

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *In Vitro Maturation* (IVM)

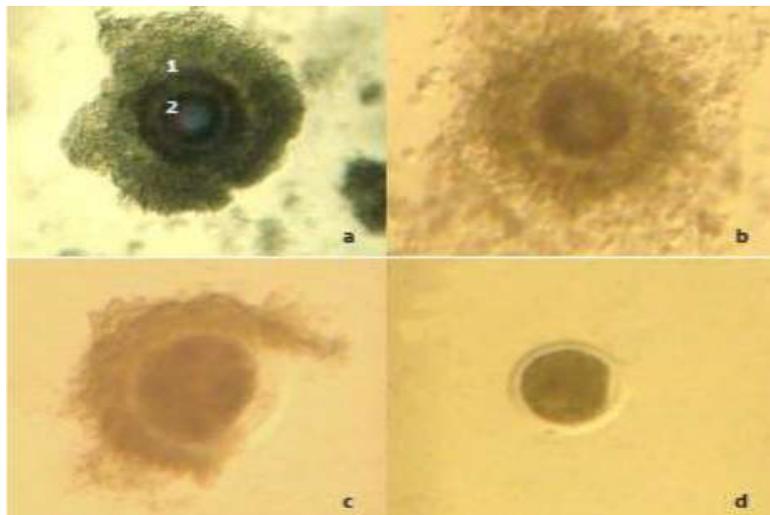
In vitro maturation (IVM) adalah suatu proses yang perlu dilalui oleh oosit agar oosit mengalami perubahan struktur dan biokimiawi menjadi fase *metaphase II* melalui pembelahan meiosis secara *in vitro* (Anthony *et al.*, 2011). Umumnya oosit yang dikoleksi dari ovarium adalah oosit primer, oleh karena itu diperlukan suatu proses kultur yang dikenal dengan nama IVM. Kualitas oosit dan keberhasilan oosit berkembang menjadi fase *metaphase II* secara *in vitro* dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya adalah kondisi donor, transportasi ovarium, seleksi folikel dan IVM (Gordon, 2003).

Kualitas oosit yang digunakan untuk proses *maturasi in vitro* akan sangat mempengaruhi keberhasilan *in vitro fertilization* (IVF) selanjutnya. Jika salah satu dari faktor-faktor tersebut tidak ditangani dengan baik dapat menyebabkan abnormalitas pada hasil IVF dan pembentukan embrio. Transportasi ovarium merupakan tahap awal dari proses produksi embrio secara *in vitro* yang menjadi faktor penting karena dapat mempengaruhi kualitas oosit. Penanganan pada ovarium terdiri dari tiga faktor, yaitu faktor suhu, faktor waktu dan medium penyimpanan (Gordon, 2003). Ketiga faktor ini penting karena penyimpanan ovarium tanpa suplai darah dapat menurunkan kualitas oosit.

2.1.1 Maturasi Oosit

Oosit dikelilingi oleh sel-sel granulosa yang disebut sel-sel kumulus membentuk kompleks kumulus oosit (COC) (Chian *et al.*, 2003). Kualitas oosit sangat berpengaruh terhadap tingkat maturasi yang dihasilkan. Kualitas oosit diklasifikasikan menjadi empat (Gambar 2.1) yaitu Kualitas A : Kumulus berlapis

padat yang mempunyai lebih dari tiga lapisan dan ooplasma homogen; Kualitas B: Lapisan kumulus padat, satu sampai tiga lapis dengan ooplasma homogen, memiliki penampakan kasar dan zona pelucida yang berwarna lebih gelap; Kualitas C: Lapisan kumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki lapisan gelap; serta Kualitas D: Oosit gundul tanpa lapisan cumulus (Amer *et al.*, 2008). Oosit dengan morfologi bagus, yaitu sel kumulus berlapis lapis, kompak, ooplasma homogen, penampakan COC terang dan transparan, serta adanya zona pelucida (ZP) yang intak menghasilkan lebih banyak oosit yang matang setelah *In Vitro Maturation* (IVM) (Rahman *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Morfologi oosit sapi immatur. (a) oosit sapi kualitas A, (b) oosit sapi kualitas B, (c) oosit sapi kualitas C, (d) oosit sapi kualitas D. (kumulus ooporos, (2) ooplasma oosit (Budiyanto, 2013).

Maturasi oosit meliputi maturasi inti dan maturasi sitoplasma. Selama maturasi oosit, struktur kromatin dalam oosit immatur melewati suatu proses penyusunan morfologi yang dimulai pada profase pembelahan meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase kedua (Kusindarta, 2009). Metaphase kedua ditandai dengan migrasi kortika granula ke oolemma, peningkatan mitokondria

dan lipid droplet yang menyebabkan perubahan susunan aparatus golgi dan keberadaan retikulum endoplasmik granulas, aktivitas *Maturation Promoting Factor* (MPF) dan metabolisme oosit (Rahman *et al.*, 2006).

Pematangan oosit didefinisikan sebagai inisiasi dan penyelesaian meiosis pertama dari tahap *germinal vesicle* (GV) menjadi metaphase II, dengan disertai pematangan sitoplasma untuk fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Pematangan oosit secara konseptual dibagi menjadi pematangan nukleus dan pematangan sitoplasma. Pematangan nukleus mengacu pada kembalinya meiosis dan perkembangan menjadi *metaphase II*. Pematangan sitoplasma mengacu pada persiapan oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrio. Pematangan nukleus dikendalikan oleh pematangan sitoplasma (Chian *et al.*, 2003).

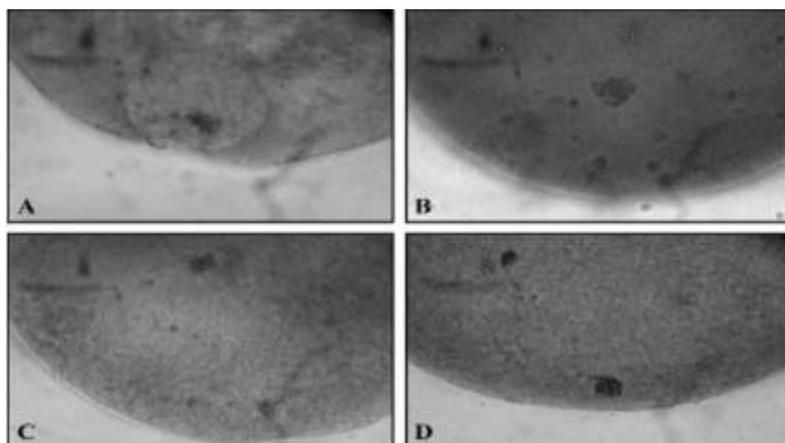
Oosit yang matang ditandai dengan sejumlah kriteria seperti migrasi kortikal granula ke oolemma, peningkatan mitokondria dan lipid droplet yang akan menyebabkan perubahan susunan aparatus golgi dan keberadaan retikulum endoplasmik granular (Rahman *et al.*, 2006), adanya aktivitas *maturation promoting factor* (MPF) (Rahman *et al.*, 2006; Kakisina dan Indra, 2008), ekspansi sel-sel kumulus, *germinal vesicle break down* (GVBD), ekstrusi first polar body (Gordon, 2003).

2.1.1 Maturasi Inti Oosit

Oosit dan sel kumulus yang dihubungkan gap junction menunjukkan bahwa sel-sel granulosa mengontrol GVBD melalui sel kumulus. Gap junction mengatur regulasi molekul seperti steroid, Ca^{2+} , inositol 1,4,5-trophosphate (IP3), Camp, dan purin untuk bebas berada pada antar sitoplasma oosit dan sel kumulus. Sintesis protein dibutuhkan untuk perkembangan oosit dari tahap GV ke MII (metaphase II), serta untuk pemeliharaan mempertahankan MII. Protein

sitoplasma, MPF, dan faktor sitostastik mengatur pematangan inti oosit (Chian *et al.*, 2003).

Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke metaphase II. Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk *Germinal Vesicle* (GV) kemudian mengalami pelepasan membran inti membentuk *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Setelah GVBD terjadi, kromosom dibungkus oleh *mikrotubulus* dan *mikrofilament* yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap *metaphase I* (MI). Pada oosit sapi metaphase I terjadi setelah 12-14 jam inkubasi dan diikuti oleh tahap *anaphase I* (AI) dan *telophase I* (TI) yang berlangsung relatif singkat (14-18 jam) setelah masa inkubasi (Chohan and Hunter, 2003). Tahap *metaphase II* (MII) akan terjadi dan ditandai dengan terbentuknya badan *polar body I* dan *metaphase plate* (Gordon, 2003).



Gambar 2.2 Klasifikasi oosit dengan pewarnaan aceto orcein. (A) *Germinal vesicle* (GV); (B) *germinal vesikel breakdown* (GVBD); (C) *metaphase I* (MI); (D) *metaphase II* (MII). Dengan perbesaran 100 x (Prentice-Biensch *et al.*, 2012).

2.1.2 Maturasi Sitoplasma Oosit

Maturasi sitoplasma oosit mencakup kejadian-kejadian pada kemampuan oosit untuk melengkapi pematangan inti, fertilisasi dan awal embriogenesis serta mempersiapkan suatu dasar untuk implantasi, inisiasi kebuntingan dan perkembangan fetus normal (Sirard *et al.*, 2006).

Maturasi sitoplasma meliputi beragam metabolik dan modifikasi struktural, termasuk peristiwa yang menjamin terjadinya pembuahan normal, meiosis mitosis untuk progresi siklus sel, dan aktivasi jalur diperlukan untuk program genetik dan epigenetik dari perkembangan embrio praimplantasi. Maturasi sitoplasma juga meliputi akumulasi protein mRNA, perkembangan regulasi Ca^{2+} , perubahan aktivitas dari *maturation promoting factor* (MPF), *nitrogen activated protein kinase* (MAPK) dan redistribusi organel seluler (Anguita *et al.* 2007). Hal ini dibutuhkan untuk membantu kemampuan perkembangan oosit dan juga membantu kemampuan perkembangan embrionik (Watson, 2007).

2.2 Ovarium

Ovarium adalah organ reproduksi betina yang terletak di ruang abdomen seekor hewan. Pada domba bentuk ovarium seperti kacang almond. Ovarium dapat bekerja sebagai organ eksokrin (menghasilkan sel telur) dan endokrin (menghasilkan hormon). Ovarium dibagi menjadi dua bagian, yaitu kortek dan medula. Sebagian besar ovarium didominasi oleh kortek. Kortek dilapisi oleh simple squamous dan epitelium kuboid. Di bagian yang lebih dalam terdapat jaringan yang tidak beraturan yang disebut tunika albuginea. Tunika albuginea berhubungan dengan stroma ovarium yang terdiri dari jaringan ikat longgar yang mengandung folikel dan korpus luteum. Sedangkan daerah medula terdiri atas

pembuluh darah, pembuluh limfe, saraf, jaringan ikat dan otot polos (Schatten and Gheorghe, 2007). Pada saat fetus, ovarium menghasilkan oogonia melalui pembelahan mitosis. Sekitar 1 (satu) juta oosit berkembang setelah fetus dilahirkan namun hanya beberapa ratus oosit yang akan diovulasikan. Umumnya oosit akan berkurang karena mengalami degenerasi dan atresia (Schatten dan Gheorghe, 2007).

2.3 Oogenesis dan Folikulogenesis

Oogenesis merupakan proses pembentukan gamet betina atau oosit. Proses ini bersamaan dengan proses pembentukan folikel yang dikenal dengan folikulogenesis. Folikel primordial yang telah terbentuk sewaktu di dalam kandungan maupun setelah lahir akan terus berkembang dan mengalami pematangan, ovulasi ataupun degenerasi (Hafez, 2000).

Pada saat hewan lahir, ovarium memiliki sejumlah folikel primordial yang akan berkembang pada saat pubertas. Folikel ini mengandung oosit dengan inti berada pada tahap profase dari pembelahan meiosis pertama (oosit primer). Setelah pubertas, folikel primordial berkembang menjadi folikel primer. Pembentukan folikel dibagi menjadi empat fase: primordial, primer, sekunder dan tertier (Schatten & Gheorghe 2007). *Follicle stimulating hormone* (FSH) dilepaskan dari pituitari anterior untuk menstimuli perkembangan folikel primer menjadi sekunder, tersier dan akhirnya mencapai bentuk folikel de Graaf. Folikel primer terbentuk, dimulai dari sel epitel yang mengelilingi oosit berubah bentuk dari pipih menjadi kuboid (Schatten dan Gheorghe, 2007). Awalnya sel folikel berhubungan erat dengan oosit, kemudian terbentuk zona pelusida yang berasal dari suatu lapisan zat

seluler dan terdiri dari mukopolisakarida diendapkan pada permukaan oosit (Thomas dan Joanna, 2002).

Sel folikel mulai berproliferasi dengan membentuk suatu lapisan seluler yang tebal yang mengelilingi oosit. Selanjutnya dibawah pengaruh gonadotropin dari hipofise anterior, sel-sel folikel terus berkembang menjadi beberapa lapis seluler hingga membentuk ruang-ruang yang disebut antrum folikel, ini dikenal sebagai folikel sekunder (Gordon, 2003). Folikel yang matang dikenal sebagai folikel tersier, yang dikelilingi oleh dua lapisan jaringan ikat yaitu teka interna dan teka externa. Teka interna adalah lapis bagian dalam yang menghasilkan estrogen dan kaya dengan pembuluh darah sedangkan teka eksterna adalah lapis luar yang berangsur-angsur akan bersatu dengan stroma ovarium. Antrum folikel akan terus bertambah besar seiring dengan perkembangan folikel tersier sampai menjelang ovulasi. Pada saat ini folikel tertier disebut folikel de Graaf (Thomas dan Joanna, 2002).

2.4 Urea

Pada saluran pencernaan ternak ruminansia terdapat mikroba salah satunya dalam rumen. Mikroba dalam rumen merubah pakan melalui proses enzimatik pada pakan yang dikonsumsi ternak, termasuk protein. Protein pakan yang masuk kedalam rumen akan difermentasi oleh mikroorganisme proteolitik. Mikroorganisme proteolitik tersebut menghasilkan enzim proteolitik seperti protease, peptida, dan deaminase untuk mendegradasi protein menjadi asam amino, peptida dan amonia (Pamungkas dkk., 2008). Ketika pakan masuk kedalam rumen, fraksi NPN akan seketika berubah menjadi amonia (NH_3). Amonia yang dihasilkan akan digunakan oleh mikroba rumen untuk berkembang

biak dan menjadi sumber protein pada ternak. Sebagian amonia dibawa darah ke hati dan kemudian dikonversi ke urea (Gulliński *et al.*, 2014).

Asam amino adalah perantara utama dalam degradasi dan asimilasi N dalam rumen. Penggunaan amonia memungkinkan mikroba rumen mendaur ulang sejumlah besar urea dari metabolisme perantara, sebagai sumber N untuk sintesis protein mikroba bila jumlah energi yang tersedia cukup. Kompleks nitrogen lainnya juga dapat didaur ulang melalui air liur atau lapisan rumen seperti metabolit purin dan mucoprotein. Adaptasi evalusioner ruminansia ini secara efektif mengurangi N minimal yang dibutuhkan dan meningkatkan waktu bertahan hidup hewan yang kekurangan gizi (Nolan and Dobos, 2005).

Amonia merupakan sumber N utama bagi mikroba untuk sintesis protein mikroba rumen. Konsentrasi amonia yang tinggi di dalam rumen menunjukkan proses degradasi protein pakan lebih cepat daripada proses pembentukan protein mikroba sehingga terjadi akumulasi NH_3 (McDonald *et al.*, 2002). Protein pakan yang mengalami degradasi di dalam rumen akan kehilangan fungsinya sebagai sumber asam amino karena proses deaminasi akan memisahkan gugus amonia dari rantai karbon utamanya (Haryanto, 2012).

Daur ulang urea secara signifikan berhubungan dengan produksi NH_3 dan penyerapan saluran pencernaan pada ruminansia. Keseluruhan NH_3 diserap melalui epitel rumen, mukosa usus halus, dan mukosa usus besar yang melalui vena porta masuk ke dalam hati, Bagian jaringan NH_3 juga masuk ke hati. Metabolisme hati memiliki peran pokok dalam integrasi metabolisme N. Amonia didetoksifikasi dalam hati dengan cara mengkonversi menjadi urea, yang kemudian urea dapat didaur ulang langsung ke dalam rumen, usus halus, atau usus

besar. Urea ini dapat masuk ke dalam rumen dalam saliva, diekskresikan oleh ginjal, susu dan keringat (Alio *et al.*, 2000).

Dalam mitokondria, NH_3 bebas akan berikatan dengan CO_2 dan H_2O yang dibantu dengan 2ATP akan bereaksi yang kemudian akan membentuk carbamyl phosphate, kemudian carbamyl phosphate akan memberikan gugus karbamoil kepada ornitin untuk membentuk sitrulin dan membebaskan fosfatnya, dalam suatu yang dikatalisis oleh ornitin transkarbamoilase yang terdapat pada bagian mitokondria sel hati, yakni enzim mitokondria hati yang memerlukan Mg^{2+} . Sitrulin yang terbentuk kemudian meninggalkan mitokondria menuju ke dalam sitosol sel hati. Gugus asam amino kedua hadir dalam bentuk L-aspartat yang sebaliknya diberikan dari L-glutamat oleh kerja aspartat transaminase. L-glutamat tentu menerima gugus asam amino dari asam amino umum lainnya oleh transmisi menjadi α -ketoglutarat. Pemindahan gugus amino kedua ke sitrulin dengan adanya ATP, untuk membentuk aginosuksinat. Reaksi ini dikatalisa oleh arginosuksinat sintetase sitosol hati, suatu enzim yang tergantung kepada Mg^{2+} . Selanjutnya sitrulin bereaksi dengan asam aspartat membentuk asam argininosuksinat. Reaksi ini berlangsung dengan bantuan enzim argininosuksinat sintese. Dalam reaksi tersebut ATP merupakan sumber energi dengan jalan melepaskan gugus fosfat dan berubah menjadi AMP (Nourozi *et al.*, 2010).

2.5 *Bcl-2* (*B-Cell Lymphoma*)

Bcl-2 merupakan *B-cell lymphoma / leukemia-2* dan protein kedua dari berbagai protein yang ditemukan pada limfoma. Sesuai dengan namanya, gen ini ditemukan karena keterlibatannya dalam keganasan sel-B, dimana terjadi

translokasi kromosomal yang kemudian mengaktifkan sebagian besar gen pada non-Hodgkin's sel-B limfoma folikuler (Bronchud, 2004).

Gen *Bcl-2* memiliki lebih dari 230 kb dari DNA dan terdiri dari tiga exons yang mana exon 2 dan sebagian kecil dari exon 3 mengkode protein. *Bcl-2* mengkode 2 mRNA, yaitu *Bcl-2 α* dan *Bcl-2 β* , yang mana hanya *Bcl-2 α* yang sepertinya memiliki relevansi biologis. Protein *Bcl-2* memiliki berat molekul 26 kDa terletak pada bagian sitosolik dari amplop nuklear, retikulum endoplasma dan bagian luar membran mitokondria dan sitoplasma (Elmore, 2007 dan Ignae *et al.*, 2002).

Berdasarkan dari struktur dan fungsi, protein *Bcl-2* adalah suatu regulator utama pada proses apoptosis meliputi antiapoptosis dan proapoptosis. Saat ini ada 18 anggota family *Bcl-2* yang telah diidentifikasi dan dibagi kedalam 3 grup, yaitu (1) *The anti apoptotic channel-forming* protein meliputi *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Mcl-1*, (2) *The proapoptotic channel-forming* protein diwakili *Bax* (*Bcl-2 associated x protein*) dan *Bak* (*Bcl-2 associated killer*), aktifitas dari kelompok sub grup ini bersifat menstimulasi pelepasan Cytochrom C dari membran mitokondria, (3) *The proapoptotic channel-forming* protein yaitu *Bid* (*BH3 interacting domain death agonist*), *Bik*, *NOxa*, *Puma*, *Hrk*, *BNIP3*, *Bad* (*Bcl-2 associated death-only death promoter*) merupakan molekul proapoptosis. Protein kelompok ini mendorong kematian sel sebagai protein adaptor yang terikat pada jalur upstream untuk memutuskan berlangsungnya program apoptosis (Walensky, 2008).

Bcl-2 dapat memperpanjang hidup sel. Ekspresi protein ini seringkali berlebihan pada berbagai keganasan meskipun tanpa adanya translokasi kromosom t yang mengakibatkan perubahan gen *Bcl-2*. Resistensi obat bisa

terjadi oleh karena meningkatnya ekspresi *Bcl-2*, kanker. Paparan yang berlebihan *Bcl-2* bisa menyebabkan suatu keadaan terjadinya kemoresisten (Ghobrial *et al.*, 2005).

Famili protein *Bcl-2* merupakan regulator apoptosis jalur intrinsik yang bekerja dengan mengontrol pelepasan Cytochrome C dan protein intermembran mitokondria lainnya ke sitosol. Beberapa protein *Bcl-2* merupakan pro-apoptosis yang memicu apoptosis dengan meningkatkan pelepasan Cytochrome C ke sitosol, sedangkan protein *Bcl-2* lainnya merupakan anti-apoptosis yang menghambat apoptosis dengan menghambat pelepasan Cytochrome C ke sitosol. Protein *Bcl-2* yang termasuk protein anti-apoptosis antara lain *Bcl-2*, *Bcl-Xl*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, dan *A1* (Alberts *et al.*, 2008).

Protein yang berperan dalam apoptosis yaitu BH1, BH2, BH3, BH4, artinya satu gen yang terdiri dari beberapa lobus. Bila yang dinyalakan BH1, BH2, BH3, BH4 maka akan menjadi *Bcl-2/Bcl-Xl* yang merupakan anti-apoptosis. Kalau yang dinyalakan BH1, BH2, BH3 (atau hanya BH3) maka akan menjadi pro-apoptosis.

Pro-survival / anti apoptosis (*Bcl-2*, *Bcl-Xl*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *A1*) dikepeng oleh pro-apoptosis (molekul yang menginduksi apoptosis: Bim, Puma, tBid, Bad, Noxa, Bax) pro-apoptosis yang disbanding oleh gen yang sama tapi terjadi alternatif splicing sehingga gen yang sama tetapi *splicing* berbeda bisa menjadi protein yang berbeda. Sehingga gen yang sama tetapi karena splicing yang berbeda bisa menjadi pro/anti-apoptosis.

Anti apoptotic menghambat supaya BH123 tidak bergabung menjadi satu supaya Cytochrom C tidak keluar. Selanjutnya karena adanya apoptotic stimulus sehingga BH123 mengumpul jadi satu akan memberikan jalan ke Cytochrom C

untuk menginduksi terjadinya apoptosis. Tetapi ada juga ada apoptosis stimulus yang meng-inaktivasi Bcl2 sehingga BH123 tetap menjadi satu dan Cytochrom C terlepas.

Pada kondisi sel yang normal, cytochrome c hanya ada pada mitochondria (dalam sel) karena dijaga oleh *Bcl-2* protein supaya permeabilitas mitokondria selalu terjaga. Sebenarnya antara yang pro dan anti apoptosis selalu bersaing. Sehingga kalau banyak yang anti-apoptosis maka membrane mitokondria akan tetap intake dan Cytochrom C tidak keluar. Tetapi kalau produksi *Bax* berlimpah, maka akan mengganggu permeabilitas dan Cytochrom C keluar, sehingga apoptosis dimulai.

2.6 *Bax (Bcl-2 associated x protein)*

Bax dan *Bak* sifatnya sebagai regulator apoptosis pada sel (sebagai apoptosis promoter). Mereka terletak di dalam mitokondria dan reticulum endoplasma dan mengaktifkan kaspase untuk mengatur jalur apoptosis (Allaire *et al.*, 2000).

Bax merupakan salah satu protein penting yang berperan pada proses apoptosis dan termasuk famili dari *Bcl-2*, apoptosis seperti halnya karsinogenesis berhubungan dengan berbagai gen yang mengatur perkembangan sel. Kelainan pada aktivitas proliferasi sel juga berhubungan erat dengan kontrol apoptosis, sehingga ada dugaan bahwa pada kanker terjadi kelainan pada berbagai gen yang terlibat dalam apoptosis yang berakibat disregulasi proses yang juga berakibat disregulasi apoptosis (Ruiz-vela *et al.*, 2005).

Apoptosis, yang merupakan *programmed cell death*, terjadi normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk

memelihara populasi sel dalam jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan, misalnya reaksi imun atau apabila sel rusak akibat penyakit atau agen perusak. Walaupun ada berbagai jenis rangsangan dan keadaan, baik fisiologik ataupun patologik, tidak semua sel harus mati sebagai respon terhadap rangsangan yang sama. Obat yang digunakan untuk terapi kanker menyebabkan kerusakan DNA dalam sel yang dapat berakibat apoptosis melalui jalur p53. Mekanisme kerja p53 sangat kompleks. Ia dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Dalam beberapa penelitian terakhir mengatakan bahwa p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis tergantung situasi dan latar belakang sel (Hung *et al.*, 2008)

Protein famili *Bcl-2* dapat menginduksi atau menghambat pengeluaran Cytochrom C ke dalam sitosol yang akan mengaktifasi Caspase 9 dan Caspase 3, menghasilkan proses apoptosis. Pelepasan Cytochrom C secara tidak langsung dimediasi oleh potensial transmembran *pore* pada membran mitokondria lapisan dalam (*inner*). Kadar protein *Bcl-2* yang tinggi akan menghindarkan/menjaga sel-sel dari kematian awal sel oleh apoptosis. Protein *Bcl-2* akan menekan proses apoptosis dengan cara mencegah aktivasi Caspase yang akan menghasilkan proses tersebut (Cunningham *et al.*, 2010)

Bcl-2 sering terekspresi berlebihan pada berbagai keganasan meskipun tanpa adanya translokasi kromosom yang mengakibatkan perubahan gen *Bcl-2*. Peningkatan ekspresi *Bcl-2* dapat menyebabkan resistensi terhadap obat kemoterapi dan terapi radiasi. Pemaparan berlebihan dari *Bcl-2* dapat menghasilkan akumulasi sel pada fase G0 dari siklus sel dan menyebabkan suatu kondisi kemoresisten (Westphal *et al.*, 2010)

Apabila aktivasi apoptosis *Bak* atau *Bax* akan membentuk mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) dan melakukan mediasi keluarnya Cytochrom C, anti-apoptosis *Bcl-2* akan menghalangi proses tersebut melalui jalur inhibisi *Bax* dan atau *Bak* (Cunningham *et al.*, 2010)

2.7 Rasio *Bax/Bcl-2*

Proses utama apoptosis dikontrol oleh protein kelompok *Bcl-2*. Perubahan konformasi membran mitokondria tergantung pada rasio antara protein proapoptosis (*Bax*, *Bad*, *Bak*, *Bid*, dan *Bcl-Xs*) dengan protein anti-apoptosis (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bag-1*, *Bcl-W*) (D'Archivio *et al.*, 2008).

Rasio *Bcl-2/Bax* merupakan kunci proses apoptosis dimana nilai yang kecil akan menyebabkan kematian sel. Ekspresi *Bcl-2* yang menurun menyebabkan terhambatnya proses apoptosis. Ekspresi *Bcl-2* yang tinggi akan memperlambat pertumbuhan sel hingga kematian sel, sedangkan ekspresi *Bcl-2* yang rendah akan memicu inhibisi apoptosis sel. Protein *Bcl-2* merupakan protein antiapoptotik, sedangkan protein *Bax* bersifat proapoptotik. Protein-protein tersebut berperan dalam regulasi apoptosis melalui pengaturan pelepasan Cytochrom C.

Igney dan Krammer (2002) menyatakan bahwa ekspresi *Bcl-2* mencegah pelepasan Cytochrom C dari mitokondria. *Bax* akan menginduksi pelepasan Cytochrom C. Di dalam sitosol Cytochrom C akan membentuk kompleks dengan Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), ATP dan Procaspase-9. Komplek ini disebut apoptosom, yang mengaktifkan caspase-9. Caspase-9 mengaktifasi caspase 6 dan caspase-7 untuk mengeksekusi apoptosis.

2.8 Apoptosis

2.8.1 Pengertian Apoptosis

Kematian sel yang terprogram memainkan peranan utama dalam fisiologi perkembangan organisme multiselular dan mempertahankan homeostasis. Apoptosis adalah jalur dari kematian sel yang terprogram dimana enzim yang biasanya aktif mulai berdegradasi meliputi inti DNA dan protein nukleus serta sitoplasma. Sel yang mengalami apoptosis terpecah menjadi beberapa fragmen yang disebut sebagai badan apoptosis, terdiri dari sebagian sitoplasma dan sebagian lagi inti sel. Membran plasma dan badan sel apoptosis tetap utuh akan tetapi strukturnya diubah sedemikian rupa sehingga menarik bagi fagosit. Sel yang mati dan fragmen-fragmennya dengan cepat difagositosis, sehingga kematian sel melalui jalur ini tidak menimbulkan reaksi inflamasi pada inang (Kumar *et al.*, 2010).

Pada umumnya apoptosis terjadi secara fisiologis, namun dapat juga terjadi secara patologis karena pengaruh faktor dari luar. Apoptosis terjadi secara fisiologis baik selama masa perkembangan dan sepanjang masa dewasa, serta berfungsi untuk menghilangkan sel yang tidak diinginkan, sel yang sudah menua atau sel yang berpotensi berbahaya. Apoptosis juga merupakan peristiwa patologis ketika sel yang sakit menjadi rusak dan tidak dapat diperbaiki akhirnya dapat menjadi sebuah penyakit. Secara umum, terdapat tiga tipe utama perubahan biokimia yang dapat dilihat pada apoptosis yaitu: 1) aktivasi caspase; 2) pemecahan DNA dan protein; 3) perubahan membran dan pengenalan oleh sel fagosit. Teraktivasinya caspase sebagai pertanda bahwa sel akan menuju apoptosis dan mengaktifkan DNA-ase sehingga menimbulkan pemecahan inti DNA dan

protein seluler. Membran plasma pada sel apoptosis kemudian berubah untuk memberi jalan fagosit untuk mengenali sel yang telah mati. Yang perlu diingat bahwa sel yang mati oleh karena apoptosis tidak menimbulkan aktivasi respon imun sehingga tidak terjadi reaksi radang/inflamasi (Philchenkov, 2012; Wong, 2011).

Selain perubahan biokimia pada apoptosis terdapat juga perubahan secara seluler baik itu bentuk dan ukuran. Pertanda awal perubahan secara morfologi pada apoptosis dalam nukleus adalah kondensasi dari kromatin dan fragmentasi *nuclear* yang disertai dengan pembulatan dari sel, pengurangan volume selular (*pyknosis*) dan retraksi pseudopoda. Kondensasi dari kromatin dimulai pada pinggiran membran *nuclear*, membentuk bulan sabit atau struktur seperti cincin. Kromatin selanjutnya terpecah di dalam sel dengan membran yang utuh, fitur ini digambarkan sebagai *karyorrhexis*. Plasma membran masih tetap utuh selama proses keseluruhan tersebut. Pada tahap apoptosis selanjutnya terjadi beberapa perubahan morfologi termasuk membran yang melepuh, modifikasi organel sitoplasmik dan kehilangan integritas membran (Wong, 2011).

Sel yang mati oleh karena apoptosis pada tingkatan molekular membentuk kaskade yang kompleks, yang dikontrol secara reguler oleh gen dan protein meliputi protease, protein kinase, phosphate dan endonuklease sehingga terbentuk *apoptosis bodies*. Namun biasanya sel fagosit memakan sel apoptosis secara cepat sebelum *apoptosis bodies* terbentuk. Sementara pemicu dari terjadinya apoptosis oleh berbagai faktor antara lain paparan ultraviolet atau γ -radiasi yang berkepanjangan pada epidermis, *stress metabolic* yang disebabkan oleh lipid yang toksik pada individu yang *obese*, berkurangnya *growth factor*, obat kemoterapi

ataupun radioterapi yang menimbulkan stres kimia, atau adanya sinyal dari *death receptor (DRs)* (Khalil *et al*, 2013).

Apoptosis berbeda dengan nekrosis walaupun prosesnya bisa saja sama terjadi secara simultan. Apoptosis merupakan kegiatan yang sinkron dan prosesnya memerlukan energi yang meliputi aktivasi dari *cysteine proteases* (caspase) dan *cascade complex* sedangkan kematian sel oleh karena nekrosis tidak meliputi ekspresi gen dan prosesnya terjadi secara eksternal pasif yang dihasilkan dari tidak berjalannya metabolisme pada sel yang mati tersebut. Proses apoptosis secara morfologi berbeda dengan nekrosis dengan karakteristik seperti sel membelah, kondensasi sitoplasma, fragmentasi DNA, kondensasi kromatin, fragmentasi nukleus, melepuhnya membran sitoplasma dan terbentuknya *apoptosis bodies* sedangkan nekrosis meliputi hilangnya integritas membran, pembengkakan dari sel, terbentuknya vakuola sitoplasma, retikulum endoplasma yang membengkak, mitokondria yang hancur, *lysosome* terlepas serta *lysis*-nya isi sitoplasma hingga jaringan yang mengelilinginya. Sehingga menyebabkan reaksi inflamasi pada nekrosis, yang mana hal ini tidak terjadi pada apoptosis (Rastogi *et al.*, 2009).

2.8.2 Mekanisme apoptosis

Terdapat mekanisme intrinsik pada semua sel yang akan mengeluarkan sinyal kematian atau sinyal untuk bertahan hidup, dan apoptosis dihasilkan dari ketidakseimbangan antara kedua sinyal tersebut. Oleh karena apoptosis yang terlalu banyak atau terlalu sedikit dapat mendasari banyak penyakit, seperti penyakit degenerasi dan kanker. Salah satu fakta yang muncul dalam mekanisme dasar apoptosis adalah gen dan protein yang mengendalikan proses serta alur yang

berurutan pada apoptosis serta ini terdapat dalam semua organisme multiselular. Selain itu, aliran energi dalam mekanisme apoptosis tergantung pada peristiwa molekular yang terjadi (Rastogi *et al.*, 2009).

Proses apoptosis dapat dibagi menjadi tahap inisiasi, dimana terdapat beberapa caspase yang menjadi katalis aktif, serta tahap eksekusi atau pelaksanaan, dimana caspase lainnya memicu degradasi komponen selular. Inisiasi apoptosis dapat terjadi oleh karena dua jalur yang terpisah yang nanti menyatu pada jalur eksekusi kematian sel. Pertama, jalur intrinsik atau mitokondria dan jalur kedua adalah jalur ekstrinsik atau kematian reseptor. Kedua jalur ini diinduksi oleh stimulus yang berbeda dan melibatkan set protein yang berbeda, walaupun terdapat beberapa persilangan jalur diantaranya. Kedua jalur akan bertemu untuk mengaktifkan caspase, yang merupakan mediator sebenarnya dari kematian sel (Kumar *et al.*, 2010).

2.8.3 Inisiasi apoptosis jalur intrinsik

Jalur apoptosis intrinsik dikatakan jalur mitokondria oleh karena menghasilkan peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan dari molekul pro-apoptosis (*death inducers*) ke dalam sitoplasma. Mitokondria mengandung protein seperti Cytochrom C yang penting bagi kehidupan, tetapi bila beberapa protein yang serupa terlepas ke dalam sitoplasma (merupakan indikasi bahwa sel tersebut tidak sehat), akan menginisiasi program “bunuh diri” dari apoptosis. Pelepasan protein mitokondria ini dikontrol secara seimbang melalui anggota keluarga protein *Bcl-2* sebagai regulator apoptosis. Lebih dari 20 anggota keluarga *Bcl* yang dikenal sebagai pro-apoptosis dan yang lain sebagai antiapoptosis. Overekspresi dari *Bcl-2* akan mencegah folikular B-sel dari

apoptosis dan ini akan menginisiasi pertumbuhan kanker secara lambat (Kumar *et al.*, 2010; Schulz, 2007).

Tabel 2.1 Keluarga BCL-2 sebagai Regulator Apoptosis (Schulz, 2007).

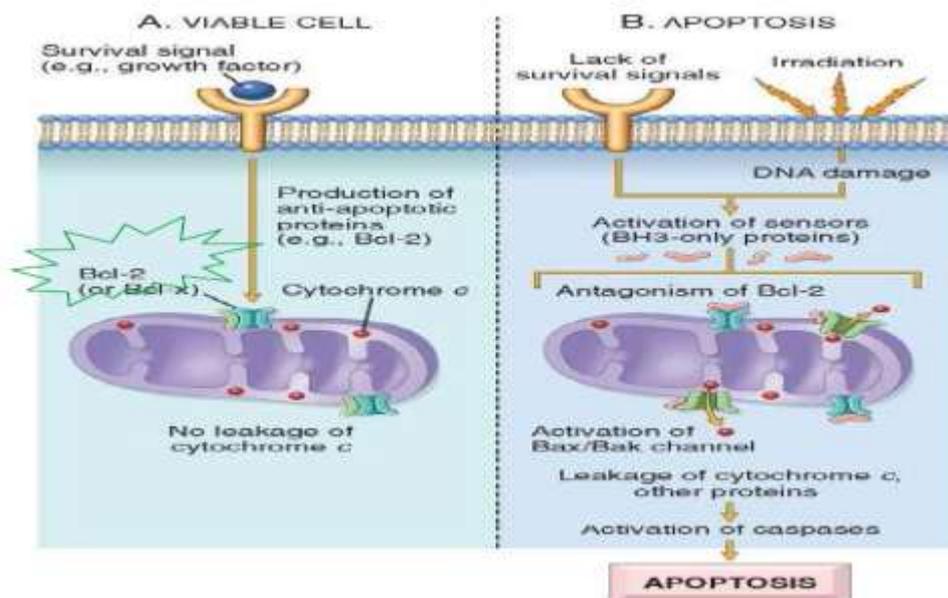
<i>Subfamily</i>	<i>Structure elements*</i>	<i>Representative members</i>	<i>Regulators**</i>	<i>Other members</i>
Anti-apoptotic	BH4-BH3-BH1-BH2-TM	BCL2 BCL-XL	TP53↓ NFκB↑	BCL-W, MCL-1, A1, NRF3
Pro-apoptotic***	BH3-BH1-BH2-TM	BAX	TP53↑, AKT↓	BAK , BOK
BH3-only pro-apoptotic	BH3-TM or BH3	BID BAD, NOXA, PUMA NIX	Caspase 8 (↑ by cleavage) TP53↑ Hypoxia	BAD, BIK, BLK, BMF

* BH: BCL2 homology domains; TM: transmembrane domain,
 ** ↑ activation/induction, ↓ inactivation/downregulation
 *** BAX and BAK indicated in bold print are likely effectors at mitochondria

Untuk menginduksi apoptosis pada jalur intrinsik ini diperlukan inaktivasi dari *Bcl-2* dan protein anti apoptosis lainnya seperti *Bcl-XL*. Normalnya protein ini terdapat pada sitoplasma dan membran mitokondria, dimana mereka mengontrol permeabilitas mitokondria dan mencegah kebocoran protein mitokondria yang nantinya memiliki kemampuan untuk mencetuskan kematian. Bila sel kehilangan sinyal bertahan / *survival* maka akan terjadi kerusakan DNA, atau kesalahan sintesis protein yang akan merangsang stres retikulum endoplasma (RE), sensor dari kerusakan atau stres akan diaktifkan. Sensor tersebut juga merupakan anggota dari keluarga *Bcl-2* dan termasuk juga protein yang dinamakan Bim, Bid dan Bad yang mengandung *Bcl-2 homology domain* tunggal (tiga dari empat domain tersebut ada pada *Bcl-2*) dan dinamakan *BH3-only proteins* (Kumar *et al.*, 2010; Schulz, 2007).

Sensor kemudian akan mengaktifkan dua efektor (proapoptosis), *Bax* dan *Bak*, yang membentuk *oligomers* yang kemudian masuk ke dalam membran mitokondria dan membuat saluran atau jalan yang memungkinkan protein dari

membran dalam mitokondria untuk meresap ke dalam sitoplasma. *BH3* juga mengikat dan memblok fungsi dari *Bcl-2* dan *Bcl-XL*. Di waktu yang sama sintesis dari *Bcl-2* dan *Bcl-XL* menurun. Hasil aktivasi dari *Bax-Bak* disertai dengan hilangnya fungsi perlindungan dari anggota keluarga *Bcl-2* antiapoptosis akan terjadi pelepasan beberapa protein mitokondria ke dalam sitoplasma yang akan mengaktifkan jalur caspase (Kumar *et al.*, 2010; Schulz, 2007) (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Apoptosis Jalur Intrinsik (Mitokondria) (Kumar *et al.*, 2010).

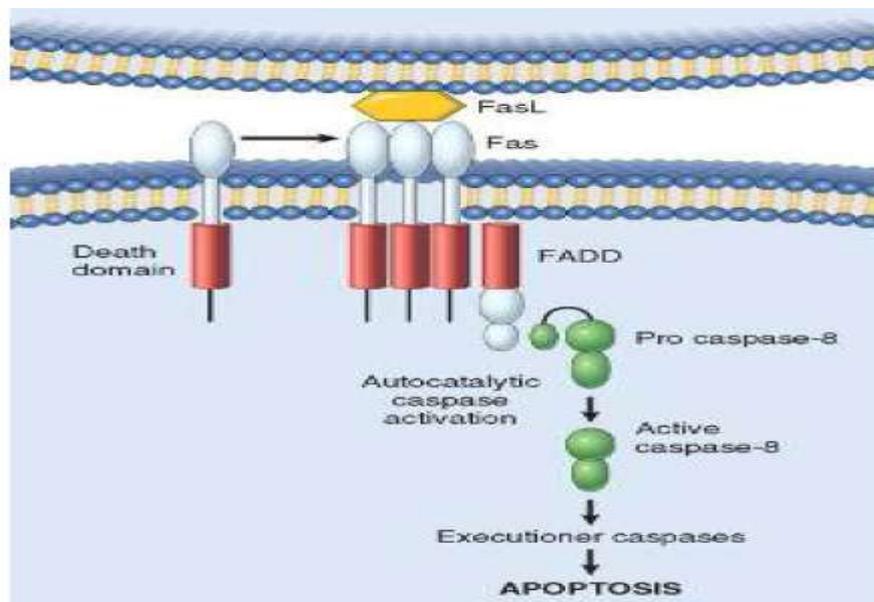
Salah satu protein tersebut adalah Cytochrom C, yang diketahui fungsinya pada respirasi mitokondria. Sekali terlepas ke dalam sitosol, Cytochrom C mengikat protein yang dinamakan *Apaf-1* (*apoptosis-activating factor-1*), yang kemudian akan membentuk heksamer berbentuk seperti roda yang disebut apoptosom. Komplek ini mengikat caspase-9, caspase inisiator yang penting dari jalur mitokondria dan enzim akan memecah molekul caspase-9 yang berdekatan sehingga membentuk sebuah proses auto-amplifikasi (Kumar *et al.*, 2010; Schulz, 2007).

2.8.4 Inisiasi apoptosis jalur ekstrinsik

Jalur ini diawali keterlibatan reseptor kematian membran plasma dengan ligan yang spesifik pada berbagai sel sehingga dikatakan sebagai inisiasi reseptor kematian. Reseptor atau domain kematian merupakan anggota dari keluarga reseptor TNF yang mengandung domain sitoplasma yang ikut dalam interaksi protein, disebut domain kematian karena pentingnya untuk mengantarkan sinyal apoptosis (beberapa anggota keluarga reseptor TNF tidak mengandung domain kematian, fungsi mereka untuk mengaktivasi jalur inflamasi dan perannya dalam mencetuskan apoptosis sangat sedikit). Reseptor kematian yang paling banyak diketahui adalah reseptor TNF tipe-1 (TNFR1) dan ligan yang terkait yang dinamakan Fas ligan (CD95). Fas ligan merupakan satu dari sekian komponen penting dalam membunuh sel terinfeksi atau sel tumor. Ini juga berperan dalam eliminasi secara selektif pada sel imun. Adanya defek / kecacatan fungsi CD95 ini terjadi pada penyakit autoimun dan juga kanker. Fas ligan diekspresikan pada sel T-sitotoksik untuk mengenali *self* antigen (berfungsi untuk mengeliminasi *selfreactive* limfosit) dan pada beberapa limfosit T-sitotoksik (yang membunuh sel yang terinfeksi virus atau tumor) (Kumar *et al.*, 2010).

Ketika FasL mengikat Fas, tiga atau lebih molekul dari Fas dibawa bersama-sama dengan domain kematian sitoplasma yang kemudian membentuk tempat pengikatan untuk protein yang juga mengandung domain kematian dan dinamakan FADD (*Fas-associated death domain*). FADD yang melekat pada reseptor kematian kemudian berubah bentuk menjadi caspase-8 inaktif (pada manusia, caspase-10). Molekul pro-caspase-8 multipel dibawa ke dalam jarak tertentu sehingga mereka bersatu membentuk caspase-8 yang aktif. Enzim

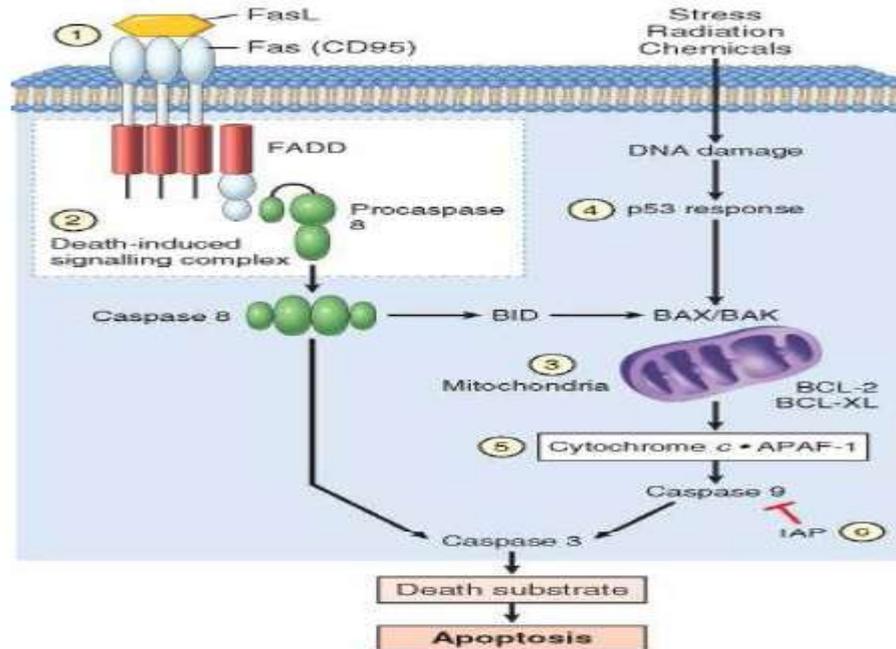
kemudian mencetuskan aktivasi caspase dengan membelah dan dengan demikian mengaktifkan pro-caspase yang lain. Kemudian enzim yang aktif memediasi fase eksekusi apoptosis, caspase-3. Jalur apoptosis ini dapat dihambat oleh protein yang dinamakan FLIP, yang dapat mengikat pro-caspase-8 tetapi tidak dapat membelah dan mengaktifkan caspase karena sedikit mengandung domain protease. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan menggunakan inhibitor ini untuk melindungi dirinya dari apoptosis yang dimediasi oleh Fas (Kumar *et al.*, 2010; Schulz 2007) (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Apoptosis Jalur Ekstrinsik (Inisiasi Reseptor Kematian) (Kumar *et al.*, 2010).

Walau secara fundamental melibatkan molekul yang berbeda untuk melakukan inisiasi apoptosis pada jalur ekstrinsik dan intrinsik, terdapat hubungan antara jalur tersebut dalam terjadinya apoptosis. Jalur reseptor kematian atau jalur ekstrinsik diaktifkan melalui ikatan Fas dengan ligan sehingga membentuk FADD (*Fas-associated death domain*). FADD dan procaspase-8 kemudian bergabung membentuk sinyal kompleks yang menimbulkan kematian atau *death-inducing*

signaling complex (DISC). Teraktivasinya DISC ini kemudian menyebabkan procaspase-8 menjadi caspase-8 yang nantinya mengaktifkan secara langsung caspase efektor (caspase-3, -6, -7) atau secara tidak langsung melalui pembelahan BID (BH3 protein pro-apoptosis yang termasuk keluarga *Bcl-2*). Kemudian menimbulkan perpindahan / *shift* pro-apoptosis pada keseimbangan keluarga *Bcl-2* menghasilkan homodimerisasi dari *Bax* dan pembentukan inti dari mitokondria, yang mana mampu melepaskan Cytochrom C dan Smac dari ruang intermembran mitokondria hingga sitoplasma. Cytochrom C menimbulkan apoptosome, tersusun dari *Apaf-1* dan procaspase-9, sehingga memicu aktivasi caspase-9 dan nantinya mengaktifkan caspase efektor (caspase-3, -6, -7). Smac mengubah sinyal apoptosis dengan melindungi caspase dari interaksi IAP kemudian memfasilitasi aktivasi procaspase-9 (Kumar *et al.*, 2010) (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Hubungan Inisiasi Apoptosis Jalur Ekstrinsik dengan Intrinsik (Kumar *et al.*, 2010).

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram. Apoptosis memiliki

peranan penting dalam fenomena biologis, proses apoptosis yang tidak sempurna dapat menyebabkan timbulnya penyakit yang sangat bervariasi. Terlalu banyak apoptosis menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol (kanker). Apoptosis berfungsi pada sel yang rusak atau terinfeksi agar tidak berkembang terus-menerus, respon terhadap stres atau kerusakan DNA, dan berperan pada sistem homeostasis. Pada apoptosis membran inti tidak ruptur dan inti mengalami fragmentasi yang kemudian mengirimkan sel di dekatnya untuk difagosit.

Terdapat dua metode untuk mekanisme kematian apoptosis yaitu melalui jalur intrinsik (jalur mitokondrial) dan ekstrinsik (jalur kematian reseptor). Jalur intrinsik (jalur mitokondrial) terjadi karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro-apoptosis ke dalam sitoplasma, tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis *Bcl-2*, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein anti apoptosis yang utama adalah : *Bcl-2* dan *Bcl-Xl* yang pada keadaan normal terdapat pada membran mitokondria dan sitoplasma. Jalur ekstrinsik (diinisiasi oleh kematian reseptor) terjadi karena adanya inisiasi oleh pengikatan reseptor kematian pada permukaan bagian dari reseptor tumor nekrosis faktor yang terdiri dari cytoplasmic domain, berfungsi untuk mengirim sinyal apoptosis.