

Respons Sitokin TNF- α Dan IL-4 Pasca Stimulasi Antigen Fusi Resat-6-CFP-10

CYTOKINE RESPONSE OF TNF- α AND IL-4 POST-STIMULATION rESAT-6-CFP-10 FUSION ANTIGEN

Rahma Indah Pratiwi¹, Jusak Nugraha¹, dan Betty Agustina Tambunan¹,
dan Francisca Srioetami Tanoerhardjo²

¹Departemen/Instalasi Patologi Klinik Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya
KAMPKampus KaUS A Univrsitas Airlangga. Kampus A Universitas Airlangga
Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47. Surabaya - 60131 Indonesia

²Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Jl. Percetakan Negara 29 Jakarta Pusat
Email:drpratiwi88@gmail.com

Submitted : 09-06-2017, Revised : 27-02-2017, Revised : 19-09-2017, Accepted : 26-02-2017

Abstract

Protective immunity of tuberculosis (TB) infection is highly dependent on the balance of Th1 and Th2 cytokines. TNF- α cytokines produced by Th1 cell retain a latent status, and IL-4 produced by Th2 aids in the production of antibodies. The recent development of the vaccine candidates shows that rESAT-6-CFP-10 fusion antigen is specific to induce protective immune responses. The objective of the study was to determine the immune response. This study used a quasi experimental design in the laboratory in vitro with cultured PBMC of patients with new cases of pulmonary TB, latent TB and healthy individuals. Examination of TNF- α and IL-4 levels was done by ELISA. The highest TNF- α mean levels were 866,05 in the latent TB group, compared to 814,56 in active TB and 414,58 in healthy individuals, but they were not significantly different. The highest IL-4 mean levels were 1,39 in the active TB group, compared to 0,88 in latent TB and 0,74 in healthy individuals, but they were not significantly different. High levels of TNF- α and low levels of IL-4 in latent TB post-stimulation of rESAT-6-CFP-10 fusion antigen show that the candidate vaccine is capable of providing protective reponse against Mycobacterium tuberculosis infection.

Key words : TNF- α , IL-4, PBMC, ELISA, rESAT-6-CFP-10

Abstrak

Imunitas protektif terhadap infeksi tuberculosis sangat bergantung terhadap keseimbangan sitokin T-helper (Th)-1 dan Th2. Sitokin TNF- α yang disekresi oleh sel Th1 mampu mempertahankan status laten, dan IL-4 yang disekresi oleh Th2 membantu produksi antibodi. Pengembangan kandidat vaksin terbaru yaitu antigen fusi rESAT-6-CFP-10 bersifat spesifik terhadap respons imun protektif. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui respons imun seluler melalui kadar TNF- α dan IL-4 pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen semu di laboratorium secara in vitro pada kultur PBMC. Pemeriksaan kadar sitokin TNF- α dan IL-4 dengan metode ELISA. Rerata kadar TNF- α pasca stimulasi paling tinggi ditemukan pada kelompok TB laten 866,05, dibandingkan TB aktif 814,56 dan orang sehat 414,58, tetapi tidak berbeda bermakna. Reratakadar IL-4 pasca stimulasi paling tinggi ditemukan pada kelompok TB aktif, dibandingkan TB laten dan orang sehat, tetapi tidak berbeda bermakna. Kadar TNF- α yang tinggi dan kadar IL-4 yang rendah pada TB laten pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 menunjukkan bahwa kandidat vaksin mampu memberikan repons protektif terhadap infeksi Mycobacterium tuberculosis secara invitro.

Kata kunci : TNF- α , IL-4, PBMC, ELISA, rESAT-6-CFP-10.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang termasuk 10 besar penyakit penyebab kematian di dunia. *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa saat ini penularan individu terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* ke individu lain terjadi tiap detik. Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang mudah menular dan terutama menyerang organ paru. Penyakit TB berkembang setelah inhalasi droplet terinfeksi *M. tuberculosis* yang dibatukkan oleh penderita TB.^{1,2} Setiap tahun lebih dari 3 juta penderita TB tidak terdiagnosis, tidak terobati atau tidak terdata oleh program nasional TB. Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita TB paling banyak kedua di dunia setelah negara India. Jutaan penderita yang tidak terdiagnosis merupakan kegagalan kesehatan publik global karena TB merupakan penyakit yang menular melalui droplet sehingga orang yang tidak terdiagnosis dan tidak terobati dapat menularkan penyakit ini kepada 10 sampai 14 individu setiap tahun.¹⁻³

Imunitas protektif terhadap bakteri intraselular seperti *M. tuberculosis* sangat bergantung terhadap keseimbangan produksi sitokin tipe Th1 dan tipe Th2. Respons imun pejamu melawan *M. tuberculosis* dimediasi oleh imunitas selular terutama oleh peran sitokin dan sel *T helper* (Th)-1. Berbagai kejadian yang diperantarai oleh sitokin sangat penting untuk menentukan imunitas pejamu melawan *M. tuberculosis* atau resistensi pejamu. Sitokin adalah molekul yang memediasi komunikasi interselular dalam sistem imun, diproduksi oleh berbagai jenis sel.^{3,4}

Tumor Necrosis Factor (TNF)- α merupakan salah satu sitokin yang disekresi oleh sel Th1 dan mempunyai peran penting untuk pencegahan infeksi *M. tuberculosis* dan mempertahankan status laten. Tumor Necrosis Factor Alpha adalah sitokin yang diproduksi terutama oleh monosit atau makrofag, juga diproduksi oleh sel mast, sel endotel, jaringan saraf dan sel limfosit seperti limfosit T dan B dan sel natural killer (NK). Peningkatan jumlah makrofag aktif terjadi ketika TNF- α diproduksi terus menerus untuk pembentukan granuloma. Sebagian besar peran TNF- α adalah menghambat pertumbuhan infeksi bakteri *M. tuberculosis* intraselular dan induksi apoptosis sel terinfeksi.

Kematian sel makrofag merupakan kejadian penting pada imunopatogenesis TB, karena tidak hanya ikut serta pada bakterisidal langsung pada proses respons imun innate tetapi juga memfasilitasi aktivitas respons imun adaptif. TNF- α mempunyai kapasitas dominan untuk mempertahankan status dorman infeksi *M. tuberculosis* pada manusia dan juga menunjukkan aktivitas antimikobakteri yang efektif pada sel mononuklear fagositik. Peran sitokin TNF- α meliputi induksi apoptosis, *maturasi dendritic cell* (DC) dan induksi respons sel T spesifik serta mengarahkan pergerakan leukosit. Penelitian terhadap hewan coba dan observasi klinis pada pasien autoimun yang mendapat terapi antagonis TNF- α menunjukkan bahwa pasien tersebut akan menderita tuberkulosis. Hal ini mengindikasikan bahwa TNF- α merupakan bagian penting dari respons imun protektif terhadap *M. tuberculosis*. Mekanisme proteksi TNF- α sangat kompleks dan bervariasi. Peran TNF- α pada pasien infeksi TB laten mungkin lebih tinggi dibandingkan pada TB aktif yang digambarkan melalui kadarnya pada kultur PBMBC.^{4,5}

Interleukin 4 merupakan salah satu sitokin yang disekresi oleh sel Th2. Sitokin IL-4 diperkirakan berkontribusi terhadap apoptosis limfosit T yang diaktivasi oleh *M. tuberculosis* dengan adanya TNF- α . Interleukin (IL)-4 merupakan sitokin yang dilepaskan oleh berbagai jenis sel antara lain sel *T*, *eosinofil*, *basophil*, *sel mast*, *sel natural killer* (NK) dan beberapa *antigen presenting cell* (APC). Sitokin IL-4 muncul lebih akhir sebagai hambatan terhadap respons Th1. Sitokin IL-4 mampu meningkatkan endositosis makrofag melalui aktivasi *phosphatidylinositol* 3-kinase, sehingga IL-4 masih penting dalam fungsi makrofag, walaupun demikian pada pasien dengan respons IL-4 yang tinggi dapat terjadi penurunan aktivitas makrofag sehingga menurunkan kemampuan makrofag untuk menghancurkan *M. tuberculosis*.^{6,7} Era sebelum tahun 2000, beberapa peneliti melaporkan bahwa pada infeksi TB selain sitokin Th1, terjadi pula peningkatan ekspresi IL-4.^{8,9} Peneliti lain gagal mendeteksi peningkatan kadar IL-4, sehingga masih menjadi kontroversi.¹⁰

Berdasarkan peran TNF- α dan IL-4 yang penting pada patogenesis infeksi TB, maka kami menggunakan dua sitokin tersebut untuk mewakili respons sel Th1 dan Th2 terhadap stimulasi antigen *M. tuberculosis*. Pemahaman mekanisme

respons dan fungsi sitokin yang terlibat dalam TB dibutuhkan untuk mencapai perkembangan dalam pencegahan dan pengendalian TB yang efektif.⁴

Salah satu metode pencegahan penyakit infeksi adalah vaksinasi yang diharapkan menjadi alat yang menghemat biaya untuk eradikasi dan pengendalian TB. Saat ini, *bacillus calmette-Guerin* (BCG) merupakan satu-satunya vaksin yang tersedia untuk pencegahan TB. Vaksin BCG diketahui memiliki efektifitas yang baik melawan TB miliar dan meningitis TB pada anak. Walaupun demikian, *sub-strain* BCG yang digunakan menyebabkan variabilitas efektifitas protektif vaksin BCG melawan TB paru dewasa dan terjadi peningkatan angka insiden TB di dunia dan jumlah individu terinfeksi HIV. Sampai saat ini beberapa vaksin mulai diteliti untuk mencegah TB atau meningkatkan efektifitas BCG.^{11,12}

Identifikasi antigen yang sesuai dan pemilihan cara pemberian yang sesuai dibutuhkan untuk mendesain vaksin subunit terbaru. Antigen yang digunakan adalah antigen yang disekresikan oleh *M. tuberculosis*. Protein ini diproduksi pada stadium awal penyakit dan merangsang respons imun protektif dari sel limfosit Th1. *Antigen early secreted antigenic target protein 6 kDa* (ESAT-6) dan *culture filtrate protein 10 kDa* (CFP-10) adalah dua protein sekretori yang mempunyai peran terbaik yang mampu merangsang respons imun efektif melawan infeksi TB diantara berbagai protein lainnya. Gen yang mensintesis protein ini terletak pada *genomic region of difference-1* (RD1) dan tidak ditemukan pada strain vaksin BCG. Delesi RD1 pada vaksin BCG menyebabkan hilangnya kemampuan imunogenisitas dari vaksin tersebut secara signifikan. Penelitian pada efek imunogenisitas, melalui stimulasi IFN- γ yang dihasilkan oleh Th1 dan sel T sitotoksik menunjukkan bahwa vaksin yang mengandung ESAT6 dan CFP10 merupakan kandidat vaksin terbaru yang terbaik.¹² Penelitian Torabi *et al* tahun 2013 pada hewan coba menunjukkan ada peningkatan respons imun protektif pasca vaksin yang mengandung ESAT6 dan CFP10.¹¹

Sitokin yang dilepaskan pasca stimulasi antigen spesifik secara *in vitro* menggambarkan respons imun terhadap antigen tersebut. Pengetahuan mengenai profil sitokin pada TB masih terbatas. Sehingga pada penelitian ini kami mengukur kadar TNF- α dan IL-4 sebagai respons imun pada supernatan *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) setelah stimulasi

antigen fusi rekombinan (r)ESAT-6-CFP-10 *in vitro* menggunakan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) pada pasien TB paru aktif baru, TB laten dan orang sehat serta mengamati perbedaan kadar sitokin tersebut sebelum dan setelah stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 pada masing-masing kelompok. Metode pemeriksaan ELISA menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang baik untuk mendeteksi sitokin *esktraselular*. Reaktan ELISA juga mampu memisahkan ikatan nonspesifik, hal ini menjadikan ELISA sebagai metode terbaik untuk mendeteksi analit spesifik.¹³

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimen semu (*quasi experimental design*) di laboratorium dengan cara *in vitro*. Penelitian dilakukan antara bulan Oktober 2016 sampai April 2017. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan dari komite etik penelitian kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Jumlah sampel penelitian dibagi menjadi tiga (3) kelompok, yaitu yang pertama kelompok donor PBMC pasien TB aktif sebanyak yang didiagnosis TB berdasarkan hasil pengecatan basil tahan asam (BTA) dan didiagnosis sebagai TB paru aktif kasus baru oleh spesialis paru dari RS Paru Karang Tembok Surabaya, kedua kelompok donor PBMC TB laten berasal dari perawat RS Paru Karang Tembok yang sudah bekerja minimal selama 6 bulan dan ketiga kelompok donor PBMC orang sehat sebanyak diambil dari orang sehat yang berdomisili di Surabaya. Sampel dipilih dengan consecutive sampling. Pasien TB paru yang mendapat obat anti tuberkulosis (OAT) dan pasien dengan keluhan infeksi saluran pernapasan selain TB paru, penderita diabetes *mellitus*, *human immunodeficiency virus-acquired immunodeficiency syndrome* (HIV AIDS), hepatitis B, gagal ginjal kronis dan kelainan hati tidak masuk sebagai sampel penelitian.

Sampel penelitian merupakan supernatant kultur PBMC pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10. Dosis antigen sebanyak 5 μ g/mL, dikultur dengan PBMC selama 120 jam dalam ruangan bertekanan CO₂ 5% dan suhu 37°C. Pemeriksaan sitokin TNF- α dan IL-4 menggunakan metode ELISA. Sitokin TNF- α dan IL-4 dari supernatant kultur PBMC dan antibodi spesifik pertama yaitu anti-human TNF- α atau IL-4 monoclonal antibody yang dilekatkan pada

sumuran ELISA akan membentuk kompleks antigen antibodi. Kompleks antigen dan antibodi ini dideteksi dengan biotinylated antibody spesifik terhadap TNF- α atau IL-4. Substrat TMB solution ditambahkan dan dibiarkan selama 15 sampai 25 menit untuk menginduksi terjadinya warna biru pada sumuran. Perubahan warna diukur dengan panjang gelombang 450 nm.

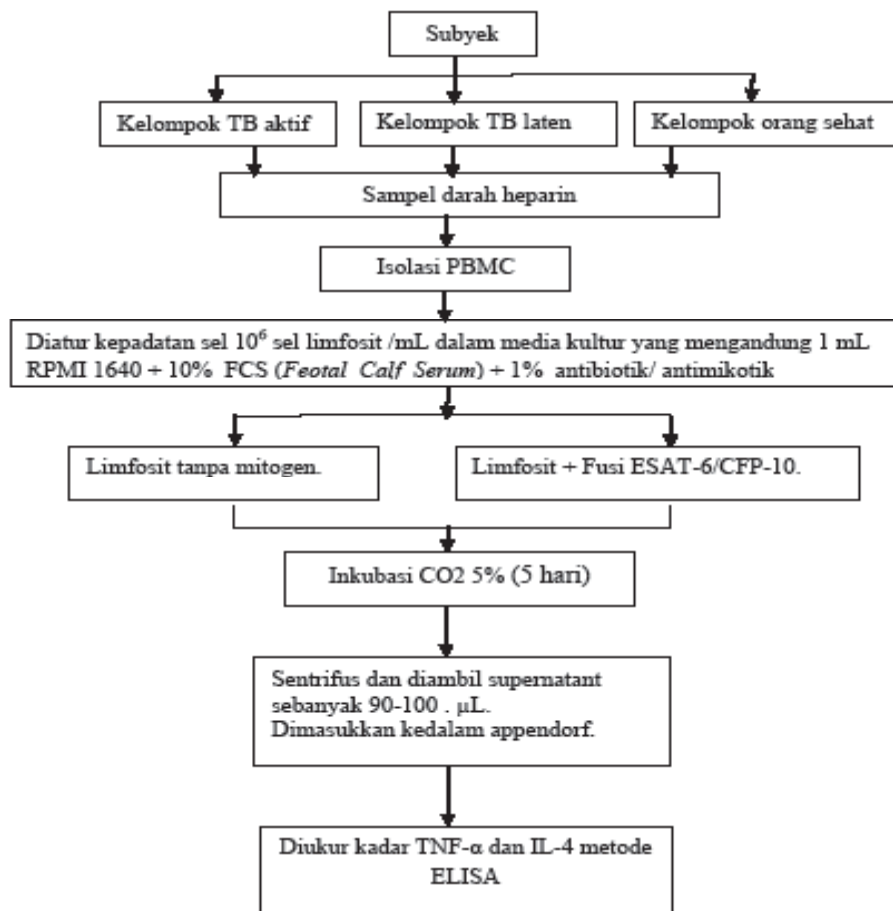
Hasil pemeriksaan ELISA diukur dengan menggunakan ELISA reader dengan hasil berupa nilai kuantitatif dari absorbans sampel. Absorbans yang terbaca di alat dimasukkan ke kurva standar untuk mendapatkan kadar sitokin yang sebenarnya. Kurva standar dibuat berdasarkan pengenceran larutan standar sebanyak 2 kali (*two fold dilution*) yaitu masing-masing untuk TNF- α dan IL-4.

Pengumpulan data dilakukan dengan lembar pengumpulan data (data tidak ditampilkan). Data yang terkumpul diolah dan disajikan dalam bentuk tabel, diagram atau grafik. Perbedaan rerata kadar TNF- α dan IL-4 pada kultur PBMC pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 antara kelompok penderita TB paru aktif, laten dan orang sehat dianalisis dengan Kruskal-Wallis dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Alur penelitian dapat

dilihat pada Gambar 1.

HASIL

Penjaminan mutu pemeriksaan laboratorik penting dilakukan untuk menghasilkan pemeriksaan yang dapat dipercaya. Penjaminan mutu sebelum pemeriksaan dilakukan melalui pengecekan tanggal kadaluarsa, nomor lot setiap kit dan penyimpanan reagensia sesuai dengan instruksi pada kit. Setiap pemeriksaan dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera pada kit insert. Dosis antigen yang digunakan adalah 5mcg. Dosis tersebut merupakan dosis optimal untuk merangsang proliferasi limfosit. Penjaminan mutu hasil dilakukan dengan kontrol impresi, yaitu mencari impresi *within run* dengan melakukan duplikasi pemeriksaan pada 10 sampel penelitian dalam waktu yang bersamaan. Hasil yang diperoleh berupa standard deviation (SD) dan coefficient of variation (CV). Uji impresi kit reagen TNF- α didapatkan SD sebesar 2,69 pg/mL dan CV sebesar 3,56%. Uji impresi kit reagen IL-4 didapatkan SD sebesar 0,05 pg/mL dan CV sebesar 5,48%.



Gambar 1. Alur penelitian

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik	TB Aktif	TB Laten	Orang Sehat
Jenis Kelamin Laki-laki	14 (77,8%)	8 (42,1%)	10 (52,6%)
Jenis Kelamin Perempuan	4 (22,2%)	11 (57,9%)	9 (47,4%)
Rerata umur (tahun)	18-60 (39,33±15,59)	26-58 (41,95±10,45)	18-53 (37±10,04)
<20	3 (16,7%)	0 (0%)	1 (5,3%)
20-50	10 (55,6%)	15 (78,9%)	16 (84,2%)
>50	5 (27,7%)	4 (21,1%)	2 (10,5)
Jumlah subjek	18	19	19

Tabel 2. Kadar TNF- α Pasca Stimulasi Antigen Fusi Resat-6-CFP-10 pada Ketiga Kelompok

	Kelompok			p value*
	TB Aktif	TB Laten	Orang sehat	
Min-Maks Median (Rerata±SD)	18,1-5385,0 152,50 (814,56± 1424,01)	4,3-3224,0 625,60 (866,05± 1.005,19)	0,2-2836,0 43,40 (414,58± 746,74)	0,111

Tabel 3. Kadar IL-4 Pasca Stimulasi Antigen Fusi Resat-6-CFP-10 pada Ketiga Kelompok

	Kelompok			p value*
	TB Aktif	TB Laten	Orang sehat	
Min-Maks Median (rerata±SD)	0,17-9,21 1,08 (1,39±1,99)	0,13-1,87 0,85 (0,88±0,57)	0,01-2,33 0,57 (0,74±0,57)	0,295

Karakteristik Subjek Penelitian

Jumlah subjek penelitian ini sebanyak 56 orang yang terdiri dari 18 penderita TB paru aktif baru, 19 orang perawat sehat yang berisiko menderita TB paru dan 19 orang sehat dengan tes tuberkulin negatif (Tabel 1). Rentang usia penderita TB aktif terbanyak yaitu pada rentang 20-50 tahun sebanyak 10 orang (55,5%) dan penderita TB laten sebanyak 15 orang (78,9%). Penderita TB aktif dan TB laten terbanyak pada usia reproduktif yaitu 20-50 tahun.

Kadar TNF- α Pasca Stimulasi Antigen Fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat

Rerata kadar TNF- α pada kelompok TB laten paling tinggi dibandingkan TB aktif dan orang sehat. Analisis kadar TNF- α pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p>0,05$) (Tabel 2).

Kadar IL-4 Pasca Stimulasi Antigen Fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat

Rerata kadar IL-4 paling tinggi didapatkan

dari kelompok TB aktif dibandingkan TB laten dan orang sehat. Analisis kadar IL-4 pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p>0,05$) (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Karakteristik Subjek Penelitian

Penderita TB paru aktif baru terbanyak berjenis kelamin laki-laki yaitu sebanyak 14 orang (77,8%). Secara keseluruhan diperkirakan 70% kasus BTA positif berasal dari laki-laki.¹⁴⁻¹⁶ Beberapa hipotesis yang memicu kejadian TB paru lebih banyak pada laki-laki akibat perbedaan imunitas, perbedaan paparan *M. tuberculosis* pada lingkungan sosial, kebiasaan merokok. Perbedaan imunitas antara laki-laki dan perempuan dapat dipengaruhi oleh hormon reproduksi. Penekanan hormon androgen pada hewan tikus jantan menyebabkan peningkatan jumlah sel limfosit T di kelenjar limfatik dan peningkatan proliferasi sel setelah paparan antigen.¹⁷ Hormon estradiol mampu meningkatkan aktivasi makrofag.¹⁸ Teori yang menjelaskan mengapa kejadian infeksi TB banyak pada laki-laki dengan aktivitas lingkungan

sosial yang luas adalah semakin banyak terpapar kuman *M. tuberculosis*. Kebiasaan merokok secara aktif meningkatkan risiko menderita TB 78 kali dibandingkan bukan perokok.^{14,19}

Penderita TB paru aktif paling banyak termasuk dalam rentang usia produktif. Laporan WHO (2014) menyatakan bahwa sebagian besar kasus TB terjadi pada usia produktif, walaupun demikian infeksi TB dapat menyerang berbagai usia.^{20,21} Hal tersebut juga diperkirakan karena pada usia tersebut lebih mudah terjadi paparan terhadap kuman *M. tuberculosis* dari lingkungan kerja dan lingkungan sosial.²²

Kadar TNF- α Pasca Stimulasi Antigen Fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat

Penelitian kami menemukan bahwa pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 sitokin TNF- α lebih banyak disekresikan oleh PBMC penderita TB laten dibandingkan penderita TB aktif dan orang sehat. Sesuai dengan hasil penelitian kami, penelitian lain juga menemukan kadar TNF- α plasma penderita TB laten lebih tinggi dibandingkan kontrol sehat dan CFP-10 mampu merangsang respons hipersensitivitas tipe lambat ketika disuntikkan intradermal pada guinea-pigs yang terinfeksi *M. tuberculosis*.^{23,24} Sitokin TNF- α diduga berperan pada respons hipersensitivitas tipe lambat (*delayed type hypersensitivity*). Sitokin TNF- α merupakan modulator yang terpenting pada respons peradangan awal terhadap kuman *M. tuberculosis*. Sitokin TNF- α juga berperan untuk mempertahankan status laten infeksi TB.²³ Imunitas protektif sangat tergantung kemampuan pejamu untuk menghasilkan sitokin sel T spesifik dan merangsang aktivasi makrofag melalui IFN- γ dan TNF- α dan selanjutnya membentuk granuloma. Pembentukan granuloma bukan merupakan respons yang terjadi secara cepat setelah terpapar oleh kuman *M. tuberculosis*. Pembentukan granuloma membutuhkan waktu sampai 3 minggu untuk mencapai jumlah sel yang cukup menghambat proliferasi kuman *M. tuberculosis*. Dalam waktu tersebut, kuman *M. tuberculosis* melakukan invasi dan replikasi cepat di dalam makrofag. Sistem imun innate terus merangsang rekrutmen dan aktivasi makrofag yang menghasilkan beberapa faktor autokrin. Sitokin TNF- α berperan penting pada TB karena mampu mencegah perkembangan TB laten menjadi TB aktif.²⁵⁻²⁷ Hal ini dibuktikan dengan netralisasi

TNF- α (contohnya, pemberian antibodi anti-TNF- α sebagai terapi penyakit inflamasi contohnya psoriasis dan artritis rematoid), menyebabkan reaktivasi TB laten menjadi TB aktif. Netralisasi TNF- α pada mencit yang menderita infeksi TB kronis menyebabkan peningkatan penyebaran bakteri dan 100% mortalitas, serta memberikan gambaran infiltrasi sel-sel inflamasi yang tinggi ke paru.^{23,28}

Kadar sitokin antar individu diperkirakan sangat bervariasi, sehingga hasil pemeriksaan kadar sitokin mempunyai rentang yang sangat lebar. Produksi TNF- α mengalami *down-regulation* atau mengalami hambatan produksi oleh beberapa sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β dan IL-10, yang dapat dirangsang oleh komponen mikobakteri seperti Ag85B, walaupun pada kadar yang lebih rendah dari TNF- α . Rerata kadar TNF- α penderita TB aktif yang lebih rendah dibandingkan penderita TB laten pada penelitian ini menunjukkan bahwa status imun penderita TB aktif termasuk immunocompromised dibandingkan penderita TB laten, dan subjek orang sehat tidak bersifat naïve terhadap antigen *M. tuberculosis*. Sekresi sitokin TNF- α pada subjek orang sehat bisa disebabkan beberapa hal, antara lain paparan dengan Mycobacterium lingkungan atau akibat vaksin BCG. Meskipun demikian, sekresi TNF- α oleh PBMC pasca stimulasi antigen fusi rESAT-6-CFP-10 yang paling tinggi ditemukan pada kelompok penderita TB laten. Hal ini mendukung peran antigen fusi rESAT-6-CFP-10 yang bersifat protektif.^{5,29}

Berbeda dengan penelitian kami, Satchidanandam *et al* (2016) menemukan perbedaan kadar TNF- α yang signifikan pada PBMC kelompok TB aktif dibandingkan TB laten pasca stimulasi antigen *M. tuberculosis* Rv1860. Sitokin TNF- α terutama dihasilkan oleh sel-sel non-T. Antigen *M. tuberculosis* Rv1860 sangat berbeda dengan antigen ESAT-6 dan CFP-10. Seperti diketahui bahwa antigen ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen yang spesifik terhadap sel T CD4+, sedangkan antigen *M. tuberculosis* Rv1860 lebih dominan terhadap sel T CD8+. Penggunaan antigen yang dominan terhadap sel T CD8+ dan spesifik terhadap TNF- α diduga mampu memberikan hasil sekresi TNF- α yang signifikan. Penelitian tersebut memeriksa kadar TNF- α supernatan kultur PBMC setelah kultur selama 48 jam, dengan dosis antigen 2,5 $\mu\text{g/mL}$, sementara pada penelitian kami menggunakan

dosis antigen yang lebih tinggi 5 µg/mL atau 10 µL dengan lama kultur selama 120 jam. Diduga perbedaan HLA menyebabkan respons imun yang berbeda pada tiap individu.³⁰

Kadar IL-4 Pasca Stimulasi Antigen Fusi rESAT-6-CFP-10 pada kelompok TB aktif, TB laten dan orang sehat

Kadar IL-4 pasca stimulasi pada kelompok TB laten lebih rendah dibandingkan TB aktif karena mekanisme sistem imun yang menghambat produksi IL-4 pasca stimulasi dengan antigen spesifik Th1. Produksi sitokin IL-4 dihambat oleh IFN-γ dan IL-2 pada kadar yang tinggi pada orang sehat maupun TB laten berperan aktif untuk menghambat produksi IL-4.⁹ Mekanisme penghambatan ini tidak terjadi pada penderita TB aktif. Oleh sebab itu, kadar sitokin IL-4 ditemukan paling tinggi pada kelompok TB aktif. Penelitian oleh Crevel menunjukkan bahwa penderita TB paru aktif menunjukkan peningkatan produksi IL-4 yang signifikan dari limfosit T. Produksi IL-4 tidak hanya berasal dari sel T CD4+ tetapi juga dari sel T CD8+. Ekspresi berlebihan IL-4 terjadi pada pasien dengan kavitas paru, hal ini memprediksi peran IL-4 yang bersifat merusak jaringan.^{31,32} Produksi IL-4 yang tinggi berhubungan dengan risiko tinggi berkembang menjadi TB aktif.

Kadar IL-4 ditemukan rendah pada kelompok penderita TB aktif, TB laten dan orang sehat. Beberapa hal diduga yang mempengaruhi rendahnya kadar IL-4 antara lain IL-4 aktif berada pada jumlah dan kelipatan yang rendah, mRNA yang mengkode IL-4 mempunyai waktu paruh yang singkat, adanya IL-4 splice variant (IL-4δ2) yang merupakan antagonis IL-4 dan stimulasi sel yang menghasilkan IFN-γ secara cepat menyebabkan *down regulated* proliferasi sel Th2 selanjutnya menurunkan jumlah sitokin IL-4 yang memang sebelumnya rendah.³³ Selain itu Sitokin IL-4 mungkin berhubungan dengan hilangnya respons protektif terhadap kuman *M. tuberculosis* dan berperan pada patogenesis infeksi TB.³⁴

KESIMPULAN

Kadar TNF-α yang tinggi dan kadar sitokin IL-4 yang rendah pada penderita TB laten mendukung peran antigen fusi rESAT-6-CFP-10 yang dominan menginduksi respons protektif Th1 mensekresi TNF-α. Sitokin TNF-α terutama penting untuk mempertahankan status laten TB.

Sitokin IL-4 umumnya bersifat merusak jaringan tubuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dr. Fransisca, dr., Sp.PK dan PBTDK Litbang Depkes Jakarta atas dukungan dan bantuan pengadaan antigen fusi spesifik TB rESAT-6-CFP-10 serta reagen ELISA TNF-α dan IL-4.

DAFTAR RUJUKAN

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 20th Edition. Geneva : WHO; 2015.
2. UNOPS. Global Plan to End TB: The Paradigm Shift 2016-2020.[s.l.] : UNOPS; 2015.
3. Schluger NW. The Pathogenesis of Tuberculosis: The First One Hundred Years. American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology. 2005; 32: 251-6.
4. Vila Y, Cavalcanti N, Carolina M, Brelaz A, Kelle J, Lemoine DA, et al. Role of TNF-Alpha , IFN-Gamma , and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. [s.l.] : Hindawi Publishing Corporation; 2012.
5. Mootoo A, Stylianou E, Arias MA, Reljic R. TNF-α in Tuberculosis : A Cytokine with a Split Personality. Journal of Inflammation & Allergy - Drug Targets. 2009;8: 53-62.
6. Wu H, Wu C, Yu C, Liu Y. Efficiency of interleukin-4 expression in patients with tuberculosis and nontubercular pneumonia. Journal of Human Immunology. 2007;3: 832-8
7. Etna MP, Giacomini E, Severa M, Coccia EM. Pro- and anti-inflammatory cytokines in TB : A two-edged sword in. Semin Immunol [Internet]. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.011>.
8. Schauf V, Rom WN, Smith KA, et al. Cytokine gene activation and modified responsiveness to interleukin-2 in the blood of tuberculosis patients. Journal of Infectious Diseases. 1993;168(4):1056-9.
9. Sanchez FO, Rodrigues J, Agudelo G, et al. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls Immune Responsiveness and Lymphokine Production in Patients with Tuberculosis and Healthy Controls. Journal of Infection and Immunity. 1995; 62(12): 5673-8.
10. Lin Y, Zhang M, Hofman FE, Gong J, Barnes,

- PF. Absence of a Prominent Th2 Cytokine Response in Human Tuberculosis. *Journal of Infection and Immunity*. 1996; 64(4): 1351-6.
11. Torabi A, Tahmoorespur M, Vahedi F, et al. Quantiation of IL-4, IL-10 and IFN- γ genes expression after immunization of mice with CFP-10 and ESAT-6 containing vectors. *Iran Journal of Immunology*. 2013;10(4):205-15.
 12. Farsiani H, Mosavat A, Soleimanpour S, et al. Fc-based delivery system enhances immunogenicity of a tuberculosis subunit vaccine candidate consisting of the ESAT-6:CFP-10 complex. *Molecular BioSystem*. 2016; 12: 2189-201.
 13. ELISA Encyclopedia. Sino Biological Inc., 2004. Available at. www.elisa-antibody.com
 14. Watkins RE, Plant AJ. Does smoking explain sex differences in the global tuberculosis epidemic?. *Epidemiology Infection*. 2006; 134: 333–9.
 15. World Health Organization. Global tuberculosis control. Geneva : WHO; 2000.
 16. Diwan VK, Thorson A. Sex, gender, and tuberculosis. *Lancet*. 1999; 353: 1000–1.
 17. Roden AC, Moser MT, Tri SD. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *Journal of immunology*. 2004; 173: 6098-108.
 18. Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V. Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Journal of Immunology*. 2008; 180: 7980-8.
 19. Thorson A, Long NH, Johansson E., et al. Tuberculosis and Gender. 2001. http://www.who.int/gender/documents/WHO%20TB-Gender%20_finalversion%2031.pdf.
 20. Chakrabarti B, Calverley PMA, Davies PDO, et al. Tuberculosis and its incidence, special nature, and relationship with chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstruction Pulmonary Diseases*. 2007; 2(3): 263–72.
 21. World health organization. World Health Organization: Tuberculosis—Global Facts 2014/2015. Geneva: WHO; 2015.
 22. Diwan, V.K., Thorson A. Sex, gender, and tuberculosis. *Lancet*. 1999; 353: 1000–1.
 23. Yousef BA , Khalil EA, Hamid NH, et al. TNF- α and IL-10 Levels: Possible Risk Markers For Latent M. tuberculosis Infections Among Sudanese. *International Journal of Tropical Medicine*. 2014; 9(1): 1-6.
 24. Trajkovic V, Singh G, Singh B, et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis-Specific 10-Kilodalton Antigen on Macrophage Release of Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide. *Journal of Infection and Immunity*. 2002; 70(12): 6558–66.
 25. Jacobs M, Togbe D, Fremond C, Samarina A, et al. Tumour necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infection*. 2007;9: 623-8.
 26. Steger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis*. 2009; 64: 24-8.
 27. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumour necrosis factor and tuberculosis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. 2007; 12: 22-5.
 28. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, et al. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. *Journal of Infection and Immunity*. 2001; 69(3): 1847–55.
 29. Al-Attayah R, Madi NM, El-Shamy AM, et al. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Federation of European Microbiological Societies*. 2006; 47: 254–61.
 30. Satchidanandam V, Kumar N, Biswas S, et al. The Secreted Protein Rv1860 of Mycobacterium tuberculosis Stimulates Human Polyfunctional CD8+ T Cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2016; 23(4): 282-93.
 31. Crevel RV, Karyadi E, Preyers F, et al. Increased Production of Interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T Cells from Patients with Tuberculosis Is Related to the Presence of Pulmonary Cavities. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181: 1194–7.
 32. Demissie A, Wassie L, Abebe M, et al. The 6-Kilodalton Early Secreted Antigenic Target-Responsive, Asymptomatic Contacts of Tuberculosis patients Express elevated levels of Interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Journal of Infection and immunity*. 2006; 74(5): 2817-22.
 33. Gonzalez RD, Prince O, Cooper A, et al. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiol Spectr*. 2016; 4(5): 1-58.
 34. Surcel HM, Troya-Bloomberg M, Pauline S, et al. Th1/Th2 profiles in tuberculosis based on proliferation and cytokine response of blood lymphocyte to microbial antigens. *Immunology*. 1994; 8(1): 171-6.