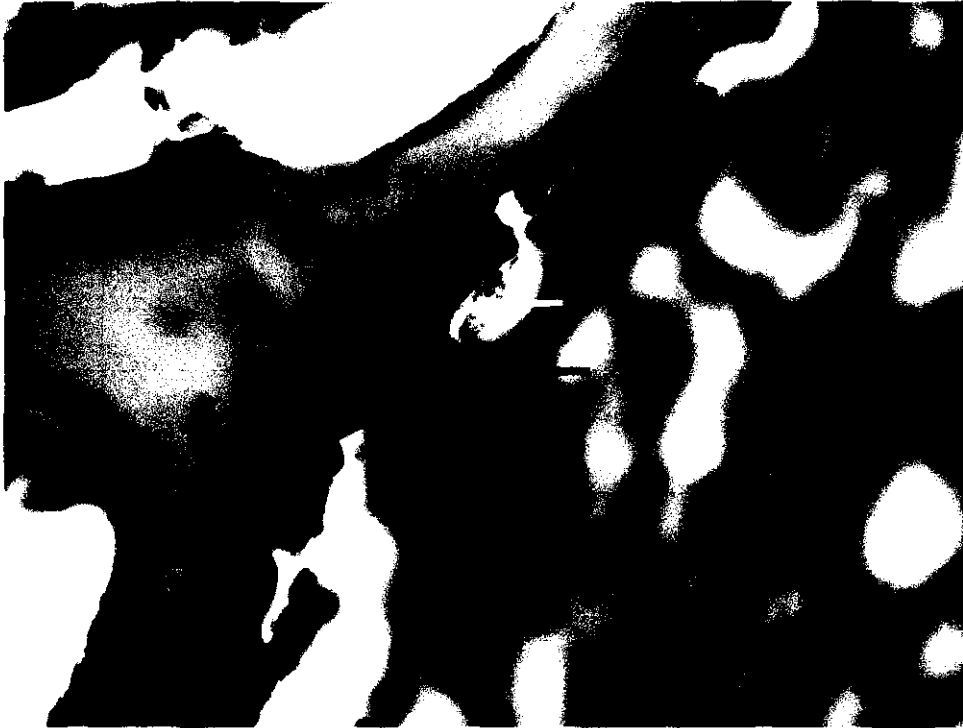


B

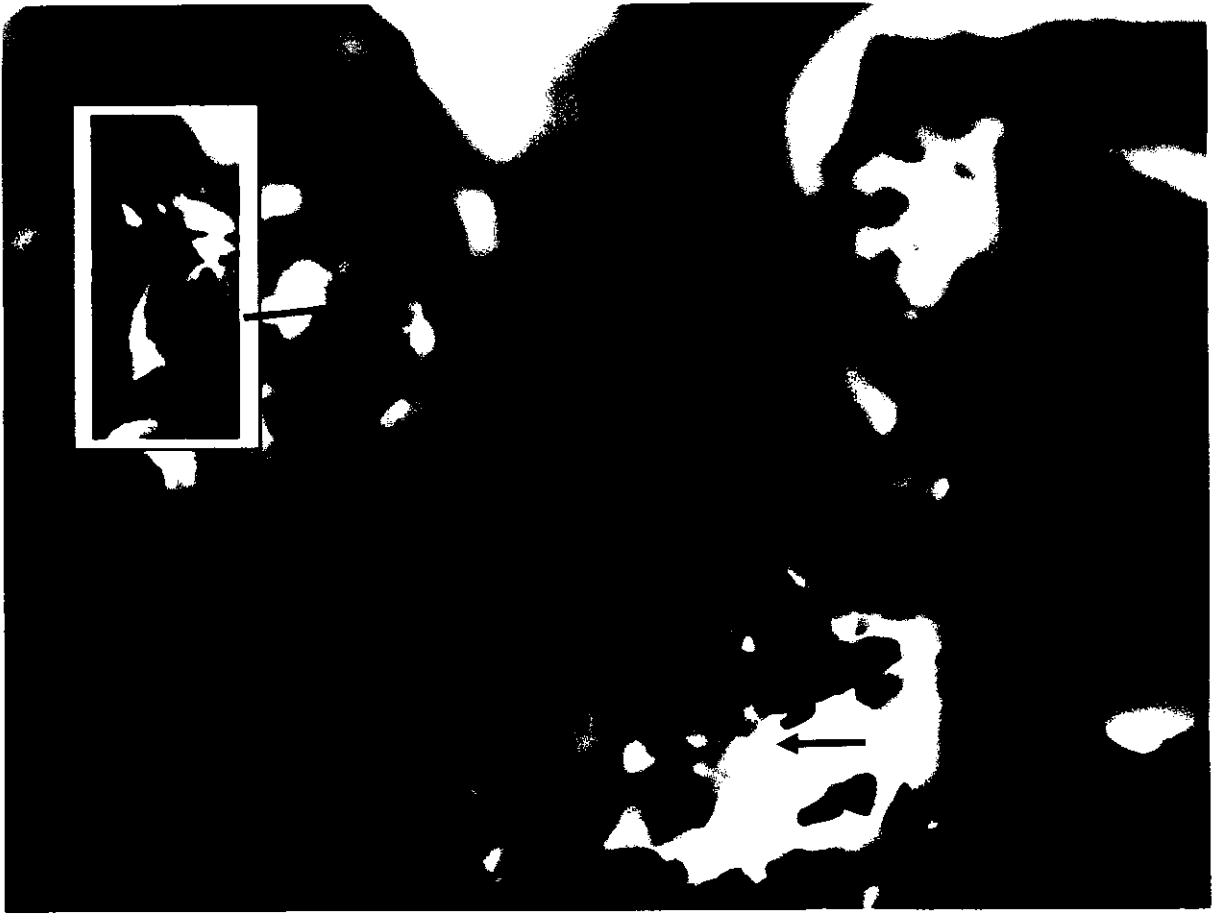
Gambar 5.1 Gambaran Histologi Tulang Femur dengan pengecatan IHC. Perbesaran 400x . A. Kelompok Kontrol. B Kelompok yang diinfeksi *T. gondii*. Anak Panah Hijau : Sel yang ekspresikan TNF- α , Anak Panah Merah: Sel yang negatif

Menurut Kitaura *et al.* (2002), peningkatan TNF- α pada jaringan tulang dapat menginduksi aktivitas osteoklas. Peningkatan TNF- α pada penelitian ini kemungkinan juga menginduksi peningkatan osteoklas hal ini terlihat hasil pengecatan IHC tulang diketemukan osteoklas yang berdekatan dengan sel yang mengekspresikan TNF- α (Gambar 5.2) dan pada hasil pengecatan HE terdapat peningkatan osteoklas pada tulang femur yang

diinfeksi *T. gondii* (Gambar 5.3), sementara pada kelompok control osteoklas jarang ditemukan. Untuk memastikan apakah infeksi *T. gondii* meningkatkan osteoklas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 5.2 . Osteoklas (anak panah kuning) teraktivasi oleh TNF- α yang dikeluarkan oleh sel mesenkimal (anak panah merah)



Gambar 5.3 Osteoklas dengan Pengecatan HE. Perbesaran 1000x. Peningkatan Jumlah Osteoklas pada Tulang femur yang terinfeksi (Anak Panah merah)

5.2 Apoptosis Pada Tulang akibat infeksi *T. gondii*

Dari hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis. Peningkatan hampir 2 kali lipat, pada tulang femur mencit yang diinfeksi indeks apoptosis 16,28 sedangkan pada kontrol 9,17. (lihat Tabel 5.2 dan Gambar 5.4).

Hasil penelitian ini melengkapi penelitian sebelumnya di mana infeksi *T. gondii* meningkatkan indeks apoptosis trofoblas (Suwanti, 2005), sel otot (Mufasirin, 2011), sel

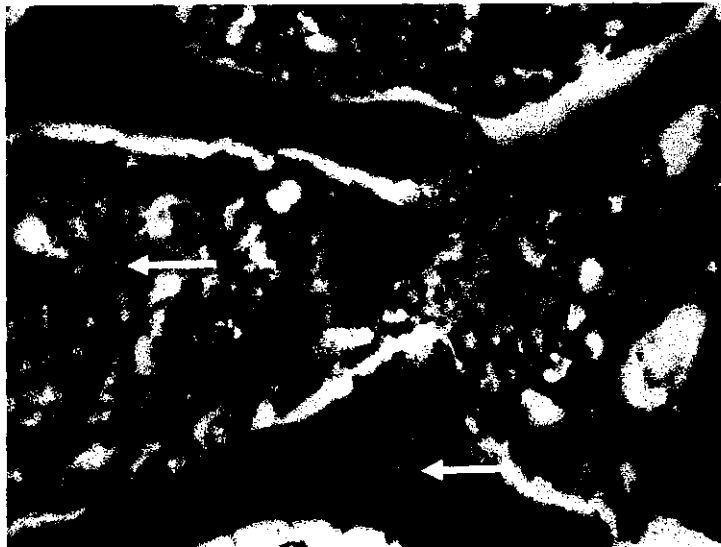
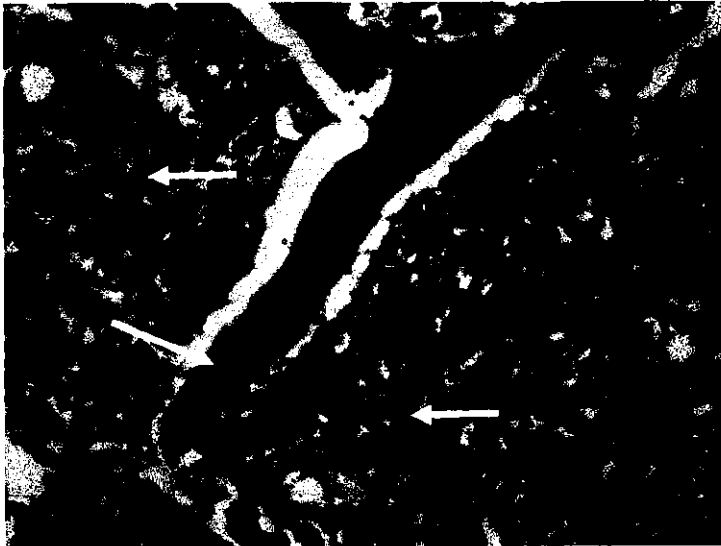
hati (Basuki, 2013; Mordue *et al.* 2001). Sel yang mengalami apoptosis sebagian besar sel mesenkimal, hanya sedikit osteosit yang mengalami apoptosis akibat infeksi *T. gondii*.

Tabel 5.2. Rerata dan Simpangan Baku Indeks Apoptosis Tulang Femur Mencit

Perlakuan	Indeks Apoptosis
Tidak diinfeksi	9,17 ± 3,04 ^a
Diinfeksi	16,28 ± 3,37 ^b

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata

Setelah analisis diteruskan dengan uji regresi linear ternyata peningkatan apoptosis sel tulang pada penelitian ini karena pengaruh peningkatan TNF- α . Pada uji regresi terdapat korelasi positif (R 0,651) antara peningkatan TNF α dengan Indeks Apoptosis. didapatkan persamaan garis $Y = 0,323X + 6,513$ (lihat Lampiran 4). Penelitian ini berbeda dengan penelitian Mordue *et al.* (2001) dan Suwanti (2005) yang mengatakan bahwa meskipun pada infeksi *T. gondii* terjadi peningkatan TNF- α tetapi tidak mempengaruhi secara terjadinya apoptosis langsung. Pada Mordue *et al* (2001) peningkatan apoptosis merupakan reaksi peradangan dan menyebabkan terjadinya nekrosis sel hati, sedangkan hasil Suwati (2005) peningkatan TNF- α bersamaan dengan peningkatan IFN- γ di plasenta menginduksi trofoblas mengekspresikan Fas dan menstimuli Fas lebih sensitive terhadap apoptosis.



Gambar 5.4 Gambaran Sel Tulang Femur dengan pengecatan TUNEL. Perbesaran 400x . A. Kelompok Kontrol. B Kelompok yang diinfeksi *T. gondii*. Anak Panah Kuning : Sel yang normal (hidup), Anak Panah Merah: Sel yang mengalami Apoptosis

BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Penelitian akan dilanjutkan di tahun kedua. Pada tahap kedua bertujuan untuk mengetahui pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap perkembangan tulang pada anak mencit yang dilahirkan oleh induk yang terinfeksi. Hal ini dilakukan karena pengaruh infeksi pada perkembangan embrio menurunkan jumlah somite dan memperpendek panjang embrio (Suwanti dkk, 2010). Somite adalah calon tulang rangka.

Langkah yang akan dilakukan pada tahap kedua adalah:

a) Perbanyak isolat *T. gondii*

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *strain* RH yang didapatkan dari Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. Perbanyak isolat dilakukan pada mencit. Isolat diinjeksikan secara *intraperitoneal* sebanyak 1×10^6 takizoit, kemudian mencit dipelihara selama 3-4 hari. Mencit yang sudah menunjukkan gejala sakit kemudian dikorbankan dengan cara dilakukan dislokasi kapitis. Cairan *intraperitoneal* diambil dengan cara memasukkan 3 ml NaCl fisiologis ke dalam rongga peritoneum dan cairan diambil kembali. Keberadaan stadium takizoit dilihat di bawah mikroskop dan jumlah takizoit dihitung dengan *hemositometer improve Neubauer*.

b) Perkawinan mencit

Sebanyak 10 ekor mencit bunting digunakan dalam penelitian ini. Setiap mencit biasanya mengandung lebih dari 4 ekor fetus. Mencit bunting yang digunakan dalam penelitian mempunyai umur kebuntingan yang sama, didapatkan dengan cara mencit betina yang digunakan dilakukan penyerentakan birahi dengan kombinasi 5 IU PMSG (Folligon, Batch No. 2563304, Intervet International B.V. Boxmeer Holland) dan 5 IU HCG (Chorulon, Batch. No. 2563304, Intervet International B.V. Boxmeer Holland).

Mencit betina diinjeksi secara *intraperitoneal* dengan PMSG dalam 100 µl NaCl fisiologis dan setelah 48 jam, diinjeksi dengan HCG dalam 100 µl NaCl fisiologis dengan cara yang sama. Kemudian mencit dikawinkan dengan pejantan dengan perbandingan satu ekor betina dengan satu ekor pejantan. Keesokan hari, mencit diperiksa terhadap keberadaan *vaginal plug* dan apabila positif ditemukan berarti mencit bunting 0,5 hari (Suwanti, 2005). Mencit dipelihara sampai kebuntingan umur 9,5 hari.

c) Perlakuan

Mencit bunting umur 9,5 hari dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan (P) adalah mencit bunting 9,5 hari diinfeksi dengan *T. gondii* dan kelompok kontrol (K) adalah mencit bunting 9,5 hari yang tidak diinfeksi *T. gondii*. Dosis infeksi adalah 10 takizoit setiap mencit secara *intraperitoneal* yang dilarutkan dalam 100 µl NaCl fisiologis. Kelompok kontrol hanya diinjeksi 100 µl NaCl fisiologis. Induk dipelihara sampai umur kebuntingan 18 hari. Mencit dikurbankan dan 16 jaringan tulang pada batok kepala anak mencit pada masing-masing perlakuan digunakan sebagai sampel penelitian. Jaringan tulang batok kepala disimpan dalam bufer formalin 10% dan selanjutnya dilakukan proses untuk uji apoptosis (Uji TUNEL) dan uji imunohistokimia untuk melihat ekspresi TNF α .

d) Penentuan apoptosis menggunakan uji TUNEL

Penentuan apoptosis dilakukan menggunakan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP-nick end labeling* (TUNEL) yang diadopsi dari Runic *et al.* (1998) dengan ApopTag[®]Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon[®] International, S7101). Jaringan dalam *embedding paraffin* dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron. Sayatan jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sudah diberikan *poly-L-lysine*, kemudian dideparafinisasi selama 2 jam pada suhu 58°C, selanjutnya dilakukan dehidrasi

dengan xylene dan rehidrasi dengan ethanol. Sayatan jaringan kemudian ditambahkan 20 µg/ml proteinase K selama 25 menit pada temperatur kamar, dicuci dengan dH₂O, aktivitas peroksidase internal diblok dengan cara diinkubasi dengan 3% H₂O₂ dalam methanol absolut selama 5 menit. Sayatan jaringan kemudian dicuci dengan PBS dan diinkubasi dalam larutan yang mengandung *digoxigenin* yang dilabel *deoxy-UTP* dan *terminal deoxynucleotidyl transferase* selama 1 jam pada suhu 37°C. Jaringan kemudian dicuci dengan PBS dan diinkubasi dalam larutan yang mengandung *antidigoxigenin antibody-peroxidase conjugated* selama 30 menit pada temperatur kamar, kemudian dicuci dengan PBS dan selanjutnya diinkubasi pada larutan *diaminobenzidine*, kemudian dilakukan *counterstain* dengan *methyl green* (Sigma).

e) Pengecatan imunohistokimia

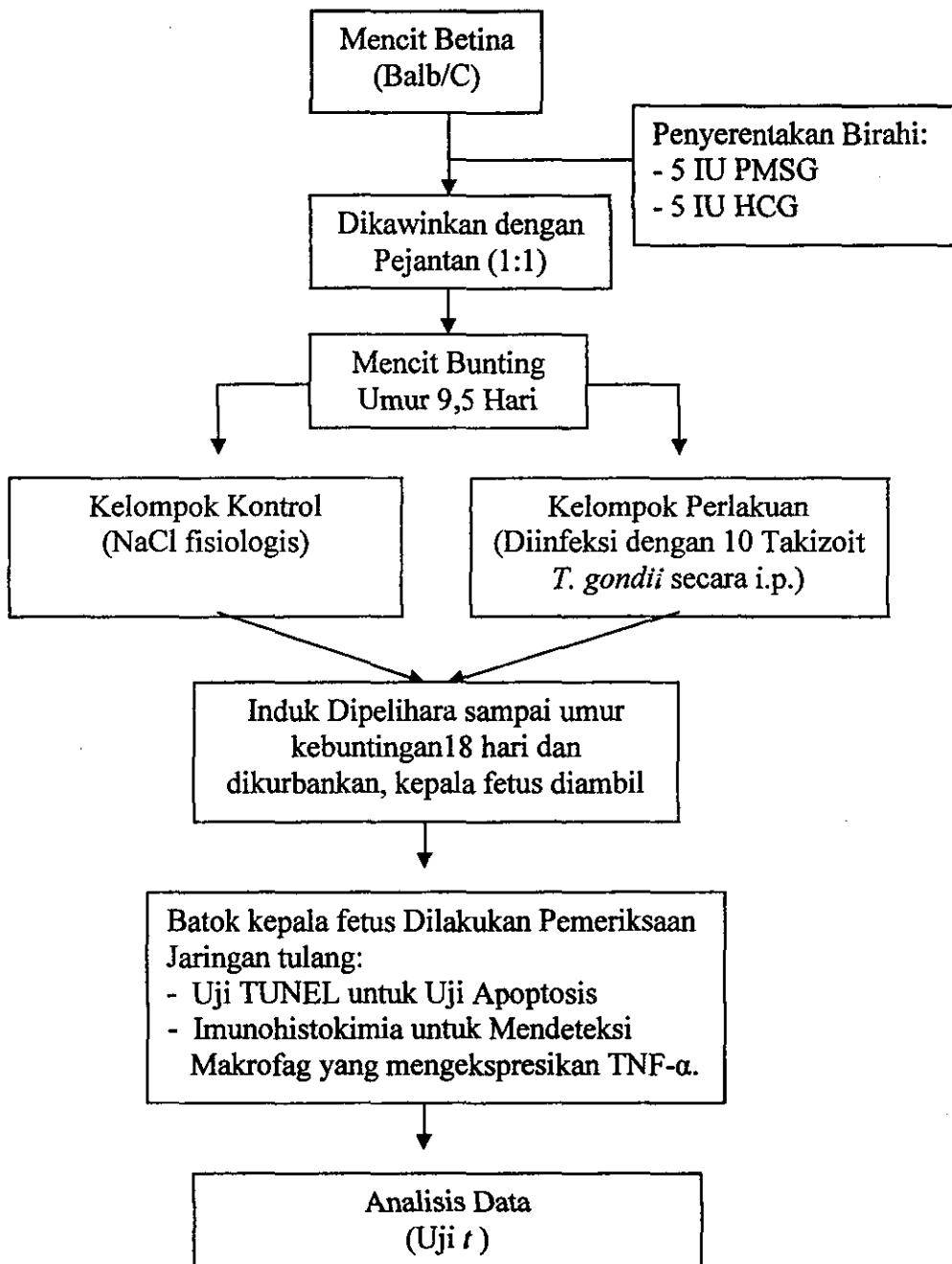
Pengecatan imunohistokimia menggunakan metode streptavidin dan biotin yang diadopsi dari Burnett and Hunt (2000). Jaringan dalam *embedding paraffin* dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron sebanyak 3 sayatan untuk pemeriksaan TNF-α, MyoD dan MMPs. *Slide* dideparafinisasi dalam xylol 2 kali masing-masing 5 menit dan selanjutnya dimasukkan dalam ethanol absolut 2 kali selama 3 menit, ethanol 95% 2 kali selama 3 menit dan ethanol 70% selama 3 menit dan terakhir dicuci dengan aquabides. *Slide* ditetesi dengan proteinase K selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali, kemudian ditambahkan H₂O₂ 3% selama 5 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali dan setiap sayatan diinkubasi dengan antibodi monoklonal terhadap TNF-α (Santa Cruz Biotechnology, Inc, TNF-α (52B83: sc-52746) selama 30 menit, kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder yang dilabel biotin selama 30 menit dan dicuci 2 kali dengan PBS. Preparat ditetesi dengan streptavidin peroxidase selama 15-30 menit dan dicuci 2 kali dengan PBS dan kemudian dimasukkan ke dalam larutan substrat selama 5-10 menit. Pewarnaan

counterstain, slide dimasukkan dalam hematoxylin 30 detik pada suhu kamar dan dicuci 3 kali dengan dH₂O. Preparat dikeringkan, diberikan perekat dan ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X.

f) Analisis Data

Pengaruh infeksi terhadap jumlah persentase makrofag jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α dan sel tulang yang mengalami apoptotik dianalisis dengan uji *t* (dengan tingkat kemaknaan $\alpha= 0,05$).

Kerangka operasional penelitian tahun ke-2 dapat dilihat pada Gambar 6.1.



Gambar 6.1 Kerangka operasional penelitian tahun ke-2.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

- a) Infeksi *T. gondii* pada mencit dapat meningkatkan jumlah sel pada jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- α .
- b) Infeksi *T. gondii* pada mencit dapat meningkatkan jumlah sel jaringan tulang yang mengalami apoptosis
- c) Peningkatan TNF- α . Pada tulang akibat infeksi *T. gondii* berpengaruh langsung terhadap peningkatan indeks apoptosis tulang.

6.2. Saran

- a). Perlu penelitian lanjut pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap gambaran patologi pada tulang anak yang lahir dari induk terinfeksi.
- b) Perlu penelitian lanjut terhadap kemungkinan pengaruh infeksi *T. gondii* terhadap resiko osteoporosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, JM., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281: 1322-1326.
- Aggarwal, B. B., S. Shishodia, K. Ashikawa, and A.C. Bharti, A. 2002. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 1: 327-341
- Adihetty, P.J., and D.A. Hood. 2003. Mechanisms of apoptosis in skeletal muscle. *Basic Appl Myol*. 13: 171-179.
- Arsenijevic, D., L. Girarder, J. Seydoux, JC. Pechere, I. Garcia, H.R. Chang, and A.G. Dulloo. 1998. Metabolic-cytokine response to a second immunological challenge with LPS in mice with *T. gondii* infection. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 274: E439-E445.
- Baker, S.J., and E.P. Reddy. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 17: 3261-3270.
- Bogoyevitch, M.A., D.C. Ng, N.W. Court, K.A. Draper, A. Dhillon, and L. Abas. 2000. Intact mitochondrial electron transport function is essential for signalling by hydrogen peroxide in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 32: 1469-1480.
- Brenner, C., H. Cadiou, H.L. Vieira, N. Zamzami, I. Marzo, Z. Xie, B. Leber, D. Andrews, H. Duclohier, JC. Reed, and G. Kroemer. 2000. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene*. 19: 329-336.
- Cadenas, E., and K.J. Davies. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 29: 222-230.
- Chen, G., and D.V. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 296: 1634-1635.
- Correa, R., I. Cedeno, C. de Escobar, and I. Fuentes. 2008. Increased urban seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infecting swine in Panama. *Vet Parasitol*. 153. 9-11.
- Davitaia, M., A. Telia, and I. Phavlenishvili. 2002. On the Different strategies of Interpersonal Relationships in Case of Deviant Orphanagers. *Ann Biomed Res Edu*. 2: 60-62.
- Deveraux, Q., N. Roy, HR. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, SM. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*. 17: 2215-2223.
- Dubey, J.P. 1990. Status toxoplasmosis in sheps and goats in The United States. *J Am Vet Med Assoc*. 196: 259-262.
- Dupouy-Camet, J. 1997. Immunopathogenesis of toxoplasmosis in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecolog*. 5: 121-127.
- Fatoohi, A. F., G. J. N. Cozon, T. Greenland, J. Ferrandiz, J. Bienvenu, S. Picot, and F. Peyron. 2002. Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 9: 704-709.

- Filiseti, D., and E. Candolfi. 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann 1st Super Sanita*. 40: 71-80.
- Food Safety. 2011. Foodborne Disease reduced economy productivities. <http://www.food-safety-issue.com/2011/03/foodborne-disease-reduced-economy.html>. 27 Mei. *Jam* 15.36.
- Frenkel, J.K. 1990. Toxoplasmosis in human being. *J Am Vet Med Assoc*. 196:240-248.
- Ghaffar, A. 2001. Blood and tissue protozoa, MBIM 650/750 Medical Microbiology. URL: <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/blood-proto.htm>.
- Inoue, I., C.S. Leow, D. Husin, K. Matsuo and P. Darmani. 2001. A Survey of *Toxoplasma gondii* in pigs in Indonesia. *Shoutheast Asian J Trop Med Public Health*. 32: 38-40.
- Jones, J., A. Lopez and M. Wilson. 2003. Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Phisic*, 67:2131-2138.
- Karaca, M., C. Balber, B. Celebi, H.A. Akkan, M.Tutuncu, I. Keles, B.A. Uslu, and S.A. Islic. 2007. Investigation on the seroprevalence of toxoplasmosis, listeriosis and brucellosis in goats living in the region of Van, Turkey. *Yyu Vet Fak Derg*. 18:45-49.
- Kitaura, H., N. Nagata, Y. Fujimura, H. Hotokezaka, N. Yoshida and K. Nakayama. 2002. Effect of IL-12 on TNF- α -Mediated Osteoclast Formation in Bone Marrow Cells: Apoptosis Mediated by Fas/Fas Ligand Interaction. *J. Immunol*. 169 (9): 4732-4738
- Koseki, T., I. Naohiro, S. Chen, and G. Nunez. 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 5156-5160.
- Kumar, S. 1999. Mechanism mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Diff*. 6: 1060-1066.
- Lechardeur, D., L. Dryzmala, M. Sharma, D. Zylka, R. Kinach, J. Pacia, C. Hicks, N. Usmani, JM. Rommens, and GL. Luckas. 2000. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J Cell Biol*. 150: 321-334.
- Li, Y., and M. Reid. 2001. Effect of tumor necrosis factor-[alpha] on skeletal muscle metabolism. *Curr Opin Rheumatol*. 13: 483-487.
- Lozupone E, Palumbo C, Favia A, Ferretti M, Palazzini S, Cantatore FP. (1996) Intermittent compressive load stimulates osteogenesis and improves osteocyte viability in bones cultured "in vitro". *Clin Rheumatol*. 15: 563-72.
- Malik, M.A., D.W. Dressen and A. Cruzz. 1990. Toxoplasmosis in sheep in Northeastern United States. *J Am Vet Med Assoc*. 196: 263-265.
- Maharana, B., M. Panigrahi, R.K. Baithalu, S. Parida and I.M. Allaie. 2010. Toxoplasmosis: beware of cat. *Vet World*. 3: 247-249.
- Masala, G, R. Porcu, L. Madau, A. Tanda, B. Ibba, G. Satta, and S. Tola. 2003. Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol*. 117:15-21.

- McNeill PL (2002) Repairing a torn cell surface: makeway, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci* 115: 873-879. McNeill PL, Steinhardt RA (1997) Loss restoration and maintenance of plasma membrane integrity. *J Cell Biol* 137:1-4.
- Morgan, O., P. Crook, T. Cheasty, B. Jiggle, I. Giraudon, H. Hughes, S. Jones, and H. Maguire. 2006. Perinatal Toxoplasmosis, Northern Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 12: 1460-1461.
- Mufasirin. 2011. Mekanisme berat lahir rendah anak menciit dari induk toksoplasmosis melalui perubahan molekuler sel otot skelet. Disertasi. Program Pascasarjana Unair. Surabaya.
- Mullens, A. 1996. I think we have a problem in Victoria: MDs respond quickly to toxoplasmosis outbreak in BC. *Can Med Assoc J.* 154: 1721-1724.
- Murphy, KM., V. Ranganathan, M.L. Farnsworth, M. Kavallaris, and R.B. Lock. 2000. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* 7:102-111.
- Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6: 1028-1042.
- Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. 2003. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C934-C943.
- Nomura, K., H. Imai, T. Koumura, T. Kobayashi, and Y. Nakagawa. 2000. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J.* 351: 183-193.
- Paspalaki, P.K., E.P. Mihailidou, M. Bitsori, D. Tsagkarakaki and E. Mantzouranis. 2001. Polyomyositis and myocarditis associated with acquired toxoplasmosis in an immunocompetent girl. *Musculoskelet Disord.* 2. 1471-1474.
- Qin, ZH., Y. Wang, E. Kikly, K.B. Sapp, N. Kegel, Aronin, and M. Difiglia. 2001. Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into the cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem.* 276: 8079-8086.
- Runic, R., CJ. Lockwood, L. LaChapelle, B. Dipasquale, RI. Demopoulos, A. Kumar and S. Guller. 1998. Apoptosis and fas expression in human fetal membranes. *J Clin Endocr Metabol.* 83: 660-666.
- Salvesen, G.S., and V.M. Dixit. 1999. Caspase activation: the induced proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 10964-10967.
- Sanjaya A. 2006. Studi Uji Komparasi Hasil Pemeriksaan Metode ELISA dan Aglutinasi Latex dalam Pemeriksaan Antibodi IgG *Toxoplasma gondii* pada Wanita Hamil Di Puskesmas Pegirian Surabaya. JIPTUNAIR (tesis Unair).
- Sasmita, R. dan E. Suprihati. 1993a. Sigi prevalensi antibodi *Toxoplasma* pada kambing di Tuban dan Kediri, Jawa Timur. *Bulletin IPKHI.* 3:11-20.
- Sher, A., E.Y. Denkers, and R.T. Gazzinelli. 1995. Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*. *Ciba Found Symp.* 195: 95-109.

- Stuebe, A.M. 2005. Review: Pregnancy Health Center. Department of Obstetrics and Gynecology, Brigham and Women's Hospital, Boston.
- Suwanti, L.T. 2005. Mekanisme Peningkatan Apoptosis Trofoblas Mencit Terinfeksi *Toxoplasma gondii* melalui Peningkatan Desidua Penghasil IFN- dan TNF- serta Trofoblas Penghasil FAS dan TNFR-1. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Szeredi, L., and A. Bacsadi. 2002. Detection of *Chlamydia* (*Chlamydia*) *abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin–biotin method. *J Comp Pathol.* 127: 257-263.
- Wang R, Zagariya A, Ang E, Ibarra-Sunga O, Uhal BD. 1999. Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am J Physiol* 277: 1245-1250.
- Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. 2000. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2907-2912.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data

Nomor	Persentase Sel yang mengekspresikan TNF alfa		Indeks Apoptosis	
	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi	Tidak Diinfeksi	Diinfeksi
1	20.00	20.00	10.00	16,11
2	10.00	18.00	11,11	21,67
3	10.00	23.33	11,11	13,89
4	20.00	26.67	9,44	15,56
5	10.67	33.33	11,11	21,11
6	9.33	33.33	7,77	14,44
7	8.00	25.33	10,00	15,56
8	13.33	38.67	3,33	14,44
9	10.00	20.00	10,56	13,89
10	11.33	26.67	6,67	17,78
11	12.00	36.67	10.00	16,67
12	12.67	38.67	9,44	17,78
13	6.67	20.00	7,77	13,86
14	8.00	24.67	6,11	8,33
15	7.33	23.33	5,56	18,89
16	13.33	24.00	16,67	20,56

Lampiran 2. Perhitungan Statistik Peningkatan TNF- α

T-Test

Group Statistics

	Infeksi Toxoplasma gondii	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Jumlah Sel yang mengekspresikan TNF- α	Tidak infeksi	16	11,41625	3,916622	,979156
	infeksi	16	27,04188	6,920356	1,730089

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
TNF- α	Equal variances assumed	6,369	,017	-7,860	30	,000	-15,625625	1,987952	-19,685565	11,565685
	Equal variances not assumed			-7,860	23,715	,000	-15,625625	1,987952	-19,731167	11,520083

Lampiran 3. Perhitungan Statistik Indeks Apoptosis

T-Test

Notes

Output Created		22-Okt-2013 06:59:47
Comments		
Input	Data	D:\UPT 2013 Apoptosis Tulang\TNF Tulang Data.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	32
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.
Syntax		T-TEST GROUPS=Periakuan(1 2) /MISSING=ANALYSIS /VARIABLES=Apoptosis /CRITERIA=CI(.95).
Resources	Processor Time	0:00:00.032
	Elapsed Time	0:00:00.046

Group Statistics

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Indeks Apoptosis	Tidak infeksi	16	9,1656	3,03706	,75927
	infeksi	16	16,2838	3,37128	,84282

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Indeks Apoptosis	Equal variances assumed	,217	,645	-6,275	30	,000	-7,11813	1,13439	-9,43485	-4,80140
	Equal variances not assumed			-6,275	29,679	,000	-7,11813	1,13439	-9,43590	-4,80035

Lampiran 4. Perhitungan Statistik Regresi Peningkatan TNF- α terhadap Indeks Apoptosis

Regression

Notes

Output Created		22-Okt-2013 08:46:48
Comments		
Input	Data	D:\UPT 2013 Apoptosis Tulang\TNF Tulang Data.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	32
Missing Value Handling	Definition of Missing Cases Used	User-defined missing values are treated as missing. Statistics are based on cases with no missing values for any variable used.
Syntax		REGRESSION /MISSING LISTWISE /STATISTICS COEFF OUTS R ANOVA /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10) /NOORIGIN /DEPENDENT Apoptosis /METHOD=ENTER TNFalfa.
Resources	Processor Time	0:00:00.031
	Elapsed Time	0:00:00.032
	Memory Required	1380 bytes
	Additional Memory Required for Residual Plots	0 bytes

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
-------	-------------------	-------------------	--------

1	Jumlah Sel yang mengekspresikan TNF-alfa ^a		Enter
---	---	--	-------

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Indeks Apoptosis

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,651 ^a	,424	,405	3,70302

a. Predictors: (Constant), Jumlah Sel yang mengekspresikan TNF-alfa

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	302,812	1	302,812	22,083	,000 ^a
	Residual	411,370	30	13,712		
	Total	714,181	31			

a. Predictors: (Constant), Jumlah Sel yang mengekspresikan TNF-alfa

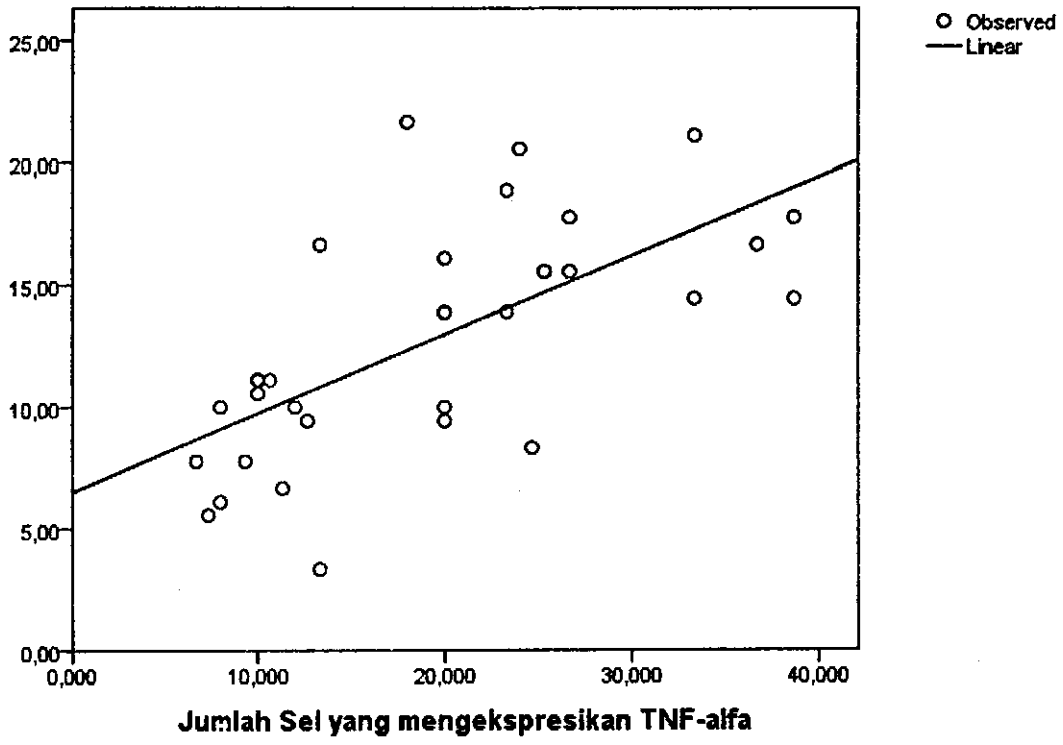
b. Dependent Variable: Indeks Apoptosis

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	6,513	1,475		4,415	,000
	Jumlah Sel yang mengekspresikan TNF-alfa	,323	,069	,651	4,699	,000

a. Dependent Variable: Indeks Apoptosis

Indeks Apoptosis





KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
Animal Care and Use Committee (ACUC)

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

No : 259-KE

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :

PENELITIAN BERJUDUL : Peran TNF α pada Apoptosis Tulang Mencit yang
Diinfeksi *Toxoplasma gondii*

PENELITI UTAMA : Lucia Tri Suwanti

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
PENELITIAN LPPM Universitas Airlangga Surabaya

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 22 Mei 2013

Ketua,

Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh.
NIP. 196609201992031003



Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh.
NIP. 195312161978062001