

## PENINGKATAN TNF- $\alpha$ DAN INDEKS APOPTOSIS PADA TULANG MENCIT YANG DIINFEKSI *Toxoplasma gondii*

### *The Increase of TNF- $\alpha$ and Apoptotic Index in Bone of Toxoplasma gondii-Infected Mice*

Lucia Tri Suwanti<sup>1,2</sup> dan Mufasirin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Parasitologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Surabaya

E-mail: tswant@gmail.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui peningkatan tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) dan indeks apoptosis pada tulang mencit yang diinfeksi *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Tiga puluh dua ekor mencit dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok 1 (K1), merupakan kelompok kontrol, tidak diinfeksi sedangkan Kelompok 2 (K2) diinfeksi dengan 10 takizoit *T. gondii* secara intraperitoneal. Enam hari setelah infeksi mencit dikorbankan, diambil tulang femur dan dilakukan pembuatan preparat histologis dengan pengecatan immunohistochemistry (IHC) dan Tunel assay. Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel tulang yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  pada K2 (27,04 $\pm$ 6,92) berbeda sangat nyata dibandingkan dengan K1 (11,42 $\pm$ 3,92). Indeks apoptosis pada K1 dan K2 masing-masing adalah 9,17 $\pm$ 3,04 dan 16,28 $\pm$ 3,37. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan TNF- $\alpha$  dan indeks apoptosis sel tulang femur.

Kata kunci: indeks apoptosis, bone, *T. gondii*, TNF- $\alpha$

#### ABSTRACT

This study aims to determine the increase of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and apoptotic index in bone of *Toxoplasma gondii*-infected mice. Thirty-two mice were divided into two groups. First group was the uninfected control group. The second group was the treatment group. Mice in the treatment group were infected with 10 *T. gondii* tachyzoites, intraperitoneally. Six days after infection mice were sacrificed, femur bone removed to make histopathology slides. Slides were stained with immunohistochemistry (IHC) and Tunel assay. Datas were analyzed by t test. The results show that the bone cells that express TNF- $\alpha$  in infection group (27.04 $\pm$ 6.92) were higher than those in the control group (11.42 $\pm$ 3.92). As well as for the apoptic index. The treatment group was higher (16.28 $\pm$ 3.37) than those in the control group (9.17 $\pm$ 3.04). In conclusion, *T. gondii* infection increased TNF- $\alpha$  and apoptotic index femur bone cells.

Key words: apoptotic index, bone, *T. gondii*, TNF- $\alpha$

#### PENDAHULUAN

Toksoplasmosis adalah penyakit yang bersifat zoonosis, disebabkan oleh *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) menyerang manusia dan mamalia berdarah panas termasuk unggas. Maharana *et al.* (2010) melaporkan bahwa sepertiga populasi manusia sudah terinfeksi *T. gondii*. Kerugian sosio-ekonomi 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. Sitokin tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) 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.

Infeksi *T. gondii* membangkitkan respons imun individu terinfeksi baik respons imun humoral maupun seluler. Kemampuan *T. gondii* membangkitkan respons imun seluler ditandai dengan respon Th1 dengan dilepaskannya interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Denkers dan Gazzinelli, 1998; Lee *et al.*, 1999). Pada awal infeksi, IFN- $\gamma$  diproduksi oleh sel natural killer (NK). Pada fase ini melibatkan sistem imun alami, sel NK dan makrofag. Sel NK merupakan sel utama penghasil IFN- $\gamma$  dan akan mengaktifkan makrofag untuk menghasilkan TNF- $\alpha$  sebagai mikrobisid. Pada fase kronis, limfosit T memproduksi IFN- $\gamma$  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 glukokortikoid menginduksi hilangnya tulang (apoptosis) pada manusia dan tikus berhubungan dengan peningkatan 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- $\alpha$  pada apoptosis tulang perlu dibuktikan. Penelitian ini mencoba mencari pengaruh TNF- $\alpha$  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.

## MATERI DAN METODE

### Perbanyak Isolat *T. gondii*

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain RH yang didapatkan dari Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada. Perbanyak isolat dilakukan pada mencit. Isolat diinjeksikan secara intraperitoneal sebanyak  $1 \times 10^6$  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*.

### Hewan Coba

Sebanyak 32 ekor mencit Balb/c, jantan, umur 8 minggu digunakan untuk penelitian ini. Mencit kemudian dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol (K1) yaitu mencit yang tidak diinfeksi *T. gondii* dan kelompok perlakuan (K2) yaitu kelompok yang diinfeksi dengan *T. gondii*. Kelompok kontrol hanya diinjeksi 100  $\mu$ l NaCl fisiologis. Dosis infeksi adalah 10 takizoit setiap mencit secara intraperitoneal yang dilarutkan dalam 100  $\mu$ l 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 $\alpha$ .

### Pengecatan Imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia menggunakan metode streptavidin dan biotin yang diadopsi dari Burnett dan Hunt (2000). Jaringan dalam *embedding paraffin* dipotong dengan ketebalan 4-5 mikron *Slide* dideparafinisasi dalam *xylol* dua kali masing-masing selama lima menit dan selanjutnya dimasukkan dalam etanol absolut dua kali selama tiga menit, etanol 95% dua kali selama tiga menit dan etanol 70% selama tiga menit dan terakhir dicuci dengan *aquabidest*. *Slide* ditetesi dengan proteinase K selama lima menit dan dicuci dengan *phosphate buffered solution* (PBS) dua kali, kemudian ditambahkan peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% selama lima menit dan dicuci dengan PBS dua kali dan setiap sayatan diinkubasi dengan antibodi monoklonal terhadap TNF- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc, TNF- $\alpha$  (52B83: sc-52746) selama 30 menit, kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder yang dilabel biotin selama 30 menit dan dicuci dua kali dengan PBS. Preparat ditetesi dengan streptavidin peroksidase selama 15-30 menit dan dicuci dua kali dengan PBS dan kemudian dimasukkan ke dalam larutan substrat selama 5-10 menit. Pewarnaan *counterstain*, *slide* dimasukkan dalam hematoxilin 30 detik pada suhu kamar dan dicuci tiga kali dengan akuades

( $dH_2O$ ). Preparat dikeringkan, diberikan perekat dan ditutup dengan gelas penutup dan dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 400-1000x.

### Analisis Data

Pengaruh infeksi terhadap jumlah persentase sel pada jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  dan sel tulang yang mengalami apoptotik dianalisis dengan uji t.

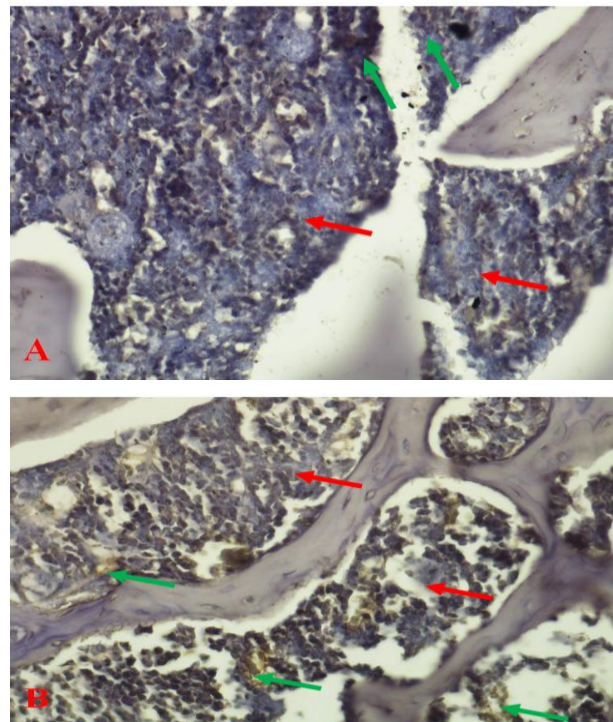
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengertian sel pada tulang ini adalah semua sel pada jaringan tulang baik yang di sumsum tulang (sel-sel mesenkim) maupun yang di lakuna (osteosit, osteoblas dan osteoklas). Hasil perhitungan persentase jumlah sel tulang yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ . Hal ini tercermin dari hasil perhitungan jumlah sel tulang femur mencit yang diinfeksi *T. gondii* lebih banyak 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 (Tabel 1 dan Gambar 1).

**Tabel 1.** Rerata dan simpangan baku persentase jumlah sel tulang femur yang mengekspresikan TNF- $\alpha$

Perlakuan	Jumlah sel tulang femur yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ (dalam %)
Tidak diinfeksi	11,42 $\pm$ 3,92 <sup>a</sup>
Diinfeksi	27,04 $\pm$ 6,92 <sup>b</sup>

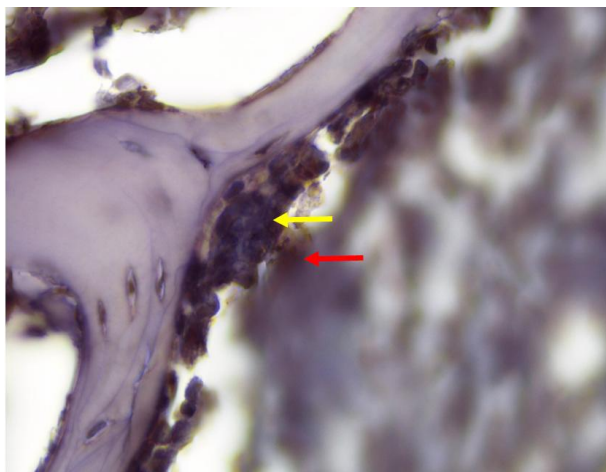
<sup>a,b</sup>Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata



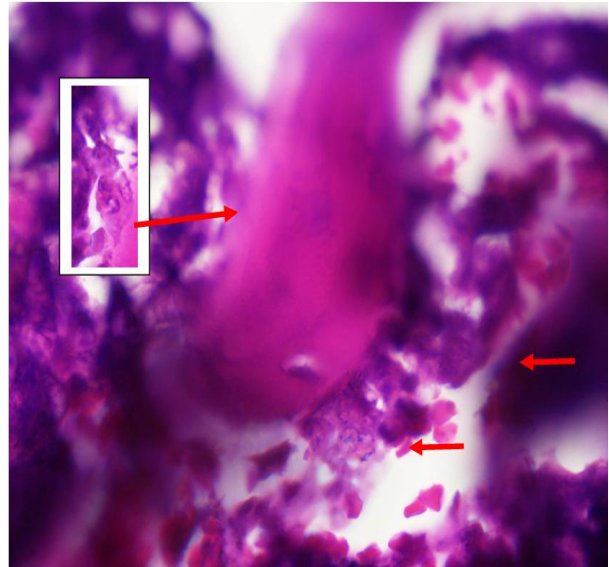
**Gambar 1.** Gambaran sel I tulang femur dengan pengecatan IHC. Pembesaran 400x. A= Kelompok kontrol. B= Kelompok yang diinfeksi *T. gondii*. Anak Panah Hijau= Sel yang ekspresikan TNF- $\alpha$ , Anak Panah Merah= Sel yang negatif

Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah makrofag desidua (jaringan plasenta) (Suwanti, 2005) dan sel otot (Mufasirin, 2011), sel-sel hati dan limfa (Mordue *et al.*, 2001) yang mengekspresikan TNF- $\alpha$ . Peningkatan TNF- $\alpha$  pada infeksi *T. gondii* merupakan kaskade respons imun tubuh penderita yang dimaksudkan untuk mengeliminasi parasit. Segera setelah induk semang terinfeksi *T. gondii*, terjadi pembelahan takizoit dan menyebar ke seluruh tubuh termasuk jaringan tulang. Adanya parasit di dalam jaringan tulang akan menginduksi *antigen-presenting cell* (APC) untuk mengeliminir parasit dengan cara memproduksi TNF- $\alpha$  yang dapat menginduksi sel imun lain seperti sel *natural killer* (NK). Pada sumsum tulang terdapat sel-sel mesenkimal yang merupakan prekursor dari hematopoetik yang memerankan sistem imun. Pada penelitian sel yang mengekspresi TNF- $\alpha$  yaitu sel-sel mesenkimal yang terdapat di sumsum tulang, merupakan prekursor sel yang tidak dideteksi.

Menurut Kitaura *et al.* (2002), peningkatan TNF- $\alpha$  pada jaringan tulang dapat menginduksi aktivitas osteoklas. Peningkatan TNF- $\alpha$  pada penelitian ini kemungkinan juga menginduksi peningkatan osteoklas, hal ini terlihat pada hasil pengecatan imunohistokimia tulang ditemukan osteoklas yang berdekatan dengan sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  (Gambar 2) dan pada hasil pengecatan HE terdapat peningkatan osteoklas pada tulang femur yang diinfeksi *T. gondii* (Gambar 3), sementara pada kelompok kontrol osteoklas jarang diketemukan. Untuk memastikan apakah infeksi *T. gondii* meningkatkan osteoklas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Menurut Hirayama *et al.* (2002), peningkatan aktivitas osteoklas dapat mengakibatkan hilangnya tulang sehingga berisiko terjadinya osteoporosis. Hirayama *et al.* (2002) menyatakan apabila dikaitkan dengan hasil penelitian ini, maka kemungkinan *T. gondii* dapat mendatangkan risiko osteoporosis. Untuk membuktikan ini maka perlu penelitian lebih lanjut.



**Gambar 2.** Osteoklas (panah kuning) teraktivasi oleh TNF- $\alpha$  yang dikeluarkan oleh sel mesenkimal (panah merah). (1000x)



**Gambar 3.** Osteoklas dengan pengecatan HE (1000x). Panah merah= Peningkatan jumlah osteoklas pada tulang femur yang terinfeksi

**Apoptosis pada Tulang Akibat Infeksi *T. gondii***

Dari hasil perhitungan statistik menunjukkan bahwa infeksi *T. gondii* meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis. Pada tulang femur mencit yang diinfeksi indeks apoptosis adalah 16,28 sedangkan pada kontrol 9,17. (Tabel 2 dan Gambar 4). Hasil penelitian ini melengkapi penelitian sebelumnya, infeksi *T. gondii* meningkatkan indeks apoptosis tropoblas (Suwanti, 2005), sel otot (Mufasirin, 2011), sel hati (Mordue *et al.*, 2001). Sel yang mengalami apoptosis sebagian besar sel mesenkimal, hanya sedikit osteosit yang mengalami apoptosis akibat infeksi *T. gondii*.

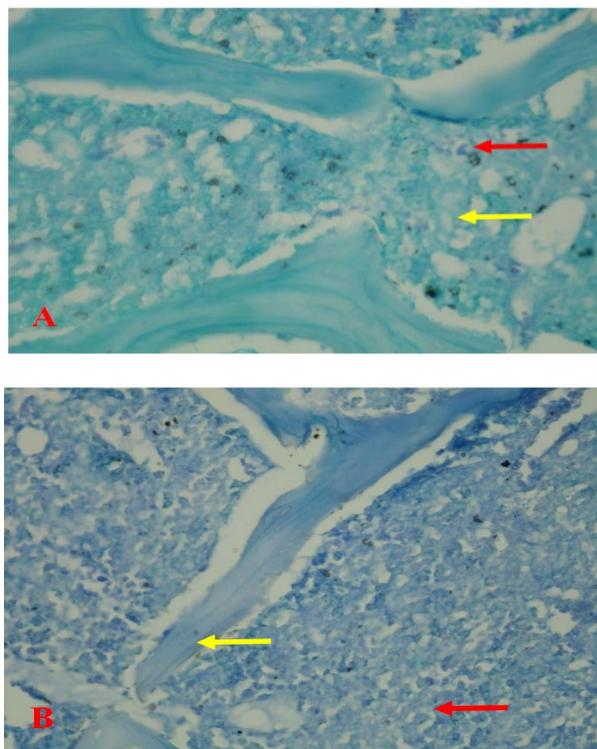
Setelah analisis diteruskan dengan uji regresi linear ternyata peningkatan apoptosis sel tulang pada penelitian ini karena pengaruh peningkatan TNF- $\alpha$ . Pada uji regresi terdapat korelasi positif ( $R= 0,651$ ) antara peningkatan TNF $\alpha$  dengan indeks apoptosis, dengan persamaan garis  $Y= 0,323X + 6,513$ . Penelitian ini berbeda dengan penelitian Mordue *et al.* (2001) dan Suwanti (2005) yang menyatakan meskipun pada infeksi *T. gondii* terjadi peningkatan TNF- $\alpha$  tetapi tidak memengaruhi terjadinya apoptosis secara langsung. Mordue *et al.* (2001) menyatakan peningkatan apoptosis merupakan reaksi peradangan dan menyebabkan terjadinya nekrosis sel hati, sedangkan Suwanti (2005) menyatakan peningkatan TNF- $\alpha$  bersamaan dengan peningkatan IFN- $\gamma$  di plasenta menginduksi tropoblas mengekspresikan Fas dan menstimuli Fas lebih sensitif terhadap apoptosis.

**Tabel 2.** Rerata dan simpangan baku indeks apoptosis tulang femur mencit

Perlakuan	Indeks apoptosis
Tidak diinfeksi	9,17 $\pm$ 3,04 <sup>a</sup>
Diinfeksi	16,28 $\pm$ 3,37 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup>Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan ada perbedaan yang nyata ( $P<0,05$ )





**Gambar 4.** Gambaran sel I tulang femur dengan pengecatan TUNEL (400x). A= Kelompok kontrol. B= Kelompok yang diinfeksi *T. gondii*. Panah kuning= Sel yang normal (hidup), Panah merah= Sel yang mengalami apoptosis

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa infeksi *T. gondii* pada mencit dapat meningkatkan jumlah sel pada jaringan tulang yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  dan mengalami apoptosis. Peningkatan mengekspresikan TNF- $\alpha$  pada tulang akibat infeksi *T. gondii* berpengaruh langsung terhadap peningkatan indeks apoptosis tulang.

### DAFTAR PUSTAKA

- Burnett, T.G. and J.S. Hunt. 2000. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. **J. Immunol.** 164:5245-5250.
- Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli, 1998. Regulation and function of t-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Cli. Microbiol. Rev.** 11:569-588
- Hirayama, T., L. Dank, A. Sabokbar, and N.A. Athanasou. 2002. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. **Rheumatol.** 41(11):1232-1239.
- Kitaura, H., N. Nagata, Y. Fujimura, H. Hotokezaka, N. Yoshida, and K. Nakayama. 2002. Effect of IL-12 on TNF- $\alpha$ -mediated osteoclast formation in bone marrow cells: Apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. **J. Immunol.** 169(9):4732-4738.
- Lee, Y-H., K.H. Ely, A. Lepage, and L.H. Kasper. 1999. Interleukin-15 enhances host protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in T-cell receptor- $\alpha$   $-/-$  deficient mice. **Parasite Immunol.** 21:299-306.
- Maharana, B., M. Panigrahi, R.K. Baithalu, S. Parida, and I.M. Allai. 2010. Toxoplasmosis: Beware of cat. **Vet World.** 3:247-249.
- Mordue, D.G., F. Monroy, M.L. Regina, C.A. Dinarello, and L.D. Sibley. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **J. Immunol.** 167:4574-4584.
- Mufasirin. 2011. Mekanisme Berat Lahir Rendah Anak Mencit dari Induk Toksoplasmosis Melalui Perubahan Molekuler Sel Otot Skelet. **Disertasi.** Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Paspalaki, P.K., E.P. Mihailidou, M. Bitsori, D. Tsagkaraki, and E. Mantzouranis. 2001. Polyomyositis and myocarditis associated with acquired toxoplasmosis in an immunocompetent girl. **Musculoskelet Disord.** 2:1471-1474.
- Rorman, E., C.S. Zamir, I. Rilkis, and H. Ben-David. 2006. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicol.** 21:458-472.
- 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.
- Suwanti, L.T. 2005. Mekanisme Peningkatan Apoptosis Tropoblas Mencit Terinfeksi *Toxoplasma gondii* melalui Peningkatan Desidua Penghasil IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$  serta Tropoblas Penghasil FAS dan TNFR-1. **Disertasi.** Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Weinstein, R.S., R.W. Nicholas, and S.C. Manolagas. 2000. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 85:2907-2912.