

Ekspresi Caspase-3 sebagai Petanda Apoptosis Makrofag Lesi Kulit Penderita Kusta Tipe Pausibasiler dan Multibasiler

(Caspase-3 Expression as Macrophage Apoptotic Marker on Skin Lession of Paucibacillary and Multibacillary Patients)

Anggun P Yuniaswan, Santoso Basuki, Delya Widasmara

Department of Dermatovenereology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya/dr. Saiful Anwar Hospital
Jl. Jaksa Agung Suprpto No. 2 Malang

e-mail: angg_yuniaswan@yahoo.com

Abstract

Macrophage and Schwann cells are target cell on leprosy disease, where apoptotic is assumed as one of elimination mechanism of macrophage previously infected by M.leprae. Several study showed various result in apoptotic on leprosy disease. Apoptotic level can be evaluated by observing caspase-3 activity, an executioner caspase on cell death. This study is aimed to observe the relationship of caspase-3 expression with paucibacillary and multibacillary types of leprosy. We used observational analytic and cross sectional study with consecutive sampling method. The subject was leprosy patient which had been diagnosed on dermatovenereology division outpatient clinic Saiful Anwar Hospital, and fulfilled the inclusion-exclusion criteria. Total subject was 19 persons (11 multibacillary and 8 paucibacillary). Sampling was taken with punch biopsy on skin lession, followed by immunohistochemical staining with caspase-3 antibody, and caspase-3 expression was measured by ImmunoRatio method. Comparison test revealed significant difference ($p < 0.05\%$) between caspase-3 expression mean on paucibacillary patient (84.46%) compared to multibacillary patient (65.39%). Pearson correlation test revealed caspase-3 expression tend to be higher in paucibacillary patient than multibacillary (coefficient correlation -0.759). In conclusion, there is a significance relationship between caspase-3 expression with leprosy type.

Keywords: *apoptotic, caspase-3, leprosy, paucibacillary, multibacillary*

Abstrak

Makrofag merupakan sel target pada penyakit kusta selain sel Schwann, dimana apoptosis diperkirakan sebagai mekanisme eliminasi makrofag yang telah terinfeksi *Mycobacterium leprae*. Beberapa studi terdahulu menunjukkan data yang tidak konsisten mengenai apoptosis pada penderita kusta. Tingkat apoptosis dapat dievaluasi dengan melihat aktivitas caspase-3, caspase eksekusioner dalam kematian sel. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta pausibasiler dan multibasiler. Desain penelitian menggunakan analitik observasional *cross sectional* dengan metode *consecutive sampling*. Subyek penelitian adalah penderita terdiagnosa kusta di Instalasi Rawat Jalan Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSUD.dr. Saiful Anwar Malang (RSSA) dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Jumlah total subyek adalah 19 orang (11 penderita multibasiler dan 8 penderita pausibasiler). Sampel diambil dengan biopsi *punch* pada lesi kulit, selanjutnya dilakukan pengecatan immunohistokima dengan antibodi caspase-3 dan dilakukan pengukuran ekspresi caspase-3 dengan metode ImmunoRatio. Hasil uji t tidak berpasangan menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05\%$) antara rerata ekspresi caspase-3 pada penderita kusta PB (84.46%) dibandingkan dengan penderita MB (65.39%). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan ekspresi caspase-3 cenderung lebih tinggi pada tipe kusta PB dibandingkan tipe MB (koefisien korelasi -0.759). Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini ialah adanya hubungan signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta.

Kata kunci: apoptosis, caspase-3, kusta, pausibasiler, multibasiler

Pendahuluan

Kusta atau Morbus Hansen adalah penyakit infeksi kronis yang disebabkan oleh *Mycobacterium leprae* yang memiliki predileksi pada kulit dan saraf perifer. Kendati secara nasional telah mencapai Eliminasi Kusta namun dengan besarnya penduduk dan luasnya wilayah, Indonesia menduduki peringkat 4 penyumbang terbanyak kusta di dunia setelah India, Brazilia dan Nepal [1]. Sekitar 2-3 juta orang dilaporkan menderita kecacatan akibat kerusakan saraf perifer yang disebabkan oleh penyakit kusta [1,2].

Makrofag merupakan sel target pada infeksi oleh *M.leprae*, dimana pada beberapa studi ditemukan bahwa makrofag yang terinfeksi oleh *M.leprae* mampu mensekresikan beberapa sitokin seperti *inducible Nitric Oxide Synthetase* (iNOS), *Tumor Necrotizing Factor* (TNF) yang dapat menginduksi apoptosis [3]. Induksi kematian sel yang terprogram (apoptosis) oleh *M.leprae* memiliki peranan penting dalam progresivitas penyakit [4].

Beberapa studi mengenai kusta menitik beratkan pada apoptosis berkaitan dengan spektrum penyakit dan sebagai mekanisme pertahanan pejamu terhadap *Mycobacterium leprae*, namun masih terdapat kesimpangsiuran mengenai perbedaan apoptosis pada tipe kusta. Tingkat apoptosis dapat dievaluasi dengan melihat aktivitas caspase-3, yaitu caspase eksekusioner dalam kematian sel [4]. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi caspase-3 sebagai petanda apoptosis makrofag pada lesi kulit penderita kusta dengan tipe pausibasiler dan multibasiler.

Metode Penelitian

Rancangan penelitian berupa observasional analitik *cross sectional* dengan subyek adalah penderita yang terdiagnosa kusta menurut kriteria WHO dan berobat di Instalasi Rawat Jalan Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RS Saiful Anwar. Periode pengambilan sampel dimulai dari Mei 2015 sampai jumlah sampel terpenuhi (n=19).

Dilakukan seleksi subyek penelitian sesuai kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah penderita kusta yang didiagnosis berdasarkan kriteria WHO, sedang mendapat *Multi Drug Therapy* (MDT) dan bersedia ikut penelitian dengan membuat persetujuan sukarela setelah diberi penjelasan tentang prosedur penelitian. Kriteria eksklusi yaitu keadaan umum penderita buruk (dengan pemeriksaan darah lengkap, fungsi ginjal dan fungsi hati), mendapat terapi kortikosteroid sistemik atau obat anti inflamasi lain selama 1 minggu terakhir, sedang menderita reaksi kusta, baik reaksi tipe 1 maupun tipe 2, menderita penyakit sistemik (diabetes melitus, HIV dan keganasan), menderita efek samping dari regimen pengobatan (MDT) yang diberikan (sindroma dapson, sindroma hipersensitivitas obat, efek hepatotoksik, efek nephrotoksik). Besar sampel ditetapkan berdasarkan rumus penelitian analitik untuk data numerik tidak berpasangan sebanyak 19 orang, diambil secara *consecutive sampling*. Pengambilan sampel pada lesi kulit aktif dengan menggunakan biopsi *punch*.

Subyek penelitian dikelompokkan berdasarkan kriteria WHO (1998) menjadi pausibasiler lesi tunggal, pausibasiler dan multibasiler. Pada penelitian ini, penderita pausibasiler lesi tunggal dikelompokkan dalam kriteria pausibasiler. Pengukuran ekspresi *caspase-3* dilakukan dengan melihat area yang berwarna kecoklatan pada preparat yang diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan *Diamino Benzidine* (DAB). Selanjutnya dilakukan penghitungan dengan teknik *Immunoratio* dan hasilnya dinyatakan dalam persentase. Analisis data penelitian dilakukan dengan menggunakan uji t tidak berpasangan dengan alternatif *Mann Whitney* dan *uji korelasi Pearson* dengan alternatif *uji Spearman*. Perbedaan hasil berbagai pengukuran diuji dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$ dan interval kepercayaan 95%.

Hasil

Subyek pada penelitian ini terdiri dari 7 orang wanita (36.8%) dan 12 orang laki-laki

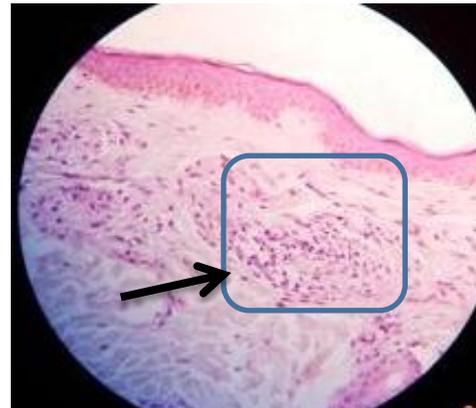
(63.2%). Pada kelompok PB didapatkan 5 orang wanita (62.5%) dan 3 orang laki-laki (37.5%), sedangkan pada kelompok MB didapatkan 2 orang wanita (10.5%) dan 9 orang laki-laki (47.4%). Pada uji *Mann Whitney* didapatkan nilai $p = 0.109$ ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jenis kelamin antara tipe kusta PB dan MB.

Rentang usia subyek penelitian ini adalah 13 hingga 48 tahun. Rerata usia subyek pada kelompok PB adalah 32.37 sedangkan rerata usia subyek pada kelompok MB adalah 35.09. Berdasarkan hasil uji *t* tidak berpasangan, nilai signifikansi untuk perbandingan umur pasien berdasarkan tipe kusta PB dan MB adalah sebesar 0.614 ($p > 0.05$). Sehingga, dapat diasumsikan bahwa usia subyek pada kelompok PB dan MB tidak berbeda secara bermakna.

Pada subyek penelitian didapatkan 4 orang (21.1%) yang pernah terdiagnosa kusta sebelumnya atau sedang mengalami kekambuhan. Dari 4 subyek tersebut, seluruhnya merupakan subyek dari kelompok MB. Hasil analisa dengan uji *Mann Whitney* mendapatkan $p = 0.206$ ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada penderita yang pernah menderita kusta sebelumnya antara tipe kusta PB dan MB.

Pada pemeriksaan histopatologis dengan pengecatan Hematoksillin Eosin didapatkan gambaran pada penderita pausibasiler sesuai dengan tipe tuberkuloid dan borderline tuberkuloid yaitu adanya radang granulomatous dengan adanya sel epiteloid, sel Langhans dan disertai infiltrasi limfosit (gambar 1a). Infiltrasi limfosit terutama ditemukan di sekitar granuloma, namun pada beberapa penderita ditemukan menyebar dan bentukan granuloma kadang minimal. Pada penderita multibasiler didapatkan gambaran sesuai tipe lepromatous dan borderline lepromatous. Didapatkan karakteristik infiltrat sel limfosit yang minimal dan lebih didominasi oleh sel makrofag. Tidak dijumpai adanya bentukan granuloma dan sel makrofag memiliki sitoplasma yang dominan

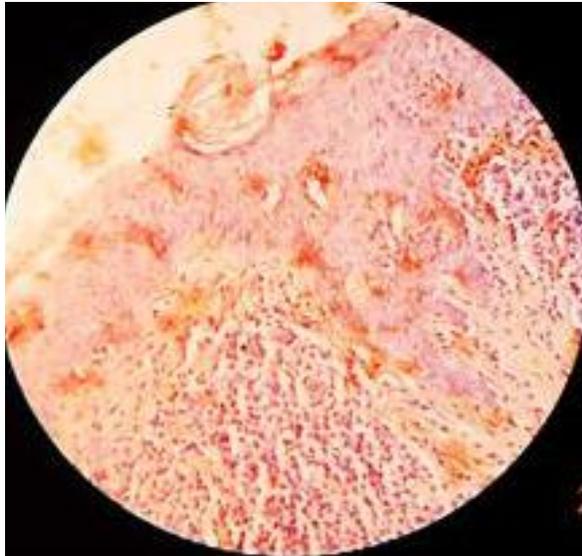
sehingga memiliki gambaran *foamy macrophage*. Ekspresi caspase-3 ditunjukkan dengan adanya warna kecoklatan pada pemeriksaan Immunohistokimia menggunakan DAB (gambar 1 b, c). Ekspresi kecoklatan pada sel ini kemudian dihitung dengan metode ImmunoRatio.



Gambar 1a. Radang granulomatous (H&E, 400x)

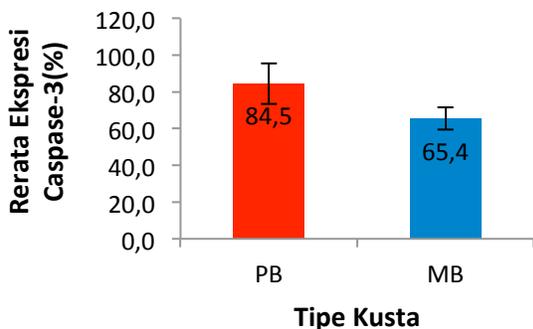


Gambar 1b. Infiltrat limfosit yang menyebar pada biopsi kulit penderita multibasiler (DAB, 400x)

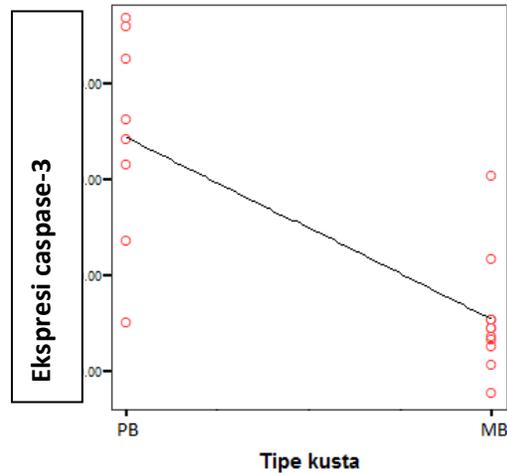


Gambar 1c. Ekspresi caspase-3 yang intens dan tersebar pada pasien MB (DAB,400x)

Hasil uji t tidak berpasangan untuk ekspresi caspase-3 pada penderita PB dan MB (gambar 2), menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara ekspresi caspase-3 pada penderita PB (mean= 84.46%) dan MB (mean=65.39%), $p=0.000$ ($p<0.05$). Sedangkan uji korelasi menunjukkan nilai p sebesar 0.000 ($p<0.05$) dengan koefisien korelasi sebesar -0.759. Hal ini menunjukkan adanya hubungan signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta, dimana ekspresi caspase-3 cenderung lebih tinggi pada tipe kusta PB dibandingkan MB. (Gambar 3).

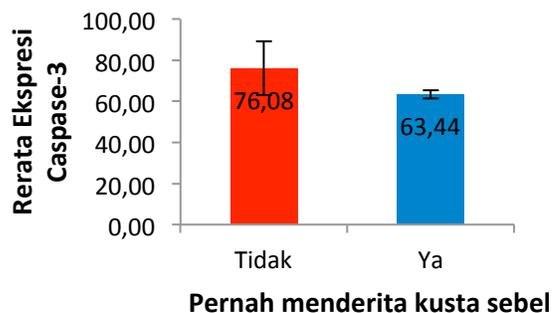


Gambar 2. Rerata Ekspresi Caspase-3 penderita Kusta PB dan MB



Gambar 3. Grafik linieritas hubungan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta

Berdasarkan hasil uji t tidak berpasangan, terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0.002$) antara ekspresi caspase-3 pada penderita yang pernah menderita kusta sebelumnya (mean= 63.44) dengan penderita yang tidak pernah menderita kusta sebelumnya (mean= 76.08). Hasil uji korelasi menunjukkan nilai p sebesar 0.079 ($p>0.05$) dan koefisien korelasi sebesar -0.413. Hal tersebut menunjukkan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan kriteria pernah menderita kusta sebelumnya.

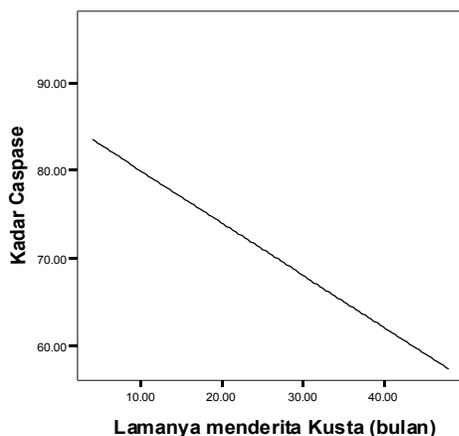


Gambar 4. Ekspresi Caspase-3 pada penderita yang pernah mengalami Kusta

Hasil uji korelasi menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan lamanya menderita kusta, dengan p sebesar 0.002 ($p<0.05$) dan koefisien

korelasi -0.674. Sehingga dapat dikatakan semakin lama seseorang menderita kusta, maka hal itu akan diikuti semakin menurunnya tingkat caspase-3, demikian juga sebaliknya.

Pada penelitian ini didapatkan rerata ekspresi caspase-3 pada penderita yang telah berobat dengan durasi >3-6 bulan (78.77%) lebih tinggi dibandingkan ekspresi caspase-3 pada penderita yang telah berobat 0-3 bulan (76.24%), namun setelah periode pengobatan >6 bulan, ekspresi caspase-3 menunjukkan adanya penurunan (64.51%). Akan tetapi perbedaan rerata ekspresi caspase-3 berdasarkan perbedaan lamanya pengobatan ini tidak bermakna secara statistik ($p=0.186$).



Gambar 5. Grafik linieritas hubungan ekspresi caspase-3 dengan lamanya menderita kusta.

Ekspresi caspase-3 pada penelitian ini juga dikorelasikan dengan usia dan jenis kelamin. Hasil uji korelasi antara ekspresi caspase-3 dengan usia penderita menunjukkan nilai p sebesar 0.398 ($p>0.05$), dengan koefisien korelasi sebesar -0.206. Hal ini menunjukkan tidak adanya hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan usia penderita. Uji t tidak berpasangan menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara ekspresi caspase-3 dengan jenis kelamin, dimana ekspresi caspase-3 pada pasien laki-laki (mean= 69.38) tidak terlalu berbeda jauh dibandingkan dengan ekspresi caspase-3 pada pasien perempuan (mean= 80.34).

Pembahasan

Menurut epidemiologi penyakit kusta, tidak terdapat perbedaan prevalensi antara laki-laki dibandingkan perempuan. Pada penelitian ini, jumlah penderita kusta laki-laki lebih banyak bila dibandingkan penderita perempuan, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada jenis kelamin antara tipe kusta PB dan MB ($p=0.109$). Hal ini sesuai dengan studi kasus yang dilakukan di Makassar oleh Apriani dkk (2014) menyatakan dari hasil analisis *case control* bahwa jenis kelamin tidak bermakna sebagai faktor risiko terhadap kejadian penyakit kusta, $OR=1,357$ (95% CI 0,760-2,422) [5].

Distribusi usia sangat bervariasi pada berbagai pelaporan statistik kusta di seluruh dunia. Bhat dkk (2012) menyatakan insiden kusta lebih tinggi pada usia dewasa muda bila dibandingkan usia anak-anak (usia < 15 tahun) dan insiden kusta tertinggi didapatkan pada usia 16-50 tahun [6]. Hal ini dimungkinkan karena pada rentang usia tersebut tingkat mobilitas cukup tinggi sehingga terdapat risiko kontak dengan sumber penularan. Pada penelitian ini, didapatkan 2 penderita (10.5%) berusia < 15 tahun dan sebanyak 17 penderita (89.5%) berusia 16 – 50 tahun. Analisis statistik menunjukkan usia subyek pada kelompok PB dan MB tidak berbeda secara bermakna ($p=0.614$).

Kriteria WHO digunakan untuk penggolongan kelompok subyek penderita kusta. Subyek dibagi menjadi dua kelompok yaitu PB dan MB, dimana penderita yang masuk dalam kelompok pausibasiler lesi tunggal digabungkan dalam kelompok PB. Pada akhir penelitian didapatkan 11 kasus MB (57.8 %) 8 kasus PB (42.1%). Kekambuhan setelah pemberian regimen MDT-WHO dapat dijumpai, baik pada kasus PB dan MB. WHO memperkirakan risiko kekambuhan sebesar 0.77% untuk pasien multibasiler dan 1.07% untuk pausibasiler setelah terapi MDT [7]. Di sini tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada penderita yang pernah menderita kusta

sebelumnya antara tipe kusta PB dan MB ($p=0.206$).

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan bermakna pada rerata ekspresi caspase-3 penderita PB dibandingkan MB, dimana rerata ekspresi caspase-3 pada penderita PB jauh lebih tinggi dibandingkan dengan rerata ekspresi caspase-3 pada penderita MB. Dengan uji korelasi, didapatkan hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta, dimana ekspresi caspase-3 cenderung lebih tinggi pada tipe kusta PB dibandingkan pada tipe kusta MB. Temuan ini mendukung hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Walsh (2004) dan de Souza dkk (2010). Walsh dkk (2004) menggunakan teknik TUNEL dan menemukan bahwa tingkat apoptosis lebih tinggi pada pasien pausibasiler dibandingkan pada pasien multibasiler [8,9]. Studi serupa oleh de Souza dkk (2010) juga menemukan apoptosis yang lebih tinggi disertai rendahnya protein anti apoptosis Bcl-2 pada kasus tuberkuloid dibandingkan lepromatosa [10]. Kedua penelitian terdahulu ini menggunakan teknik TUNEL, dimana tidak dapat dibedakan antara proses nekrosis dengan apoptosis.

Hasil sebaliknya didapatkan pada studi oleh Quaresma dkk (2010, 2012) yang menyatakan bahwa apoptosis lebih tinggi pada kelompok LL dibandingkan kelompok TT [11,12]. Temuan tersebut mendukung konsep bahwa pada tipe LL terjadi multiplikasi *M.leprae* di makrofag dalam jumlah besar sehingga apoptosis menjadi bagian dari sistem imun untuk mengeliminasi bakteri. Konsep tersebut juga didukung oleh studi yang menunjukkan bahwa pemberian *M.leprae* pada kultur monosit penderita LL menyebabkan peningkatan ekspresi TNF- α dan BAX dan menginduksi apoptosis [13]. Namun kelemahan studi oleh Quaresma (2012) ialah kurangnya data mengenai status pengobatan penderita, lamanya menderita kusta dan adanya reaksi kusta yang timbul.

Pada penderita yang pernah mengalami kusta sebelumnya didapatkan ekspresi caspase-3 yang relatif rendah. Analisis statistik menunjukkan perbedaan yang bermakna antara ekspresi caspase-3 pada penderita yang pernah menderita kusta sebelumnya dengan penderita yang tidak pernah menderita kusta sebelumnya. Terjadinya kekambuhan pada penderita-penderita tersebut dapat disebabkan oleh rendahnya ekspresi caspase-3 sehingga menyebabkan adanya persistensi bakteri. Namun, rendahnya ekspresi caspase-3 ini dapat juga berkaitan dengan pengobatan yang pernah diterima oleh penderita sehingga apoptosis menjadi lebih rendah karena proses resolusi penyakit.

Studi oleh Ajith dkk (2005) menemukan adanya kenaikan signifikan apoptosis pada penderita kusta pausibasiler dan multibasiler yang mendapat regimen MDT, dimana evaluasi dilakukan pada bulan ketiga dan keenam [14]. Pada penelitian ini, rerata ekspresi caspase-3 pada penderita yang telah berobat dengan durasi >3-6 bulan lebih tinggi dibandingkan ekspresi caspase-3 pada penderita yang telah berobat 0-3 bulan dan setelah periode pengobatan >6 bulan, ekspresi caspase-3 menunjukkan adanya penurunan. Namun perbedaan rerata ini tidak bermakna secara statistik.

Terdapat perbedaan regimen pengobatan pada tipe kusta PB dan MB, yaitu adanya perbedaan dosis dapson dan pada regimen PB tidak didapatkan komponen klofazimin. Perbedaan regimen pengobatan ini juga dapat menimbulkan bias pada perbedaan ekspresi caspase-3 pada penderita PB dan MB. Hal ini dikarenakan adanya efek pro apoptosis dari klofazimin dan dapson. Pada studi yang dilakukan oleh Fukutomi dkk (2011) pada kultur makrofag yang diperoleh dari monosit manusia, pemberian klofazimin menyebabkan penurunan aktivitas metabolik dan peningkatan aktivitas caspase-3 sehingga mereka menyimpulkan bahwa klofazimin dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada makrofag [15]. Dapson (sulfonamid) juga terbukti dapat menginduksi

apoptosis dari lekosit yang terdapat dalam sirkulasi, dimana bentuk metabolitnya dapat memicu faktor pro apoptosis [14].

Berkaitan dengan durasi seseorang menderita kusta, didapatkan hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan lamanya menderita kusta ($p < 0.05$). Akan tetapi, data mengenai durasi menderita kusta ini memiliki subyektifitas sangat tinggi. Apoptosis merupakan mekanisme yang terlibat dalam homeostasis tubuh, sehingga derajat terjadinya apoptosis sangat berfluktuasi. Aktivasi caspase-3 sangat mungkin hanya terjadi pada periode awal terjadinya apoptosis, sehingga keberadaan caspase-3 yang teraktivasi hanya bersifat transien. Sejauh ini, belum ada literatur yang menyebutkan rentang masa aktif caspase-3.

Berdasarkan uji statistik, ekspresi caspase-3 tidak dipengaruhi oleh parameter klinis seperti usia dan jenis kelamin. Temuan serupa dilaporkan oleh Andersson dkk (2003), yang menyatakan bahwa aktivitas caspase-3 nampaknya tidak dipengaruhi oleh usia dan jenis kelamin [16]. Bellini dkk (2010) juga menyatakan bahwa usia, jenis kelamin, konsumsi alkohol dan merokok tidak berpengaruh pada caspase-3 [17].

Makrofag sebagai sel spesifik yang mengalami apoptosis dapat diidentifikasi dengan spesifik, yaitu dengan pewarnaan imunohistokimia CD68. Untuk menentukan pewarnaan sitoplasma dari caspase-3 yang teraktivasi hanya terbatas pada sel makrofag saja dapat dilakukan pewarnaan ganda caspase-3 dan CD68 sebagai antibodi monoklonal untuk petanda makrofag [18].

Pada penelitian ini, sediaan jaringan yang telah dilakukan pengecatan imunohistokimia kemudian dilakukan penghitungan sel yang mengalami apoptosis menggunakan metode immunoratio sehingga diharapkan meminimalkan subyektifitas. Akan tetapi, metode imunohistokimia tetap memiliki kelemahan karena sangat bergantung pada kualitas pengecatan. Penggunaan metode penelitian yang lebih representatif seperti *Enzyme Link ImmunoSorbent Assay* (ELISA)

diharapkan dapat mengurangi faktor perancu pada penelitian ini.

Simpulan dan Saran

Pada penelitian ini didapatkan hubungan yang signifikan antara ekspresi caspase-3 dengan tipe kusta, yaitu ekspresi caspase-3 cenderung lebih tinggi pada tipe kusta PB dibandingkan pada tipe kusta MB.

Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan dengan menyingkirkan semua faktor yang dapat menimbulkan bias serta masa observasi yang lebih panjang untuk mengamati perubahan ekspresi caspase-3. Pengembangan ekspresi caspase-3 sebagai salah satu petanda biokimia untuk melihat prognosis pada penderita kusta dapat dipertimbangkan

Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. Global strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining leprosy control activities 2006-2010. 2006. Operational Guidelines. Geneva: World Health Organization.
- [2] Makino M. Host Defense Against *M. leprae*.: Leprosy, Science Working Towards Dignity. 2011. Editor: Masanao M, Masanori M, Masamichi G dan Kentaro H. Tokai. Japan University Press. Chapter 7
- [3] Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nielsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. 2001. Scandinavian Journal of Immunology. Dec;54(6):630e9
- [4] Garrity MM, Burgart LJ, Riehle DL, et al. Identifying and Quantifying Apoptosis: Navigating Technical Pitfalls. 2013. Modern Pathology. 16(4):389-394
- [5] Apriani D N, Rismayanti, Wahiduddin. Faktor Risiko Kejadian Penyakit Kusta di Kota Makassar. 2014. repository.unhas.ac.id
- [6] Bhat R.M, Prakash C. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. 2012. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Vol 20
- [7] World Health Organization. The Leprosy Unit: Risk of relapse in leprosy. 1995. Indian Journal of Leprosy ;67:13-26
- [8] Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Infection of Mouse Macrophages with

- Viable Mycobacterium leprae Does Not Induce Apoptosis. 2010. *Jornal of Investigative Dermatology*. JID:201
- [9] Walsh, DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KS. TUNEL and Limited Immunophenotypic Analyses of Apoptosis in Paucibacillary and Multibacillary Leprosy Lesions. 2004. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology*. 41 : 265–269
- [10] Souza V, Nogueira M, Belone A, dkk. Analysis of Apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. 2010. *Federation of European Microbiological Societies Immunology Medical Microbiology*. 60: 270–274
- [11] Quaresma JA, Lima LW, Fuzii HT, Libonati RM, Pagliari C & Duarte MI. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. 2010. *Microbiology Pathogenesis* 49: 135–140
- [12] Quaresma JA, Almeida FA, Aarao TL, dkk. Transforming growth factor β and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the Mycobacterium leprae infection. 2012. *Microbes and Infection* 14 : 696-701
- [13] Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumor necrosis factor-alpha. 2003. *Immunology*;109:156e64
- [14] Ajith C, Gupta S, Radotra B, dkk. Study of Apoptosis in Skin Lesions of Leprosy in Relation to Treatment and Lepra Reactions. 2005. *International Journal of Leprosy*. Volume 73, Number 4
- [15] Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M. Apoptosis-Inducing Activity of Clofazimine in Macrophages. 2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 4000–4005
- [16] [Andersson M](#), [Honarvar A](#), [Sjöstrand J](#), [Peterson A](#), [Karlsson JO](#). Decreased caspase-3 activity in human lens epithelium from posterior subcapsular cataracts. 2003. [Experimental Eye Research](#). Feb; 76(2):175-82
- [17] Bellini M F, Cury P M, Silva A E. Expression of Ki-67 Antigen and Caspase-3 Protein in Benign Lesions and Esophageal Carcinoma. 2010. *Anticancer Research* July. vol. 30 no. 7 2845-2849
- [18] Dukers D F, Meijer C, Berge R, Vos W, Ossenkoppele G, Oudejans J. High numbers of active caspase 3–positive Reed-Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin disease predict favorable clinical outcome. 2002. *Blood* ;100:36-42.