

**UJI IMUNOGENITAS PROTEIN REKOMBINAN FUSI
ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis*
TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+
PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Spesialis Patologi Klinik**



Oleh:

**Modestus La'a
NIM 158070500111002**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

LEMBAR PERSETUJUAN

UJI IMUNOGENITAS PROTEIN REKOMBINAN FUSI

ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis*

TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+

PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL

Oleh :

dr. Modestus La'a

NIM. 158070500111002

Dinyatakan memenuhi syarat untuk diuji

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Maimun Z. Arthamin, M.Kes., Sp.PK

dr. Agustin Iskandar, M.Kes., Sp.PK

NIP. 19700526 199702 2 005

NIP. 19730817 199903 2 001



TESIS

**UJI IMUNOGENITAS PROTEIN REKOMBINAN FUSI
ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis***

**TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+
PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL**

Oleh :

dr. Modestus La'a

NIM. 158070500111002

Telah dipertahankan di depan Dewan Penilai

Pada tanggal 3 Januari 2019

Dinyatakan memenuhi syarat

1. Penguji I : dr. Anik Widijanti, Sp.PK (K)

NIP. 19510809 198111 2 001

2. Penguji II : dr. Siti Fatonah, Sp.PK

NIP. 19760227 201410 2 001

LEMBAR PENGESAHAN

**UJI IMUNOGENITAS PROTEIN REKOMBINAN FUSI
ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis*
TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+
PADA KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL**

Oleh :

dr. Modestus La'a

NIM. 158070500111002

**Telah disetujui menjadi Karya Tugas Akhir dalam memenuhi
persyaratan memperoleh keahlian Spesialis Patologi Klinik
Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang**

Ketua Program Studi

DR. dr. Hani Susianti, Sp.PK(K)

NIP. 19690117 199803 2 005

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Karya Tugas Akhir ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tugas akhir ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 tahun 2003 pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, 3 Januari 2019

Mahasiswa,

Nama : dr. Modestus La'a
NIM : 158070500111002
PS : Spesialis I Patologi Klinik

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, atas berkat anugerah-Nya yang melimpah, kemurahan dan kasih setia yang besar akhirnya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul ” **UJI IMUNOGENITAS**

PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis*

TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+ PADA

KULTUR PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL”. Karya Tugas Akhir

ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Spesialis Patologi Klinik pada Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Selesainya penulisan Karya Tugas Akhir ini tentunya tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik itu masukan serta dukungan dalam bentuk apapun.

Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. DR. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. dr. Restu Kurnia Tjahjani, M.Kes selaku Direktur RSUD Saiful Anwar Malang atas kesempatan untuk belajar dan bekerja serta melakukan penelitian di lingkungan Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang.
3. Dr. dr. Hani Susianti, Sp.PK (K) selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik dan dr. Siti Fatonah, Sp.PK selaku Sekretaris Program Studi Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik.

4. dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, M.Kes., Sp.PK selaku pembimbing I dan dr. Agustin Iskandar, Sp.PK selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk memberikan motivasi, bimbingan, dukungan penuh kepada penulis sehingga Karya Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
5. dr. Anik Widijanti, Sp.PK (K) selaku penguji I dan dr. Siti Fatonah, Sp.PK selaku penguji II yang telah bersedia menguji dan memberikan saran untuk penyempurnaan penyusunan tugas akhir.
6. DR. dr. Tinny Endang Hernowati, Sp.PK (K) selaku Kepala SMF/Lab Patologi Klinik dan dr. I Putu Adi Santosa, Sp.PK selaku Kepala Instalasi Laboratorium Sentral RSUD dr. Saiful Anwar Malang atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik.
7. Prof. DR. dr. Kusworini, M.Kes., Sp.PK selaku dosen pembimbing akademik Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik atas bimbingan, arahan serta nasehat dalam menjalani Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Klinik.
8. Segenap staf pengajar Patologi Klinik, Laboratorium Sentral, Laboratorium Biomedik FKUB yang telah membagikan ilmu dan pengalaman serta kerjasamanya selama pendidikan dan penelitian.
9. Seluruh rekan sejawat PPDS I Patologi Klinik teristimewa teman seangkatan dr. Marianne Lukytha Tangdililing dan tim penelitian ESAT-6/CFP-10 M.tb dr. Yeti Indrawati, dr. Jessica Santoso, dr. David Christianto atas kebersamaan dan kerjasama dalam mendukung dan membantu baik selama pendidikan maupun dalam penyelesaian Karya Tugas Akhir.

10. Kedua orang tua penulis, Bapak Ir. Pieter Duma dan Ibu Lintje Sattu yang selalu berdoa dan memberikan semangat untuk kebaikan dan kebahagiaan penulis dan terima kasih untuk bantuan dan kasih sayang yang tak terbatas. Kepada saudara tercinta kakak Moses La'a, Monika La'a dan adik Meinardo serta Melkisedek untuk semangat yang diberikan dan doa untuk kesuksesan serta kebahagiaan bersama.

11. Istriku tercinta, Irma Rante Toding, SKM., untuk setiap doa, kesetiaan, kesabaran serta kasih sayang dalam memotivasi dan menguatkan hati penulis dalam menyelesaikan proses pendidikan dokter spesialis. Anak-anaku tersayang, Kenzo Modestira atas pengertiaanya dan kerelaannya berpisah selama pendidikan dan Jill Kenzi Modestira yang telah bersama mewarnai suka duka selama proses pendidikan.

12. Segenap pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah memberikan banyak bantuan yang berharga.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa membalas kebaikan dan ketulusan semua pihak yang telah membantu penyelesaian Karya Tugas Akhir ini dengan melimpahkan berkat dan karunia-Nya.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh sebab itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk kesempurnaan tulisan ini. Akhir kata semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat dan memberi kebaikan bagi semua pihak.

Malang, 3 Januari 2019

ABSTRAK

La'a, Modestus. 2019. **UJI IMUNOGENITAS PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* TERHADAP EKSPRESI IFN- γ DAN JUMLAH LIMFOSIT T CD4+ PADA KULTUR PBMC.** Tugas Akhir Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembimbing (1) dr. Maimun Zuhaidah Arthamin, M.Kes., Sp.PK, (2) dr. Agustin Iskandar, M.Kes., Sp.PK

Latar Belakang: Vaksinasi merupakan usaha pencegahan dan pemberantasan tuberkulosis (TB) yang efektif dengan menstimulasi respons imun terutama limfosit T CD4+ untuk menghasilkan sitokin-sitokin seperti Interferon gamma (IFN- γ). Interferon gamma memiliki peranan yang sangat penting dalam proteksi terhadap infeksi TB. Protein rekombinan fusi *Early Secretory Antigenic Target 6* kDa (ESAT-6) dan *Culture Filtrate Protein 10* kDa (CFP-10) mempunyai banyak epitop yang sangat kuat dikenali oleh limfosit T sehingga diharapkan dapat menjadi kandidat vaksin baru. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb terhadap respons imun seluler pada kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) pasien TB, kontak TB dan sehat endemik. **Metode Penelitian:** Penelitian eksperimental *in vitro* menggunakan subyek penelitian pasien TB, kontak TB dan sehat endemik masing-masing kelompok 8 orang. Darah vena yang diambil dilakukan isolasi PBMC dan dikultur dengan 3 perlakuan, tidak dipapar protein apapun, dipapar PPD 2 μ g dan dipapar protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dosis 2 μ g/mL. Pemeriksaan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4+ menggunakan metode *flowcytometri*, kemudian dianalisis dengan *Anova* atau *Kruskal Wallis*. **Hasil:** Rerata ekspresi IFN- γ setelah distimulasi protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada kelompok pasien [rerata (SD)]: 39,208% (37,431), kontak TB 14,316% (7,821), dan sehat endemik 12,280% (8,376) dengan $p=0,679$. Rerata jumlah sel T CD4+ setelah distimulasi protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada kelompok pasien 25,969% (12,169), kontak TB 23,269% (8,709), dan sehat endemik 27,585% (8,085) dengan $p=0,264$. **Kesimpulan:** Pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada ketiga kelompok subyek penelitian dengan tiga perlakuan didapatkan hasil perbedaan yang tidak bermakna.

Kata kunci : ESAT-6/CFP-10, M.tb, IFN- γ , limfosit T CD4+

ABSTRACT

La'a, Modestus. 2019. **RECOMBINANT PROTEIN IMMUNOGENICITY TEST OF ESAT-6/CFP-10 Mycobacterium tuberculosis FUSION TOWARDS EXPRESSION OF IFN- γ AND AMOUNT OF CD4+ T LYMPHOCYTE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL CULTURE.** Final Project of Medical Specialist Education Program for Clinical Pathology Faculty of Medicine, Brawijaya University Malang. Advisor (1) dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, M.Kes., Sp.PK, (2) dr. Agustin Iskandar, M.Kes., Sp.PK.

Background: Vaccination is effective prevention and eradication program of Tuberculosis (TB) by stimulating the immune response, especially CD4+ T lymphocytes to produce cytokines such as interferon gamma (IFN- γ). Interferon gamma has an important role in protection against TB infection. Fusion recombinant protein called Early Secretory Antigenic Target 6 kDa (ESAT-6) and Culture Filtrate 10 kDa protein (CFP-10) have many epitopes which are very strong to be recognized by T lymphocytes, so they are expected by the researcher to become new vaccine candidates. The aim of this study was to determine the effect of giving ESAT-6/CFP-10 M.tb fusion recombinant protein to the cellular immune response in Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) in TB patients, endemic TB and healthy contacts. **Research Method:** This in vitro experimental study used TB patients, TB contact and healthy endemic contacts as a subject and each group consist of 8 people. Venous blood was isolated from PBMC and cultured with 3 treatments, not exposed to any protein, exposed to 2 μ g PPD and ESAT-6/CFP-10 fusion recombinant protein with 2 μ g/mL dosage. The flowcytometry method was used to examine IFN- γ expression and CD4+ T lymphocyte count, then these would be analysed by Anova or Kruskal Wallis test. **Results:** The mean IFN- γ expression after stimulated with ESAT-6/CFP-10 fusion recombinant protein in the patient group was [mean (SD)]: 39,208% (37,431), TB contact 14,316% (7,821), and endemic health 12,280% (8,376) with $p=0.679$. The mean number of CD4+ T cells after stimulated ESAT-6/CFP-10 fusion recombinant protein in the patient group was 25.969% (12,169), TB contacts 23,269% (8,709), and endemic health 27,585% (8,085) with $p=0.264$. **Conclusion:** There was no significant difference in administration of ESAT-6/CFP-10 fusion recombinant proteins in three research subject groups with three different treatments.

Keywords: ESAT-6/CFP-10, M.tb, IFN- γ , CD4+ T lymphocytes

DAFTAR ISI

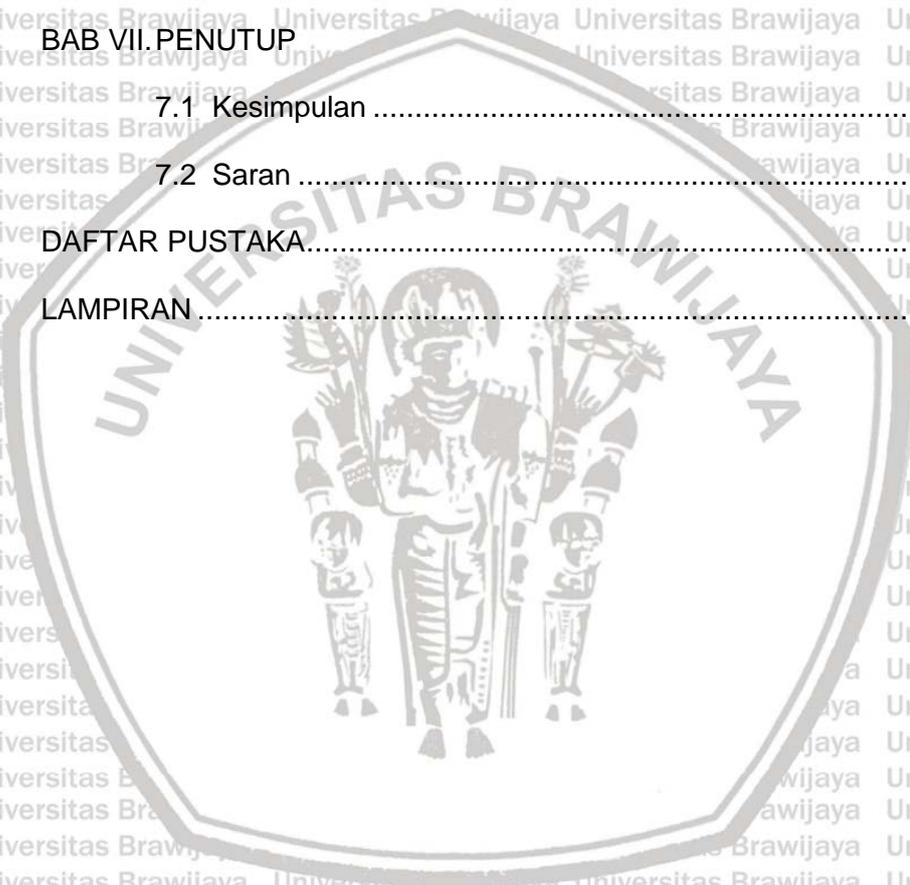
Judul	
Lembar Persetujuan	i
Lembar Penguji	ii
Lembar Pengesahan	iii
Pernyataan Orisinalitas Tulisan	iv
Kata Pengantar	v
Abstrak	viii
Abstract	ix
Daftar Isi	x
Daftar Gambar	xiv
Daftar Tabel	xv
Daftar Lampiran	xvi
Daftar Singkatan	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tuberkulosis	8
2.1.1 Tuberkulosis	8
2.1.2 Struktur dan Karakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.1.3 Epidemiologi	11
	x



2.1.4	Diagnosis	13
2.1.5	Patogenesis	17
2.2	Mekanisme Pertahanan Tubuh terhadap Infeksi Tuberkulosis	23
2.2.1	Respons Imun <i>Innate</i>	23
2.2.2	Respons Imun <i>adaptive</i>	26
2.3	Peranan CD4+ dan IFN- γ pada Mekanisme Proteksi Infeksi TB	32
2.3.1	Sel T CD4+	32
2.3.2	IFN- γ	36
2.4	<i>Purified Protein Derivate</i> (PPD)	38
2.5	Vaksin TB	39
2.6	Protein Rekombinan Fusi ESAT6:CFP-10 Sebagai Kandidat Vaksin	42
2.7	<i>Flow Cytometry</i>	46
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka konsep	49
3.2	Hipotesis Penelitian	50
BAB IV. METODE PENELITIAN		
4.1	Rancangan Penelitian	51
4.2	Hipotesis Penelitian	51
4.2.1	Populasi	51
4.2.2	Sampel	54
4.3	Variabel Penelitian	55
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	55
4.5	Definisi Operasional	55
4.6	Bahan dan Alat Penelitian	58

4.7	Prosedur Penelitian.....	60
4.8	Alur Penelitian.....	66
4.9	Pengumpulan Data dan Analisis.....	67
BAB V. HASIL PENELITIAN		
5.1	Karakteristik Subyek Penelitian.....	68
5.2	Profil Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+	70
5.3	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian	72
5.3.1	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Sehat Endemik	72
5.3.2	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Kontak TB.....	72
5.3.3	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Pasien TB.....	73
5.4	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP-10 pada Tiga Kelompok Subyek Penelitian (Sehat, Kontak, Pasien)	74
BAB VI. PEMBAHASAN		
6.1	Karakteristik Subyek Penelitian	75
6.2	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian	80
6.2.1	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Sehat Endemik.....	81
6.2.2	Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Kontak TB.....	83

6.2.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Pasien TB.....	85
6.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP-10 pada Tiga Kelompok Subyek Penelitian (Sehat, Kontak, Pasien).....	86
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	89
BAB VII. PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	90
7.2 Saran.....	90
DAFTAR PUSTAKA.....	91
LAMPIRAN.....	99



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Dinding M.tb 10

Gambar 2.2 *Mycobacterium tuberculosis*..... 11

Gambar 2.3 Estimasi Tingkat Infeksi TB tahun 2016 12

Gambar 2.4 Alur Diagnosis TB 17

Gambar 2.5 Patogenesis TB 21

Gambar 2.6 Mekanisme Utama dalam Proses Imunitas Alamiah & Adaptif 25

Gambar 2.7 Diagram Skematik Respon Imun Adaptif terhadap M.tb 30

Gambar 2.8 MHC dan Peranannya dalam Pengenalan Antigen 34

Gambar 2.9 Skema Fungsi Th1 35

Gambar 2.10 Struktur Kompleks ESAT-6 CFP-10 43

Gambar 2.11 Desain Sederhana *Flow Cytometer*..... 47

Gambar 2.12 Contoh dot plot, densitas dan kontur pada 2 jenis fluorokrom 48

Gambar 3.1 Kerangka Konsep 49

Gambar 5.1 Rerata jumlah IFN- γ dengan perlakuan tanpa antigen, pemberian PPD, dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6 CFP-10 71

Gambar 5.2 Rerata jumlah sel T CD4+ dengan perlakuan tanpa antigen, pemberian PPD, dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6 CFP-10 71

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perbedaan Subset Sel Th1 dan Th2.....	33
Tabel 2.2	Struktur Interferon Gamma.....	37
Tabel 2.3	Efektivitas BCG	40
Tabel 5.1	Karakteristik Subyek Penelitian	69
Tabel 5.2	Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6 CFP-10) pada kelompok subyek sehat endemik.....	72
Tabel 5.3	Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6 CFP-10) pada kelompok subyek kontak TB.....	73
Tabel 5.4	Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6 CFP-10) pada kelompok subyek Pasien TB.....	73
Tabel 5.5	Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6 CFP-10 pada tiga kelompok subyek.....	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Profil Data Subyek Penelitian.....	99
Lampiran 2	Data Hasil <i>flowcytometry</i>	100
Lampiran 3	Hasil Analisis Data.....	104
Lampiran 4	Formulir Penjelasan Untuk Mengikuti Penelitian.....	123
Lampiran 5	Surat Pernyataan Persetujuan Ikut Serta Dalam Penelitian.....	125
Lampiran 6	Surat Keterangan Kelaikan Etik Penelitian.....	126
Lampiran 7	Foto-foto Penelitian.....	128



DAFTAR SINGKATAN

APC	:	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BAL	:	<i>Broncho Alveolar Lavage</i>
BCG	:	<i>Bacillus of Calmette and Guerin</i>
BTA	:	<i>Basil Tahan Asam</i>
CFP-10	:	<i>Culture Filtrate Protein 10</i>
CR	:	<i>Complement Receptors</i>
Cy	:	<i>Cyanines</i>
ESAT-6	:	<i>Early Secreted Antigenic Target Protein 6 kDa</i>
FBS	:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	:	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	:	<i>Forward Scatter</i>
H ₂ O ₂	:	<i>gugus Hidroksil Peroksida</i>
HIV	:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ig	:	<i>Immunoglobulin</i>
IL	:	<i>Interleukin</i>
IFN- γ	:	<i>Interferon gamma</i>
iNOS2	:	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LAM	:	<i>Lipoarabinomannan</i>
MDR-TB	:	<i>Multi Drugs Resistant Tuberculosis</i>
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
M. tb	:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	:	<i>Natural Killer Cells</i>
NO	:	<i>Nitric Oxide</i>

NOS2	:	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
Nramp	:	<i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein</i>
TGF- β	:	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TLR	:	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- α	:	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
PBMC	:	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	:	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PE	:	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
PerCP	:	<i>Peridin Chlorophyll Protein</i>
PGL-I	:	<i>Phenolic-Glycolipid I</i>
PPD	:	<i>Purified Protein Derivative</i>
RD	:	<i>Region of Difference</i>
RNI	:	<i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
ROI	:	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
SSC	:	<i>Side Scatter</i>
TB	:	<i>Tuberkulosis</i>
Th	:	<i>T-helper</i>
TNF- α	:	<i>Tumor Necrotizing Factor alpha</i>
WHO	:	<i>World Health Organization</i>





BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), basil tahan asam yang berbentuk batang lurus atau agak bengkok biasanya mengenai paru, walaupun organ lain dapat terkena (Jawetz and Adelberg, 2007). TB telah menjadi masalah kesehatan di seluruh dunia, bahkan penyakit ini telah ada 3000 tahun sebelum masehi (Cole, 2002). Transmisi penyakit ini pada umumnya melalui udara dari percikan kuman baik itu bersin ataupun batuk penderita tuberkulosis paru (Raviglione & O'Brien, 2008).

Diagnosis TB paru ditegakkan dengan gejala klinis, foto toraks, pemeriksaan dahak pasien secara mikroskopis dengan menemukan adanya kuman M.tb melalui pewarnaan *Ziehl-Neelsen*, kultur ataupun melalui tes cepat molekuler. Pemeriksaan dahak dan kultur merupakan pemeriksaan baku emas untuk diagnosis TB, tetapi pada beberapa kasus, diagnosis tidak dapat dibuktikan dan dikonfirmasi secara bakteriologis dan seringkali hanya didasarkan atas kecurigaan yang sangat terhadap TB (konfirmasi klinis) dan respons yang baik terhadap pengobatan anti TB (Palomino, 2005).

Berdasarkan data WHO *Global Tuberculosis Report* 2016, Indonesia menempati posisi ke-2 dengan beban TB tertinggi di dunia. Tren insiden kasus TB di Indonesia tidak pernah menurun, masih banyak kasus yang belum terjangkau dan terdeteksi. Angka TB di Indonesia berdasarkan mikroskopik sebanyak 759 per 100 ribu penduduk untuk usia 15 tahun ke atas dengan jumlah

laki-laki lebih tinggi daripada perempuan, dan jumlah di perkotaan lebih tinggi daripada di pedesaan (Kemenkes RI, 2018).

Dengan angka pasien TB yang terus meningkat, maka diperlukan upaya pencegahan dan pemberantasan penyakit TB, salah satunya dengan pemberian vaksinasi. Vaksinasi yang paling efektif adalah dengan memberikan vaksin yang dapat menstimulasi respons imun, terutama limfosit T, untuk menghasilkan sitokin-sitokin seperti *Interferon Gamma* (IFN- γ), *Tumor Necrosis Factor Beta* (TNF- β), *Interleukin-2* (IL-2), *Interleukin-3* (IL-3) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α), meningkatkan fungsi sel-sel T sitotoksik, dan menstimulasi respons humoral melalui pembentukan antibodi terhadap antigen yang spesifik (Martin, 2006).

Vaksin TB yang paling banyak digunakan sampai saat ini adalah *Bacillus of Calmette and Guerin* (BCG) (Young and Stewart, 2002). Brewer (2000) melakukan penelitian meta-analisis terhadap 26 penelitian efikasi vaksin BCG didapatkan BCG hanya dapat mengurangi risiko TB sebesar 50% dan daya efikasinya dipengaruhi etnis dan letak geografis (Brewer, 2000). Efek proteksi vaksin BCG terhadap infeksi TB bervariasi diakibatkan perbedaan strain yang digunakan dalam vaksin, keadaan lingkungan, dan genetik host. Infeksi TB sangat dipengaruhi oleh sel T representatif pada sistem imun yang bergantung pada ikatan spesifik terhadap epitop antigen, sehingga terjadinya mutasi pada antigen epitop vaksin BCG akan mempengaruhi kemampuan proteksinya (Zhang *et al.*, 2013).

Vaksin BCG yang digunakan saat ini merupakan galur turunan dari BCG awal. Penamaan galur BCG yang digunakan biasanya berdasarkan lokasi vaksin BCG diproduksi seperti BCG Tokyo, Pasteur, Rusia. Karakteristik tiap strain BCG

akan berbeda-beda terutama jika telah dilakukan perbanyakan lebih dari 1000 kali, hal ini dibuktikan dengan penelitian Saki *et al.*, (2009) yang menemukan perbedaan struktur genetik pada BCG strain yang berbeda bahkan terdapat perbedaan genetik antar substrain akibat adanya proses mutasi (Seki *et al.*, 2009). Blanco *et al.*, (2007) menemukan kemampuan yang berbeda dalam menstimulasi limfosit T dan produksi IFN- γ pada berbagai strain BCG (Blanco *et al.*, 2007). WHO pada tahun 1996 merekomendasikan vaksin BCG hendaknya tidak dibuat dari kultur dengan perbanyakan lebih dari 12 kali dari kultur bahan baku kering (Seki *et al.*, 2009).

Vaksin yang memiliki kemampuan dapat memberikan perlindungan terhadap semua bentuk TB pada semua populasi sangat penting pengaruhnya dalam eliminasi TB. Para peneliti yang tergabung dalam *Working Group On New Vaccine* dalam program *Global Plan to Stop TB* telah menemukan banyak kandidat vaksin baru untuk mengatasi penyebaran TB dalam sepuluh tahun terakhir (Wingfield & Jefferys, 2011).

Penelitian terhadap vaksin terus dilakukan, terutama komponen antigenik yang tidak terdapat pada BCG tetapi dapat merangsang perlindungan sistem imun terhadap infeksi TB. *Early Secretory Antigenic Target 6 kDa* (ESAT-6) merupakan salah satu antigen yang diekspresikan oleh *M.tb* tetapi tidak terdapat di BCG. *ESAT-6-specific T cells* umum ditemukan pada pasien dengan infeksi TB. Penelitian Gallegos (2008) membuktikan bahwa *T cell receptor transgenic T cells specific* terhadap ESAT-6 terbukti dapat menghambat infeksi TB (Gallegos *et al.*, 2008).

ESAT-6 dan *Culture Filtrate Protein 10 kDa* (CFP-10) disandi oleh gen *Excretion System-1* (Esx-1). ESAT-6 mempunyai kemampuan untuk melisiskan

membran dan hal ini diketahui berperan dalam kemampuan M.tb dalam menghindari proses fagolisosom dalam sitoplasma makrofag. Strain M.tb yang mengalami mutasi pada gen *esx-1* dapat menghilangkan kemampuan M.tb dalam menghindari proses fagolisosom (Saviola, 2013).

Proses fagositosis intraseluler bakteri termasuk M.tb melalui *Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II - Mediated Antigen Processing Pathway* dan kemampuan CD4+ sel T helper dalam mempresentasikan antigen

TB. Sel T CD4+ terdiri dari dua subset, yaitu sel T helper 1 (Th1) dan sel T helper 2 (Th2). Sel Th1 menghasilkan IFN- γ , TNF- α , dan/atau IL-2, dan berkontribusi dalam pengaktifan makrofag serta pembentukan granuloma (Nagata and Koide, 2012).

Perbedaan genetik pada galur M.tb yang berbeda dapat menimbulkan respons imun yang berbeda-beda yang nantinya akan mempengaruhi tingkat keparahan infeksi M.tb. Rakotosamimanana (2010) menemukan terdapat perbedaan yang bermakna kadar IFN- γ pada *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) yang distimulasi dengan M.tb strain Beijing, strain *Central Asian* (CAS) dan strain *East African-Indian* (EAI) (Rakotosamimanana *et al.*, 2010).

IFN- γ merupakan bahan yang pertama kali diidentifikasi dari sel kultur virus yang menunjukkan adanya replikasi virus. Kadar IFN- γ dapat digunakan untuk menunjukkan kemampuan proteksi sistem imun terhadap infeksi TB (Nagata and Koide, 2012). IFN- γ di produksi oleh limfosit sel T helper dan bekerja pada sel makrofag, sel endotel, fibroblas, sel T sitotoksik dan limfosit B anti-viral (Jalius, 2012). IFN- γ dihasilkan selama respons imun berlangsung oleh adanya antigen spesifik sel T dan *Natural Killer Cells* (sel NK) yang di stimulasi oleh IL-2.(Roostati, 2008). Pengaruhnya mengaktifkan makrofag untuk

meningkatkan fagositosis dan kemampuan membunuh sel tumor, meningkatkan pertumbuhan sel T sitolitik dan sel NK. Aktivitas IFN- γ lainnya yakni meningkatkan presentasi antigen oleh makrofag, mengaktifkan aktivitas lisosom di dalam makrofag, meningkatkan aktivitas Th2, mempengaruhi sel normal untuk meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I, mempromosikan adhesi dan mengikat leukosit yang bermigrasi, mempromosikan aktivitas sel NK dan mengaktifkan APCs, merangsang diferensiasi Th1 dengan pengaturan transkripsi faktor T (Widjaja, 2010). IFN- γ meregulasi ekspresi antigen MHC-1 dan menginduksi MHC kelas II. Dengan diaktifkannya MHC kelas II pada sel endotel, sel tersebut menjadi peka terhadap aksi sel T sitolitik spesifik kelas II (Kusuma, 2007).

Penelitian *in vitro* dengan metode PBMC menunjukkan bahwa M.tb dapat memicu terjadinya apoptosis sel T, hal ini dikarenakan kemampuan M.tb untuk menghambat produksi IFN- γ dan IL-2, namun pada penelitian pada hewan dan manusia belum dapat dibuktikan (Raja, 2004).

Derrick *et al.*, (2011) menemukan kemampuan proteksi vaksin terhadap infeksi TB sangat berkaitan dengan kemampuan dan kualitas sel T CD4+ serta berkaitan erat dengan kemampuan sel T CD4+ dalam mengekspresikan TNF- α , IFN- γ , dan IL-2 (Derrick *et al.*, 2011), sehingga diperlukan penelitian untuk mengetahui apakah protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb dapat menginduksi sintesis IFN- γ oleh limfosit T CD4+ pada kultur PBMC.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4⁺ pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB positif, dan sehat endemik.
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4⁺ pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB positif, dan sehat endemik.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Untuk menentukan pengaruh pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb terhadap ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4⁺ pada kultur PBMC pasien TB, kontak, dan sehat.
2. Untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4⁺ pada kelompok pasien TB, kontak TB positif, dan sehat endemik yang dipapar oleh protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menentukan bahwa pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4⁺ pada kultur PBMC pasien TB, kontak, dan sehat.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah wawasan ilmu pengetahuan sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian

selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya dalam hal pencegahan dan pengobatan tuberkulosis dalam bentuk kandidat vaksin baru.

1.4.2 Manfaat Praktis

- Protein antigenik M.tb galur Indonesia yang digunakan pada penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan dasar vaksin TB.
- Dapat membantu mencegah meningkatnya insiden TB dengan menggunakan bahan dasar vaksin kombinasi berbagai protein yang antigenik M.tb.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Definisi

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh kuman *M.tb*. Umumnya kuman ini menginfeksi paru (TB paru) namun bisa juga menginfeksi organ lain (TB ekstra paru). Penyakit ini ditularkan melalui udara dalam bentuk percikan dahak (*droplet nuclei*) dari pasien yang terinfeksi TB paru dengan cara batuk atau bersin, sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak.

Umumnya penularan lebih mudah terjadi pada ruangan dengan ventilasi yang kurang, gelap dan lembab dimana percikan dahak dapat berada dalam waktu yang lama. Jumlah kuman yang dikeluarkan ke udara dari pasien TB mempengaruhi kemampuan penularan TB, semakin tinggi derajat kepositifan hasil pemeriksaan dahak, maka semakin tinggi tingkat penularannya (Kemenkes RI, 2011). Tingkat penularan yang tinggi juga dipengaruhi oleh daya tahan tubuh yang rendah, dimana risiko penularan *M.tb* sangat tinggi pada mereka yang terinfeksi HIV, gizi kurang, diabetes, merokok dan konsumsi alkohol (WHO, 2017).

2.1.2 Struktur dan Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

M.tb merupakan basil tahan asam yang berbentuk batang lurus atau agak bengkok dengan ukuran 0,2-0,4 x 1-4 μm . *M.tb* tidak bisa dimasukkan dalam klasifikasi gram negatif maupun gram positif. *Mycobacterium* memiliki dinding sel dengan struktur yang dinamis yang mampu berubah selama pertumbuhan

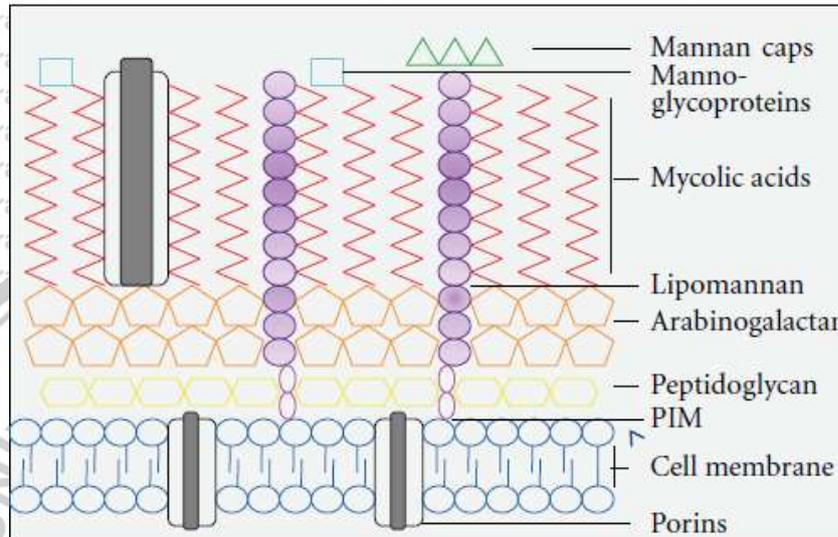
sehingga dapat bertahan dalam lingkungan berbeda. Dalam kondisi yang tidak menguntungkan *Mycobacterium*, seperti adanya mekanisme pertahanan tubuh dari *host*, mereka membentuk *walld deficient (L-form)*. *L-form* memiliki karakteristik pleomorfisme dan kelenturan, disebabkan kurangnya lapisan *murein* sehingga *Mycobacterium* lebih tahan terhadap mekanisme pertahanan tubuh (Markova *et al.*, 2012).

M.tb memiliki dinding sel yang mengandung asam mikolik hidropobik dan komponen ini sekitar 50% dari berat kering M.tb tersebut. Oleh karena lapisan asam mikolik tersebut, masuknya nutrisi ke dalam sel menjadi terganggu sehingga menyebabkan pertumbuhan M.tb menjadi lambat. Namun hal ini juga menyebabkan ketahanan kuman M.tb terhadap enzim lisosom menjadi tinggi (Brennan & Nikaido, 1995). Asam mikolik didistribusikan sebagai lapisan tebal penyusun dinding sel bakteri, sedangkan lapisan internal dari *Mycobacterium* sebagian besar mengandung *Arabinogalactan*, *Phosphatidyl-myo-Inositol Mannosides* (PIMs), dan *Peptidoglycans*. Di luar lapisan asam mikolik, komponen biomolekul mengandung *mannose* lain penyusun dinding mikobakterium yaitu *Mannose-Capped Lipoarabinomannan* (Man-LAM), *Lipomannan* (LM) dan *Mannoglycoproteins* (Torrelles dan Schlesinger, 2010). *Mannan* dan *Arabinomannan* ada pada permukaan sel dan membentuk kapsul luar *Mycobacterium*. Man-LAM, LM dan PIMs termasuk *Mannosyl Phosphatidyl-myo-Inositol* (MPI) merupakan struktur utama membran plasma (Briken *et al.*, 2004).

Mycobacterium tuberculosis jika telah diwarnai tidak akan bisa dihilangkan pewarnaannya dengan alkohol. Bakteri yang telah diwarnai akan hilang pewarnaannya jika diberikan alkohol asam, hal ini tidak terjadi pada bakteri *Mycobacterium*. Salah satu metode pewarnaan yang sering dipakai untuk

melakukan pengecatan terhadap bakteri M.tb adalah metode *Ziehl-Neelsen*.

Pada pengecatan dengan metode fluoresen dengan menggunakan auramine, rhodamine akan memberikan warna kuning-jingga (Jawetz and Adelberg, 2007).



Gambar 2.1 Struktur dinding M.tb

Gambar ini menunjukkan secara skematik komponen utama dinding sel dan distribusi masing-masing komponen. Lapisan dalam mengandung peptidoglikan yang berikatan dengan lapisan *arabinogalactan*. Membran luar mengandung asam mikolik, *glycolipids like (mannose-capped) lipomannan*, dan *mannoglycoproteins* (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011)

Kuman M.tb tumbuh lambat, koloni tampak setelah lebih kurang 2 minggu bahkan kadang- kadang setelah 6-8 minggu. Suhu optimum 37°C, tidak tumbuh pada suhu 25°C atau lebih dari 40°C. Medium padat yang biasa dipergunakan adalah *Lowenstein-Jensen*. *Mycobacterium* tidak tahan panas, akan mati pada suhu 6°C selama 15-20 menit. Biakan dapat mati jika terkena sinar matahari langsung selama 2 jam. Dalam dahak dapat bertahan 20-30 jam. Basil yang berada dalam percikkan bahan dapat bertahan hidup 8-10 hari. Biakan basil ini dalam suhu kamar dapat hidup 6-8 bulan dan dapat disimpan dalam lemari dengan suhu 20°C selama 2 tahun. *Mycobacterium* tahan terhadap berbagai bahan kimia dan desinfektan antara lain phenol 5%, asam sulfat 15%, asam sitrat

3% dan NaOH 4%. Basil ini dihancurkan oleh yodium tinctur dalam 5 menit, dengan alkohol 80 % akan hancur dalam 2-10 menit (Jawetz and Adelberg, 2007).

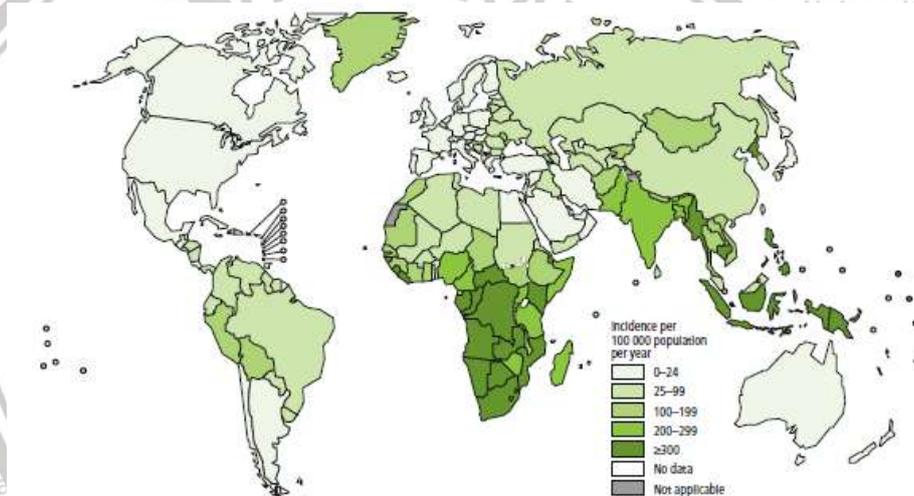


Gambar 2.2 *Mycobacterium tuberculosis*
Gambaran kuman M.tb pada pengecatan Ziehl-Neelsen yang berasal dari hapusan dahak berbentuk batang merah (Khutlang et al, 2010)

2.1.3 Epidemiologi

TB masih menjadi masalah utama kesehatan dunia. TB menginfeksi jutaan manusia di dunia dan menjadi penyebab kematian terbesar kedua pada penyakit infeksi setelah HIV. Diperkirakan pasien TB pada tahun 2016 rata-rata adalah 10.4 juta kasus TB (sekitar 8.8 juta - 12.2 juta kasus TB) yang terdiri dari 90% dewasa, 65% laki-laki, 10% dengan HIV. TB menempati urutan ke-sembilan penyebab kematian terbesar di seluruh dunia, bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan penyebab kematian karena HIV/AIDS. Sebagian besar kematian ini bisa dicegah dengan diagnosis dini dan perawatan yang tepat. Pada tahun 2015 dilaporkan bahwa tingkat keberhasilan pengobatan TB secara umum adalah 83% dan pada negara dengan penghasilan yang tinggi (WHO, 2017).

Sebagian besar jumlah kasus TB terdapat di wilayah Asia Tenggara (45%), Afrika (25%), Pasifik Barat (17%), dan sebagian kecil kasus terjadi di wilayah timur Mediterania (7%), Eropa (3%) dan Amerika (3%). Negara berkembang penyumbang 87% dari semua kasus TB di dunia. Lima negara yang memiliki insiden kasus TB terbesar adalah India, Indonesia, Cina, Filipina dan Pakistan. Diantara India dan Cina, Indonesia sendiri penyumbang 45% dari seluruh kasus TB pada tahun 2016. Nigeria dan Afrika Selatan masing-masing menyumbang 4% dari seluruh kasus TB di dunia (WHO, 2017).



Gambar 2.3 Estimasi tingkat infeksi TB tahun 2016 (WHO, 2017).

Diperkirakan jumlah kasus kematian penderita TB tanpa HIV sekitar 1,3 juta (antara 1,3 – 1.4 juta) kematian dan 374.ribu (antara 325.000 – 427.000) kematian pada penderita TB dengan HIV positif (WHO, 2017). Prevalensi kematian terbanyak terjadi pada pria. Pada tahun 2012 diperkirakan terdapat 2,9 juta kasus TB terjadi pada perempuan dengan angka kematian mencapai 410.000 kasus, dan pada anak-anak diperkirakan terdapat 530.000 kasus

dengan angka kematian 74.000. Angka kematian infeksi TB dapat ditekan jika penderita mendapatkan perawatan kesehatan yang tepat (Floyd *et al.*, 2013).

2.1.4 Diagnosis

Diagnosis yang ditegakkan sedini mungkin akan meningkatkan tingkat keselamatan pasien, deteksi daerah kontak dan memonitor kemungkinan terjadinya penularan terhadap lingkungan sekitar. Penegakkan diagnosis TB dapat dilakukan dengan anamnesis, pemeriksaan fisik dan laboratorium (Senol, 2013).

Keluhan yang dirasakan pasien TB dapat bermacam-macam atau malah banyak pasien ditemukan TB paru tanpa keluhan sama sekali dalam pemeriksaan kesehatan. Keluhan yang terbanyak adalah: demam, batuk/batuk darah, sesak napas, nyeri dada, kelemahan badan (Amin & Bahar, 2009).

Pemeriksaan pertama terhadap keadaan umum pasien mungkin ditemukan konjungtiva mata atau kulit yang pucat karena anemia, suhu demam (subfebris), badan kurus atau berat badan menurun. Pada pemeriksaan fisik pasien sering tidak menunjukkan suatu kelainan terutama pada kasus-kasus dini atau yang sudah terinfiltrasi secara asimtomatik. Demikian juga bila sarang penyakit terletak di dalam, akan sulit menemukan kelainan pada pemeriksaan fisik, karena hantaran getaran lebih dari 4 cm ke dalam paru sulit dinilai secara palpasi, perkusi dan auskultasi. Anamnesis dan pemeriksaan fisik TB paru sulit dibedakan dengan pneumonia biasa. Tempat kelainan lesi TB paru yang paling dicurigai adalah bagian apeks paru. Bila dicurigai adanya infiltrat yang agak luas, maka didapatkan perkusi yang redup dan auskultasi suara napas bronkial, akan didapatkan juga suara napas tambahan berupa ronki basah, kasar, dan nyaring.

Tetapi bila infiltrat ini diliputi oleh penebalan pleura, suara napasnya menjadi vesikular melemah. Bila terdapat kavitas yang cukup besar, perkusi memberikan suara hipersonor atau timpani dan auskultasi memberikan suatu suara amforik (Amin & Bahar, 2009).

Pada saat ini pemeriksaan radiologis dada merupakan cara yang praktis untuk menemukan lesi TB. Pemeriksaan ini memang membutuhkan biaya lebih dibandingkan pemeriksaan dahak, tetapi dalam beberapa hal ia memberikan keuntungan seperti pada TB anak dan TB milier. Pada kedua hal di atas diagnosis dapat diperoleh melalui pemeriksaan radiologis dada, sedangkan pemeriksaan dahak hampir selalu negatif. Lokasi lesi TB umumnya di daerah apeks paru (segmen apikal lobus atas atau segmen apikal lobus bawah), tetapi dapat juga mengenai lobus bawah (bagian inferior) atau di daerah hilus menyerupai tumor paru misalnya pada TB endobronkial (Amin & Bahar, 2009).

Pemeriksaan darah rutin kurang mendapat perhatian, karena hasilnya kadang-kadang meragukan, hasilnya tidak sensitif dan juga tidak spesifik. Pada saat TB baru mulai (aktif) akan didapatkan jumlah leukosit yang sedikit meningkat dengan hitung jenis pergeseran ke kiri. Jumlah limfosit masih di bawah normal, laju endap darah mulai meningkat. Bila penyakit mulai sembuh, jumlah leukosit kembali normal dan jumlah limfosit masih tinggi, laju endap darah mulai normal kembali (Amin & Bahar, 2009).

Pemeriksaan dahak adalah penting karena dengan ditemukannya kuman BTA, diagnosis TB sudah dapat dipastikan. Disamping itu pemeriksaan dahak juga dapat memberikan evaluasi terhadap pengobatan yang sudah diberikan.

Pemeriksaan ini mudah dan murah sehingga dapat dikerjakan di lapangan (puskesmas). Tetapi kadang-kadang tidak mudah untuk mendapatkan dahak,

terutama pasien yang tidak batuk atau batuk yang non produktif. Dalam hal ini dianjurkan satu hari sebelum pemeriksaan dahak, pasien dianjurkan minum air sebanyak 2 liter dan diajarkan melakukan refleksi batuk. Dapat juga dengan memberikan tambahan obat-obat mukolitik ekspektoran atau dengan inhalasi larutan garam hipertonik selama 20-30 menit. Bila masih sulit, dahak dapat diperoleh dengan cara bronkoskopi diambil dengan *brushing* alat *bronchial washing* atau *Broncho Alveolar Lavage* (BAL). Kuman BTA dari dahak bisa juga didapat dengan cara bilasan lambung. Hal ini sering dikerjakan pada anak-anak karena mereka sulit mengeluarkan dahaknya. Dahak yang akan diperiksa hendaknya sesegar mungkin (Amin & Bahar, 2009).

Bila dahak sudah didapat, kuman BTA pun kadang-kadang sulit ditemukan. Kuman baru dapat ditemukan bila bronkus yang terlibat proses penyakit ini terbuka ke luar, sehingga dahak yang mengandung kuman BTA mudah ke luar. Diperkirakan di Indonesia terdapat 50% pasien BTA positif tetapi kuman tersebut tidak ditemukan dalam dahak mereka. Kriteria dahak BTA positif adalah bila sekurang-kurangnya ditemukan 3 batang kuman BTA pada satu sediaan. Dengan kata lain diperlukan 5.000 kuman dalam 1 ml dahak (Amin and Bahar, 2009).

Pemeriksaan tuberkulin masih banyak dipakai untuk membantu menegakkan diagnosis TB terutama pada anak-anak (balita). Biasanya dipakai tes *mantoux*, yakni dengan menyuntikkan 0,1 cc tuberkulin *Purified Protein Derivative* (PPD) intrakutan berkekuatan 5 T.U (*intermediate strength*). Bila ditakutkan reaksi hebat dengan 5 T.U dapat diberikan dulu 1 atau 2 T.U (*first strength*). Kadang-kadang bila dengan 5 T.U masih memberikan hasil negatif dapat diulangi dengan 250 T.U. (*second strength*). Bila dengan 250 T.U masih

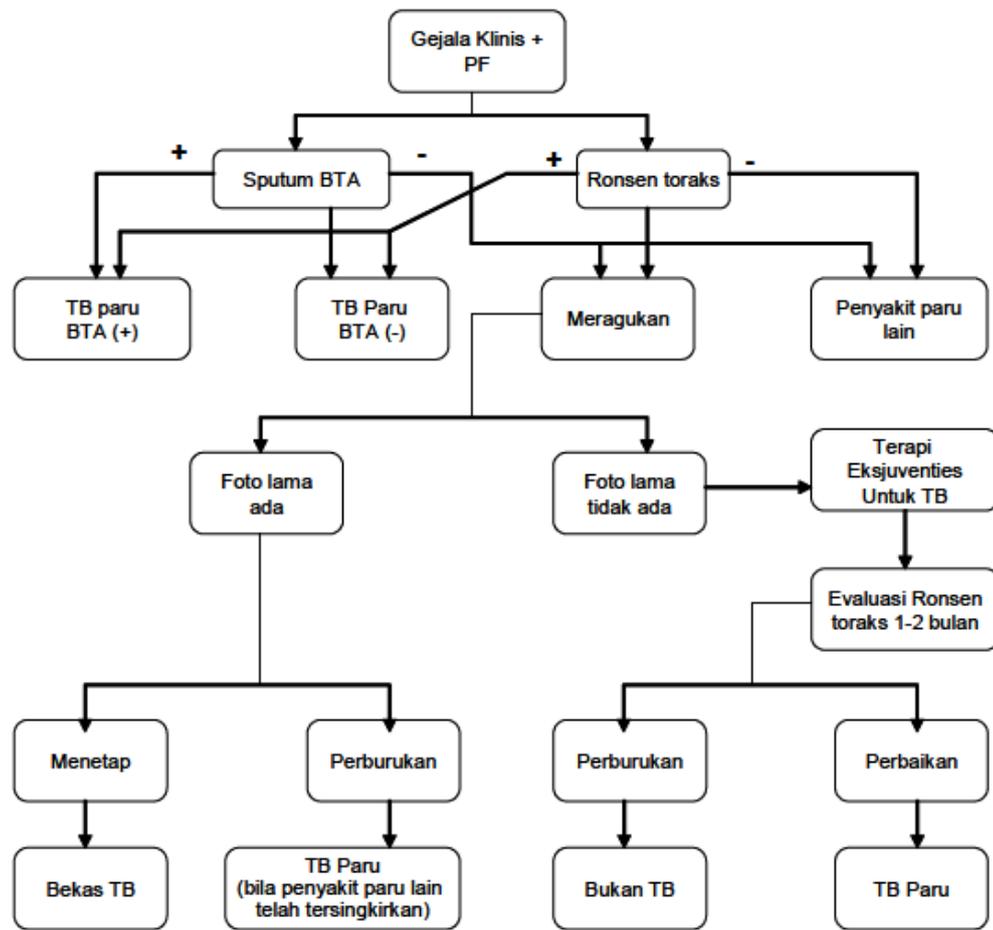
memberikan hasil negatif, berarti TB dapat disingkirkan. Umumnya tes *mantoux* dengan 5 T.U saja sudah cukup berarti (Amin & Bahar, 2009).

Tes tuberkulin hanya menyatakan apakah seseorang individu sedang atau pernah mengalami infeksi *M.tb*, *M. bovis*, vaksinasi BCG dan *Mycobacteria* patogen lainnya. Dasar tes tuberkulin ini adalah reaksi alergi tipe lambat. Pada penularan dengan kuman patogen baik yang virulen ataupun tidak (*M.tb* atau BCG) tubuh manusia akan mengadakan reaksi imunologi dengan dibentuknya antibodi seluler pada permulaan dan kemudian diikuti oleh pembentukan antibodi humoral yang dalam perannya akan menekankan imun seluler (Amin & Bahar, 2009).

Beberapa teknik pemeriksaan berdasarkan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *Isothermal Amplification Assay* (IAA) telah dikembangkan. Berbagai penelitian melaporkan bahwa deteksi cepat *M.tb* menggunakan PCR dengan cara amplifikasi DNA memiliki sensitivitas yang tinggi (Hatta, 2010). Pemeriksaan PCR adalah teknologi canggih yang dapat mendeteksi DNA, termasuk DNA *M.tb*. Namun salah satu masalah dalam pelaksanaan teknik ini adalah kemungkinan kontaminasi. Pemeriksaan dengan metode PCR dapat menggunakan spesimen yang berasal dari paru maupun diluar paru sesuai dengan organ yang terlibat (PDPI, 2006). Salah satu Tes Cepat Molekuler (TCM) yaitu dengan metode *Xpert M.tb/RIF*. Tes Cepat Molekuler merupakan sarana untuk penegakkan diagnosis TB serta ada tidaknya resistensi rifampisin namun tidak dapat digunakan untuk evaluasi hasil pengobatan (Kemenkes, 2016).

Tidak semua fasilitas kesehatan di Indonesia memiliki fasilitas TCM sehingga masih banyak penegakkan diagnosis dilakukan dengan menggunakan

pemeriksaan mikroskopis BTA. Berikut alur diagnosis TB di Indonesia (Kemenkes, 2016).



Gambar 2.4 Alur diagnosis TB
 Diagnosis TB menggunakan data dari Hasil pemeriksaan dahak BTA dan foto toraks (PDPI, 2006)

2.1.5 Patogenesis Tuberkulosis

a. Tuberkulosis Primer

Infeksi TB paru primer adalah suatu peradangan yang terjadi sebelum tubuh mempunyai kekebalan spesifik terhadap basil M.tb. Sebagian besar

penderita TB paru primer (90%) akan sembuh sendiri dan 10% akan mengalami penyebaran endogen (Alsagaff *et al.*,2005).

Kuman TB akan masuk ke dalam jaringan paru melalui *airbone infection*, karena ukurannya yang sangat kecil $<5 \mu\text{m}$, kuman TB dalam *droplet nuclei* yang terhirup dapat mencapai alveolus. Pada sebagian kasus M.tb dapat dihancurkan seluruhnya oleh mekanisme imun nonspesifik, sehingga tidak terjadi proses imunologi spesifik. Akan tetapi pada sebagian kasus lainnya tidak seluruh kuman dapat dihancurkan dan akan berkembang biak di dalam makrofag dan akhirnya menyebabkan makrofag lisis. Selanjutnya M.tb membentuk lesi di tempat tersebut yang dinamakan fokus *Gohn*. Selama perkembangan fokus primer, basil tuberkel dibawa ke jaringan tubuh melalui pembuluh darah dan limfe. Dari fokus primer akan timbul peradangan saluran getah bening (limfangitis lokal) menuju kelenjar limfe regional (limfadenitis regional) sehingga terbentuk suatu kompleks primer yang disebut kompleks primer dari *Ranke*. Infeksi primer dari *Gohn* dan kompleks primer dari *Ranke* dinamakan TB paru primer. Semua proses ini memakan waktu 3-8 minggu. Kompleks primer ini selanjutnya dapat menjadi :

- Sembuh dengan tidak mengalami cacat sama sekali.
- Sembuh dengan meninggalkan sedikit bekas berupa garis-garis fibrotik, kalsifikasi di hilus.
- Berkomplikasi dan menyebar dengan cara : (1) perkontinuitatum, menyebar ke sekitarnya, (2) penyebaran secara bronkogen, baik di paru bersangkutan maupun ke paru sebelahnya. Kuman juga dapat tertelan bersama dahak dan ludah sehingga menyebar ke usus, (3) penyebaran secara hematogen dan limfogen ke organ tubuh lainnya (Amin *et al*, 2009).

Penyebaran ini juga dapat menimbulkan TB pada alat tubuh lainnya seperti tulang, ginjal, adrenal, genitalia dan sebagainya (PDPI, 2006)

b. Tuberkulosis paska primer (Tuberkulosis sekunder)

Kuman yang *dormant* pada TB primer akan muncul bertahun-tahun kemudian sebagai infeksi endogen menjadi TB dewasa (TB *post primer* = TB paska primer = TB sekunder). Mayoritas reinfeksi mencapai 90%. TB sekunder terjadi karena imunitas menurun seperti malnutrisi, alkoholisme, penyakit maligna, diabetes, AIDS, gagal ginjal. TB paska primer ini dimulai dengan sarang dini yang berlokasi di regio atas paru (bagian apikal-posterior lobus superior atau inferior). Invasinya adalah ke daerah parenkim paru dan tidak ke nodus hiler paru (Amin *et al*, 2009).

Sarang dini ini mula-mula juga berbentuk sarang pneumonia kecil. Dalam 3-10 minggu sarang ini menjadi tuberkel yakni suatu granuloma yang terdiri dari sel-sel histiosit dan sel *Datia-Langhans* (sel besar dengan banyak inti) yang dikelilingi oleh sel-sel limfosit dan berbagai jaringan ikat (Amin *et al*, 2009).

TB paska primer juga dapat berasal dari infeksi endogen dari usia muda menjadi TB usia tua (*elderly tuberculosis*). Tergantung dari jumlah kuman, virulensinya dan imunitas pasien, sarang ini dapat menjadi :

- Direabsorpsi kembali dan sembuh tanpa meninggalkan cacat.
- Sarang yang mula-mula meluas, tetapi segera menyembuh dengan serbuk jaringan fibrosis. Ada yang membungkus diri menjadi keras, menimbulkan perkapuram. Sarang dini yang meluas sebagai granuloma berkembang menghancurkan jaringan ikat sekitarnya dan bagian tengahnya mengalami nekrosis, menjadi lembek membentuk jaringan keju.

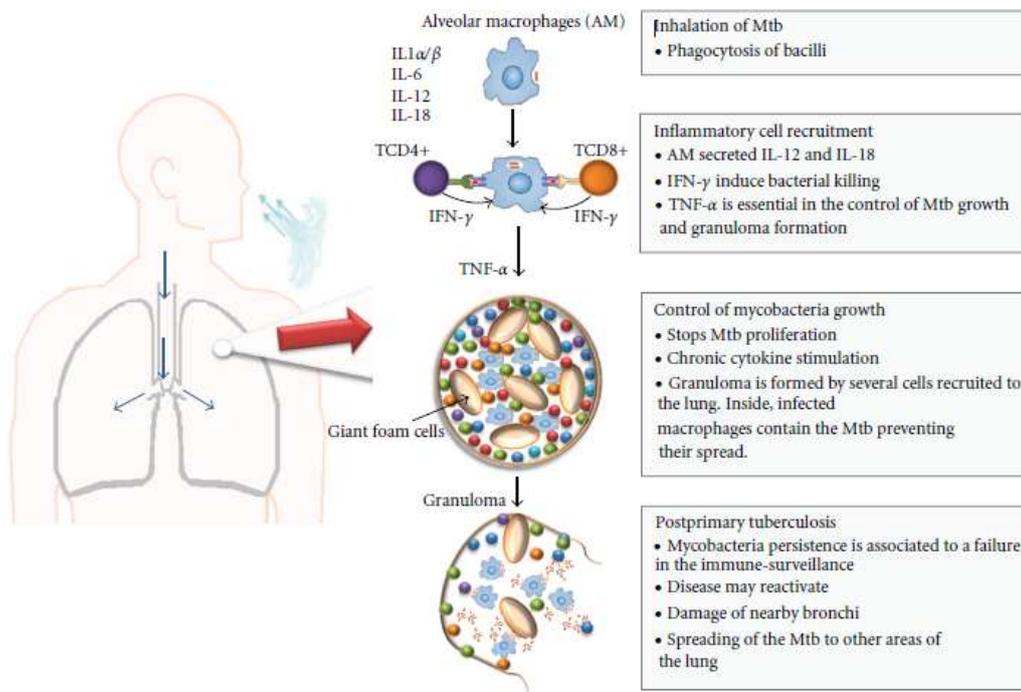
Bila jaringan keju dibatukkan ke luar maka akan terjadi kavitas. Kavitas ini mula-mula berdinding tipis, lama-lama dindingnya menebal karena infiltrasi jaringan fibroblas dalam jumlah besar, sehingga menjadi kavitas sklerotik (Amin *et al*, 2009).

Kuman *M.tb* bersifat obligat aerob, patogen intraseluler, predileksi terletak di paru yang merupakan organ kaya oksigen dan masuk ke tubuh melalui saluran pernapasan. Penularan kuman ke seluruh tubuh melalui saluran limfatik dan pembuluh darah yang melalui paru. Penderita TB ekstra paru seperti TB pleura, tulang, peritoneum, kulit sebesar 15% dari keseluruhan pasien TB. Proses fagositosis *M.tb* oleh makrofag paru merupakan proses pertama interaksi sistem imun *host* dengan bakteri, hal ini akan mempengaruhi perkembangan penyakit. Setelah 2 sampai 6 minggu infeksi, sistem imun seluler mulai berkembang, pergerakan limfosit dan makrofag menuju lesi akan membentuk granuloma. Terjadi pertumbuhan basil di dalam granuloma dan akan bercampur dengan makrofag mati membentuk sebuah kaseosa. Basil dapat bertahan lama di dalam granuloma, dapat juga menjadi aktif atau dibuang melalui saluran pernapasan.

Mekanisme pertahanan tubuh terakhir adalah pembentukan fibrosis jika semua sistem pertahanan gagal mengatasi infeksi basil (Raja, 2004).

Interaksi makrofag dengan *M.tb* terjadi melalui mekanisme terjadinya ikatan *M.tb*, terbentuk penggabungan *M.tb* yang nantinya akan membunuh basil dan pengaktifan sel untuk terjadinya proses peradangan lokal dan akan dipresentasikannya antigen basil untuk sel T agar dapat membangkitkan sistem imun tingkat lanjut. *Complement Receptors* (CR1, CR2, CR3 dan CR4), *Mannose Receptors* (MR) dan reseptor permukaan lainnya memegang peranan penting dalam mekanisme perlekatan basil dengan makrofag sampai proses fagositosis.

Terjadinya ikatan makrofag dan M.tb melalui *Glycoprotein Lipoarabinomannan* (LAM). Prostaglandin E2 (PGE2) dan IL-4, *Th2-type cytokine*, *upregulate receptors* CR dan MR, serta IFN- γ akan menurunkan ekspresi reseptor sehingga akan mengurangi kemampuan pengikatan M.tb dengan makrofag. Kemampuan ikatan antara M.tb dengan makrofag juga dipengaruhi *Surfactant Protein Receptors*, reseptor CD14 dan reseptor *scavenger* (Raja, 2004).



Gambar 2.5 Patogenesis TB

Patogenesis TB terdiri dari 4 tahapan yaitu inhalasi M.tb, pengaktifan sel proinflamasi, kontrol pertumbuhan kuman M.tb dan setelah infeksi primer TB (Zuniga *et al.*, 2012)

Setelah terjadi fagositosis terhadap kuman, kuman akan dihancurkan oleh *intralysosomal acidic hydrolases* pada proses penggabungan *phagolysosome*. Proses ini merupakan cara yang paling ampuh dalam membunuh kuman pada proses fagositosis. Kemampuan bertahan M.tb pada proses fagositosis makrofag diyakini karena kemampuan M.tb menghindari proses penggabungan

fagolisosom. Kemampuan tersebut dikarenakan adanya *mycobacterial sulphatides* yang merupakan turunan dari *multiacylated trehalose 2-sulphate* yang dapat menghambat proses penggabungan fagolisosom. Penelitian *in vitro* menunjukkan M.tb menghasilkan amoniak yang juga mempunyai efek inhibitor (Ahmad, 2011).

Makrofag akan menggunakan berbagai sistem antimikroba untuk menghancurkan M.tb yang telah difagosit seperti *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI), *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI), dan mekanisme yang diperantarai oleh sitokin. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan ROI yang dihasilkan oleh makrofag. Infeksi M.tb pada paru akan meningkatkan jumlah makrofag dan kadar H_2O_2 , tetapi peningkatan H_2O_2 tidak spesifik terhadap infeksi TB saja. Makrofag pada jaringan paru menghasilkan H_2O_2 lebih sedikit jika dibandingkan dengan monosit darah (Raja, 2004).

Proses fagositosis yang diaktifkan oleh $IFN-\gamma$ dan $TNF-\alpha$ akan menghasilkan *Nitric Oxide* (NO) dan berhubungan dengan produksi RNI melalui perantaraan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS2) dengan menggunakan L-arginin sebagai substrat. Kemampuan menghancurkan M.tb dengan RNI terbukti sangat baik (Raja, 2004).

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi M.tb adalah proses apoptosis makrofag. Proses apoptosis yang dilakukan makrofag dimaksudkan untuk menekan jumlah M.tb, proses ini paling banyak terjadi di granuloma (Raja, 2004).

M.tb mempunyai berbagai cara untuk melindungi diri dari sistem imun manusia, seperti memodifikasi antigen yang di tampilkan makrofag sehingga terhindar dari proses penghancuran oleh sel T. M.tb mampu mensekresi

superoxide dismutase dan katalase yang bersifat antagonis terhadap ROI.

Komponen M.tb seperti LAM dan *Phenolic-Glycolipid I* (PGL-I) bersifat radikal oksigen yang kuat. Mekanisme lain yang diperankan oleh *Antigen Presenting Cells* (APCs) dalam menurunkan fungsi sel T yaitu dengan memproduksi sitokin seperti TGF- β , IL-10 atau IL-6 (Raja, 2004).

2.2 Mekanisme Imun Terhadap Infeksi Tuberkulosis

2.2.1 Respons Imun *Innate*

Respons imun *innate* merupakan pertahanan lini pertama terhadap masuknya kuman patogen yang akan melindungi semua jaringan dan organ tubuh terhadap paparan patogen luar. Respons imun ini diawali dengan fagositosis, kemudian sekresi IL-12, dimana prosesnya diinisiasi tanpa adanya paparan antigen sebelumnya. *Innate immunity* bersifat segera sebagai pertahanan nonspesifik terhadap patogen dan tidak menimbulkan memori imunologis (Raja, 2004).

Respons imun *innate* mempunyai kemampuan dalam melemahkan kuman patogen dan pengenalan antigen sebagai benda asing. Peran lainnya yaitu sebagai jembatan penghubung dengan imunitas adaptif dalam mengaktifkan sel-sel imun dari sistem imun adaptif seperti limfosit T (Azuma, 2006; Shingadia & Burgner 2008)

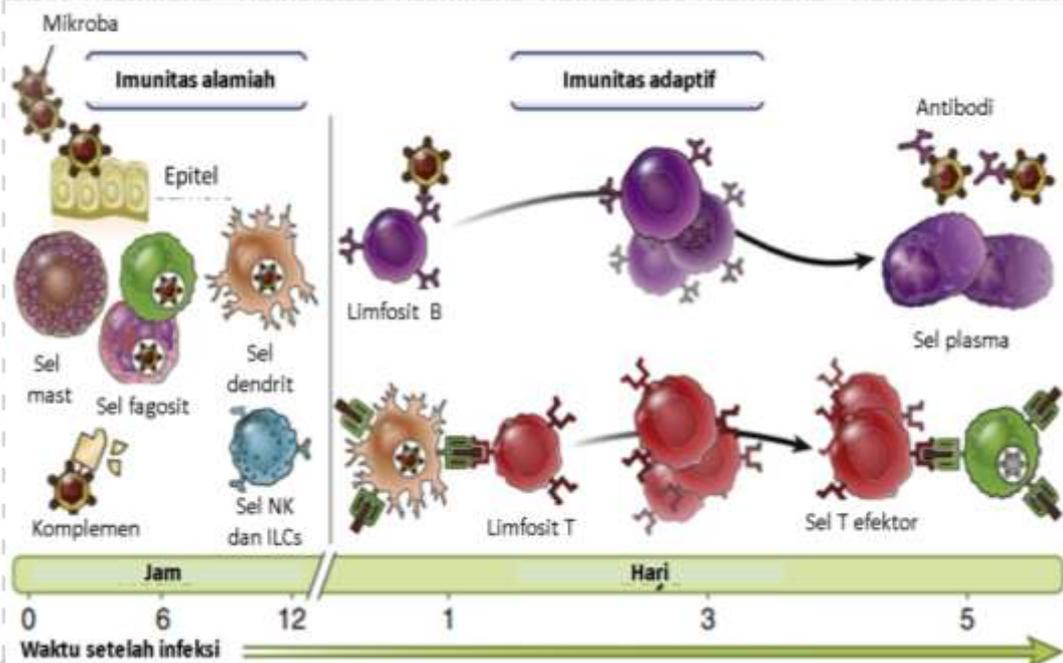
Di dalam saluran pernafasan ini terdapat sel-sel pertahanan yang nantinya dapat menghasilkan sitokin dan kemokin yang akan mengawali reaksi inflamasi sebagai respons terhadap patogen. Sel-sel pertahanan imun *innate* terhadap M.tb terutama diperankan oleh makrofag dan sel dendritik. Sistem ini dikendalikan oleh interaksi antara patogen dan reseptor pada makrofag maupun

pada *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang terdapat pada makrofag dan sel dendritik (Elly and Beatty. 2009).

M.tb yang ada di udara terhirup dan masuk ke paru-paru, bakteri ini akan difagositosis, terutama oleh makrofag alveolar. Makrofag alveolar adalah sel fagositik paru yang dapat juga menjadi habitat M.tb di paru. Fagositosis M.tb oleh makrofag alveolar difasilitasi oleh sejumlah molekul termasuk kolesterol dan mannose reseptor yang mengenali *mannose-rich cell* yang ada pada M.tb (Raja, 2004).

Sel dendritik dan makrofag dapat memfagosit M.tb. Sel dendritik aktif bermigrasi ke kelenjar getah bening dan sangat efektif untuk memproduksi IL-12 dan menyajikan antigen, menginisiasi terbentuknya Th1 dan membentuk CD4⁺ dan CD8⁺. Setelah diaktivasi oleh IFN- γ , makrofag sangat efektif mengeliminasi M.tb, sementara sel dendritik tidak dapat membunuh organisme yang menyerang bahkan setelah aktivasi IFN- γ sekalipun (Raja, 2004). Oleh karena itu, diperlukan respons imun adaptif terhadap TB, sel dendritik mungkin dapat bertindak sebagai *mycobacterial reservoir* untuk pertumbuhan dan berperan dalam penyebaran infeksi saat sel dendritik bermigrasi ke kelenjar getah bening, berbeda dengan makrofag yang memiliki kemampuan selular untuk mengendalikan infeksi TB (Welin, 2011).

Aktivasi sel dendritik dan alveolar makrofag mengakibatkan pelepasan sitokin *pro-inflammatory* seperti IL-1, TNF- α dan yang paling penting IL-12 dan juga kemokin, yang menginisiasi tempat peradangan untuk mempromosikan masuknya monosit, neutrofil dan sel NK dan kemudian limfosit yang sudah diaktifkan (Bafica, et al., 2005).



Gambar 2.6 Mekanisme utama dalam proses imunitas alamiah dan adaptif.

Imunitas alamiah menjadi pertahanan pertama menghadapi infeksi, dengan mencegah terjadinya infeksi dan proses eliminasi mikroba. Respons imunitas adaptif berlangsung beberapa saat kemudian yang dimediasi oleh limfosit dan produk-produknya. Antibodi kemudian akan bekerja dengan menghambat infeksi dan mengeliminasi mikroba, sedangkan limfosit T bertugas mengeliminasi mikroba intraselular. Waktu terjadinya respons imun alamiah dan adaptif adalah perkiraan yang dapat berbeda-beda untuk tiap infeksi (Abbas *et al.*, 2014)

Komponen sistem imun bawaan (*innate immunity*) lainnya yaitu *Natural Resistance Associated Macrophage Protein* (Nramp), *neutrophils*, *Natural Killer Cells* (NK). Plasma lisosim dan enzim lainnya merupakan pertahanan pertama dari sistem imun bawaan yang bekerja menangkal infeksi M.tb (Raja, 2004). Nramp berperan penting sebagai pembawa nitrit dari komponen intraseluler seperti dari sitosol menuju tempat yang lebih asam seperti fagolisosom. Nitrit yang dibawa oleh Nramp akan diubah menjadi NO. Kelainan yang terjadi pada Nramp akan meningkatkan kemungkinan terjadinya infeksi TB (Raja, 2004).

Peningkatan akumulasi netrofil pada granuloma dan peningkatan kemotaksis diyakini memegang peranan penting pada netrofil sebagai tempat multifikasi kuman *M.tb.* Netrofil dapat menghasilkan *defensin* yang terbukti menurunkan kemampuan makrofag dalam membunuh *M.tb.* (Raja, 2004).

Sel NK merupakan salah satu sistem pertahanan tubuh bawaan. Sel ini dapat menghancurkan langsung kuman patogen, maupun menghancurkan monosit yang terinfeksi. Penelitian *in vitro* menunjukkan sel NK berperan penting dalam respons imun melawan infeksi TB. Terjadinya penurunan ekspresi sel NK biasanya terjadi pada pasien dengan MDR-TB. Sel NK mampu memproduksi IFN- γ dan dapat melisis sel target (Raja, 2004).

Toll-Like Receptors (TLR) diyakini berperan penting dalam sistem imunitas terhadap infeksi *M.tb.*, yaitu sebagai penghubung antara sistem imun bawaan dengan sistem imun didapat. Kuman *M.tb.* dapat mengaktifkan sistem imun melalui TLR 2 atau TLR 4 pada *CD 14-independent*, dan ikatan ligan (Raja, 2004).

2.2.2 Respons Imun Adaptif

a. Sistem Imun Seluler

Dalam respons imun adaptif, sel T CD4+ dan sel T CD8+ sangat penting untuk mengendalikan infeksi mikobakterial. Fungsi utama sel T CD4+ adalah untuk memberikan bantuan kepada limfosit lain, terutama dengan menghasilkan sitokin. Bila sel T CD4+ diaktifkan oleh *trigger* TCR karena kehadiran IL-2 dan IL-12, sel tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi efektor sel T CD4+ Th1. Selama awal infeksi *mycobacterial*, *Dendritic Cell* (DC) menghasilkan IL-12, dan dapat menghasilkan IL-2 dan IFN- γ . Produksi IL-2 oleh DC akan

ditingkatkan neutrofil yang terinfeksi M.tb (Jinfang, 2009). Sel T CD8+ juga dapat menghasilkan sitokin seperti IFN- γ dan IL-4 yang berperan dalam sistem keseimbangan Th1 dan Th2 pada pasien dengan infeksi TB. Sel T CD8+ jelas memiliki peran dalam stimulasi sistem imun untuk proteksi infeksi dan mengontrol penularan tapi sejauh mana mereka mengendalikan pertumbuhan bakteri, masih belum diketahui (Skold, et al. 2012).

Kuman M.tb terutama berdiam dalam vakuol makrofag sehingga peranan MHC kelas II dalam mempresentasikan antigen M.tb sangat penting. Penelitian menunjukkan sel T CD4+ sangat berperan dalam mengontrol infeksi TB. Penurunan jumlah sel T CD4+ akan meningkatkan kemungkinan terjadinya infeksi akut maupun reaktivitas infeksi TB. Fungsi utama sel T CD4+ adalah memproduksi IFN- γ dan sitokin lainnya dan mengaktifkan sel makrofag (Raja, 2004).

Infeksi M.tb merupakan contoh klasik infeksi yang sangat bergantung pada sistem imun seluler. Tikus yang terinfeksi M.tb menunjukkan peningkatan pengaktifan sel T CD4+ dan CD8+ di kelenjar getah bening paru dan akan bermigrasi ke paru setelah 2 sampai 4 minggu infeksi dan menunjukkan *memory phenotype* (CD44^{hi}CD45^{lo}CD62L⁻). Sel T yang bermigrasi ke paru kebanyakan CD69+, hal ini menunjukkan terjadinya interaksi sel T dengan APC. Sel T CD4+ dan CD8+ yang terdapat dalam granuloma berfungsi mencegah terjadinya reaktivitas infeksi TB. Fungsi lain dari sel T CD4+ adalah berperan sebagai respons proteksi yang berhubungan dengan sistem imun yang sangat berguna dalam penelitian vaksin (Raja, 2004).

Sel T CD8+ juga dapat menghasilkan sitokin seperti IFN- γ dan IL-4 yang berperan dalam sistem keseimbangan Th1 dan Th2 pada pasien dengan infeksi

TB. Mekanisme protein M.tb pada MHC kelas 1 tidak diketahui dengan pasti. Sel T CD8+ diyakini memegang peranan penting untuk stimulasi sistem imun untuk proteksi infeksi (Raja, 2004).

Sel T *gamma-delta* (sel T $\gamma\delta$) merupakan sel limfosit bergranula besar yang dapat berkembang menjadi sel dendritik di jaringan limfa, kebanyakan sel T $\gamma\delta$ adalah CD8+. Penelitian menemukan kadar sel T $\gamma\delta$ lebih tinggi pada pasien dengan sistem imun protektif terhadap TB dibandingkan pada pasien TB yang tidak memiliki sistem imun protektif terhadap TB (Raja, 2004).

Interleukin (IL-12) menginduksi proses fagositosis M.tb oleh makrofag dan sel dendritik, yang akan memicu perkembangan respons Th1 dengan memproduksi IFN- γ . Gangguan pada *IL-12p40-gene* dicurigai sebagai penyebab terjadinya infeksi dan peningkatan pertumbuhan kuman M.tb, hal ini kemungkinan dikarenakan menurunnya produksi IFN- γ (Raja, 2004).

Interferon gamma merupakan sitokin penting untuk mengontrol infeksi M.tb. IFN- γ diproduksi oleh CD4+, CD8+ dan sel NK. Sitokin IFN- γ mungkin akan memperkuat presentasi antigen yang mengarahkan limfosit T CD4+ dan limfosit T sitotoksik. Interferon gamma merupakan pengaktif utama makrofag dalam menghambat pertumbuhan M.tb (Raja, 2004).

Sitokin TNF- α dipercaya memiliki peranan yang beragam pada patogenesis infeksi TB. Kuman M.tb dapat menginduksi makrofag, sel dendritik dan sel T untuk menyekresi TNF- α . Penelitian pada tikus menunjukkan bawa penurunan TNF- α akan mempercepat kematian dan meningkatkan konsentrasi M.tb. Sitokin TNF- α dan IFN- γ bekerja sama untuk memicu terbentuknya *Nitric Oxide Synthase* (NOS2) (Raja, 2004).

Interleukin (IL-1) bersama dengan TNF- α berperan dalam fase respons akut terhadap infeksi *Mycobacterium* seperti demam dan penurunan nafsu makan. Sitokin IL-1 juga membantu limfosit T mengekspresikan reseptor IL-2 dan pelepasan IL-2 (Raja, 2004).

Interleukin (IL-2) mempunyai peran penting dalam pembentukan limfosit spesifik terhadap suatu antigen, merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 CD4+ dan sangat berperan dalam perjalanan penyakit TB (Raja, 2004).

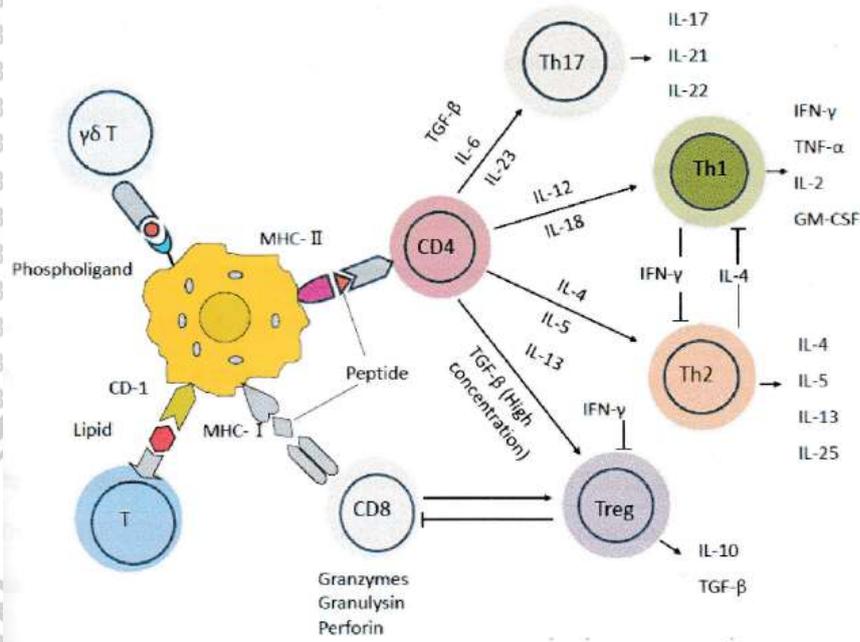
Peranan IL-4 dalam infeksi TB masih menjadi perdebatan. Penelitian yang dilakukan pada manusia didapatkan IL-4 akan menekan respons Th1 tetapi pada penelitian PBMC didapatkan IL-4 tidak meningkatkan respons Th2 pada penderita TB (Raja, 2004).

Interleukin (IL-6) diketahui mempunyai peranan penting dalam proses infeksi TB. Sitokin ini mempunyai peran dalam pengaturan inflamasi, hematopoiesis dan diferensiasi sel T. Sitokin IL-6 mempunyai peranan yang penting dalam proses awal infeksi TB (Raja, 2004).

Interleukin (IL-10) mempunyai fungsi sebagai sitokin anti inflamasi. Sitokin ini diproduksi oleh makrofag dan sel T saat terjadi infeksi M.tb dan akan mempengaruhi proses menonaktifkan makrofag dan menurunkan produksi IL-12 dan nantinya akan menurunkan produksi IFN- γ oleh sel T. Sitokin IL-10 secara langsung menghambat respons sel T CD4+ dan menghambat fungsi APC (Raja, 2004).

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) ditemukan pada lesi granulomatous pada penderita TB dan diproduksi oleh monosit setelah ada stimulasi oleh M.tb atau lipoarabinomannan (LAM). Sitokin TGF- β mempunyai efek anti inflamasi, termasuk menekan makrofag dalam memproduksi ROI dan

RNI, menekan proliferasi sel T, mempengaruhi sel NK dan fungsi CTL, menurunkan pelepasan IFN- γ , TNF- α dan IL-1 (Raja, 2004).



Gambar 2.7 Diagram skematik respon imun adaptif terhadap M.tb (Dhedha, 2011) Makrofag terinfeksi dan sel dendritik menyekresi sitokin meliputi IL-12, IL-23, IL-7, IL-15, TNF α dan mempresentasikan antigen ke populasi sel T termasuk sel T CD4+ (MHC kelas I), sel T CD8+ (MHC kelas II), sel T CD1-restricted (glycolipid antigens) dan sel T $\gamma\delta$ (phospholigands). Sel T ini memproduksi sitokin efektor IFN- γ yang mengaktifasi makrofag bersama-sama dengan TNF- α dalam upaya membunuh basil M.tb intraseluler melalui *intermediate reactive oxygen and nitrogen*. Sel T sitotoksik CD8+ dapat membunuh basil M.tb intraseluler melalui jalur yang dimediasi granulysin dan perforin. Sel Th2 CD4+ memproduksi sitokin immunosupresif seperti IL-4 dan sel T *regulatory* CD4+CD25+FoxP3+ (Treg) memproduksi IL-10 dan TGF- β yang mensupresi mekanisme efektor *mycobacterisidal*. Sel T subset yang disebut T helper 17 (Th17) yang diproduksi karena adanya IL-23 dikenali dengan adanya produksi IL-17, merupakan modulator inflamasi penting dan respons *recall memory*. Sel Th17 dapat merekrut netrofil dan monosit, dan produksi IFN- γ oleh T CD4+, dan menstimulasi sintesis kemokin. IFN- γ dapat mensupresi produksi IL-17 oleh sel Th17. Terdapat regulasi yang kompleks antara respons sel Th1, Th2, Th17 dan Treg. (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; IFN, *interferon*; TGF, *transforming growth factor*; TNF, *tumour necrosis factor*) (Dhedha 2011)

b. Sistem Imun Humoral

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi TB terutama terletak pada sistem imun bawaan dan sistem imun seluler, tetapi sistem imun humoral juga mempunyai peran yang cukup penting dalam proses infeksi TB (Maglione and

Chan, 2009). Penelitian tentang imun respons humoral terhadap infeksi TB umumnya untuk menegakkan diagnosis (Raja, 2004).

Mekanisme antibodi humoral dalam proteksi infeksi M.tb yaitu dengan membentuk antibodi spesifik terhadap antigen permukaan M.tb yang berperan terhadap perlekatan sel sehingga mengurangi kemampuan M.tb menginfeksi sel.

Mekanisme lain yang diperankan sistem imun humoral yaitu membantu terjadinya penyatuan antara fagolisosom dengan lisosom, menetralkan toksin yang dihasilkan M.tb dan membantu melisis bakteri melalui mekanisme seluler dan komplemen (Zuniga *et al.*, 2012).

Beberapa penelitian menunjukkan pentingnya fungsi sistem imun humoral dalam mencegah infeksi TB. Anak yang tidak dapat menghasilkan IgG terhadap antigen LAM M.tb mempunyai risiko yang lebih besar terinfeksi TB. Penelitian yang dilakukan di Meksiko menemukan bahwa pasien yang memiliki kadar antibodi yang tinggi terhadap antigen Ag87 M.tb akan mempunyai prognosis yang baik setelah dilakukan terapi. Pasien yang mempunyai kadar antibodi rendah akan mempunyai prognosis yang lebih buruk (Acosta *et al.*, 2013)

Sistem imun humoral juga berperan dalam meningkatkan sistem imun seluler terhadap M.tb. Valliere (2005) menemukan bahwa peningkatan IgG terhadap LAM M.tb yang signifikan setelah subjek diberikan BCG akan meningkatkan produksi IFN- γ oleh sel T CD4+ dan CD8+ (Valliere *et al.*, 2005).

Human Secretory IgA (hslgA) merupakan antibodi yang berkaitan erat dengan proteksi imun terhadap permukaan mukosa. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tikus yang telah diberikan hslgA intranasal kemudian diberikan kuman M.tb memperlihatkan pertumbuhan kuman yang lebih sedikit

dibandingkan kelompok kontrol, disertai dengan terjadi peningkatan produksi iNOS pada tikus yang diberikan hslgA (Acosta *et al.*, 2013).

Mekanisme proteksi IgA terhadap infeksi melalui mekanisme langsung dan tidak langsung dengan melawan kuman yang mencoba masuk melalui mukosa. Diyakini IgA berkaitan dengan plgR yang akan menetralkan patogen saat proses transpor dari basolateral ke apikal pada sel epitel. Immunoglobulin (IgA) juga akan berinteraksi dengan Gal-3 yang akan mempengaruhi interaksi M.tb dengan membran fagosom yang nantinya akan menurunkan daya tahan bakteri dan kemampuan replikasi dalam membran fagosom (Acosta *et al.*, 2013).

2.3 Peranan CD4+ dan IFN- γ Pada Mekanisme Proteksi Infeksi TB

2.3.1 Sel T CD4+

Sel T CD4+ terbagi menjadi dua subset, Th1 dan Th2, berdasarkan sitokin yang diproduksi, walaupun beberapa sel T memiliki pola sitokin campuran.

Sel Th1 menekan sel Th2 dan sel Th2 menekan sel Th1. Sel Th1 memproduksi sitokin IL-2, IL-3, IFN- γ , dan TNF β . Sitokin IL-2 menyebabkan proliferasi sel T, sedangkan IFN- γ , dan TNF β keduanya mengaktifkan makrofag setelah mendapat stimulasi antigen bakteri TB. Sitokin IFN- γ merupakan sitokin utama yang diproduksi oleh sel T CD4+ (Th1) dan dapat menekan respons sel Th2. Sel subset Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 yang meningkatkan produksi antibodi oleh sel B. Sitokin IL-4, IL-10, IL-13 menekan respons sel Th1 (Manabe & Dannenberg, 2006).

Major Histocompatibility Complex Class II-restricted sel T CD4+ berperan sebagai kunci dalam respons imun terhadap TB, karena memproduksi IFN- γ dan sitokin-sitokin lainnya. *Host* yang terinfeksi HIV memiliki sel T CD4+ yang rendah

akan meningkatkan kepekaan terhadap infeksi TB dan meningkatkan keparahan penyakit (Manabe & Dannenberg, 2006).

Tabel 2.1 Perbedaan subset sel Th1 dan Th2 (Abbas *et al.*, 2016).

	Subset Th1	Subset Th2
Produksi sitokin :		
IFN- γ , IL-2, TNF	+++	-
IL-4, IL-5, IL-3	-	+++
IL-10	+/-	++
IL-3, GM-CSF	++	++
Ekspresi reseptor sitokin		
IL-12R β chain	++	-
IL-18R	++	-
Ekspresi reseptor kemokin		
CCR3, CCR4	+/-	++
CXCR3, CCR5	++	+/-
Antibodi isotype yang distimulasi	IgG2a (tikus)	IgE; IgG1 (tikus)/IgG4 (manusia)
Aktivasi makrofag	+++	

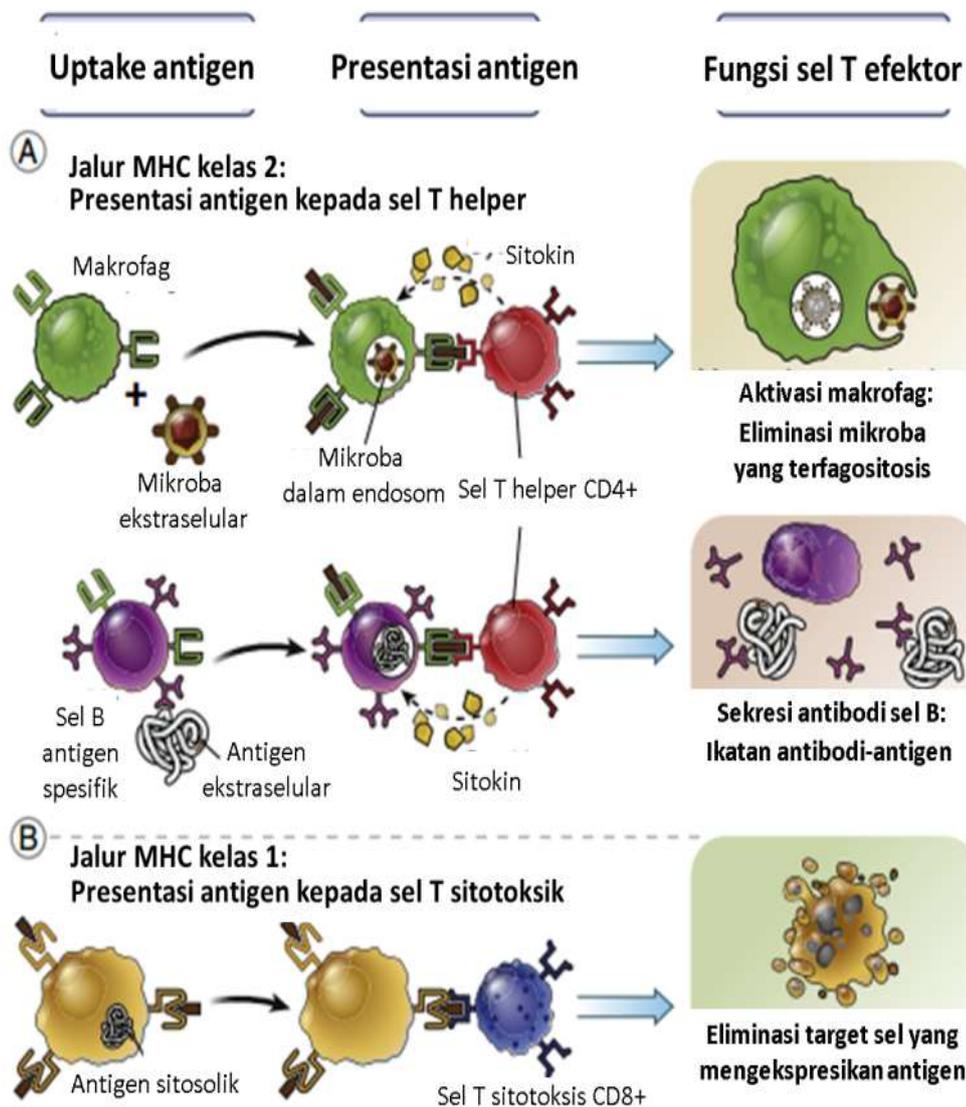
. Kuman *M.tb* terdapat terutama pada vakuola makrofag sehingga menyebabkan presentasi antigen mikobakterium MHC kelas II pada sel T CD4+.

Subset sel T ini sangat penting dalam perlindungan terhadap *M.Tb*. Epidemi HIV menunjukkan bahwa hilangnya sel T CD4+ sangat meningkatkan kerentanan

host manusia terhadap TB akut dan reaktivasi: subjek HIV (+) PPD (+) memiliki

resiko tahunan 8-10% untuk berkembang menjadi TB aktif, dibandingkan dengan

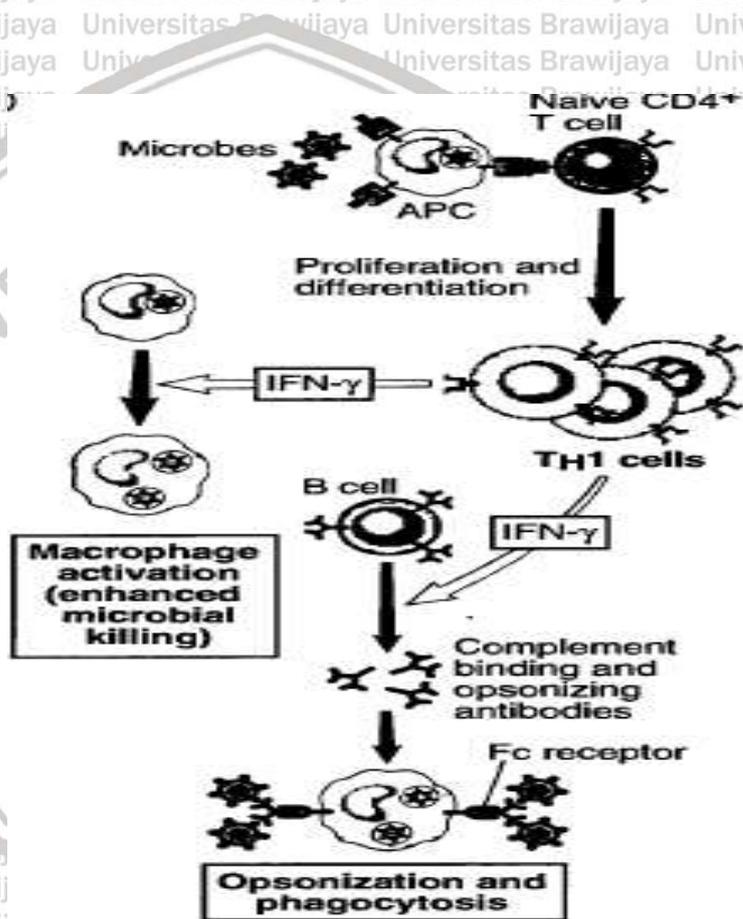
10% resiko seumur hidup untuk pasien dengan PPD (+) HIV (-)(Flynn, 2004).



Gambar 2.8 MHC dan peranannya dalam pengenalan antigen

- A. Protein antigen dari mikroba yang telah difagositosis oleh makrofag dan limfosit B diproses melalui MHC kelas 2. Sebagai hasilnya protein antigen tersebut akan dikenali oleh sel T helper CD4 yang berfungsi mengaktivasi makrofag agar menghancurkan mikroba yang telah terfagositosis dan mengaktivasi sel B agar memproduksi antibodi yang melawan mikroba ekstrasel dan toksinnya. B. Protein antigen dari mikroba yang hidup dalam sitoplasma sel yang terinfeksi diproses melalui MHC kelas 1. Sebagai hasilnya protein antigen tersebut akan dikenali oleh sel T sitotoksik CD8 yang berfungsi mengeliminasi sel yang terinfeksi.
- B. MHC kelas I merupakan molekul yang terdiri dari rantai *heavy polypeptide* (34k-Da) yang terikat secara *noncovalent* pada rantai *peptide* yang lebih ringan (12k-Da) yang disebut mikroglobulin $\beta 2$. Mikroglobulin $\beta 2$ bertugas menstabilkan ekspresi molekul MHC kelas I (Abbas et al., 2014).

Meskipun produksi IFN- γ oleh sel T CD4⁺ adalah fungsi efektor penting dari subset ini, sel-sel ini kemungkinan memiliki peran lain dalam mengendalikan infeksi M.Tb. Peranan yang mungkin termasuk apoptosis yang diperkirakan menjadi bagian penting dalam pengendalian infeksi M.Tb yang berhubungan dengan APC, bantuan terhadap sel B dan sel T CD8⁺, dan produksi dari sitokin lainnya (Flynn, 2004).



Gambar 2.9 Skema Fungsi Th1

Sel Th1 produksi sitokin IFN- γ yang akan mengaktifkan fagositosis untuk membunuh mikroba dan menstimulasi produksi antibodi untuk memfagosit bakteri yang masuk (Abbas *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa infeksi M.tb menghambat presentasi antigen MHC kelas II ke sel T CD4⁺ yang menyebabkan ketidakmampuan *host* mengeliminasi infeksi persisten. Presentasi *soluble*

ovalbumin pada hibridoma sel T berkurang seiring infeksi TB pada makrofag.

Salah satu mekanisme infeksi M.tb yang mungkin menghambat pengenalan makrofag oleh sel T CD4+ adalah adanya penurunan ekspresi permukaan sel molekul MHC kelas II. Penelitian lainnya melaporkan bahwa penurunan ekspresi gen oleh karena menggunakan mikobakterium *avirulent* seperti M.tb H37Ra atau BCG. Makrofag yang terinfeksi M.tb juga menghasilkan sitokin seperti TGF- β , IL-10 atau IL-6 yang dapat mengurangi stimulasi sel T. Ketidakmampuan sel T CD4+ untuk mengeliminasi bakteri intraseluler mungkin karena kurangnya pengenalan atau aktivasi dari makrofag yang terinfeksi (Flynn, 2004).

2.3.2 IFN- γ

Interferon mempunyai kemampuan dalam mempengaruhi replikasi virus merupakan bahan yang pertama kali ditemukan dari supernatan kultur sel yang terinfeksi oleh virus. Interferon dibagi menjadi 2 tipe, tipe I yang dirangsang dan berperan pada infeksi virus, terdiri dari IFN- α yang diproduksi oleh leukosit dan IFN- β yang diproduksi oleh fibroblast. Interferon tipe II atau yang lebih dikenal dengan IFN- γ dihasilkan oleh sel T dan sel NK setelah menjadi aktif dengan stimulus inflamasi. Sitokin IFN- γ merupakan sitokin utama yang berperan sebagai pelindung dari infeksi TB (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Fungsi utama IFN- γ adalah mengaktifkan makrofag sehingga meningkatkan kemampuannya sebagai antimikroba. Fungsi lain IFN- γ yaitu meningkatkan kemampuan presentasi antigen oleh MHC I dan II dan membantu perubahan sel T CD4+ menjadi subpopulasi Th1. Sitokin IFN- γ merangsang transkripsi lebih dari 200 gen di makrofag, termasuk produksi molekul antimikroba seperti radikal oksigen dan NO, yang sangat berperan dalam

penghancuran M.tb. Beberapa antigen M.tb seperti 19 kDa lipoprotein dapat menghambat respons makrofag dengan cara menghambat transkripsi gen yang responsif terhadap IFN- γ (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Tabel 2.2 Struktur Interferon Gamma (Abbas *et al.*, 2006)

Sitokin dan subunit	Sumber sel utama	Reseptor sitokin dan subunit	Sel Target dan efek biologis
Interferon- γ	Sel T(Th1, sel T CD8+), sel NK dan ILCs grup 1	CD119 (IFNGR1) IFNGR2	Makrofag:aktivasi klasik(meningkatkan fungsi mikrobisidal) Sel B:beralihnya isotope menjadi sub klas IgG opsonisasi dan fiksasi komplemen (pada mencit) Sel T:diferensiasi Th1 berbagai sel meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan kelas II meningkatkan proses dan presentasi antigen kepada sel T

Penelitian terhadap tikus membuktikan bahwa IFN- γ berperan penting dalam mengaktifkan makrofag dan kematian *Mycobacterium* dalam sel. Tikus yang kehilangan atau mengalami kerusakan pada gen IFN- γ juga akan mengalami TB yang berat (Cavalcanti *et al.*, 2012).

Penelitian *in vitro* yang dilakukan dengan melihat respons kultur PMBC penderita TB dengan riwayat kontak TB sehat terhadap antigen 30 kDa didapatkan terjadinya penurunan produksi IFN- γ pada pasien TB. Penurunan produksi IFN- γ menjadi bukti bahwa IFN- γ mempunyai peran proteksi terhadap infeksi TB (Cavalcanti *et al.*, 2012).

2.4 Purified Protein Derivate (PPD)

Purified Protein Derivate (PPD) atau yang disebut tuberkulin, merupakan protein murni yang dihasilkan dari kuman TB (tetapi tidak mengandung kuman TB aktif). Tuberkulin pertama kali ditemukan oleh ilmuwan Jerman yakni dokter Robert Koch pada tahun 1890. Awalnya tuberkulin yang ditemukan Koch adalah ekstrak gliserin dari *tubercle bacilli* dan dikembangkan sebagai obat untuk TB. Namun tidak dapat mengurangi angka kematian TB seperti yang diharapkan dalam pengobatan TB (Surjanto *et al.*, 2006).

Uji tuberkulin adalah salah satu metode yang digunakan untuk mendiagnosis infeksi TB. Pemeriksaan ini dilakukan untuk melihat respons kekebalan terhadap basil TB tetapi uji tuberkulin tidak dapat menentukan M.tb tersebut aktif atau tidak aktif (laten). Oleh sebab itu harus dikonfirmasi dengan ada tidaknya gejala dan lesi pada foto toraks untuk mengetahui seseorang tersebut terdapat infeksi TB atau sakit TB (Surjanto *et al.*, 2006).

Terdapat 2 perusahaan yang memproduksi tuberkulin (PPD) yaitu PPD dari USA: *Parke-Davis* (Aplisol) dan PPD-S dibuat oleh Siebert dan Glenn tahun 1939 yang sampai sekarang digunakan sebagai standar internasional. Sebagai dosis standar adalah 5 Tuberkulin Unit (TU) PPD-S yang diartikan aktivitas uji tuberkulin ini dapat mengekskresikan 0,1 µg PPD-S, dimana 1 unit tuberkulin (1 TU) didefinisikan sebagai 0,02 µg PPD-S. Standar tuberkulin ada 2 yaitu PPD-S dan PPD RT 23, dibuat oleh *Biological Standards Staten*, Serum Institute, Copenhagen, Denmark. Dosis standar 5 TU PPD-S sama dengan ½ TU PPD RT 23. Organisasi WHO merekomendasikan penggunaan 1 TU PPD RT 23 Tween 80 untuk penegakkan diagnosis TB guna memisahkan terinfeksi TB dengan sakit

TB (Drapper P & Dafee M., 2005). Dalam penelitian ini digunakan tuberkulin dengan dosis sebanyak 2 µg/mL sebagai kontrol positif.

2.5 Vaksin TB

Vaksin adalah bahan antigenik yang digunakan untuk menghasilkan kekebalan aktif terhadap suatu penyakit sehingga dapat mencegah atau mengurangi pengaruh infeksi. Pemberian vaksin TB merupakan salah satu cara untuk mengendalikan infeksi TB. Vaksin TB yang paling banyak digunakan sampai saat ini adalah BCG. *Mycobacterium bovis* (M. bovis) *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) merupakan vaksin bakteri hidup yang dilemahkan dan telah digunakan sejak tahun 1921 (Pitt *et al.*, 2013).

Vaksin BCG merupakan vaksin yang dapat ditoleransi tubuh dengan baik. Lebih dari 100 juta dosis diberikan setiap tahun. Komplikasi BCG sangat jarang ditemui. Reaksi lokal yang parah seperti ulserasi berat dan limfadenitis regional hanya terjadi kurang dari 2 kasus per satu juta pemberian vaksin BCG. Pemberian BCG tidak diperbolehkan pada pasien dengan imunokompromi seperti penderita HIV karena akan memperparah infeksi penyakit (Rowland and McShane, 2011).

Hasil berbagai penelitian efikasi proteksi BCG terhadap infeksi TB sangat bervariasi antar 0 sampai 90% (Rowland and McShane, 2011). Hasil penelitian meta-analisis terhadap 26 penelitian efikasi vaksin BCG didapatkan BCG hanya dapat mengurangi risiko TB sebesar 50% (Brewer, 2000). Penelitian jangka panjang pada populasi Indian dan Alaska menunjukkan BCG memiliki efikasi 82% setelah 20 tahun dan 52% setelah 50-60 tahun, hal ini membuktikan bahwa

efikasi proteksi TB mungkin sangat bermanfaat pada beberapa populasi (Rowland and McShane, 2011).

Efektivitas vaksin BCG bervariasi antara 20% - 80% dari bentuk paling ringan (kompleks primer) sampai bentuk milier (*disseminated*) yang berat.

Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa mekanisme proteksi dari vaksinasi BCG mencakup pengurangan penyebaran hematogen basil dari lokasi infeksi primer yang dimediasi oleh limfosit T memori yang diinduksi oleh paparan BCG.

Vaksin BCG tidak terbukti mengurangi risiko terinfeksi tetapi mencegah bentuk – bentuk TB tergantung dari penyebaran hematogen. Penghambatan penyebaran hematogen mengurangi risiko langsung penyakit dan reaktivasi penyakit.

Efektivitas yang tinggi terutama pada kasus TB yang berat. Sedangkan untuk mengurangi risiko terinfeksi, efektivitas vaksin BCG masih rendah (Konsorsium Riset Vaksin TB, 2012). Efektivitas vaksin BCG terhadap berbagai bentuk TB klinis tampak seperti pada tabel berikut :

Tabel 2.3 Efektivitas BCG (Konsorsium Riset Vaksin TB, 2012)

Bentuk Klinis TB	Efektifitas Perlindungan BCG (%)
Kompleks primer di Paru	20
Kompleks primer dengan ekstensi Malang	32
Limfadenitis	32
TB tulang	39
Meningitis TB	52
<i>Disseminated TB</i>	80

Ada beberapa hipotesa yang menjelaskan perbedaan efikasi proteksi BCG pada beberapa penelitian yaitu variasi genetik antar strain BCG yang

digunakan, kehilangan gen penting yang mampu merangsang sistem imun, tidak optimalnya respon sel T CD8+ dan sel T CD4+, letak geografis dan lingkungan, infeksi cacing, variasi teknik pemberian vaksin, eksposur terhadap berbagai jenis *Mycobacterium* sp (Brewer, 2000, Rowland and McShane, 2011, Lucaa and Mihaescu, 2013).

Penelitian terus dilakukan untuk dapat mengurangi keterbatasan vaksin BCG maupun menemukan vaksin yang mampu menggantikan vaksin BCG.

Selama 10 tahun terakhir telah dilakukan lebih dari 170 kandidat vaksin TB telah dilakukan pada hewan. Berbagai jenis kandidat vaksin ini yaitu *Culture Filtrates* (CF), protein, *lipoglycoproteins*, *glycolipids*, vaksin DNA, vaksin bakteri hidup yang dilemahkan atau rekombinan bakteri. Penelitian juga terus dilakukan untuk meningkatkan kemampuan vaksin BCG seperti penurunan dosis, pemberian secara oral, protokol pemberian vaksin (Coler *et al.*, 2012).

Tiga kandidat *attenuated* vaksin TB yang telah memasuki fase preklinis yaitu MTBVAC01, mc22020, dan mc22030. Vaksin MTBVAC01 merupakan strain *M.tb* yang dilemahkan dengan menghilangkan gen *phoP* yang berperan mengkode *virulent transcription factor*. Vaksin mc22020 dan mc22030 merupakan *auxotrophic* strain *m.tb* yang terbukti melindungi tikus terhadap tikus dan diberikan melalui aerosol (Rowland and McShane, 2011).

VPM1002 rBCG Δ ureC:Hly merupakan rekombinan BCG strain (Δ ureC:Hly + rBCG;VPM1002) yang mampu mengekspresikan listeriolysin (Hly).

VPM1002 mempunyai kemampuan meningkatkan produksi sel T CD8+ dengan cara meningkatkan presentasi antigen BCG melalui jalur MHC kelas I (Rowland and McShane, 2011).

Cara lain untuk meningkatkan efikasi BCG adalah memodifikasi BCG agar dapat sekresi satu atau lebih protein yang dapat membangkitkan sistem imun terhadap infeksi TB. AERAS-422 (rBCG) merupakan salah satu vaksin BCG yang mempunyai kemampuan lebih dalam menyekresi protein M.tb, antigen 85B, dan 30-kDa mycolyl transferase (Rowland and McShane, 2011).

2.6 Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 Sebagai Kandidat Vaksin

Antigen spesifik yang berhasil diidentifikasi diantaranya berasal dari dinding sel kuman, tetapi juga dijumpai dalam filtrat kultur seperti ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen imunodominan pada mayoritas pasien TB paru.

Antigen ESAT-6 merupakan molekul berat rendah yakni 6 kDa yang sangat kuat dikenali oleh sel-sel limfosit yang memproduksi IFN- γ (Andersen et al.,2000).

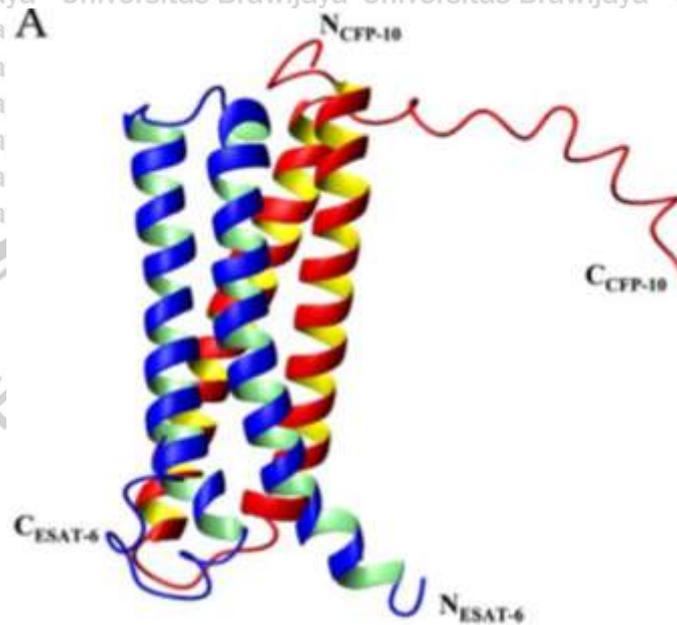
ESAT-6 pertama kali ditemukan dari kultur M.tb pada kultur sel tikus yang terinfeksi M.tb. Penelitian pada genom M.tb H37Rv didapatkan 23 gen yang berhubungan dengan *operon* ESAT-6. Antigen ESAT-6 mempunyai bermacam-macam epitop yang semuanya dikenal oleh sel limfosit T pada berbagai populasi genetik yang tidak sama (Andersen et al.,2000).

Gen ESAT-6 pada M.tb terletak di *Region of Difference 1* (RD1), di mana regio ini tidak terdapat pada seluruh jenis vaksin M.bovis BCG. Selain mengandung gen yang mengkode ESAT-6, RD1 juga mengandung gen yang mengkode molekul berat rendah yaitu CFP-10, ESAT-6 (*esxA*) dan CFP-10 (*esxB*) termasuk dalam ESAT-6 *family* (Mustafa, 2013).

Antigen CFP-10 juga disebut *Mycobacterium tuberculosis Specific Antigen 10* (MTSA 10), diketahui sebagai antigen yang poten terhadap sel T.

Genome M.tb terdiri dari 22 pasang gen yang mengkode protein CFP-10 dan

ESAT-6, terletak pada lokus gen 11 dan selalu didahului gen protein PE dan PPE (Rom, 2004; Lightbody *et al*, 2008 gilang). Antigen CFP-10 bekerja dengan menurunkan produksi NO dan ROS yang dihasilkan oleh makrofag, sehingga menghambat kemampuan membunuh makrofag (Handzel, 2013).



Gambar 2.10 Struktur kompleks ESAT-6 CFP-10.

Representasi pita dari struktur penyusun kompleks ESAT-6 CFP-10, ESAT-6 ditandai dengan pita berwarna biru dan CFP-10 ditandai dengan pita berwarna merah (Renshaw *et al.*, 2005)

Kompleks CFP-10 dan ESAT-6 merupakan protein dengan susunan 100 sekuens asam amino. Protein ESAT-6/CFP-10 memiliki sifat hidrofobik dengan kandungan struktur α -heliks yang tinggi. Analisis struktur resonansi dari kompleks ESAT-6/CFP-10 didapatkan 2 struktur jepit rambut *helix-turn-helix* yang dibentuk oleh masing-masing protein yang terletak anti-paralel satu sama lain dan membentuk empat kumparan *heliks* (gambar 2.10). Lengan panjangnya yang lentur memproyeksikan empat kumparan *heliks* yang dibentuk oleh tujuh asam amino C-terminal CFP-10, sangat penting untuk mengikat dan melekat pada permukaan sel darah putih seperti makrofag dan monosit. Jika asam amino

C-terminal ini diputus, maka kemampuan untuk melekat dan menempel menjadi sangat berkurang (Renshaw *et al.*, 2005).

Antigen CFP-10 adalah antigen yang berperan dalam terhadap virulensi M.tb. CFP-10 membentuk kompleks heterodimerik yang kuat dengan ESAT-6 dengan perbandingan 1:1. Dalam sel *mycobacterial* dua protein ini sangat bergantung satu sama lain agar tetap stabil. Protein rekombinan fusi ESAT-6 CFP-10 sangat stabil dan dapat bertahan selama 4 tahun pada kondisi beku (-20°C s.d -80°C) (Rekombiotech, 2018).

Kompleks ESAT-6 dan CFP-10 disekresi oleh *Excretion System-1* (ESX-1), yang juga dikenal sebagai wilayah *regions of differences 1* (RD1) untuk memindahkan faktor virulensi ke dalam makrofag dan monosit dari *host* selama infeksi. Pada M.tb, komponen utama dari sistem sekresi ESX-1 meliputi Rv3877 dan dua AAA *Adenosine Triphosphatase* (ATPase) termasuk Rv3870 dan Rv3871 yang merupakan protein sitosolik. Kompleks heterodimer ESAT-6 dan CFP-10 ditargetkan untuk sekresi oleh sequen sinyal terminal pada CFP-10 yang dikenali oleh protein sitosolik Rv3871. Protein Rv3871 kemudian berinteraksi dengan CFP-10 C-terminal dan membawa kompleks ESAT-6/CFP-10 ke Rv3870 dan Rv3877, yaitu suatu protein multi transmembran yang membuat pori-pori pada membran sitosolik dari sel *host virulent*. Setelah itu, pada membran sel *host virulent*, CFP-10 C-terminal melekat dan mengikat dirinya pada permukaan sel. Sekresi kompleks ESAT-6 dan CFP-10 dan perlekatannya pada sel *host virulent* berperan dalam patogenesis M.tb (Meher *et al.*, 2006).

Kompleks ESAT-6/CFP-10 sebagai antigen fusi spesifik yang disekresikan hanya oleh M.tb pada awal masa kultur, menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap M.tb dibandingkan dengan ESAT-6 atau CFP-10 yang

digunakan secara terpisah. Pada vaksin BCG yang ditambahkan regio RD1 yang mengkode ESAT-6 dan CFP-10 didapatkan peningkatan imunogenitas dari vaksin tersebut. Beberapa hal lain yang dilaporkan mengenai kemampuan kompleks ESAT-6/CFP-10 antara lain menghambat produksi IL12 dan TNF- α makrofag (Guo *et al.*, 2012).

Protein ESAT-6 dan CFP-10 merupakan protein penting untuk menstimulasi sel T dan juga digunakan pada *Interferon Gamma Releasing Assays (IGRAs)*. Kombinasi BCG dengan gen ESAT-6 menunjukkan terjadinya peningkatan virulensi pada mencit yang diinfeksi dengan aerosol dosis rendah. Kira-kira sepertiga dari pasien TB memiliki hasil seronegatif dari semua antigen M.tb, hal ini mengapa terus dilakukan studi pada kombinasi protein baik yang terpisah ataupun yang terfusi (Bekmurzayeva, 2013).

Penelitian yang dilakukan Gallegos *et al.*, (2008) menemukan bahwa tikus yang diberikan sel T CD4+ spesifik ESAT-6 mempunyai kemampuan perlindungan terhadap infeksi TB setelah diinduksi dengan kuman M.tb hidup. Kadar bakteri M.tb dalam paru 100 kali lebih sedikit dibanding tikus yang tidak diberikan sel T CD4+ spesifik ESAT-6 (Gallegos *et al.*, 2008).

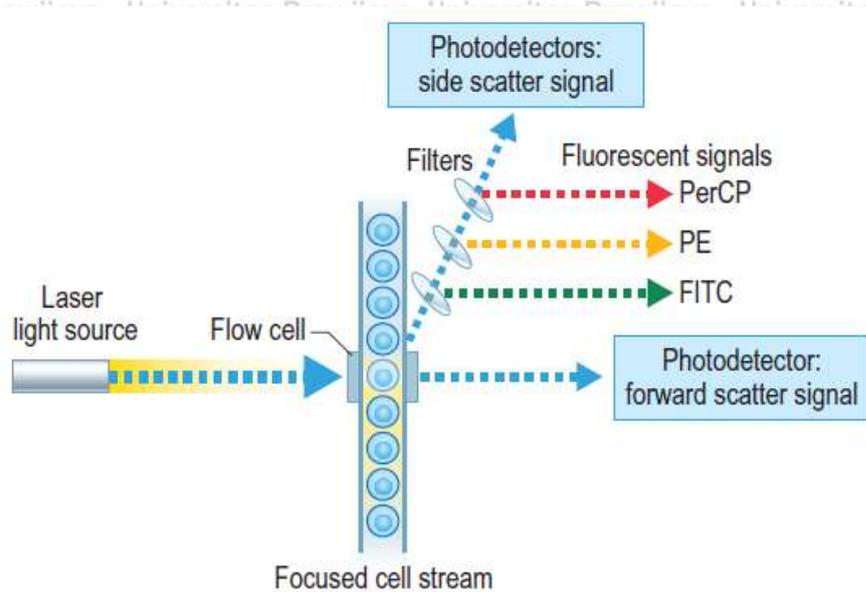
Penelitian lain yang dilakukan oleh Dissel *et al.*, (2010) dengan menggunakan protein rekombinan Ag85B dan atau ESAT-6 terhadap manusia sehat dengan pemberian pada 0 dan 2 bulan. Setelah diberikan vaksin didapatkan terbentuknya sel T spesifik terhadap antigen Ag85B dan atau ESAT-6. Selama penelitian 2,5 tahun, respons imun spesifik ini dapat bertahan dengan baik, hal ini menunjukkan kedua antigen dapat menginduksi sistem memori dengan baik (Dissela *et al.*, 2010).

Penelitian yang dilakukan Zhang *et al.*, (2008) menemukan bahwa tikus yang diberikan protein fusi ESAT-6/CFP-10 yang dikembangkan dari *M.smegmatis* dapat menginduksi secara nyata respons imunitas seluler dan humoral yang lebih tinggi dan cepat dibandingkan dengan pemberian vaksin BCG dan memiliki manfaat perlindungan yang serupa dengan pemberian vaksin BCG pada tikus yang terinfeksi *M.tb* (Zhang *et al.*,2008).

2.7 Flow Cytometry

Flow cytometry adalah suatu teknik pengukuran terhadap sifat fisik dan kimia dari sel hidup yang dilewatkan dalam cairan, dimana setiap sel dilewatkan satu persatu pada *apparatus*. Alat yang digunakan disebut *flow cytometer*. Satu atau lebih laser digunakan untuk mengukur tiap sel, sistem akan mengukur derajat dan arah sebaran cahaya sebagai indikator besarnya sel. Zat yang ingin diukur dapat diberikan label fluoresen (fluorokrom) maka cahaya akan mengaktifkan label ini sehingga dapat diperoleh informasi biologis pada zat ini (Wulff, 2006).

Komponen dasar dari *flow cytometer* dapat dilihat pada gambar 2.11, termasuk sumber cahaya, sistem optik, sistem fluida, elektronik dan komputer. Sel yang akan diteliti dilewatkan pada tabung satu persatu dengan sistem fluida, kemudian dipaparkan dengan sinar yang akan menghasilkan interferensi cahaya yang akan ditangkap oleh detektor cahaya yang bertugas mengubah sinyal cahaya menjadi sinyal elektronik untuk dilakukan analisis (Fleisher and Oliveira, 2013).

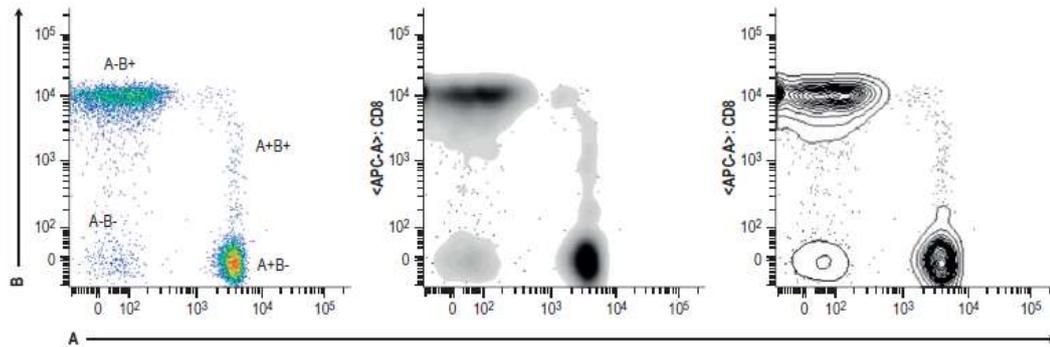


Gambar 2.11 Desain sederhana *flow cytometer* dengan satu sumber cahaya (laser) yang dapat mengukur 5 parameter. Termasuk dua parameter nonfluoresen (warna biru) berupa *forward* dan *side scatter*, dan mengukur tiga parameter fluoresen yaitu hijau (FITC), kuning (PE) dan merah (PerCP) (Fleisher and Oliveira, 2013).

Standar reagen antibodi monoklonal umumnya dikongjugasi dengan fluorokrom, penanda yang mampu menyerap dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang tertentu. Fluorokrom yang sering digunakan adalah *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC), *Phycoerythrin* (PE), *Peridin Chlorophyll Protein* (PerCP), dan *Allophycocyanin* (APC). Kongjugasi PE dan APC pada *cyanines* (Cy5, Cy5.5, dan Cy7) dan *Alexa Fluor*. Perbedaan panjang gelombang yang dipancarkan masing-masing fluorokrom memungkinkan untuk melakukan pemeriksaan 6 sampai 8 parameter pada waktu yang bersamaan (Fleisher and Oliveira, 2013).

Gating merupakan istilah yang digunakan dalam *flow cytometer* yang menggambarkan metode untuk menentukan populasi sel yang ingin diketahui. Data dengan dua parameter yang berbeda secara sekaligus akan memberikan informasi yang lebih jika dibandingkan *single-parameter* histogram. Cara ini

dapat menampilkan secara langsung empat populasi yang berbeda yaitu A+/B-, A-/B+, A+/B+, A-/B- (gambar 2.12). Cara ini sangat berguna untuk menilai hubungan antara 2 parameter (Fleisher and Oliveira, 2013).



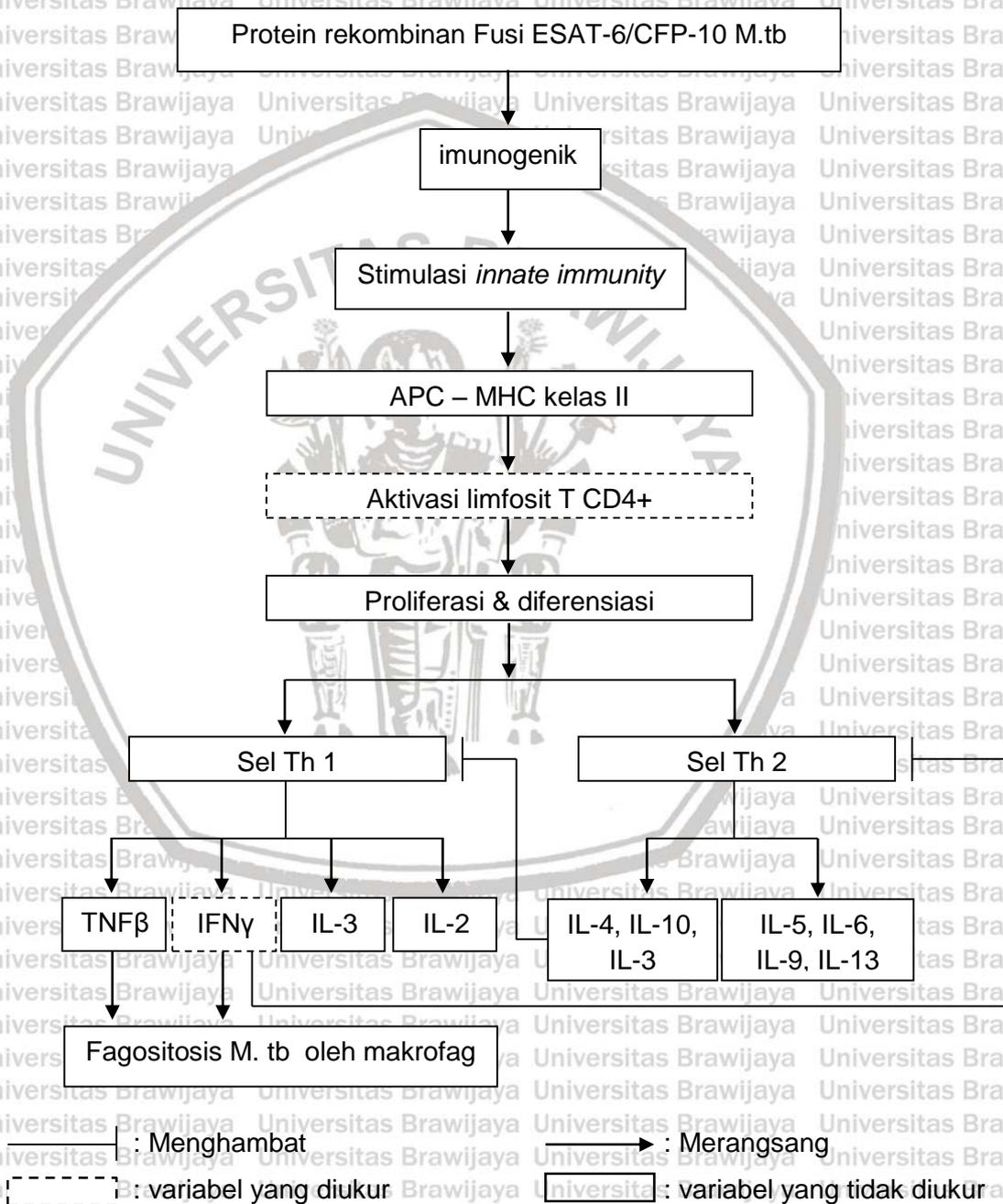
Gambar 2.12 Contoh dot plot *pseudocolor* (kiri), densitas (tengah) dan kontur (kanan) berdasarkan dua parameter berbeda (2 jenis fluorokrom). Metode ini dapat menilai ekspresi dari penanda A dan penanda B (Fleisher and Oliveira, 2013).

Satu contoh penggunaan teknik *flow cytometry* adalah pemeriksaan limfosit. Sampel yang bisa digunakan adalah darah tepi sehingga diperlukan cara untuk mengetahui sel limfosit dan sel bukan limfosit. *Gating* awal yang digunakan untuk dapat membedakan populasi leukosit adalah dengan menggunakan dua parameter non fluoresen yaitu *forward scatter* (FSC) dan *side scatter* (SSC). Pada FSC merupakan potongan melintang dari sel sehingga dapat menggambarkan ukuran sel, sedangkan SSC menggambarkan granulositas sel, dan bentuk permukaan sel. Kombinasi dari dua parameter ini akan dapat membedakan sel leukosit yakni normal limfosit, monosit dan granulosit (Fleisher and Oliveira, 2013).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep

Keterangan gambar :

Antigen protein rekombinan fusi Esat-6/CFP-10 *M.tb* bersifat imunogenik akan menstimulasi respons imun seluler, *innate* dan adaptif. Respons imun diawali dengan stimulasi imunitas *innate* oleh antigen protein rekombinan fusi Esat-6/CFP-10 *M.tb*. Selanjutnya APC akan mempresentasikan molekul Ag Esat-6/CFP-10 melalui MHC kelas II kepada sel T CD4+ kemudian akan berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi sel T subset (sel Th1 dan sel Th2). Sel Th1 akan memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi penting yaitu TNF- β , IFN- γ , IL-2 dan IL-3. TNF- β dan IFN- γ akan mengaktifkan kemampuan makrofag dalam fagositosis *M.tb*. Selain itu IFN- γ dapat menekan respons sel Th2. Sel subset Th2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 yang akan meningkatkan produksi antibodi oleh sel B. IL-4, IL-10, IL-13 menekan respons sel Th1

3.2 Hipotesis Penelitian

Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M.tb* dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4+ pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB dan sehat endemik.



PBAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *ex vivo* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)*

untuk ketiga kelompok sampel yang telah diinduksi dengan protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb. Sampel darah (*whole blood*) diambil dengan menggunakan antikoagulan EDTA sebanyak 12 mL (4 tabung) dari ketiga kelompok populasi subyek penelitian, yaitu kelompok sehat endemik, kelompok kontak TB, dan kelompok penderita TB, kemudian dilakukan isolasi PBMC. Dilakukan 3 perlakuan terhadap PBMC ini, yaitu perlakuan kontrol (tidak diinduksi dengan protein apapun / tanpa perlakuan), perlakuan dengan antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb, dan perlakuan dengan induksi PPD 2 µg sebagai kontrol positif. Setelah diinkubasi selama 48 jam, diukur jumlah ekspresi IFN-γ dan jumlah limfosit T CD4+ yang kemudian dianalisa menggunakan SPSS *statistic version 19*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi subyek pasien TB adalah penderita yang telah didiagnosis TB paru baru yang belum pernah mendapatkan terapi Obat Anti TB (OAT) kategori I kurang dari 2 minggu dan selanjutnya memberikan respons bagus terhadap pengobatan dengan anti TB sebelumnya yang datang ke Poli Paru, Instalasi

Rawat Inap IRNA I Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang dan Puskesmas jejaring RSSA (Puskesmas Janti dan Arjuno).

Untuk kelompok pasien TB, diagnosis nya didasarkan pada klinis dan radiologis. Terdapat riwayat batuk lebih dari 3 minggu, demam, keringat pada malam hari dan *cachexia*. Pada pemeriksaan radiologis gambaran foto toraks nya menunjukkan TB. Penyakit aktif dikonfirmasi dengan BTA dahak positif dengan pengecatan *Ziehl-Neelsen* (lebih dari 2 bakteri/10 lapangan pandang), atau dengan pemeriksaan tes cepat molekuler didapatkan *M.tb detected*.

Subyek dengan kontak TB positif adalah dokter dan paramedis sehat yang telah kontak langsung dengan penderita TB atau sampel biologis atau kultur dari penderita TB selama lebih dari 6 bulan. Semua kontak TB positif dan kontrol sehat tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Pada subyek dengan kontak TB dilakukan pemeriksaan dahak BTA, tes *mantoux* dan foto toraks. Pada pemeriksaan dahak BTA subyek kontak harus negatif atau dengan menggunakan tes cepat molekuler tidak didapatkan *M.tb*, namun positif untuk tes *mantoux* dengan gambaran foto toraks normal (Sable *et al.*, 2005).

Kontrol sehat adalah subyek sehat yang tidak pernah kontak dengan penderita TB sebelumnya yang tinggal di daerah endemis TB (Sable *et al.*, 2005). Subyek sehat adalah subyek tanpa riwayat infeksi *M.tb* atau riwayat kontak dengan penderita TB sebelumnya, tes *mantoux* negatif atau positif tetapi <10 mm, tidak memiliki riwayat penyakit DM, tidak HIV, dan memiliki gambaran foto toraks normal. Pada pemeriksaan dahak BTA negatif atau dengan menggunakan tes cepat molekuler tidak ditemukan *M.tb* (Sable *et al.*, 2005).

Kriteria Inklusi

Secara umum subyek penelitian harus seronegatif terhadap HIV, hasil pemeriksaan laboratorium *Complete Blood Count* (CBC), uji fungsi hati dan ginjal, serta urinalisis normal. Subyek penelitian tidak dalam menggunakan immunosupresan atau pengobatan steroid. Wanita yang ikut terlibat dalam penelitian ini tidak boleh dalam keadaan hamil atau merencanakan kehamilan. Usia subyek penelitian antara 18 -50 tahun. Berikut kriteria inklusi untuk masing-masing subyek :

a. Kriteria inklusi pasien TB

- Pasien TB paru dengan BTA positif yang terdiagnosis secara bakteriologis (baik dari dahak BTA ataupun tes cepat molekular didapatkan *M.tb detected*),
- Belum pernah mendapat OAT kategori I sebelumnya atau yang mendapatkan terapi OAT kategori I kurang dari 2 minggu.

b. Kriteria inklusi kontak TB

- Tidak mempunyai riwayat TB.
- Subyek sehat yang telah kontak dengan pasien TB selama lebih dari 6 bulan / tinggal serumah dengan pasien TB dan pada pemeriksaan dahak BTA negatif ataupun tes cepat molekular tidak didapatkan *M.tb*.

Pada pemeriksaan foto toraks normal, memiliki hasil tes *mantoux* positif, memiliki riwayat imunisasi BCG.

c. Kriteria inklusi kontrol sehat

- Subyek sehat yang tinggal di daerah endemis TB, tidak mempunyai riwayat TB dan tidak pernah kontak dengan pasien TB, pada pemeriksaan dahak BTA negatif ataupun pemeriksaan tes cepat

molekuler tidak didapatkan M.tb, pada foto toraks normal, hasil tes *mantoux* negatif.

Kriteria eksklusi

a. Kriteria eksklusi pasien TB

- Pasien TB-HIV
- Pasien dengan hasil kultur positif MDR –TB ataupun TB RR (TB RO)
- Pasien TB ekstra paru saja tanpa TB paru
- Penderita dengan penyakit komorbid lain seperti keganasan, diabetes, pasien dengan gangguan fungsi hati, gangguan fungsi ginjal, penyakit kardiovaskular yang berat, infeksi lain yang berat.
- Pasien sedang dalam pengobatan steroid atau immunosupresan
- Pasien yang sedang hamil

b. Kriteria eksklusi kontak TB dan kontrol sehat

- Hasil laboratorium tes CBC, uji fungsi hati, fungsi ginjal, urinalisis yang abnormal dan HIV reaktif
- Kelainan foto toraks
- Dalam kondisi hamil

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah PBMC yang diisolasi dari *whole blood* ketiga subyek penelitian dalam populasi, kemudian masing-masing dilakukan kultur dengan 3 perlakuan, yaitu diberi paparan antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb, diberi paparan PPD sebagai kontrol positif dan tidak diberikan perlakuan.

Jumlah sampel untuk setiap kelompok adalah 8, yang diperoleh dari rumus: $p(n-1) \geq 16$, n = jumlah sampel tiap-tiap perlakuan, dan p = jumlah perlakuan (Satroasmoro and Ismail, 2002). Jadi total 24 subyek penelitian (8 penderita TB, 8 kontak positif, 8 kontrol normal/individu sehat).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu :

- A. Variabel bebas (*independent variable*) : Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb
- B. Variabel tergantung (*dependent variable*) : IFN- γ dan sel T CD4+

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium yaitu di Instalasi Laboratorium Sentral RSSA untuk pengambilan sampel darah dan urine, Laboratorium Radiologi RSSA untuk foto toraks, Poli Anak RSSA untuk tes *mantoux*, Laboratorium Mikrobiologi RSSA untuk kultur dan pengecatan dahak BTA, dan Laboratorium Biomedik FKUB untuk isolasi kultur dan pemanenan PBMC serta uji ekspresi IFN- γ pada limfosit T CD4+.

Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai pada bulan April 2017 sampai dengan Maret 2018.

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan adalah :

- a. Pasien TB adalah subyek dengan TB, diagnosis nya berdasarkan pada klinis yaitu terdapat riwayat batuk lama lebih dari 3 minggu, demam, keringat

malam hari dan *cachexia*. Pada pemeriksaan radiologis gambaran foto toraks menunjukkan TB. Pada pemeriksaan bakteriologis didapatkan dahak dengan pemeriksaan BTA hasil positif, atau dengan pemeriksaan tes cepat molekuler didapatkan M.tb *detected*, ataupun dengan pengecatan *Ziehl-Neelsen* (lebih dari 2 bakteri /10 lapangan pandang). Semua penderita belum pernah mendapatkan terapi obat anti tuberkulosis sebelumnya atau mendapatkan terapi obat anti tuberkulosis kategori I kurang dari 2 minggu.

b. Subyek dengan kontak TB positif adalah subyek sehat yang telah kontak langsung dengan pasien TB atau sampel biologis atau kultur dari pasien TB selama lebih dari 6 bulan / tinggal serumah dengan pasien TB dan tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Pada gambaran foto toraksnya normal dan pemeriksaan dahak BTA negatif atau tes cepat molekuler tidak didapatkan M.tb .pada pemeriksaan *mantoux* tes positif.

c. Subyek sehat endemik adalah subyek sehat yang tinggal di daerah endemis TB yang tidak pernah kontak dengan pasien TB sebelumnya serta tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Memiliki gambaran foto toraks normal dan pemeriksaan dahak BTA negatif atau tes cepat molekuler tidak didapatkan M.tb, pada pemeriksaan tes *mantoux* negatif.

d. Kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cultured* (PBMC) adalah kultur sel darah tepi manusia dimana hanya sel yang mempunyai nukleus bulat saja (limfosit, monosit, makrofag) dikultur pada kondisi tertentu dan dipanen pada saat tertentu. *Pellet* PBMC diperoleh dengan beberapa rangkaian *sentrifuge*, yang mana pemisahan PBMC dari sampel darah menggunakan ficoll-hipaque $d=1.077$ g/mL. PBMC kemudian dikultur selama 48 jam dengan

pemberian 3 perlakuan (tanpa antigen, PPD dan Protein Fusi ESAT-6/CFP10).

e. Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 adalah penggabungan dua gen protein ESAT-6 dan CFP-10. ESAT-6 dan CFP-10 merupakan antigen imunodominan yang spesifik, berasal dari filtrat kultur. Keduanya disandi oleh gen *region of difference 1* (RD-1) dan merupakan famili ESAT-6. Protein rekombinan ini diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Litbangkes) melalui penelitian pengembangan protein sub-unit kandidat vaksin. Isolat yang digunakan untuk membuat protein sub unit antigen berasal dari *M.tb* H37Rv yang ditumbuhkan dalam media *Middlebrook* 7H9 dan 7H10, dengan penambahan 0,05% *Tween* 80 v/v dan 0,2% gliserol v/v. Degradasi dilakukan menggunakan proteinase K dan subkultur dilakukan dalam media *Sauton*. Dilakukan kloning gen pengkodnya pada *E.coli* galur H101 yang ditumbuhkan dalam medium *Luria Bertani*. Konsentrasi akhir *Higromisin* untuk *E.coli* sebesar 200 ug/ml. Klon yang dihasilkan dicek dengan PCR dan *sequencing*. Dosis protein ini yang digunakan pada kultur PBMC adalah 2 µg/mL.

f. *Interferon gamma* (IFN-γ) adalah sitokin proinflamasi yang terutama diproduksi oleh Th1 berperan penting pada infeksi *M.tb* yang berfungsi meningkatkan fagositosis *M.tb* oleh makrofag. Cara mengukur IFN-γ pada penelitian ini melalui sintesis interseluler pada sel T CD4+ yang dilakukan dengan metode *flowcytometry* menggunakan *anti human* IFN-γ berlabel *fluorochrome* PerCP-Cy (*Peridin Chlorophyll Protein*)-Cy dengan satuan prosen (%).

g. Sel limfosit T CD4⁺ adalah sel yang dipresentasikan dari molekul MHC kelas II yang memiliki peran penting untuk mengontrol infeksi M.tb (Raminero *et al*, 2015). Sel limfosit T CD4⁺ pada penelitian ini diperoleh dengan metode *flowcytometry*, dimana *pellet* PBMC yang telah *staining* dengan *cell staining buffer*, *staining* kembali dengan antibodi *cell surface marker* anti CD4⁺ berlabel *fluorochrome* FITC.

h. *Flowcytometri* adalah teknik analisa kuantitatif terhadap sel yang dialirkan melalui suatu saluran. Suspensi sel diaspirasi ke dalam suatu *flow cell* yang dialiri cairan khusus. Sel melalui *flow cell* satu persatu dan disorot oleh suatu cahaya laser. Cahaya akan dipantulkan atau diabsorpsi ketika mengenai sel yang akan dianalisa. Cahaya dengan panjang gelombang tertentu yang diabsorpsi akan dipancarkan kembali sebagai fluoresensi bila pada sel terdapat bahan *fluorescent*, atau satu atau lebih antibodi berlabel *fluorochrome* yang terdapat di permukaan atau struktur internal sel. Pantulan cahaya yang dihasilkan tergantung pada struktur internal sel, ukuran dan bentuknya. Sinyal pantulan cahaya fluoresens dideteksi oleh *photodetector* dan diampifikasi, kemudian dirubah menjadi sinyal listrik digital pada sistem komputer untuk dianalisa (Riley & Idowu, 2003).

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

A. Pemeriksaan Umum

- Pengambilan darah dan urin
- Vacutainer set dengan 2 tabung (EDTA dan SST) untuk pemeriksaan CBC dan kimia klinik, serologi, manset, bantalan tangan. Untuk

pengambilan urin menggunakan botol urin dan formulir permintaan pemeriksaan laboratorium.

- Foto toraks, formulir permintaan foto toraks.
- Tes *mantoux*
- PPD RT 23-25 TU, spuit 1 ml, bantalan tangan, dan formulir tes *mantoux*.
- Pemeriksaan dahak, permintaan pemeriksaan dahak BTA dan tes cepat molekuler.
- Botol dahak 3 buah: 2 buah botol biasa dan 1 buah botol steril dan identitas sampel.
- *Informed consent*, formulir *informed consent* terlampir.

B. Isolasi PBMC

- Alat : Botol sentrifus 15 ml, mikropipet, *Swing Centrifugated* sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*), *Bio Safety cabinet (Faster Safe Fast Elite 212-D 588)*
- Bahan : *Ficoll-Hipaque* $d=1.077$ g/mL, *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, sampel darah yang dimasukkan dalam *vacutainer* EDTA dengan total volume 12 ml.

C. Kultur PBMC dan Pemberian Antigen

- Kultur PBMC ketiga kelompok sampel, protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb, PPD 2 μ g/mL (*Statens Serum Institut Denmark*), *well plate*, inkubator.

D. *Staining Cells Surface Marker*

- Alat : Botol sentrifus 1,5 ml, mikropipet, sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*)

- Bahan : Antibodi *cell surface marker anti-human CD4+*, larutan sel *staining buffer*.

E. *Staining Intracellular (Cytoplasmic) Marker*

- Alat : Botol sentrifus 1.5 ml, mikropipet, sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*)

- Bahan : Sel *staining buffer*, larutan *fix buffer*, larutan *perm wash buffer*, antibodi intraseluler *anti-human IFN-γ*.

F. *Flow cytometry : Flow cytometer BD FACS Calibur*, kuvet.

4.7 **Prosedur Penelitian**

A. Pemeriksaan Umum

1. Pengambilan darah dan urin

- 3 mL untuk EDTA *blood tube*, untuk pemeriksaan CBC
- 3 mL untuk *serum separator tube (SST)*,

Darah dalam SST, disentrifus 4.000 rpm selama 20 menit. Serum yang terbentuk diambil untuk dilakukan pemeriksaan ureum, kreatinin, SGOT, SGPT, gula darah acak dan serologis HIV.

- Sampel urin untuk tabung urin

Urin dalam tabung urin dilakukan pemeriksaan urin lengkap dan dilakukan sentrifus 4.000 rpm selama 20 menit untuk dilakukan pemeriksaan sedimen urin.

2. Foto toraks

Pada sampel pasien TB, dilakukan foto toraks untuk melihat luas lesi TB sedangkan pada kontrol atau sehat untuk menilai apakah

terdapat lesi tuberkulosis pada paru sekaligus menentukan apakah masuk daftar inklusi atau eksklusi.

3. Tes Mantoux

Tes *mantoux* dilakukan pada kontak positif dan kontrol sehat.

Tes *mantoux* dilakukan dengan menyuntikkan PPD RT 23-2 TU pada *antebrachii area volar* subyek penelitian. Lokasi kemudian diinterpretasi derajat indurasi dan eritema setelah 48-72 jam.

Interpretasinya sebagai berikut: diameter 0-4mm (negatif), diameter 5-9 mm (meragukan), dan diameter >10mm (positif). Hasilnya kemudian dicatat (Kasper et al., 2015).

4. Pemeriksaan dahak

Pemeriksaan dahak dilakukan pada ketiga kelompok sampel. Masing-masing sampel diberi 3 botol dahak untuk mengumpulkan dahak secara SP(sewaktu-pagi) kemudian dahak dicat dan dikultur atau dilakukan pemeriksaan dahak tes cepat molekuler.

B. Isolasi PBMC

a. Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin (LG

Optifresh 4°C) dan dibiarkan sampai suhu ruang.

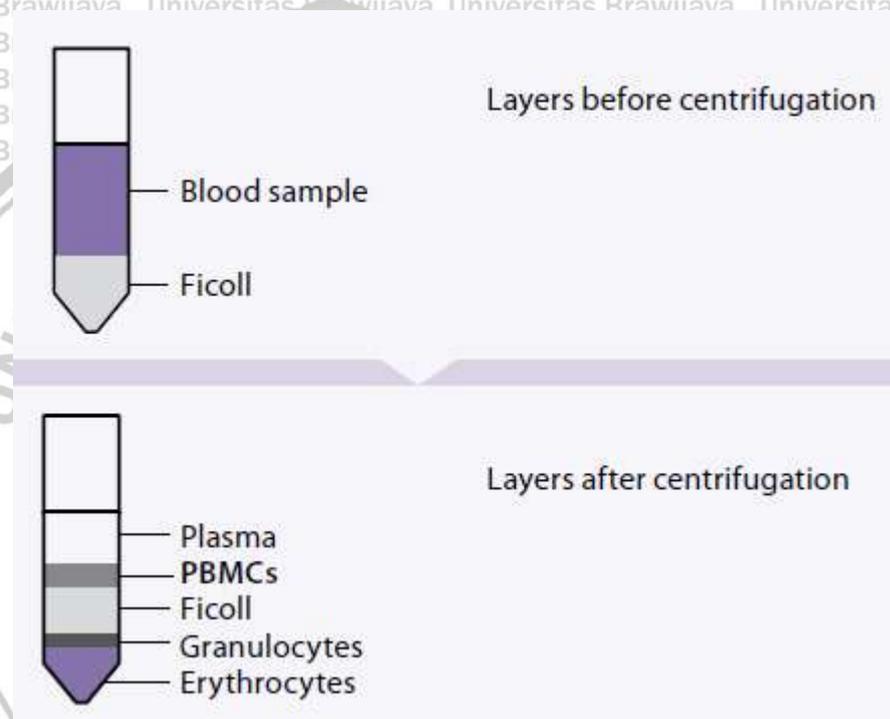
b. Disiapkan botol sentrifus 15 mL (Terumo) dan diisi dengan *Ficoll-Hpaque* d=1.077 g/mL

c. Sampel darah tepi dalam *vacutainer* EDTA sebanyak 12 mL yang akan diuji dibolak-balik perlahan agar homogen kemudian dicampur 1:1 dengan PBS. Kemudian diambil dengan *micropipette* dan disalurkan secara perlahan pada dinding *falcon* yang sudah diisi *Ficoll-*

Hipaque $d=1.077$ g/mL. Perbandingan volume antara *ficoll-hipaque* dengan sampel darah adalah 1:1. Akan terbentuk 2 lapisan.

d. Kemudian disentrifus (*Biosan LMC-3000*) suhu ruang dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit.

e. Setelah disentrifus akan terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, *Ficoll-Hipaque*, granulosit dan sel darah merah.



6. Cincin PBMC yang terbentuk diambil secara perlahan menggunakan *micropipette* dan diletakkan dalam botol sentrifus 15 mL yang baru.

7. Larutan PBMC kemudian dicuci dengan PBS 10 mL dan disentrifus suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit.

8. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan disentrifus kembali pada suhu ruang 1200 rpm (1000 – 1600 rpm) selama 10 menit, dilakukan dua kali.

9. Setelah disentrifus maka akan terbentuk *pellet* (PBMCs) di dasar botol sentrifus 15 ml.

C. Kultur PBMC dari pasien TB, TB kontak dan kontrol sehat.

1. Konsentrasi yang digunakan perlu dioptimasi dulu.

a. PBMC dikultur selama 48 jam. PBMC dikultur dalam inkubator 37°C dan disuplai 5% CO₂. PBMC dikultur masing-masing *in triplicate*. Supernatan diambil dan dimasukkan dalam 96 V bottom plate dan disimpan dalam -20°C.

b. Kultur PBMC:

- Sebanyak 10⁶ PBMC (setelah dihitung) dalam 100 µL IMDM dikultur dengan protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb.
- Ada 3 perlakuan yaitu :
 1. Sebagai kontrol negatif sel dikultur tanpa protein rekombinan M.tb dan/atau PPD.
 2. Sebagai kontrol positif sel dikultur dengan PPD 2 µg/mL.
 3. Sel dikultur dengan protein rekombinan ESAT6/CFP10 M.tb 2 µg/mL.

2. PBMC dikultur selama 48 jam. PBMC dikultur dalam inkubator 37°C dan disuplai 5% CO₂. PBMC dikultur masing-masing dalam *triplicate*. Sebelum dipanen diberikan *Brefeldin A* (Golgiplug) 10 µg/mL. Kultur dipanen pada jam ke 48.

3. Medium kultur

RPMI 1640, natrium bikarbonat 0.2%, *buffer Hepes* 0.28%, *Penstrep* 0.25%, PBS10X

4. Staining dengan *cell surface marker* CD4+

- a. Pellet PBMC ditambahkan dengan *cell staining buffer*, dan dibagi dalam beberapa *ependorf* sesuai dengan banyaknya perlakuan.

Cell staining buffer merupakan larutan yang dibuat dari 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dalam PBS.

- b. *Pellet* siap untuk *staining* dengan antibodi *cell surface marker* CD4+ (yang telah diencerkan dengan *cell staining buffer* dengan perbandingan 1:100).

- c. Antibodi yang telah diencerkan kemudian diambil sebanyak 50 μ L dan dicampurkan dengan *pellet* PBMC dan dihomogenkan.

- d. *Pellet* yang telah diberi antibodi diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

- e. Setelah inkubasi ditambahkan *cell staining buffer* sesuai dengan kebutuhan, dihomogenkan.

- f. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *Flow Cytometry (BD FACScalibur)*.

5. *Staining* dengan *Intracellular (Cytoplasmic) Marker* /Sitokin antibodi

- a. *Pellet* yang telah diinkubasi dengan antibodi *cell surface marker* kemudian dicuci dengan 500 μ L *cell staining buffer*, disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

- b. Supernatan dibuang, kemudian *pellet* yang terbentuk dicuci dengan 500 μ L larutan *fix buffer*, dihomogenkan dan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

- c. Supernatan dibuang, kemudian *pellet* difiksasi dengan 500 μ L *fix buffer* lalu diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

d. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

e. Supernatan dibuang, *pellet* yang terbentuk dicuci dengan larutan *permeable wash buffer* disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit. Larutan *perm wash buffer* tersedia dalam 10x konsentrasi, jadi apabila akan digunakan harus diencerkan terlebih dahulu dengan *deionnaised water*.

f. Supernatan dibuang, kemudian *pellet* siap untuk distaining dengan antibodi intraseluler (yang telah diencerkan dalam *permeable wash buffer* dengan perbandingan tertentu).

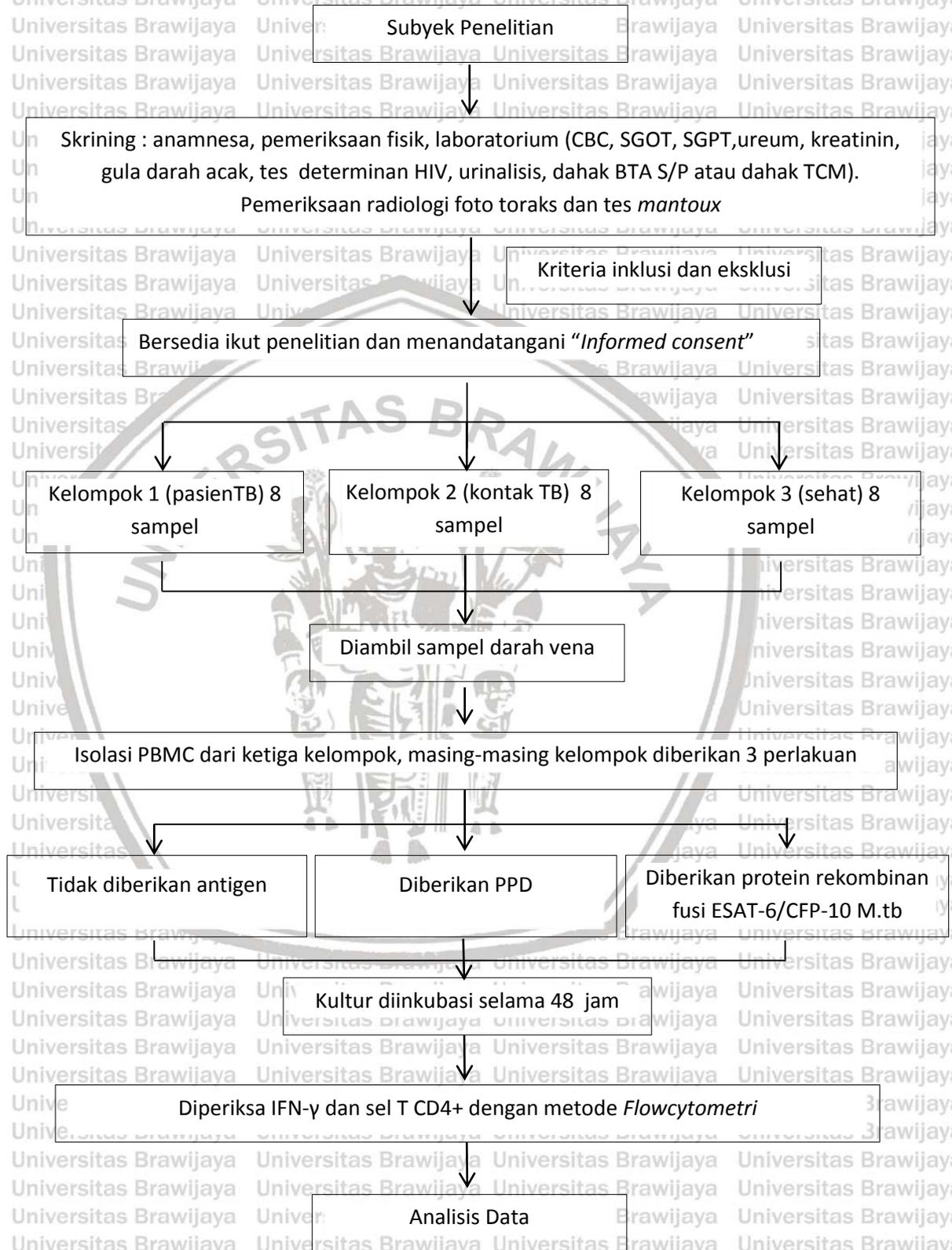
g. Masing-masing larutan distaining dengan 50 µL antibodi yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.

h. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500 µL larutan *perm wash buffer* dan disentrifus pada suhu 4 °C dengan kecepatan 2500 rpm selama 3 menit.

i. Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 µL sel *staining buffer*, dihomogenkan.

j. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *flow cytometry*.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Pengumpulan dan Analisis Data

Data hasil penelitian dihitung untuk mendapatkan rerata dan standar deviasi. Perbedaan antar kelompok dianalisis dengan *Mann - Whitney U test* atau *one way ANOVA* yaitu metode analisis statistika yang tergolong analisis komparatif (perbandingan) antara lebih dari dua rerata untuk melihat perbedaan ekspresi sitokin IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4+ pada tiap-tiap kelompok tergantung distribusi data yang nanti diperoleh, dengan tingkat kebermaknaan $p < 0,05$ dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (Tukey's Test)* untuk melihat kelompok yang bermakna. Analisis statistik menggunakan *SPSS software, version 19 for Windows*.





BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Keseluruhan subyek penelitian berada antara usia 19 tahun sampai dengan 50 tahun, dengan jumlah subyek <20 tahun 1 orang, usia 21-30 tahun 9 orang, usia 31-40 tahun 9 orang dan usia 41-50 tahun 5 orang. Pada kelompok pasien, subyek paling banyak berada pada kelompok usia 41-50 tahun. Rerata usia subyek secara keseluruhan 33 tahun dengan usia termuda 19 tahun dan usia tertua 49 tahun (tabel 5.1).

Subyek penelitian berjenis kelamin laki-laki dan perempuan sama banyak.

Pada kelompok pasien TB jumlah peserta laki-laki sebesar 75% dan peserta perempuan sebesar 25%. Berdasarkan Indeks Masa Tubuh (IMT) paling banyak pada subyek pasien TB memiliki IMT <18,5 yaitu 5 orang dan 3 orang memiliki IMT antara 18,5-23. Pada kelompok kontak TB dan Kelompok sehat hampir semua responden memiliki IMT >18,5 (tabel 5.1).

Kebiasaan merokok secara keseluruhan terdapat 2 dari 24 subyek penelitian yang merokok. Subyek yang memiliki BCG scar sebanyak 22 (91.7%) dan yang tidak memiliki BCG scar berasal dari kelompok pasien sebanyak 2 (8.3%) subyek penelitian. Pemeriksaan *mantoux* didapatkan pada seluruh subyek kelompok pasien dan kontak (tabel 5.1).

Tabel 5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

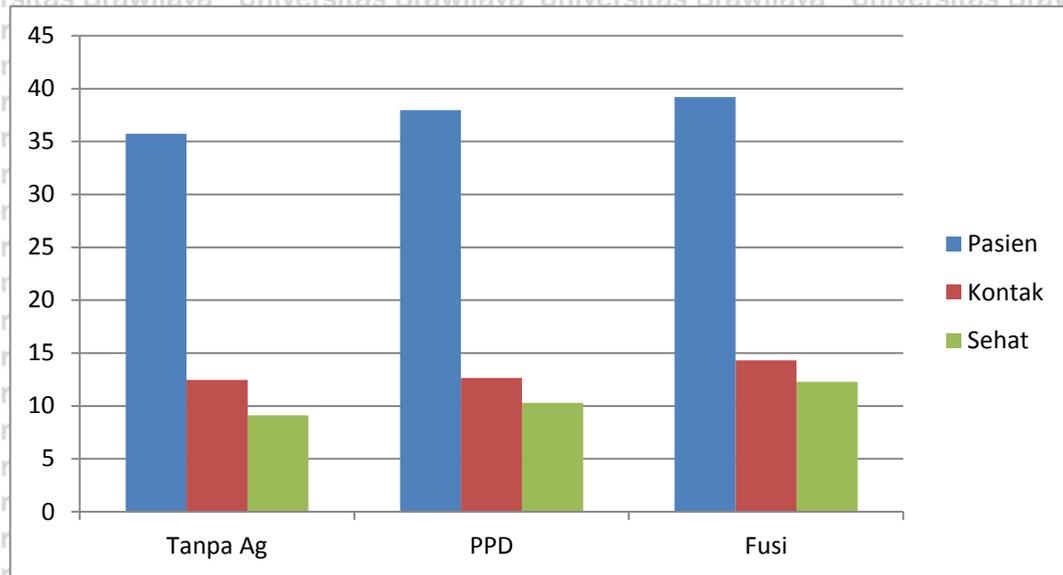
Karakteristik	Pasien N=8	Kontak N=8	Sehat Endemik N=8	
Usia (Tahun)	< 20	1/8	0	
	21 – 30	2/8	3/8	
	31 – 40	1/8	4/8	
	41 – 50	4/8	1/8	
Jenis Kelamin	Laki-laki	6/8	4/8	
	Perempuan	2/8	4/8	
	SD	2/8	-	
Pendidikan	SMP	1/8	-	
	SMU	5/8	1/8	
	Diploma	-	3/8	
Pekerjaan	Sarjana	-	4/8	
	Petani	1/8	-	
	Mahasiswa	1/8	-	
	Buruh Bangunan	1/8	-	
	Napi Narkoba	1/8	-	
	Ibu Rumah Tangga	1/8	-	
	Pedagang	1/8	-	
	Montir	1/8	-	
	Wiraswasta	1/8	-	
	Perawat	-	2/8	
	PPDS	-	6/8	
	Pustakawan	-	-	
	BMI (kg/m ²)	< 18.5	5/8	1/8
		18.5 – 23	3/8	2/8
		> 23	0/8	5/8
Riwayat merokok	Merokok	6/8	0/8	
	Tidak	2/8	8/8	
BCG Scar (+)		6/8	8/8	
Mantoux		8/8	8/8	
Gejala Klinis	Batuk	8/8	-	
	Batuk darah	2/8	-	
	Sesak	1/8	-	
	Nyeri Dada	1/8	-	
	Demam	7/8	-	
	Keringat Malam	6/8	-	
Foto Toraks	Penurunan BB	5/8	-	
	Minimal	0/8	Normal	
	Moderate	2/8	Normal	
BTA	Far advanced	6/8	-	
	+1	3/8	(-)	
	+2	3/8	(-)	
	+3	2/8	-	
TCM	Detected Low	3/8	-	
	Detected Med	3/8	-	
	Detected High	2/8	-	

Pada kelompok pasien didapatkan gejala klinis dan pemeriksaan penunjang seperti foto toraks, hasil BTA dan TCM yang mendukung diagnosis TB. Gejala klinis yang didapatkan berupa batuk (100%), demam (87.5%), keringat malam (75%), penurunan berat badan (62.5%), batuk darah (25%), sesak (12.5%) dan nyeri dada (12.5%). Gambaran foto toraks *far advanced* terbanyak didapatkan yakni 6 (75%) dari 8 subyek penelitian kelompok pasien dan sisanya memperlihatkan gambaran TB *moderate*. Hasil pemeriksaan *smear* BTA bervariasi dimana BTA +1 dan +2 masing-masing didapatkan jumlah yang sama yaitu 3 subyek penelitian, dan 2 orang dengan hasil BTA +2. Hal ini sejalan dengan hasil TCM dimana terdapat masing-masing 3 orang pada *detected low* dan *detected middle* dan 2 orang dengan hasil TCM *detected high* (tabel 5.1).

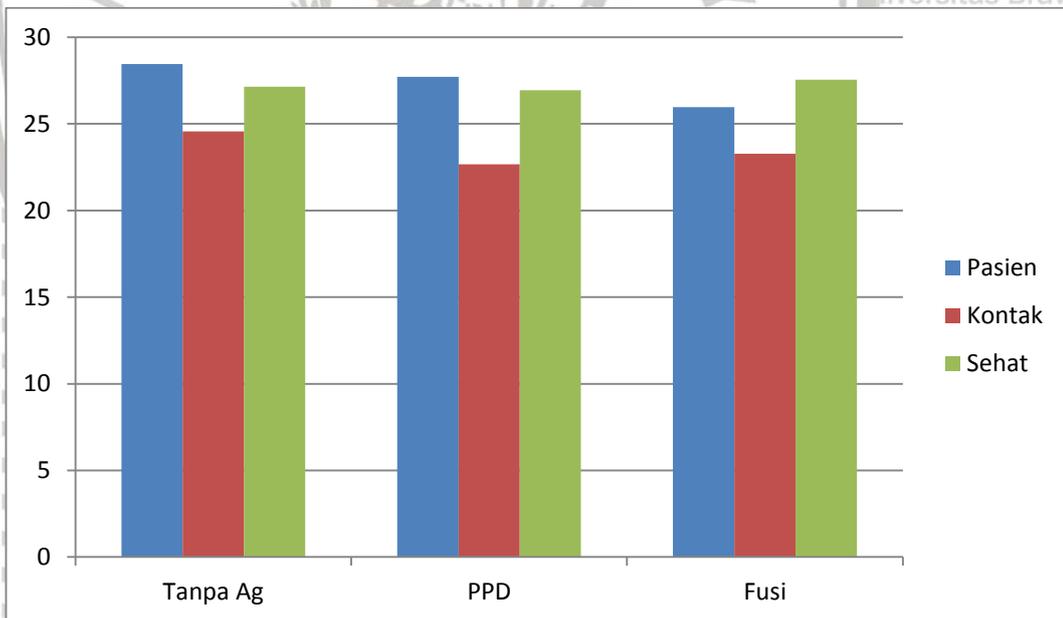
5.2 Profil Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+

Uji pengaruh pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 terhadap ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ dari kultur PBMC pada penelitian ini dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan berbeda yaitu kelompok 1 tidak diberi antigen, kelompok 2 diberi PPD dan kelompok 3 diberi protein fusi ESAT-6/CFP-10. Setelah kultur selama 48 jam dilakukan panen, kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ (pada lampiran).

Hasil *flowcytometry* menunjukkan rerata jumlah IFN- γ kelompok subyek pasien nampaknya terlihat lebih tinggi pada seluruh perlakuan baik itu tanpa antigen, pemberian PPD dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dengan pola yang hampir sama pada ketiga kelompok.



Gambar 5.1 Rerata ekspresi IFN- γ dengan perlakuan tanpa antigen, pemberian PPD dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10



Gambar 5.2 Rerata jumlah sel T CD4+ dengan perlakuan tanpa antigen, pemberian PPD dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10

5.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian

5.3.1 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Sehat Endemik

Hasil pemeriksaan rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ dengan *flowcytometry* pada kontrol sehat dengan tiga perlakuan didapatkan jumlah sel T CD4+ dan IFN- γ nampaknya cenderung lebih tinggi pada pemberian fusi ESAT-6/CFP-10, namun analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi IFN- γ dan sel T CD4+ pada kelompok subyek sehat endemik yang diberi tiga perlakuan dengan nilai $p=0.986$ untuk ekspresi sel T CD4+ dan $p=0.870$ untuk ekspresi IFN- γ (tabel 5.2).

Tabel 5.2 Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6/CFP-10) pada kelompok subyek sehat endemik

Parameter	Kelompok	N	Rerata (SD) (%)	P
Sel T CD4+	Tanpa Ag	8	27.141 (8.542)	0.986
	PPD	8	26.939 (8.658)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	27.545 (8.126)	
IFN- γ	Tanpa Ag	8	9.100 (5.250)	0.870
	PPD	8	10.300 (7.086)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	12.280 (8.376)	

5.3.2 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Pada Kelompok Subyek Kontak TB

Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan pada kelompok subyek kontak TB diperlihatkan pada tabel 5.3. Ekspresi IFN- γ terlihat cenderung meningkat pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan 2 perlakuan lainnya yakni tanpa antigen dan pemberian PPD, namun tidak terdapat perbedaan bermakna baik itu ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada kelompok subyek kontak TB yang diberi tiga perlakuan

dengan nilai $p=0.985$ untuk jumlah sel T CD4+ dan $p=0,795$ untuk ekspresi IFN- γ (tabel 5.3).

Tabel 5.3 Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6/CFP-10) pada kelompok subyek kontak TB

Parameter	Kelompok	N	Rerata (SD) (%)	P
Sel T CD4+	Tanpa Ag	8	24.565 (8.230)	0,985
	PPD	8	22.676 (8.809)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	23.269(8.709)	
IFN- γ	Tanpa Ag	8	12.460(9.124)	0.795
	PPD	8	12.648(5.185)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	14.316 (7.821)	

5.3.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Pada Kelompok Subyek Pasien TB

Tabel 5.4 menunjukkan rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan pada kelompok subyek pasien TB. Hasil IFN- γ tampak lebih tinggi pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan perlakuan tanpa antigen dan pemberian PPD, namun hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi antara IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada kelompok subyek pasien TB yang diberi tiga perlakuan dengan nilai P masing-masing $p=0.891$ untuk jumlah sel T CD4+ dan $p=0,956$ untuk ekspresi IFN- γ .

Tabel 5.4 Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ berdasarkan tiga perlakuan (tanpa antigen, PPD, Fusi ESAT-6/CFP-10) pada Kelompok Subyek Pasien TB

Parameter	Kelompok	N	Rerata (SD) (%)	P
Sel T CD4+	Tanpa Ag	8	28.4613 (9.054)	0.891
	PPD	8	27.7263 (10.499)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	25.9688 (12.169)	
IFN- γ	Tanpa Ag	8	35.726 (36.112)	0.956
	PPD	8	37.981 (36.829)	
	Fusi ESAT-6 CFP-10	8	39.208 (37.431)	

5.4 Ekspresi IFN- γ dan jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 pada Tiga Kelompok Subyek Penelitian (Sehat, Kontak, Pasien)

Hasil rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada ketiga kelompok subyek yang diberi protein rekombinan fusi ESAT-6 CFP 10 dapat dilihat pada tabel di bawah ini (tabel 5.5).

Tabel 5.5 Rerata ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada tiga kelompok subyek

Parameter	Kelompok	N	Rerata (SD) (%)	P
Sel T CD4+	Sehat	8	27.585 (8.085)	0.679
	Kontak	8	23.269 (8.709)	
	Pasien	8	25.969 (12.169)	
IFN- γ	Sehat	8	12.280 (8.376)	0,264
	Kontak	8	14.316 (7.821)	
	Pasien	8	39.208(37.431)	

Jumlah sel T CD4+ tampak meningkat pada kelompok sehat dibandingkan pada kelompok subyek kontak dan pasien, tetapi tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0.679$) pada ketiga kelompok subyek, sedangkan untuk ekspresi IFN- γ dengan hasil tampak lebih tinggi didapatkan pada kelompok subyek pasien yang diberi protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10, namun hal tersebut juga tidak memiliki perbedaan bermakna ($p=0.264$) dengan kelompok subyek kontak dan sehat.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Berdasarkan karakteristik usia didapatkan pada kelompok pasien paling banyak berada pada usia 41-50 tahun, rerata usia 33 tahun dengan usia termuda 19 tahun dan usia tertua 49 tahun. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian

Setiawan dkk (2016), dimana pasien TB paru aktif ditemukan di usia ≤ 50 tahun sebesar 80% . Hal ini menunjukkan bahwa penyakit TB dapat menyerang usia yang masih produktif (Setiawan dkk, 2016). Sekitar 75% pasien TB adalah kelompok usia yang paling produktif secara ekonomis yaitu usia 15-50 tahun (Depkes RI, 2011). Hasil ini juga didukung dari data terbaru menunjukkan bahwa jumlah kasus TB semua tipe paling banyak usia 25-34 tahun dengan persentasi 17,32% diikuti usia 45-50 tahun dengan persentasi 17,09% sedangkan pasien TB aktif BTA positif paling banyak berusia 45-50 tahun dengan persentasi 20,05% (Profil Kesehatan Dasar RI Tahun 2017). Setelah bertahun-tahun TB primer akan menjadi TB post primer umumnya pada usia 15-50 tahun (Setiawan dkk, 2016).

Pasien TB pada penelitian ini didominasi oleh laki-laki sebanyak 6 orang (75%) dan perempuan 2 orang (25%). Hal ini menunjukkan bahwa pasien TB berdasarkan karakteristik jenis kelamin paling banyak diderita laki-laki dibandingkan perempuan. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan Setiawan dkk (2016) yang menunjukan bahwa pasien TB Paru aktif dalam penelitiannya proporsi laki-laki 70%, lebih besar dibandingkan perempuan sebanyak 30% (Setiawan dkk, 2016). Data WHO 2014 bahwa secara global rasio pasien TB aktif laki-laki 1,7 dibanding perempuan (Rahmad dkk, 2017). Data ini sesuai dengan

hasil Riskerdas 2013 bahwa kasus BTA (+) pada laki-laki lebih tinggi daripada perempuan, yakni hampir 1,5 kali dibandingkan kasus BTA (+) pada perempuan (Kementerian Kesehatan RI, 2014). Hasil data ini juga didukung oleh jumlah kasus TB semua tipe tahun 2017 paling banyak laki-laki dengan jumlah 209.650 jiwa (58,11%) sedangkan perempuan 151.120 jiwa (41,89%) (Profil Kesehatan Dasar RI Tahun 2017). Di satu sisi laki-laki bersifat lebih aktif dalam pekerjaannya dan lebih banyak bertemu dengan orang, sehingga lebih berpotensi tertular penyakit TB (Setiawan dkk, 2016).

Subyek penelitian memiliki latar belakang pendidikan yang beragam. Pada kelompok pasien pendidikan tertinggi SMU. Pendidikan memang menjadi dasar untuk memperoleh semua pengetahuan yang akan diterapkan dalam kehidupan individu ataupun bermasyarakat. Pasien TB selalu dikaitkan dengan pendidikan dan pengetahuan. Semakin rendah pendidikan dan pengetahuan semakin rentan terkena penyakit TB. Tetapi semua ini kembali lagi dari perilaku dan pola hidup setiap individu untuk menjaga kesehatannya (Tarmica dkk, 2017).

Hasil penelitian Tarmica dkk (2017) didapatkan bahwa tidak ada hubungan antara pendidikan dengan kejadian TB. Tingkat pendidikan tidak memiliki hubungan dengan kejadian TB paru di wilayah kerja Puskesmas Paniki Bawah karena penyakit TB paru disebabkan oleh interaksi antara *agent* yaitu M.tb, lingkungan dan *host* yaitu pejamu atau manusia dengan berbagai faktor risiko seperti pendidikan, pendapatan, status gizi, imunitas, jadi bisa saja responden terpapar dengan faktor risiko TB paru yang lain selain faktor pendidikan (Tarmica dkk, 2017). Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian Abdul, dkk (2015) bahwa jumlah responden terbanyak dengan pendidikan rendah yaitu sebanyak 38 orang (70,37%), sedangkan jumlah responden yang berpendidikan tinggi sebanyak 16

orang (29,63%) (Abdul dkk, 2015). Peningkatan TB ada korelasinya dengan tingkat pendidikan atau pengetahuan. Pendidikan yang tinggi akan memudahkan masyarakat menyerap informasi dan pengetahuan untuk menuju hidup sehat serta mengatasi masalah kesehatannya (Rahmat, 2014).

Berdasarkan karakteristik pekerjaan, pada kelompok pasien pekerjaan terbagi sama rata dengan proporsi 12,5% sebagai petani, buruh bangunan, mahasiswa, napi narkoba, ibu rumah tangga, pedagang, montir dan wiraswasta.

Berdasarkan hasil ini didapatkan tidak ada hubungan yang bermakna antara pekerjaan dengan kejadian TB. Data ini didukung oleh penelitian Surakhmi, dkk (2016), yang menyatakan bahwa orang yang bekerja dapat meningkatkan risiko terkena TB paru sebesar 1,5 kali (150%) dibandingkan dengan orang yang tidak bekerja. Pada populasi dengan tingkat kepercayaan 95%, orang yang bekerja meningkatkan risiko terkena TB paru sebesar 0,55 kali hingga 3,8 kali (Surakhmi dkk, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan pekerjaan subyek penelitian dari kelompok pasien berasal dari sektor nonformal (petani, buruh bangunan, mahasiswa, napi narkoba, ibu rumah tangga, pedagang, montir dan wiraswasta) yang memiliki pendapatan yang tidak tetap per bulannya sehingga sangat berpengaruh pada makanan/gizi secara langsung serta kesehatan lingkungan perumahan yang tidak memenuhi syarat kesehatan yang berdampak pada kesehatan mereka sendiri. Asupan gizi yang kurang serta kondisi tempat tinggal yang tidak sehat mempermudah terjadinya penularan penyakit infeksi seperti TB paru (Surakhmi dkk, 2016).

Hasil penelitian berdasarkan karakteristik Indeks Massa Tubuh (IMT) didapatkan status gizi kurang (IMT $<18,5\text{kg/m}^2$) pada 62,5% kelompok pasien

dan 12,5% pada kelompok kontak TB. Data menunjukkan bahwa IMT yang di bawah normal yaitu nilai $<18,5\text{kg/m}^2$ memiliki risiko tinggi terkena penyakit TB.

Hal ini disebabkan faktor gizi yang kurang merupakan salah satu penyebab seseorang rentan terkena penyakit. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Fadhalna dkk (2016) yang menunjukkan bahwa sebagian besar pasien dengan diagnosis awal TB memiliki IMT di bawah normal. Penyakit TB cenderung berinteraksi dengan status gizi buruk, dimana pasien TB memiliki status gizi yang lebih buruk dibandingkan dengan orang yang sehat (Fadhalna dkk, 2016).

Riwayat merokok hanya ditemukan pada kelompok subyek pasien (75%).

Data ini menunjukkan bahwa riwayat merokok merupakan salah satu faktor risiko yang berhubungan dengan kejadian TB. Hasil ini sejalan dengan penelitian Anisa dkk (2013) yang menyatakan bahwa sebanyak tujuh responden utama dari dua puluh empat responden yang ada, menyatakan ada keterpaparan terhadap asap rokok sebelum mereka teridentifikasi mengidap penyakit TB Paru (Anisa dkk, 2013). Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Nurhayati (2012) menunjukkan bahwa presentase kebiasaan merokok lebih banyak terdistribusi pada responden yang sering merokok sebanyak 159 subyek (84,6%) dan persentase sedikit terdistribusi pada responden yang tidak sering merokok sebanyak 29 subyek (15,4%) (Nurhayati, 2012). Menurut Aditama (2003, dalam Purnamasari, 2010) kebiasaan merokok dapat menyebabkan rusaknya pertahanan paru serta merusak mekanisme *mucociliary clearance*, selain itu asap rokok juga akan meningkatkan *airway resistance* serta permeabilitas epitel paru dan merusak gerak silia, makrofag meningkatkan sintesis elastase dan menurunkan produksi

antiprotease. Semakin lama seseorang menghisap rokok maka akan semakin berisiko terkena TB paru (Fakhmi dkk, 2013).

Hasil penelitian berdasarkan karakteristik BCG scar didapatkan keseluruhan subyek penelitian hanya 2 orang subyek dari kelompok pasien tidak memiliki BCG scar. Hasil ini sesuai dengan penelitian Fajriah dkk (2016) proporsi responden yang mempunyai BCG scar lebih banyak pada non-TB dibandingkan dengan responden yang tidak mempunyai BCG scar lebih banyak pada responden TB. Pada hasil pengolahan data di atas, dapat dilihat bahwa didapatkan $p = 0,022$ (dimana nilai p yang dianggap bermakna adalah $< 0,05$), hal ini memperlihatkan hubungan antara pembentukan scar vaksin BCG dengan kejadian infeksi TB, artinya orang yang tidak memiliki BCG scar lebih banyak pada pasien TB dibandingkan dengan orang sehat. Imunisasi BCG merupakan salah satu cara pencegahan terjadinya TB pada anak. Meskipun anak sudah mendapatkan imunisasi BCG, namun anak masih terkena penyakit TB. Tidak terjadinya scar (bekas di kulit) mungkin berhubungan dengan kurang sempurnanya sistem imun anak, kesalahan pada teknik penyuntikan atau penggunaan vaksin yang sudah rusak dan dosis yang tidak sesuai. Berdasarkan penelitian faktor risiko infeksi TB pada 979 anak di Istanbul, Turki, yang pernah divaksinasi dan tidak memiliki scar BCG, menunjukkan jumlah anak yang terpapar TBC sebanyak 770 anak atau 78%. Hal ini menunjukkan, bahwa mereka masih berisiko besar terkena infeksi TB, walaupun sudah mendapatkan imunisasi BCG. Anak yang sudah mendapatkan imunisasi BCG, jika menderita TB biasanya tingkat keparahannya tidak sama dengan anak yang tidak mendapatkan Imunisasi BCG. Anak yang tidak mendapatkan Imunisasi BCG akan mempunyai tingkat keparahan yang lebih tinggi (Fajriah dkk, 2016).

Kelompok subyek pasien TB dan kontak TB 100% memiliki hasil tes *mantoux* positif sementara pada kelompok sehat endemik 100% subyek memiliki hasil tes *mantoux* negatif. Tes *mantoux* positif (>10 mm) pada subyek pasien dan kontak TB menunjukkan adanya respons imun terhadap paparan kuman M.tb dan bukan berarti menderita penyakit TB (WHO, 2016).

Gejala klinis pada subyek kelompok pasien TB semuanya mengalami batuk, batuk darah (25%), demam (87,5%), keringat malam (75%), penurunan berat badan (62,5%), sesak dan nyeri dada (12,5%). Hasil penelitian ini sesuai dengan teori bahwa gejala utama penyakit TB adalah batuk terus menerus dan berdahak selama 2 minggu atau lebih diikuti gejala tambahan antara lain batuk darah, sesak napas, nyeri dada, demam, keringat malam, badan lemah, nafsu makan menurun, berat badan turun (Fathiyah Safithri, 2011).

Pemeriksaan foto toraks didapatkan pada kelompok subyek pasien 25% lesi moderat dan 75% lesi *far advanced*. Hasil pemeriksaan BTA didapatkan +1 dan +2 masing-masing 37,5% dan 25%. Hasil pemeriksaan TCM didapatkan *detected low* dan *medium* masing-masing 37,5% dan *detected high* 25%.

Pemeriksaan TCM merupakan salah satu pemeriksaan bakteriologis yang digunakan untuk mendiagnosis TB sensitif dan resisten obat, jadi biasanya positif pada kelompok pasien TB, sedangkan pada kelompok sehat negatif (Kementerian Kesehatan RI, 2014).

6.2 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Kelompok Subyek Penelitian

Hasil penelitian ini menggunakan analisis bivariat, menggunakan uji anova (*analysis of variance*) untuk mengetahui adanya perbedaan rerata pada ketiga kelompok subyek dengan tiga perlakuan dan selanjutnya dilakukan uji

Post Hoc Tukey untuk mengkonfirmasi apakah perbedaan rerata yang ditemukan merupakan perbedaan yang sebenarnya secara statistik dimana hal ini dilakukan dengan menguji masing-masing perbedaan rerata kelompok subyek dibanding standar erornya.

6.2.1 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Sehat Endemik

Pada penelitian kami didapatkan hasil ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada kelompok subyek sehat tampak lebih tinggi dengan pemberian antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan tanpa antigen dan PPD. Namun hasil tersebut tidak memiliki perbedaan bermakna ($p=0,870$ untuk IFN- γ dan $p=0,986$ untuk sel T CD4+). Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 mempunyai pengaruh terhadap sistem imunitas yaitu mampu menginduksi limfosit T CD4+ dalam mengekspresikan sitokin IFN- γ pada kelompok subyek sehat endemik. Hasil penelitian ini didukung oleh Setiawan dkk (2016), menemukan kadar IFN- γ setelah distimulasi antigen ESAT-6 pada orang sehat endemik antara 98,84 – 135,47 pg/mL, pada TB laten 74,6 – 142,2 pg/mL dan TB aktif 72,67 – 154,21 pg/mL. Hasil analisis statistik tidak ditemukan perbedaan bermakna ekspresi IFN- γ pada ketiga kelompok (Setiawan dkk, 2016).

Ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada kelompok sehat endemik yang dipakai pada penelitian ini kemungkinan juga memperlihatkan bahwa sistem imunnya telah mengenali kuman TB sebelumnya, artinya telah terpapar dengan kuman TB sebelumnya. Dari anamnesis, seluruh subyek sehat pada penelitian ini telah mendapatkan imunisasi BCG dengan hasil tes *mantoux* negatif. Walaupun kelompok sehat endemik yang dimaksud dalam penelitian ini

adalah orang sehat yang tidak pernah kontak dengan pasien TB, tetapi berada pada daerah yang prevalensi TB tinggi, seseorang sangat mungkin terpapar dengan kuman TB meskipun dalam anamnesanya tidak didapatkan adanya kontak dengan pasien TB sebelumnya (Kemenkes, 2011).

Dalam respons imun adaptif terhadap *M.tb*, setelah makrofag dan sel dendritik mempresentasikan antigen dan membawanya ke permukaan, patogen ini akan dikenali oleh subpopulasi limfosit T melalui berbagai molekul yang terdapat di permukaan makrofag dan sel dendritik. Bila dipresentasikan oleh MHC kelas II akan mengaktifkan limfosit T CD4+. Limfosit T CD4+ dan CD8+ merupakan subpopulasi yang sangat penting dalam mengendalikan infeksi *M.tb* (Orme, 2004 ;Rabson et al., 2005; Hanekom et al., 2007)

Imunitas protektif terhadap bakteri intraselular seperti *M.tb* sangat bergantung terhadap keseimbangan produksi sitokin tipe Th1 dan tipe Th2. Respons imun pejamu melawan *M.tb* diperantarai oleh imunitas selular terutama oleh peran sitokin dan sel Th1. Berbagai kejadian yang diperantarai oleh sitokin sangat penting untuk menentukan imunitas pejamu melawan *M.tb* atau resistensi pejamu. Sitokin adalah molekul yang memediasi komunikasi interselular dalam sistem imun, diproduksi oleh berbagai jenis sel (Pratiwi dkk, 2017).

Imunitas yang diperantarai sel T berperan penting dalam pertahanan pejamu terhadap infeksi TB, terutama sel T CD4+ tipe Th1 yang mensekresi IFN- γ . Sel T CD8+ juga dapat memproduksi IFN- γ untuk membantu menghancurkan kuman *M.tb*. Sel T CD4+ saja tidak cukup untuk mengendalikan pertumbuhan kuman *M.tb* tetapi juga diperlukan sel T CD8+ yang akan meningkatkan produksi IFN- γ . Peningkatan produksi IFN- γ oleh sel T CD4+ dan sel T CD8+ diharapkan

dapat memberikan perlindungan pada saat pejamu terinfeksi oleh basil M.tb (Rahmad dkk, 2017).

6.2.2 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Kontak

Kelompok subyek kontak TB merupakan populasi dengan respons imun yang baik yang telah mendapatkan sensitisasi antigen M.tb sebelumnya, yang dibuktikan dengan hasil tes *mantoux* positif. Sel efektor memori pada kelompok kontak TB telah berkembang dengan baik atas responsnya terhadap antigen M.tb sebelumnya, tetapi tidak menimbulkan gejala klinis TB. Sehingga paparan antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb galur Malang tetap menunjukkan peningkatan dibandingkan dengan yang tanpa perlakuan.

Sistem imunitas tubuh alamiah pada 90% individu dapat melindungi dari sakit namun tidak dapat melakukan eradikasi terhadap patogen ini sehingga kemungkinan terjadi reaktivasi bahkan reinfeksi sangat besar. Hal ini karena tidak terbentuk memori imunologis yang cukup dalam mengatasi infeksi tuberkulosis selanjutnya. Respons imun yang ditimbulkan vaksinasi BCG sangat bervariasi sehingga dibutuhkan pengembangan vaksin baru yang diharapkan mempunyai memori imunologis yang lebih panjang sehingga dapat memberikan perlindungan terhadap keadaan reaktivasi TB laten (Hoft,2008).

Pada penelitian ini kami mendapatkan hasil bahwa pada ekspresi IFN- γ dan jumlah sel limfosit T CD4+ pada kelompok kontak tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,795$ pada IFN- γ dan $p=0,985$ pada sel T CD4+) baik pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10, PPD, maupun tanpa pemberian antigen. Pada ekspresi IFN- γ tampak lebih tinggi pada pemberian

protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10, sedangkan jumlah sel T CD4+ tampak lebih tinggi pada perlakuan tanpa antigen.

Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 mempunyai pengaruh terhadap sistem imunitas yaitu mampu menginduksi ekspresi IFN- γ pada kelompok kontak.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Vidal *et al.*, 2004 yang menunjukkan peningkatan kadar IFN- γ pada kelompok kontak TB dengan induksi antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 (Vidal, 2004). Dalam respons imun adaptif CD4+ dan CD8+ sangat penting untuk mengendalikan infeksi M.tb.

Namun pada penelitian kami terdapat hasil ekspresi sel T CD4+ yang tampak lebih tinggi pada perlakuan tanpa antigen dibandingkan dengan perlakuan pemberian protein rekombinan ESAT-6/CFP-10 dan PPD walaupun secara statistik tidak bermakna. Kemungkinan hal ini bisa disebabkan karena sel PBMC yang tanpa perlakuan antigen sebelumnya sudah terpapar dengan PPD (*tes mantoux*) (Trilistiyanti *et al.*, 2014).

Stimulasi oleh antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 menyebabkan aktivasi dari respons imun seluler yang menyebabkan sensitisasi dari sel T CD4+ dan sel T CD8+. Sel T ini selanjutnya akan melepaskan mediator yang akan memobilisasi monosit dan subset sel T lainnya. Oleh karena itu, antigen harus dapat dipresentasikan oleh molekul MHC kelas II untuk mengaktivasi sel T CD4+ dan dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I untuk mengaktivasi sel T CD8+ (Kaplan, 2005).

Jumlah dan kualitas respons sel T tampaknya memiliki dampak signifikan pada pembentukan memori pelindung terhadap TB, hal ini telah dibuktikan oleh sejumlah penelitian terbaru yang berkaitan dengan rangsangan patogen pada model hewan coba yang berbeda. Oleh karena itu, mengukur faktor tunggal

seperti frekuensi produksi IFN- γ saja tidak mencerminkan potensi fungsional sel Th1 secara keseluruhan, dan kemampuan memori sel T untuk mengekspresikan beberapa sitokin sekaligus tampaknya penting sebagai respons yang superior perlindungan terhadap TB (Derrick *et al.*, 2011; Lindenstorm *et al.*, 2009).

6.2.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pada Kelompok Subyek Pasien TB

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ pada kelompok subyek pasien tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,956$ untuk IFN- γ dan $p=0,891$ untuk sel T CD4+) pada ketiga perlakuan yaitu tanpa antigen, pemberian PPD dan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10. Hasil ekspresi IFN- γ tampak lebih tinggi pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan perlakuan tanpa antigen maupun pemberian PPD dan jumlah sel T CD4+ tampak meningkat pada perlakuan tanpa antigen. Tidak ada perbedaan bermakna pada penelitian ini, dikarenakan respons imun yang tidak optimal, khususnya pada pasien TB aktif. Berbeda dengan penelitian lain oleh Veenstra *et al.*, 2007, menemukan prosentase IFN- γ yang disekresi oleh sel T limfosit CD4+ pada pasien TB saat didiagnosis secara bermakna lebih tinggi daripada kontrol (Veenstra *et al.*, 2007).

Pada pasien TB juga diekspresikan berbagai sitokin anti inflamasi yang dapat menurunkan respons imun terhadap M.tb, serta menghambat respons inflamasi. Apabila jumlah sitokin tersebut berlebihan, dapat mengakibatkan kegagalan dalam pengontrolan infeksi TB. Peningkatan ekspresi IFN- γ walaupun tidak bermakna juga dapat terjadi pada pasien yang telah mendapatkan pengobatan (Tores, 2008). Sodhi dkk, menunjukkan bahwa kadar IFN- γ yang

tinggi dalam darah perifer terkait dengan klinis TB yang ringan (Raja A. 2004; Meraviglia *et al.*, 2012).

Tavares *et al.*, 2007 meneliti respons imun sel T dari kombinasi 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/PT-64 dan ESAT-6/CFP-10 pada daerah TB endemik. Penelitian tersebut menunjukkan rerata produksi IFN- γ pada pasien TB secara signifikan lebih tinggi untuk 38 kDa/CFP-10 ($p=0,012$) dan 38 kDa/MPT-64 ($P<0,035$), bila dibandingkan dengan antigen tunggal. Serupa dengan kombinasi ESAT-6/CFP-10, respons IFN- γ terhadap 36 kDa/CFP-10 menunjukkan kecenderungan peningkatan pada pasien yang diobati meskipun tidak signifikan ($p=0,16$). Penelitian ini menunjukkan untuk pertama kalinya bahwa 38 kDa/CPF-10 memiliki sensitivitas prediksi untuk pasien yang mirip dengan kombinasi ESAT-6/CFP-10 dan juga respons perbaikan signifikan yang berkaitan dengan antigen tunggal dengan reaktivitas lebih selektif diantara individu dengan *Tuberculin Skin Test* (TST) positif. Hasil penelitian ini dapat berpotensi sebagai alat diagnostik untuk infeksi TB (Tavares *et al.*, 2007).

6.3 Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Sel T CD4+ Berdasarkan Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 pada Tiga Kelompok Subyek Penelitian (Sehat, Kontak, Pasien)

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata ekspresi IFN- γ setelah distimulasi dengan protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada pasien TB aktif kecenderungan lebih tinggi dari pada kelompok kontak dan sehat, namun hasil yang didapatkan tidak memiliki perbedaan bermakna ($p=0,679$) antara ketiga kelompok subyek penelitian. Peningkatan ekspresi IFN- γ yang tampak lebih tinggi oleh karena terdapat respons imun protektif terhadap infeksi kuman TB.

Hal yang sama ditemukan pada jumlah sel limfosit T CD4+ yang juga tidak ada

perbedaan bermakna ($p=0.264$) antara ketiga kelompok subyek penelitian dengan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10, walaupun pada kelompok subyek sehat rerata jumlah sel limfosit T CD4+ kecenderungan lebih tinggi dari kelompok kontak dan pasien.

Tidak terdapat perbedaan bermakna antara ekspresi IFN- γ dan jumlah sel limfosit T CD4+ pada ketiga kelompok subyek disebabkan oleh beberapa hal sebagai berikut, pertama mengenai status gizi pasien TB aktif cenderung malnutrisi, sehingga respons imun tidak berjalan secara maksimal. Kedua, pada umumnya, pasien yang berkunjung ke rumah sakit bukan pasien TB aktif baru, suatu eksaserbasi akut yakni pasien lama yang mengalami reaktivasi setelah sempat sembuh beberapa waktu. Ketiga, pasien yang telah didiagnosis TB namun tidak segera berobat anti-TB dan sistem kesehatan berjenjang, fasilitas kesehatan 1 merujuk ke rumah sakit paru. Kondisi tersebut mengakibatkan penurunan respons imun, sehingga kadar IFN- γ tidak terlalu tinggi (Setiawan dkk, 2016). Keempat, dari data penelitian dengan subyek yang sama oleh Yeti Indrawati (2018) menunjukkan bahwa ekspresi IL-10 pasien TB signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sehat dan kontak. Interleukin 10 merupakan sitokin anti inflamasi yang menurunkan proliferasi sel Th-1 dan menghambat aktifitas makrofag, akibatnya terjadi penurunan respons imun terhadap infeksi TB, sehingga kadar IFN- γ tidak meningkat signifikan. Bila sel T CD4+ diaktifkan oleh suatu antigen yang merupakan *trigger T cell receptor* maka sel tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi efektor CD4+ Th1 maupun CD4+ Th2. Dominasi proliferasi dan diferensiasi menjadi efektor CD4+ Th1 maupun CD4+ Th2 tergantung pada lingkungan sitokin yang berperan.

Pengembangan Th1 dianggap berkontribusi sebagai pelindung terhadap TB (Raja, 2004; Zhu *et al.*, 2010).

Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Wang *et al.*, (2016) dalam penelitiannya melaporkan tidak terdapat perbedaan bermakna persentase sel T CD8+ yang mengekspresikan IFN- γ setelah stimulasi antigen dengan dosis yang sama dengan inkubasi selama 24 jam (Wang *et al.*, 2016). Pollock *et al.*, (2013) dalam penelitiannya melaporkan hasil yang berbeda, yaitu terdapat peningkatan bermakna sel T CD4+ dan CD8+ yang mengekspresikan IFN- γ setelah distimulasi dengan antigen fusi ESAT-6 dan CFP-10 menggunakan dosis yang sama selama 16 jam (Pollock *et al.*, 2013). Perbedaan hasil ini mungkin dipengaruhi oleh dosis antigen, lama paparan dan asal dari antigen yang berbeda. Dosis antigen diduga menentukan antigenitas yang mempengaruhi stimulasi terhadap proliferasi sel T dan produksi sitokin, bahkan penelitian oleh Wang *et al.*, 2009 melaporkan pada dosis tertentu antigen M.tb dapat menghambat proliferasi dan produksi sitokin dari sel T. Penurunan fungsi sel T CD4+ dan CD8+ dalam memproduksi IFN- γ dapat mengganggu proses eliminasi basil M.tb.

Kegagalan respons imun pejamu dalam mengeliminasi dan menghambat replikasi basil M.tb yang menginfeksi makrofag dan sel dendritik di alveolar akan menyebabkan pejamu menjadi pasien TB aktif yang berisiko menularkan M.tb (infeksius) ke orang lain melalui droplet. Hal ini sesuai dengan penelitian Rahmad dkk (2017) yang menunjukkan secara *in vitro* tidak terdapat peningkatan bermakna antara persentase sel T CD4+ dan CD8+ yang mengekspresi IFN- γ subyek PBMC pasien TB aktif setelah stimulasi antigen fusi ESAT-6/CFP-10 (Rahmad dkk, 2017).

Penyebab rendahnya sel T CD4+ dan CD8+ yang mengekspresikan IFN- γ pada pasien TB aktif sehingga menimbulkan respons imun yang tidak protektif terhadap infeksi *M. tuberculosis* mungkin disebabkan karena *exhausted lymphocyte*. *Exhausted lymphocyte* merupakan gangguan fungsi dari limfosit yang umumnya terjadi pada infeksi kronis termasuk TB. Gangguan fungsi ini dapat berupa penurunan kapasitas proliferasi, produksi sitokin, kemampuan sitotoksitas dan *metabolically deficient* dari limfosit yang distimulasi. Faktor genetik kelainan polimorfisme gen IFN gamma+874 T/A mungkin juga berperan dalam rendahnya produksi IFN- γ , namun pada penelitian ini tidak diteliti (Rahmad dkk, 2017).

Ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD4+ didapatkan peningkatan yang tidak bermakna pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan tanpa antigen dan pemberian PPD kemungkinan dapat disebabkan oleh karena kurangnya kemurnian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10.

6.4 Keterbatasan Penelitian

1. Pemeriksaan ekspresi sitokin hanya dilakukan satu waktu sehingga tidak dapat dinilai kualitas sel T memori dalam mempertahankan ekspresi sitokin yang penting dalam strategi vaksin.
2. Tidak dinilai persubjek yang dapat menghasilkan peningkatan ekspresi beberapa sitokin bersamaan.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb tidak mempengaruhi ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4+ pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, dan sehat endemik.
2. Ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD4+ dengan stimulasi protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 tidak memiliki perbedaan yang bermakna pada ketiga kelompok subyek penelitian ini, namun terdapat kecenderungan peningkatan ekspresi IFN- γ pada kelompok pasien.

7.2 Saran

1. Uji imunogenitas pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb galur lokal terhadap ekspresi limfosit pada kultur PBMC untuk mengetahui potensinya dalam mengekspresikan sebaiknya dilakukan dengan masa kultur yang berbeda untuk mendapatkan hasil yang optimal.
2. Uji imunogenitas lebih baik jika dilakukan bersamaan dengan uji secara *in vitro* pada hewan coba untuk membuktikan respons imun setelah paparan antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. Lichtman, Andrew H. 2016. *Basic Immunology – Functions dan Disorders of The Immune System*. Edisi kelima. Elsevier. Kanada. p. 1 – 307.
- Acosta, A., Lopez, Y., Nor, N. M., Pando, R. H., Alvarez, N., Sarmiento, M. E., et al. 2013. The role of antibodies in the defense against tuberculosis. Dalam: Mahboub, B. H. & Vats, M. G. (eds.) *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*. USA.
- Aditama, T.Y., et al, 2011. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta
- Ahmad, S. 2011. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011: 1-17.
- Alsagaff, H & Mukty, A. 2005. Dasar - dasar ilmu penyakit paru. Surabaya: Airlangga University Press.
- Amin, Z. & Bahar, A. 2009. Tuberkulosis paru. Dalam: Sudibyo, A. W., Setiyohadi, B., Alwi, I. & Setiati, S. (eds.) *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: InternaPublishing.
- Andersen P, Munk ME, Polock JM, and Doherty TM. 2000. Spesific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*: 356:1099-104
- Azuma M. 2006. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodont Res*; 41: 361- 373.
- Bafica, A. Scanga, C.A. Serhan, C. Machado, C. White, S. Sher, A. Alberti, J. 2005. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *Clin Invest*; 115(6): 160-166
- Bekmurzayeva, A. 2013. *Tuberculosis Diagnosis Using Immunodominant, Secreted Antigens of Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 93 (4): 381 – 388.
- Blanco, A. M. A., Lukey, P. T., Cliff, J. M. & Dockrell, H. M. 2007. Strain-dependent variation in *Mycobacterium bovis* BCG-induced human t-cell activation and gamma interferon production in vitro. *INFECT. IMMUN*. 75: 3197–3201.
- Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacterium. *Annu Rev Biochem*; 64:29-63

Brewer, T. F. 2000. Preventing tuberculosis with Bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clinical Infectious Diseases*.31: S64-67.

Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S., Kremer, L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*. 53: 391-403

Cavalcanti, Y. V. N., Brelaz, M. C. A., Neves, J. K. d. A. L., Ferraz, J. e. C. & Pereira, a. V. e. R. e. A. 2012. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the development of pulmonary tuberculosis. *Pulmonary Medicine*.2012: 1-10.

Cole, S. T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*.148: 2919-2928.

Coler, R. N., Baldwin, S. L. & Reed, S. G. 2012. Vaccines against Mycobacterium tuberculosis: an overview from preclinical animal studies to the clinic. In: Cardona, P. J. (ed.) *Understanding tuberculosis - analyzing the origin of mycobacterium tuberculosis pathogenicity*. Kroasia: InTech.

Derrick, S. C., Yabe, I. M., Yang, A. & Morris, S. L. 2011. Vaccine-induced anti-tuberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells. *Vaccine*.29: 2902-2909.

Dheda, K., Scwander, S.K., Zhu, B, Van Zyl-Smit, R.N, Zhan, Y., 2010. The immunology of tuberculosis: From Bench To Bedside, *Respirology* no. 15, pp.443-450

Dissela, J. T. V., Arenda, S. M., Prinsa, C., Bang, P., Tingskov, P. N., Lingnaud, K., *et al.* 2010. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine*.28: 3571-3581.

Drapper P and Dafee M. 2005 The cell envelope of mycobacterium tuberculosis with special reference to the capsule and outer permeability barrier. In : Cole ST, Eisenach KD, Mc Murray DN, Jacobs WR. Eds. *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Washington: ASM Press; p.261-85

Eley BS, Beatty DW. 2009. *The basic immunology of tuberculosis*. Saunders; p75-86.

Fadharna, dkk. 2017. Gambaran indeks massa tubuh penderita tuberkulosis (tb) positif yang Melakukan pengobatan di gerdunas tb paru rumah sakit undata palu Sulawesi tengah. Volume 1: Nomor 1. Biocelbes. Juni 2017: 9-12.

Fleisher, T. A. & Oliveira, J. B. 2013. Flow cytometry. Dalam: Rich, R. R., Fleisher, T. A., Shearer, W. T., Schroeder, H. W., Frew, A. J. & Weyand, C. M. (eds.) *Clinical immunology : principles and practice*. 4th ed. Cina: Elsevier Limited.

Flynn, J.L., & Chan John. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19:93-129

Floyd, K., Baddeley, A., Dean, A., Dias, H. M., Falzon, D., Garcia, I., et al. 2013. Global tuberculosis report 2013. Francis: WHO Press.

Gallegos, A. M., Pamer, E. G. & Glickman, M. S. 2008. Delayed protection by ESAT-6 – specific effector CD4+ T cells after airborne *M. tuberculosis* infection *J. Exp. Med.* 205: 2359-2368.

Guo Si, Xue R, Li Yi, Wang SM, Ren L, Xu JJ. 2012. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection. *Medical Hypotheses.* 78: 389-392

Kiay Mardjo, Tarmica M., dkk. 2017. Hubungan antara Tingkat Pendidikan, Pendapatan dan Riwayat Kontak Serumah dengan Kejadian Tuberkulosis Paru di Wilayah Kerja Puskesmas Paniki Bawah Kota Manado. Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sam Ratulangi Manado. 2017: 1-8.

Hakim N, Abdul, dkk. 2015. Pengaruh Latar Belakang Pendidikan Pasien terhadap Keteraturan Pengobatan TB Paru di Puskesmas Wangon I Banyumas. Volume 2. PSYCHO IDEA. Juli 2015: 1-13.

Handzel, Z. T. 2013. *The Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in Humans, Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis dan Management*. <http://www.intechopen.com/books/tuberculosis-current-issues-in-diagnosis-and-management/the-immune-response-to-mycobacterium-tuberculosis-infection-in-humans>. Kunjungan pada 2 Juli 2017.

Hapsari, Anisa Risa dkk. 2013. Analisis Kaitan Riwayat Merokok terhadap Pasien Tuberkulosis Paru (TB Paru) di Puskesmas Sronдол. Jurnal Ilmiah Mahasiswa. Volume 3, Nomor 2. September 2013: 47-50.

Hatta, M, Sultan, A. R, & Tandirogang, N. Masjudi, Yadi. 2010. Detection and identification of mycobacteria in sputum from suspected tuberculosis patients. *BMC ResNotes*

Jacobs, M., Brown, N., Allie, N. & Ryffel, B. 2000. Fatal *Mycobacterium bovis* BCG Infection in TNF-LT- α -deficient mice. *Clin Immunol.* 94: 192-199.

Jawetz, M. & Adelberg 2007. *Lange medical microbiology*, USA, McGraw-Hill Medical

Kementerian Kesehatan RI. 2018. Data dan Informasi. Profil Kesehatan Dasar Indonesia Tahun 2017.

Kementerian Kesehatan RI. 2014. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis.

Kementerian Kesehatan RI, 2016. Peraturan Menteri Kesehatan RI tentang penanggulangan tuberkulosis. Jakarta

Khutlang, R., Krishnan, S., Dendere, R., Whitelaw, A., Douglas, T. 2010. Classification of Mycobacterium tuberculosis in images of ZN stained sputum smears. *IEEE Trans Inf Technol Biomed.* 14(4): 949-957

Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Crevel, R.V. 2011. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Development Immunology*, Radboud University, Netherlands

Konsorsium Riset Vaksin TB. 2012. Naskah Roadmap Riset Vaksin TB 2012-2025. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

Lee, J. S., Song, C. H., Lim, J. H., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T. H., et al. 2003. The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol.*132: 443-449.

Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.*104: 487-501.

Lucaa, S. & Mihaescu, T. 2013. History of BCG Vaccine. *MAEDICA.*8: 53-58.

Maglione, P. J. & Chan, J. 2009. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol.*39: 676-686.

Mannabe, Y.C, Dannenberg, A.M. 2006. Pathophysiology: Basic aspects, tuberculosis & non tuberculosis mycobacterial infections. 5th ed, The McGraw-Hill Companies, Inc, United States of America, part 1-2

Markova N, Slavchev G, Michailova L. 2012. Unique biological properties of Mycobacterium tuberculosis L-variants: impact for survival under stress. *Research Articles International Microbiology*, 15:61-68

Martin C, 2006. Tuberculosis vaccines: past, present and future, *Curr Opin Pulm Med* Lippincott Williams & Wilkins, United States of America.

Meher AK, Bal NC, Chary KVR, Arora Ashish. 2006. Mycobacterium tuberculosis H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS Journal.* 273: 1445-1462

Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A. & Reljic, R. 2009. TNF- α in Tuberculosis: A Cytokine with a Split Personality. *Inflammation & Allergy - Drug Targets.*8: 53-62.

Murfikin Fakhmi., dkk. 2013. Hubungan Kebiasaan Merokok dengan Kejadian TB Paru di Wilayah Kerja Puskesmas Sidomulyo. *Universitas Riau.* 2013: 1-8.

Mustafa, A. S. 2013. Diagnostic and vaccine potentials of ESAT-6 family proteins encoded by *M. tuberculosis* genomic regions absent in *M. bovis* BCG. *J Mycobac Dis*.3: 1-4.

Nagata, T. & Koide, Y. 2012. Immune responses against *mycobacterium tuberculosis* and the vaccine strategies. In: Cardona, P. J. (ed.) *Understanding tuberculosis - analyzing the origin of mycobacterium tuberculosis pathogenicity*. Kroasia: InTech.

Oktavia Surakhmi, dkk. 2016. Analisis Faktor Risiko Kejadian TB Paru di Wilayah Kerja Puskesmas Kertapati Palembang. Fakultas Ilmu Kesehatan Masyarakat Universitas Sriwijaya. *Jurnal Ilmu Kesehatan Masyarakat*. Juli 2016: 7(2): 124-138.

Palomino JC, 2005. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis : feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J*, 26 : 339-350.

Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2006. Pedoman diagnosis dan penatalaksanaan di Indonesia. Jakarta

Pitt, J. M., Blankley, S., McShane, H. & O'Garra, A. 2013. Vaccination against tuberculosis: How can we better BCG? *Microbial Pathogenesis*.58: 2-16.

Pollock KM, Whitworth HS, Montamat-Sicotte DJ, Grass L, Cooke GS, Kapembwa MS, et al. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. *J Infect Dis*. 2013;208(6):952– 68.

Pratiwi, Rahma Indah., dkk. Respons Sitokin TNF-A dan IL-44 Pasca Stimulasi Antigen Fusi Resat-6-CFP-10. 2017: 53-59.

Quesniaux, V., Garcia, I., Jacobs, M. & Ryffel, B. 2012. Role of TNF in host resistance to tuberculosis infection: membrane TNF Is sufficient to control acute infection. Dalam: Cardona, P. J. (ed.) *Understanding tuberculosis - analyzing the origin of Mycobacterium tuberculosis pathogenicity*. Kroasia: InTech.

Rahmat, H. (2014). *Pertemuan Nasional Program Pembrantasan Penyakit Menular Langsung (P2ML)*.Purwokerto : Portal Pikiran Rakyat Online www.pikiran-rakyat.com

Raja, A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*.120: 213-232.

Rakotosamimanana, N., Raharimanga, V., Andriamandimby, S. F., Soares, J.-L., Doherty, M., Ratsitorahina, M., et al. 2010. Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Acid-Fast Bacillus Smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar. *Clin. Vaccine Immunol*.17: 1094–1103.

Ray, J. C. J., Flynn, J. L. & Kirschner, D. E. 2009. Synergy between individual TNFdependent functions determines granuloma performance for



- controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.*182: 3706-3717.
- Raviglione, MC & O'Brien, R.J, 2008. Tuberculosis, Harrison's Principles Of Internal Medicine 17 th ed, The McGraw-Hill Companies, Inc, United States of America, Chap. 158
- Rekombiotech. 2018. Recombinant chimeric antigen CFP10:ESAT6 for *Mycobacterium tuberculosis* (Koch's bacillus).
- Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G. 2005. Structure and function of the complex formed by tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *The Embo Journal.* 24: 2491-2498
- Riley, S.S, & Idowu, M. 2003. Principles and applications of flow cytometry. Departement of Pathology Medical College of Virginia / VCU Health Systems, Virginia Commonwealth University. Richmond, Virginia, P.2
- Rosandali Fajriah., dkk. 2016. Hubungan Pembentukan Scar Vaksin BCG dan Kejadian Infeksi Tuberkulosis. *Jurnal Kesehatan Andalas.* 2016: 5(2).
- Rowland, R. & McShane, H. 2011. Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev Vaccines.*10: 645-658.
- Sable, S. B., Kumar, R., Kalra, M., Verma, I., Khuller, G. K., Dobos, K., et al. 2005. Peripheral blood and pleural fluid mononuclear cell responses to low-molecular-mass secretory polypeptides of *Mycobacterium tuberculosis* in human models of immunity to tuberculosis. *Infect Immun.*73: 3547-3558.
- Safithri Fathiyah. 2011. Diagnosis TB Dewasa dan Anak Berdasarkan ISTC (International Standard for TB care). Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang. Volume 7. Nomor 15. Desember 2011: 57-67.
- Sander, C. R., Pathan, A. A., Beveridge, N. E. R., Poulton, I., Minassian, A., Alder, N., et al. 2009. Safety and Immunogenicity of a New Tuberculosis Vaccine, MVA85A, in *Mycobacterium tuberculosis*-infected Individuals. *Am J Respir Crit Care Med.*179: 724-733.
- Satroasmoro, S. & Ismail, S. 2002. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*, Jakarta Sagung Seto.
- Saviola, B. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* adaptation to survival in a human host. In: Mahboub. B. H. & Vats, M. G. (eds.) *Tuberculosis - current issues in diagnosis and management*. USA: InTech.
- Seki, M., Honda, I., Fujita, I., Yano, I., Yamamoto, S. & Koyama, A. 2009. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: A comparative study of BCG vaccine substrains *Vaccine.*27: 1710-1716.

Senol, G. 2013. Laboratory diagnosis of tuberculosis - latest diagnostic tools. Dalam: Mahboub, B. H. & Vats, M. G. (eds.) *Tuberculosis - current issues in diagnosis and management*. Croatia: Iva Lipovic.

Setiawan Heru., dkk. 2016. Analisis Kadar IFN- γ dan IL-10 pada PBMC Penderita Tuberkulosis Aktif, Laten dan Orang Sehat, Setelah di Stimulasi dengan Antigen ESAT-6. Program Studi S2 Imunologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga.

Shingadia D, Burgner D. 2008. Mycobacterium infection. Dalam: Taussig LM, Landau LI. *Pediatric Respiratory Medicine*, 2sd. Philadelphia : Mosby Elsevier; 597-614.

Simbolon, Harsa T., dkk. 2016. Hubungan Indeks Massa Tubuh dengan Kadar Albumin pada Pasien Tuberkulosis Paru. Volume 4. Nomor 2. Jurnal e-Clinic (eCl).

Skold, M. Jansson, M. Pawlowski, A. Rottenberg, M.A. Kallenius, G. 2012. Tuberculosis and HIV Co-infection. *Plos Pathogens*; 8(2): e1002464

Surjanto, E., Kenyorini, Suradi. 2006. Uji Tuberkulin. *Jurnal Tuberkulosis Indonesia*. 3(2):1-4

Torrelles J. B. & Schlesinger L.S., 2010. Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. Elsevier. 90: 84-93

Vallièrre, S., Abate, G., Blazevic, A., Heuertz, R. M. & Hoft, D. F. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun*.75: 6711-6720.

Wang F, Mao L, Hou H, Wu S, Huang M, Yin B, et al. The source of Mycobacterium tuberculosis-specific IFN- γ production in peripheral blood mononuclear cells of TB patients. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2016;32:39-45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.01.012>.

Welin A. 2011. Survival strategies of Mycobacterium tuberculosis inside the human macrophage. Linköping University Medical Dissertations. No. 1223. pp 1-90.

Wibowo Rahmad Yudha., dkk. 2017. Ekspresi IFN- γ oleh Sel T CD4+ dan CD8+ Setelah Stimulasi Antigen Fusi ESAT-6- CFP-10 pada Pasien Tuberkulosis Paru Aktif. *Buletin Penelitian Kesehatan*, Vol. 45, No. 4, Desember 2017: 223 - 226.

Wingfields, C, & Jefferys, R, 2011. The tuberculosis vaccine pipeline, HIV Treatment Bulletin

World Health Organization. 2017. Global tuberculosis report 2017, Geneva, Switzerland.

Wulff, S. 2006. An Introduction to Flow Cytometry. Dalam: Wulff, S. (ed.) *Guide to Flow Cytometry*. 2nd ed. USA: Dako.

Young, D. B. & Stewart, G. R. 2002. Tuberculosis vaccines. *British Medical Bulletin*.62: 73-86.

Zhang, W., Zhang, Y., Zheng, H., Pan, Y., Liu, H., Du, P., et al. 2013. Genome sequencing and analysis of BCG vaccine strains. *PLoS ONE*.8: e71243-71243.

Zuniga, J., Diana, T. G., Teresa, S. M., Tatiana, S. R. R., Granados, J. & Yunis, E. J. 2012. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*.2012: 1-18.



Lampiran 1. Profil Data Subyek Penelitian

Profil Data Penelitian (Pasien Tuberculosis)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (+)	TB ²	BB (kg)	IMT (kg/m ²)	BCG Scar	Mantoux tes (+)	Hb (g/dl)	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi
p14	1132781	Tn Zekana	48 th	Laki-laki	Jawa	Sekeloa Pakej Malang	Batuk, demam, keringat malam	Petani	2	Mb- Detected Medium	Lung Tb far moderate lesion	1,5	2,405	44	16,2142596	tdk ada	17	14,1	7700	Normal	36	29	20	0,89	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p13	173418219	Tn Royota	20 th	Perempuan	Jawa	Prigen Pasuruan	Batuk, demam, keringat malam	Mahasiswa	1	Mb- Detected Low	Lung Tb far advanced lesion	1,5	2,25	40	17,7777778	ada	12	13,8	6800	Normal	22	38	16,8	0,61	non reaktif	SMP	tidak	tdk ada
p10	1734110546	Tn Hani Kriawan	36 th	Laki-laki	Jawa	Mergan konoal Malang	Batuk, sesak, demam	Rendah bangunan	3	Mb- Detected High	Lung Tb far advanced lesion	1,57	2,4649	42	17,0392308	ada	16	11,8	6880	Normal	23	14	12,1	0,63	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p11	1734110661	Tn Rahmat	23 th	Laki-laki	Jawa	Lapas lowokwaru malang	Batuk, demam, keringat malam	Naga Narkotika	1	Mb- Detected low	Lung Tb moderate lesion	1,7	2,89	80	27,6818008	ada	17	14,8	18.900	Normal	25	36	14,4	0,67	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p15	1734180316	Wj Lova	27 th	Perempuan	Jawa	Sawojaya Malang	Batuk, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Ibu Rumah tangga	1	Mb- Detected Low	Lung Tb minimal lesion	1,55	2,4025	41	17,0655671	ada	18	11,1	4650	Normal	17	17	24,4	0,64	non reaktif	SMP	tidak	tdk ada
p12	1734110324	Tn Gato S	49 th	Laki-laki	Jawa	Kedung Wlter Surabaya	Batuk, keringat malam	Swasta	2	Mb- Detected Medium	Lung Tb far advanced lesion	1,81	2,5821	60	19,38937827	ada	15	14,7	9.870	Normal	13	7	15,6	0,67	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p8	1734110321	Tn Sawal	46 th	Laki-laki	Madura	J.Halmahera Pasuruan	Batuk darah, batuk, nyeri dada, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Pedagang	3	Mb- Detected High	Lung Tb far advanced lesion	1,55	2,4025	38	15,81882744	tdk ada	16	12,5	7770	Normal	14	19	26	0,91	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p5	1731180115	Tn Aep Sugarto	47 th	Laki-laki	Jawa	J.lang layng Gongsan	Batuk darah, batuk, demam	Motir Karsten	3	Mb- Detected High	Lung Tb far advanced lesion	1,6	2,56	52	20,3125	ada	15	11,7	10.190	Normal	11	16	17,1	0,68	non reaktif	STM	merokok	tdk ada
p1	1735200480	Tn Joshua	19 th	Laki-laki	Tapanuli	Tapanuli Utara	Sesak nafas, batuk, nyeri dada, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Mahasiswa	2	Mb- Detected Medium	Lung Tb far advanced lesion	1,85	2,7225	45	16,52862592	ada	13	14,4	7840	Normal	25	13	55	0,52	non reaktif	SMP	tidak	pneumothorax
10	11318806	Wj Ni Madi Ayu	26 th	Perempuan	Bali	Jl Pandjatan Malang	Batuk, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Ibu Rumah tangga	1	Mb- Detected Low	Lung Tb moderate lesion	1,55	2,4025	40	16,6402302	ada	13	11,2	8.158	Normal	28	13	14,8	0,58	non reaktif	SMP	tidak	tdk ada
p6	1734110322	Tn Irba Subano	20 th	Laki-laki	Jawa	Jl Juanda Belimbing malang	Batuk darah, penurunan nafsu makan, penurunan bb	Buruh Bangunan	2	Mb- Detected Medium	Lung Tb far advanced lesion	1,6	2,56	42	16,40625	tdk ada	14	13,2	10680	Normal	28	32	35	0,9	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p7	1734110329	Tn Doni Derman	25 th	Laki-laki	Jawa	Kedung Kandang Malang	Batuk Darah, batuk, penurunan nafsu makan, penurunan bb	Karyawan pabrik	2	Mb- Detected Low	Lung Tb moderate lesion	1,63	2,6589	47	17,68978885	ada	13	14,5	5.866	Normal	28	19	25	0,35	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p6	1734110381	Tn Mahmad	32 th	Laki-laki	Jawa	Dampit Malang	Batuk, demam, keringat malam	Pedagang	3	Mb- Detected Medium	Lung Tb far advanced lesion	1,67	2,7889	53	19,0306826	ada	12	12,6	9420	Normal	18	26	30	0,48	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p4	11322886	Tn E.R. Santoso	30 th	Laki-laki	Jawa	Jabung Malang	Batuk, Batuk darah, demam	Karyawan pabrik	3	Mb- Detected High	Lung Tb far advanced lesion	1,88	2,9224	52	18,42402626	ada	14	13	7860	Normal	24	34	44	0,74	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
15	11323867	Wj Wahyu	40 th	Perempuan	Jawa	Dampit Malang	Batuk, demam	Ibu Rumah tangga	1	Mb- Detected low	Lung Tb moderate lesion	1,59	2,5281	54	21,2691456	tdk ada	15	14,3	9.108	Normal	16	12	22,6	0,61	non reaktif	SMP	tidak	tdk ada

Profil Data Penelitian (Kontak Tuberculosis)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (+)	TB ²	BB (kg)	IMT (kg/m ²)	BCG Scar	Mantoux tes (+)	Hb (g/dl)	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi
1	1612190283	Dwi Rossa	31 th	Perempuan	Betawi	Taman Nisan Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,5	2,25	41	16,2022222	ada	13	12,8	6800	Normal	15	12	22	0,68	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
10	1736220236	Wawan Wahyu Sirena	32 th	Laki-laki	Bali	Sufat Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	75	25,9656709	ada	14	13	5800	Normal	22	40	32,9	1,03	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
49	1736220271	Ara Fumansa	36 th	Laki-laki	Sunda	Sufat Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	95	29,41176471	ada	11	17	6990	Normal	17	22	17,4	1	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
32	1612270312	Iis Cholifah	29 th	Perempuan	Jawa	Sukur Malang	tdk ada	Perawat RHCU	negatif	negatif	Normal	1,6	2,56	65	25,286625	ada	13	13,2	7870	Normal	16	14	15,2	0,84	non reaktif	Diploma	tidak	tdk ada
41	1612270170	Ratih Bernita	37 th	Perempuan	Sunda	Draga Sibandak Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,57	2,4649	63	25,588482	ada	12	12,8	5240	Normal	28	21	26,9	1	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
48	1734110644	Achrame Marissa Tauran	30 th	Perempuan	Malabar	Jl Lidjat Suboyo Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,57	2,4649	54	21,56786246	ada	17	13,1	7170	Normal	13	14	15,2	0,78	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
44	1731170382	Rizka	46 th	Laki-laki	Jawa	Binbong Malang	tdk ada	Ibu RHCU	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	65	22,48124946	ada	14	13,8	6780	Normal	16	8	23,3	1,07	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
46	1734110329	Tommy	26 th	Laki-laki	Orma	Klajan Malang	tdk ada	PPDS EM	negatif	negatif	Normal	1,81	3,2781	100	30,32488876	ada	17	16	5840	Normal	33	13	16,5	0,57	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
45		Itan	37 th	Laki-laki	Jawa	Tanggulangin Sidoarjo	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,71	2,9041	71	24,2697534	ada	12								non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
47		Andhika																							non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
117	1736220273	Andy Lumban	31 th	Laki-laki	Batak	Tidar Malang	Tidak ada	PPDS	Negatif	Negatif	Normal	1,99	3,9601	90	31,5115017	ada	13	15	7490	Normal	13	31	17,8	1,06	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
43	1612270288	Nena	30 th	Perempuan	Jawa	Kedungwaru Blitar	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,6	2,56	46	16,75	ada	18	12,1	6340	Normal	28	14	20,3	0,65	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada

Profil Data Penelitian (Sehat)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (+)	TB ²	BB (kg)	IMT (kg/m ²)	BCG Scar	Mantoux tes (+)	Hb (g/dl)	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi
1	1612190282	Khairi Anwar	25 th	Laki-laki	Jawa	Pakej Aj Malang	Tidak ada	Pustakawan UB	Negatif	Negatif	Normal	1,65	2,7225	55	20,2020202	ada	negatif	16,2	7.329	Normal	28	31	21,7	0,91	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
48	1736220281	Lita	37 th	Perempuan	Jawa	Lowek wau Malang	Tidak ada	Ibu Rumah Tangga	Negatif	Negatif	Normal	1,56	2,4336	50	20,5456962	ada	negatif	14	5840	Normal	17	14	16,4	1,03	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
47	1734110185	Dessa	30 th	Perempuan	Jawa	Karang Gayam Wajon Sby	Tidak ada	Fisioterapi	Negatif	Negatif	Normal	1,55	2,4025	50	20,91196453	ada	negatif	13,5	6980	Normal	23	31	19,1	0,75	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
4	1612190289	Wanarone Lukita	31 th	Perempuan	Jawa	Jl. Seto suda Malang	Tidak ada	PPDS PK	Negatif	Negatif	Normal	1,48	2,1904	47	21,46728836	ada	negatif	13	6240	Normal	12	12	24,2	0,63	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
45	1734180258	Evi Rheni Mawanta	26 th	Perempuan	Orma	Senggalingi Malang	Tidak ada	PPDS PK	Negatif	Negatif	Normal	1,82	3,3124	52	19,9146574	ada	negatif	16	6290	Normal	31	14	28	0,62	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
46	1734180254	Irfan	32 th	Laki-laki	Sunda	Klajan malang	Tidak ada	Wiraswasta	Negatif	Negatif	Normal	1,95	3,7225	60	22,0396749	ada	negatif	15,8	6640	Normal	21	21	26	0,96	non reaktif	SMP	Tidak	tdk ada
44	1734180260	Rina Aurelia	30 th	Perempuan	Jawa	Harsudin Jun Roro Malang	Tidak ada	Mahasiswa S2	Negatif	Negatif	Normal	1,81	3,2821	75	28,8349688	ada	negatif	15,5	7940	Normal	22	23	45	0,5	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
49	1612110209	Zuzana	33 th	Perempuan	Madura	Koatran Blimbing	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,81	3,2821	63	24,0401798	ada	negatif	14,1	8510	Normal	13	21	21,5	0,68	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
42	1612270181	Lulu Rumeana	28 th	Perempuan	Jawa	Karang Lo Malang	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,59	2,5281	60	23,7332364	ada	negatif	12,7	6610	Normal	14	24	26,9	0,74	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
11	1612190290	Yunansah	28 th	Perempuan	Jawa	Pongok Blitar	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,49	2,1804	43	18,671178	ada	negatif	13	7670	Normal	15	12	27,1	0,78	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
43	1612270173	Arin	33 th	Laki-laki	Orma	Suopati Malang	tdk ada	PPDS Patu	negatif	negatif	Normal	1,82	3,3124	80	24,1516725	ada	negatif	16,5	5690	Normal	21	37	16	0,96	non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada
41		Ilvira																							non reaktif	Sarjana	tidak	tdk ada

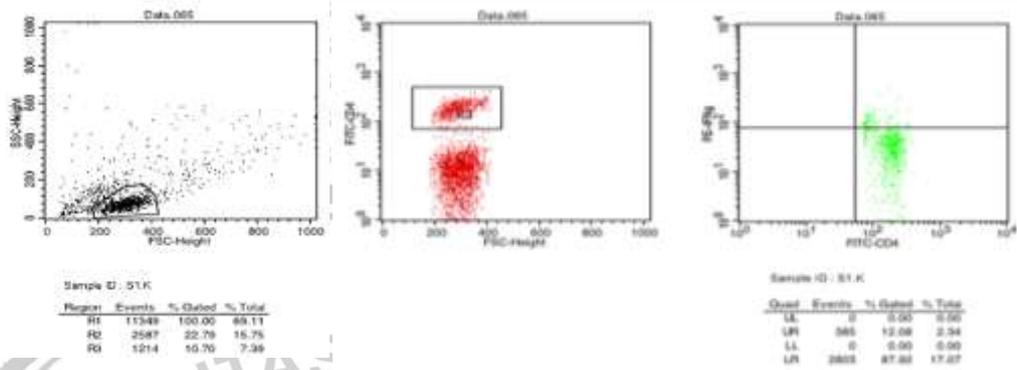


Lampiran 2. Data hasil flowcytometry

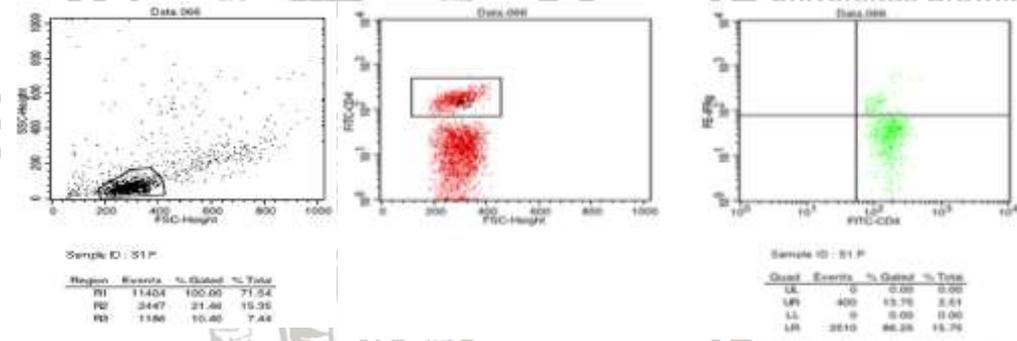
2.1 Gambar Flowcytometry

2.1.1 Gambar Flowcytometry subyek sehat

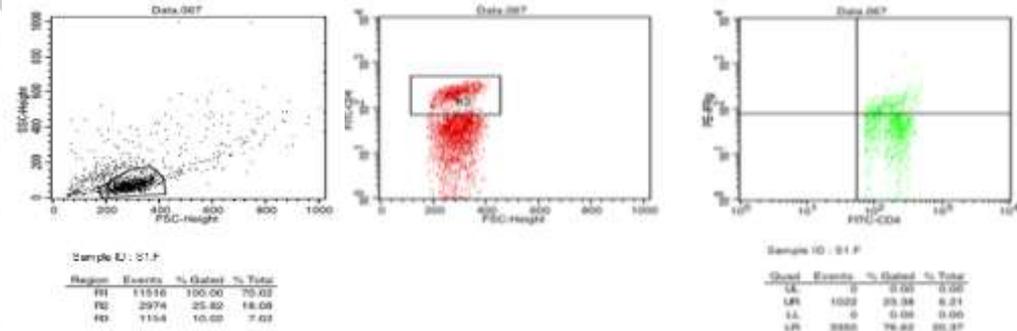
a. Tanpa antigen



b. Pemberian PPD

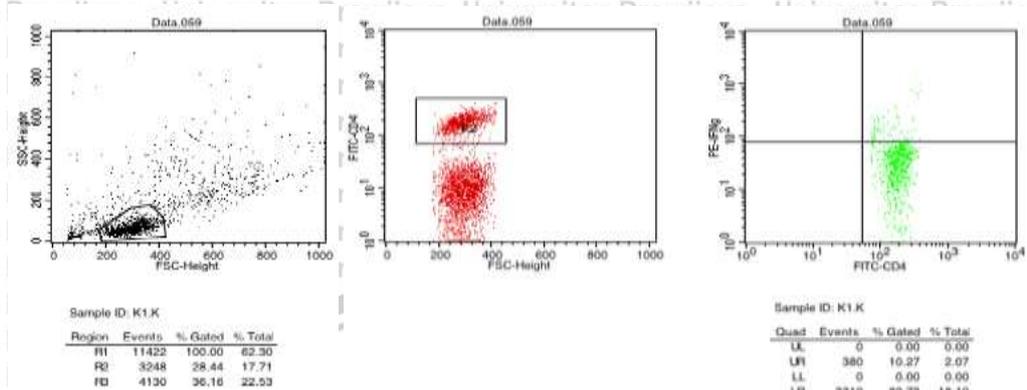


c. Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10

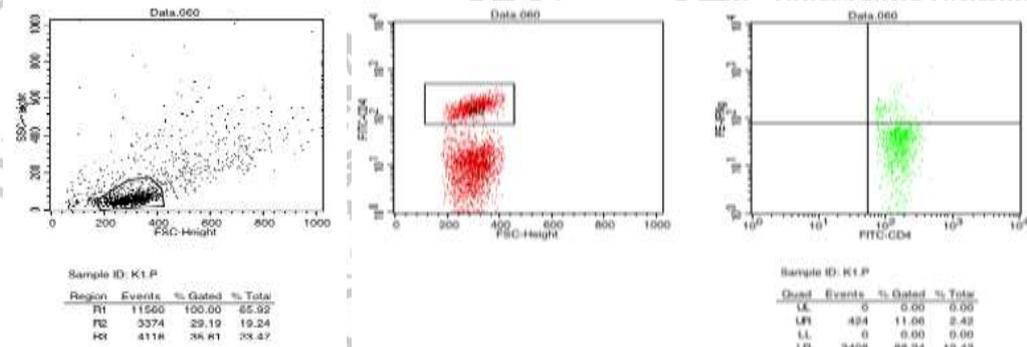


2.1.2 Gambar Flowcytometry kontak TB

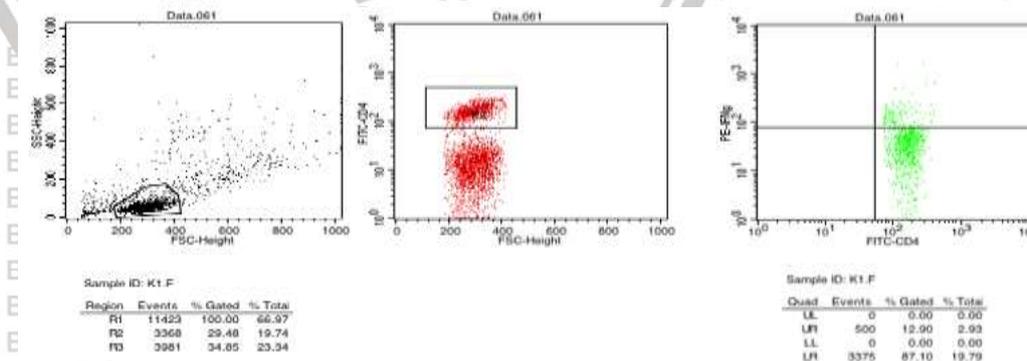
a. Tanpa antigen



b. Pemberian PPD

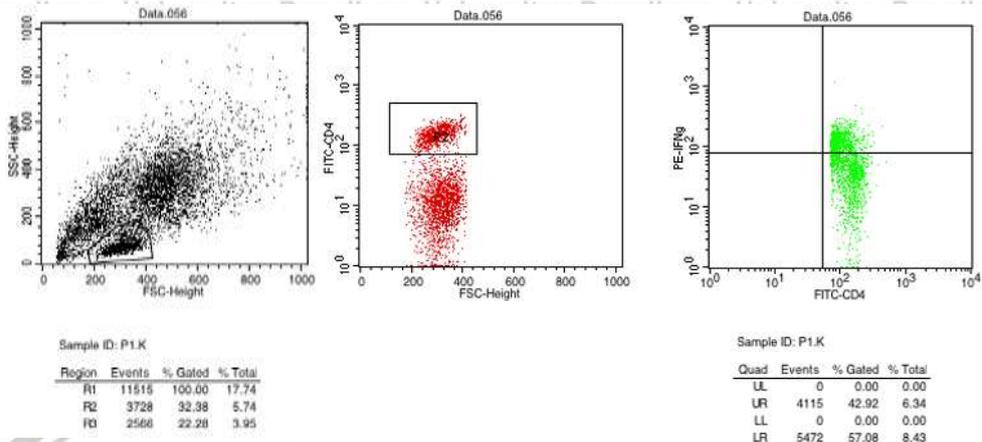


c. Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10

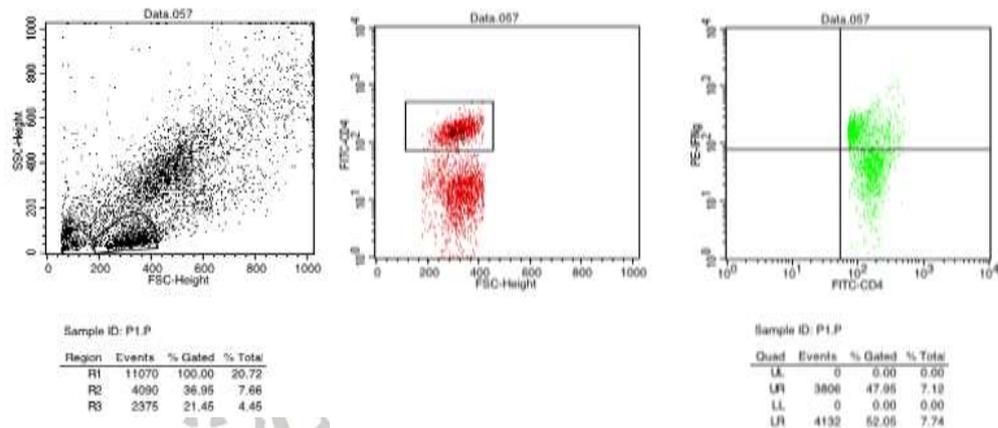


2.1.3 Gambar Flowcytometry pasien TB

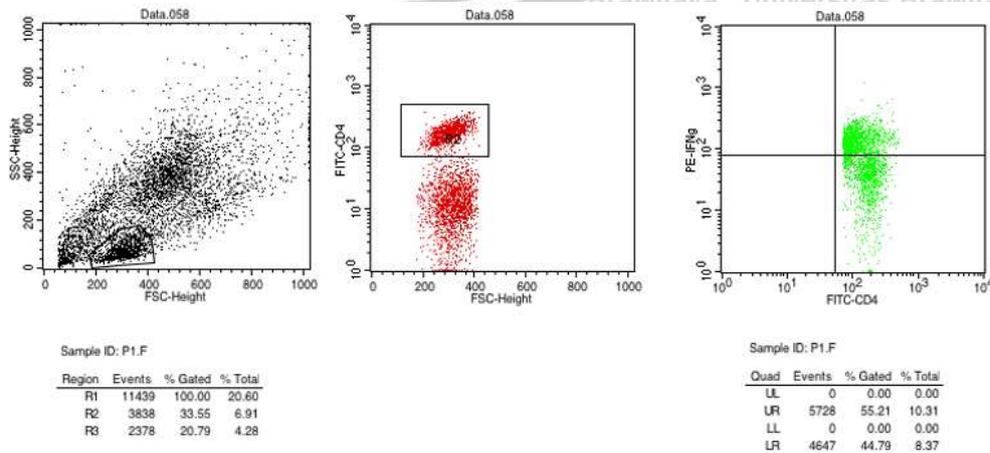
a. Tanpa antigen



b. Pemberian PPD



c. Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10



2.2 Data Hasil Flowcytometry

2.2.1 Subyek Sehat (S)

KODE	Tanpa Antigen		PPD		FUSI ESAT-6/CFP-10	
	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ
S1	12.08	22.79	13.75	21.46	23.38	25.82
S2	25.47	22.32	13.78	22.99	18.21	22.33
S3	5.18	37.17	4.18	38.70	4.3	37.26
S4	12.34	28.13	6.58	27.23	21.07	28.22
S5	5.93	39.40	5.20	39.78	5.91	39.60
S6	18.28	18.79	13.81	20.14	16.88	20.48
S7	5.89	32.23	4.26	29.34	3.57	30.71
S8	4.00	15.72	5.67	15.72	4.92	16.26

2.2.2 Subyek Kontak TB (K)

KODE	Tanpa Antigen		PPD		FUSI ESAT-6/CFP-10	
	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ
K1	10.27	28.44	11.06	29.19	12.90	29.48
K2	9.1	33.93	17.99	36.73	19.51	36.13
K3	9.32	25.01	8.82	24.07	13.30	25.42
K4	34.25	7.53	20.02	7.50	30.49	7.92
K5	11.92	25.17	10.04	23.02	10.20	25.29
K6	6.01	18.12	5.48	18.95	8.05	19.00
K7	6.13	16.26	10.22	15.91	5.36	16.08
K8	12.68	26.06	17.55	26.04	14.72	26.83

2.2.3 Subyek Pasien (P)

KODE	Tanpa Antigen		PPD		FUSI ESAT-6/CFP-10	
	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ	CD4+	IFN- γ
P1	42.92	32.38	47.95	36.95	55.21	33.55
P2	91.22	18.67	91.48	14.81	93.40	9.57
P3	15.84	19.58	13.41	20.35	15.45	20.14
P4	16.90	16.86	21.43	18.17	20.37	17.31
P5	19.74	41.13	23.91	41.21	23.19	43.54
P6	6.91	35.76	5.77	38.48	7.62	36.17
P7	1.73	34.39	4.49	31.84	3.16	33.18
P8	90.55	28.92	95.41	20	95.26	14.29

Lampiran 3. Hasil Analisis Data

3.1 Data Karakteristik Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD4+

Descriptives IFN gamma Subyek Sehat

Kondisi			Statistic	Std. Error	
InterferonG	Kontrol	Mean	9.1000	1.98434	
		95% Confidence Interval for			
		Mean	4.2445		
			Lower Bound		
			Upper Bound	13.9555	
		5% Trimmed Mean	8.8733		
		Median	5.9300		
		Variance	27.563		
		Std. Deviation	5.25008		
		Minimum	4.00		
		Maximum	18.28		
		Range	14.28		
		Interquartile Range	7.16		
		Skewness	.929	.794	
Kurtosis	-.234	1.587			
PPD	PPD	Mean	10.3000	2.36198	
		95% Confidence Interval for			
		Mean	4.8533		
			Lower Bound		
			Upper Bound	15.7467	
		5% Trimmed Mean	9.7972		
		Median	6.5800		
		Variance	50.210		
		Std. Deviation	7.08593		
		Minimum	4.18		
		Maximum	25.47		
		Range	21.29		
		Interquartile Range	9.07		
		Skewness	1.303	.717	
Kurtosis	1.534	1.400			

Fusi	Mean	12.2800	2.96133
	95% Confidence Interval for Lower Bound	5.2776	
	Mean Upper Bound	19.2824	
	5% Trimmed Mean	12.1472	
	Median	11.3950	
	Variance	70.156	
	Std. Deviation	8.37590	
	Minimum	3.57	
	Maximum	23.38	
	Range	19.81	
	Interquartile Range	15.90	
	Skewness	.171	.752
	Kurtosis	-2.307	1.481

Descriptives CD4 Subyek Sehat

Kondisi			Statistic	Std. Error
CD4	Kontrol	Mean	27.0687	3.04739
		95% Confidence Interval for Lower Bound	19.8628	
		Mean Upper Bound	34.2747	
		5% Trimmed Mean	27.0142	
		Median	25.4600	
		Variance	74.293	
		Std. Deviation	8.61933	
		Minimum	15.72	
		Maximum	39.40	
		Range	23.68	
		Interquartile Range	16.26	
		Skewness	.247	.752
		Kurtosis	-1.398	1.481
PPD	Mean	26.9200	3.06701	

	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	19.6677	
		Upper Bound	34.1723	
	5% Trimmed Mean		26.8278	
	Median		25.1100	
	Variance		75.252	
	Std. Deviation		8.67480	
	Minimum		15.72	
	Maximum		39.78	
	Range		24.06	
	Interquartile Range		15.89	
	Skewness		.536	.752
	Kurtosis		-.927	1.481
Fusi	Mean		27.5850	2.85858
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	20.8255	
		Upper Bound	34.3445	
	5% Trimmed Mean		27.5467	
	Median		27.0200	
	Variance		65.372	
	Std. Deviation		8.08527	
	Minimum		16.26	
	Maximum		39.60	
	Range		23.34	
	Interquartile Range		14.68	
	Skewness		.256	.752
	Kurtosis		-.931	1.481

Descriptives IFN Gamma Subyek Kontak

Kondisi			Statistic	Std. Error	
InterferonG	Kontrol	Mean	12.4600	3.22590	
		95% Confidence Interval for Lower Bound		4.8320	
		Mean Upper Bound		20.0880	
		5% Trimmed Mean		11.6078	
		Median		9.7950	
		Variance		83.252	
		Std. Deviation		9.12423	
		Minimum		6.01	
		Maximum		34.25	
		Range		28.24	
		Interquartile Range		5.62	
		Skewness		2.443	.752
		Kurtosis		6.429	1.481
		PPD		Mean	12.6475
95% Confidence Interval for Lower Bound				8.3130	
Mean Upper Bound				16.9820	
5% Trimmed Mean				12.6361	
Median				10.6400	
Variance				26.881	
Std. Deviation				5.18467	
Minimum				5.48	
Maximum				20.02	
Range				14.54	
Interquartile Range				8.75	
Skewness				.288	.752
Kurtosis				-1.442	1.481
Fusi				Mean	14.3163
		95% Confidence Interval for Lower Bound		7.7776	

	Mean	Upper Bound	20.8549	
	5% Trimmed Mean		13.9153	
	Median		13.1000	
	Variance		61.170	
	Std. Deviation		7.82113	
	Minimum		5.36	
	Maximum		30.49	
	Range		25.13	
	Interquartile Range		9.73	
	Skewness		1.327	.752
	Kurtosis		2.194	1.481

Descriptives CD4 Subyek Kontak

Kondisi			Statistic	Std. Error
CD4	Kontrol	Mean	22.5650	2.91002
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	15.6839	
		Upper Bound	29.4461	
		5% Trimmed Mean	22.7689	
		Median	25.0900	
		Variance	67.746	
		Std. Deviation	8.23078	
		Minimum	7.53	
		Maximum	33.93	
		Range	26.40	
		Interquartile Range	11.12	
		Skewness	-.680	
Kurtosis	.417	1.481		
PPD		Mean	22.6763	3.11476
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	15.3110	
		Upper Bound	30.0415	

	5% Trimmed Mean		22.7386	
	Median		23.5450	
	Variance		77.614	
	Std. Deviation		8.80988	
	Minimum		7.50	
	Maximum		36.73	
	Range		29.23	
	Interquartile Range		11.73	
	Skewness		-.213	.752
	Kurtosis		.580	1.481
Fusi	Mean		23.2688	3.07894
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	15.9882	
		Upper Bound	30.5493	
	5% Trimmed Mean		23.4069	
	Median		25.3550	
	Variance		75.839	
	Std. Deviation		8.70855	
	Minimum		7.92	
	Maximum		36.13	
	Range		28.21	
	Interquartile Range		12.01	
	Skewness		-.471	.752
	Kurtosis		.319	1.481

Descriptives IFN Subyek Pasien

Kondisi			Statistic	Std. Error	
InterferonG	Kontrol	Mean	35.7263	12.76751	
		95% Confidence Interval for Lower Bound		5.5359	
		Mean Upper Bound		65.9166	
		5% Trimmed Mean		34.5319	
		Median		18.3200	
		Variance		1304.075	
		Std. Deviation		36.11197	
		Minimum		1.73	
		Maximum		91.22	
		Range		89.49	
		Interquartile Range		69.50	
		Skewness		1.028	.752
		Kurtosis		-.688	1.481
		PPD		Mean	37.9813
95% Confidence Interval for Lower Bound				7.1917	
Mean Upper Bound				68.7708	
5% Trimmed Mean				36.6514	
Median				22.6700	
Variance				1356.353	
Std. Deviation				36.82870	
Minimum				4.49	
Maximum				95.41	
Range				90.92	
Interquartile Range				72.92	
Skewness				.955	.752
Kurtosis				-.820	1.481
Fusi				Mean	39.2075
		95% Confidence Interval for Lower Bound		7.9140	

Mean	Upper Bound	70.5010	
5% Trimmed Mean		38.0961	
Median		21.7800	
Variance		1401.116	
Std. Deviation		37.43149	
Minimum		3.16	
Maximum		95.26	
Range		92.10	
Interquartile Range		74.28	
Skewness		.860	.752
Kurtosis		-1.100	1.481

Descriptives CD4+ Subyek Pasien

Kondisi			Statistic	Std. Error
CD4	Kontrol	Mean	28.4613	3.20106
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	20.8919	
		Upper Bound	36.0306	
		5% Trimmed Mean	28.4019	
		Median	30.6500	
		Variance	81.974	
		Std. Deviation	9.05397	
		Minimum	16.86	
		Maximum	41.13	
		Range	24.27	
		Interquartile Range	16.52	
		Skewness	-.131	
Kurtosis	-1.655	1.481		
PPD		Mean	27.7263	3.71222
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	18.9483	
		Upper Bound	36.5042	

	5% Trimmed Mean		27.6947	
	Median		26.0950	
	Variance		110.244	
	Std. Deviation		10.49973	
	Minimum		14.81	
	Maximum		41.21	
	Range		26.40	
	Interquartile Range		19.47	
	Skewness		.109	.752
	Kurtosis		-2.174	1.481
Fusi	Mean		25.9688	4.30231
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	15.7954	
		Upper Bound	36.1421	
	5% Trimmed Mean		25.9036	
	Median		26.6600	
	Variance		148.079	
	Std. Deviation		12.16877	
	Minimum		9.57	
	Maximum		43.54	
	Range		33.97	
	Interquartile Range		20.47	
	Skewness		.047	.752
	Kurtosis		-1.619	1.481



3.2 Hasil Uji Normalitas Distribusi Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD4+

3.2.1 Kelompok sehat

Tests of Normality

Kondisi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Log_IGFNSehat Kontrol	.269	7	.135	.908	7	.385
PPD	.216	9	.200*	.884	9	.173
Fusi	.264	8	.107	.837	8	.070

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality CD4 Sehat endemik

Kondisi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4 Kontrol	.190	8	.200*	.946	8	.669
PPD	.175	8	.200*	.923	8	.453
Fusi	.134	8	.200*	.967	8	.871

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

3.2.2 Kelompok kontak

Tests of Normality

Kondisi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Log_IFNKontak Kontrol	.250	8	.150	.856	8	.110
PPD	.199	8	.200*	.924	8	.460
Fusi	.139	8	.200*	.989	8	.994

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality

Kondisi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4	Kontrol	.242	8	.187	.950	8	.712
	PPD	.141	8	.200*	.990	8	.994
	Fusi	.217	8	.200*	.969	8	.893

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

3.2.3 Kelompok pasien

Tests of Normalitysekresi IFN γ

Kondisi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Log_IFN	Kontrol	.185	8	.200*	.933	8	.541
	PPD	.135	8	.200*	.933	8	.540
	Fusi	.139	8	.200*	.943	8	.643

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality CD4+

Kondisi		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4	Kontrol	.212	8	.200*	.912	8	.370
	PPD	.259	8	.123	.877	8	.176
	Fusi	.223	8	.200*	.930	8	.520

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

3.3 Hasil Uji Homogenitas Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD4+

3.3.1 Kelompok sehat

Test of Homogeneity of Variances

Log_IGFNSehat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.691	2	21	.091

Test of Homogeneity of Variances

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.069	2	21	.933

3.3.2 Kelompok kontak

Test of Homogeneity of Variances

Log_IFNKontak

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.027	2	21	.973

Test of Homogeneity of Variances

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.008	2	21	.992

3.3.3 Kelompok pasien

Test of Homogeneity of Variances IFN γ

Log_IFN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.015	2	21	.985

Test of Homogeneity of Variances CD4+

CD4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.286	2	21	.297

3.4 Hasil Uji Anova

3.4.1 Ekspresi IFN- γ

a. Kelompok sehat

ANOVA

Log_IGFNSehat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.024	2	.012	.140	.870
Within Groups	1.828	21	.087		
Total	1.853	23			

b. Kelompok kontak

ANOVA

Log_IFNKontak

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.023	2	.011	.232	.795
Within Groups	1.018	21	.048		
Total	1.041	23			

c. Kelompok pasien

ANOVA

Log_IFN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.026	2	.013	.045	.956
Within Groups	5.998	21	.286		
Total	6.023	23			

3.4.2 Jumlah CD4+

a. Kelompok sehat

ANOVA

CD4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.949	2	.974	.014	.986
Within Groups	1504.417	21	71.639		
Total	1506.366	23			

b. Kelompok kontak

ANOVA

CD4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.290	2	1.145	.016	.985
Within Groups	1548.390	21	73.733		
Total	1550.680	23			

c. Kelompok pasien

ANOVA

CD4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.244	2	13.122	.116	.891
Within Groups	2382.083	21	113.433		
Total	2408.327	23			

3.5 Hasil Analisis Ekpresi IFN- γ Dengan Induksi Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 Pada Tiga Kelompok Penelitian

Descriptives

Sampel		Statistic	Std. Error	
PRoteinFusi	sehat	Mean	12.2800	
		95% Confidence Interval for Lower Bound	5.2776	
		Mean Upper Bound	19.2824	
		5% Trimmed Mean	12.1472	
		Median	11.3950	
		Variance	70.156	
		Std. Deviation	8.37590	
		Minimum	3.57	
		Maximum	23.38	
		Range	19.81	
		Interquartile Range	15.90	
		Skewness	.171	.752
		Kurtosis	-2.307	1.481
	kontak		Mean	14.3163
		95% Confidence Interval for Lower Bound	7.7776	
		Mean Upper Bound	20.8549	
		5% Trimmed Mean	13.9153	
		Median	13.1000	
		Variance	61.170	
		Std. Deviation	7.82113	
		Minimum	5.36	
		Maximum	30.49	
		Range	25.13	
		Interquartile Range	9.73	
		Skewness	1.327	.752
		Kurtosis	2.194	1.481

pasien	Mean		39.2075	13.23403
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.9140	
		Upper Bound	70.5010	
	5% Trimmed Mean		38.0961	
	Median		21.7800	
	Variance		1401.116	
	Std. Deviation		37.43149	
	Minimum		3.16	
	Maximum		95.26	
	Range		92.10	
	Interquartile Range		74.28	
	Skewness		.860	.752
	Kurtosis		-1.100	1.481

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PRoteinFusi sehat	.277	8	.072	.834	8	.065
kontak	.229	8	.200*	.901	8	.296
pasien	.291	8	.045	.826	8	.053

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

PRoteinFusi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
17.152	2	21	.000



Kruskal-Wallis Test

Ranks

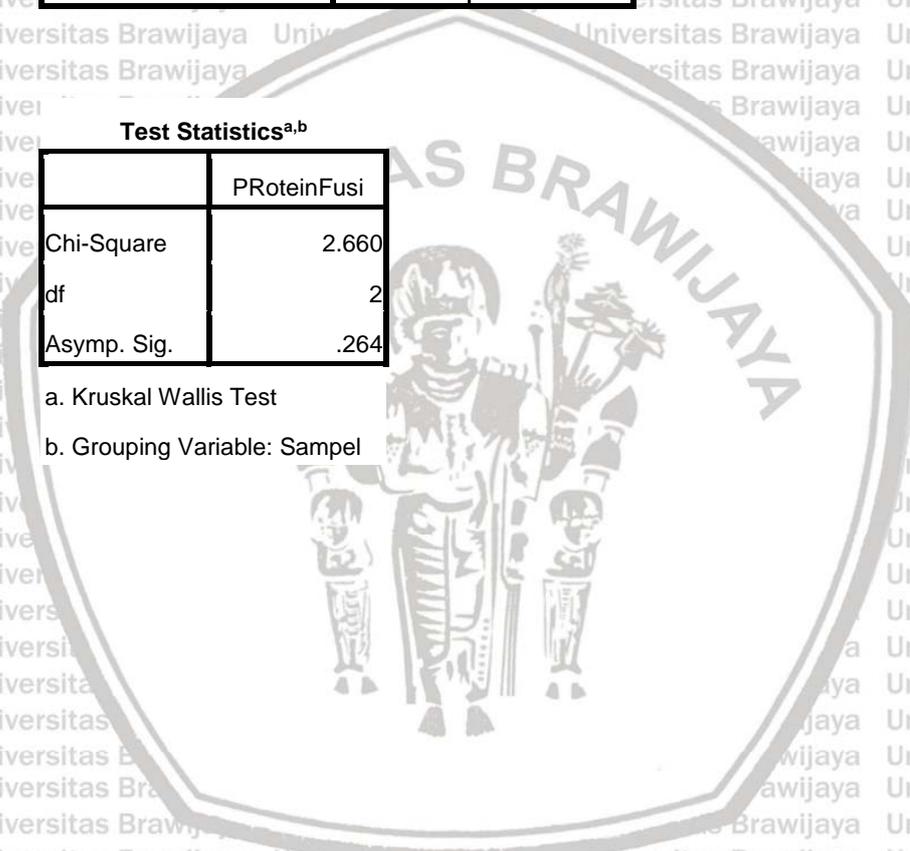
	Sampel	N	Mean Rank
PRoteinFusi	sehat	8	10.25
	kontak	8	11.50
	pasien	8	15.75
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	PRoteinFusi
Chi-Square	2.660
df	2
Asymp. Sig.	.264

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Sampel



3.6 Hasil Analisis Jumlah Limfosit T CD4+ Dengan Induksi Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 Pada Tiga Kelompok Penelitian

Descriptives

Sampel			Statistic	Std. Error
CD4Fusi	sehat	Mean	27.5850	2.85858
		95% Confidence Interval for Lower Bound	20.8255	
		Upper Bound	34.3445	
	5% Trimmed Mean	27.5467		
	Median	27.0200		
	Variance	65.372		
	Std. Deviation	8.08527		
	Minimum	16.26		
	Maximum	39.60		
	Range	23.34		
	Interquartile Range	14.68		
	Skewness	.256	.752	
	Kurtosis	-.931	1.481	
	kontak	Mean	23.2688	3.07894
95% Confidence Interval for Lower Bound			15.9882	
		Upper Bound	30.5493	
5% Trimmed Mean		23.4069		
Median		25.3550		
Variance		75.839		
Std. Deviation		8.70855		
Minimum		7.92		
Maximum		36.13		
Range		28.21		
Interquartile Range		12.01		
Skewness		-.471	.752	
Kurtosis		.319	1.481	

pasien	Mean		25.9688	4.30231
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	15.7954	
		Upper Bound	36.1421	
	5% Trimmed Mean		25.9036	
	Median		26.6600	
	Variance		148.079	
	Std. Deviation		12.16877	
	Minimum		9.57	
	Maximum		43.54	
	Range		33.97	
	Interquartile Range		20.47	
	Skewness		.047	.752
	Kurtosis		-1.619	1.481

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD4Fusi sehat	.134	8	.200*	.967	8	.871
kontak	.217	8	.200*	.969	8	.893
pasien	.223	8	.200*	.930	8	.520

Test of Homogeneity of Variances

CD4Fusi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.180	2	21	.138

ANOVA (CD4Fusi)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76.086	2	38.043	.395	.679
Within Groups	2025.026	21	96.430		
Total	2101.112	23			

Lampiran 4. Formulir Penjelasan Untuk Mengikuti Penelitian

PENJELASAN UNTUK MENGIKUTI PENELITIAN

1. Saya, dr. Modestus La'a dari bagian Laboratorium Patologi Klinik RSUD dr. Saiful Anwar Malang dengan ini meminta anda untuk berpartisipasi dengan sukarela dalam penelitian yang berjudul "Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD4+ Pada Kultur *Peripheral Blood Mononuclear cell* (PBMC).
2. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb dapat menstimulasi ekspresi IFN- γ dan limfosit sel T CD4+ pada kultur PBMC pasien TB, kontak, dan sehat; dapat memberi manfaat untuk menemukan kandidat vaksin baru sesuai galur indonesia yang dapat dipergunakan untuk pencegahan penyakit tuberkulosis. Penelitian ini akan berlangsung selama 6 minggu dan sampel berupa darah yang akan diambil dengan cara menggunakan jarum suntik melalui pembuluh balik di lengan dengan jumlah darah yang diambil sebanyak 12 mL. Jumlah tersebut terdiri dari 1 mL untuk pemeriksaan darah lengkap, 2 mL untuk pemeriksaan kimia darah seperti fungsi liver dan fungsi ginjal untuk pemantauan adanya efek samping, serta 9 mL untuk pemeriksaan penanda proses radang IFN- γ , IL-2, IL-10 dan limfosit T (CD8+ dan CD4+) yang dilakukan di Laboratorium Sentral RSSA dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3. Prosedur pengambilan sampel darah menggunakan jarum suntik, cara ini mungkin menyebabkan rasa nyeri, memar, dan dapat terjadi infeksi apabila tindakan tidak dilakukan secara steril. Tetapi anda tidak perlu khawatir karena tindakan akan dilakukan oleh seorang profesional dan sesuai standar operasional prosedur. Rasa nyeri dan kemungkinan terjadinya memar bukan merupakan suatu hal yang berbahaya dan dapat diatasi dengan kompres dingin.

4. Keuntungan yang anda peroleh dalam keikutsertaan anda adalah mendapatkan hasil pemeriksaan laboratorium lengkap, hasil pemeriksaan foto toraks dan hasil pemeriksaan dahak pada pasien TB terkait dengan tingginya biaya. Melalui pemeriksaan ini, anda dapat mengetahui beratnya derajat penyakit tuberkulosis.

5. Seandainya anda tidak menyetujui cara ini maka anda dapat memilih untuk tidak mengikuti penelitian ini sama sekali. Untuk keputusan yang anda ambil, tidak akan berpengaruh terhadap pelayanan kesehatan yang kami berikan dan tidak akan dikenakan sanksi apapun.

6. Nama dan jati diri anda sebagai partisipan dalam penelitian akan tetap dirahasiakan.

7. Biaya pemeriksaan tambahan ditanggung oleh peneliti.

8. Keputusan ini dibuat pasien setelah menerima penjelasan dari peneliti.

9. Tanda terima kasih berupa sebuah tas tangan (*goodie bag*) yang akan diberikan kepada pasien yang mengikuti penelitian.

PENELITI

dr. Modestus La'a

Lampiran 5. Surat Pernyataan Persetujuan Untuk Berpartisipasi Dalam Penelitian

**SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN
UNTUK IKUT SERTA DALAM PENELITIAN
(INFORMED CONSENT)**

Yang bertanda - tangan di bawah ini:

Nama :
Usia :
Alamat :
Pekerjaan :
No. KTP/lainnya :

Dengan sesungguhnya menyatakan bahwa:

1. Saya telah mengerti tentang apa yang tercantum dalam lembar penjelasan diatas dan telah dijelaskan oleh peneliti.
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia / tidak bersedia *) untuk ikut serta menjadi salah satu subyek penelitian yang berjudul: Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD4+ Pada Kultur PBMC.

Malang, 2018

Peneliti, Saksi 1, Yang Membuat Pernyataan,

Dr. Modestus La'a (.....)
NIM. 158070500111002 (.....)

Saksi 2,

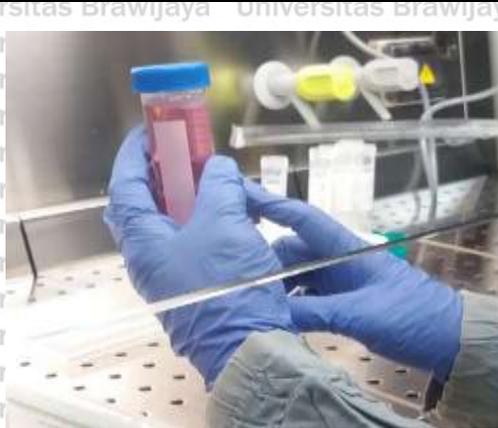
(.....)

Lampiran 6. Keterangan Kelaikan Etik Penelitian

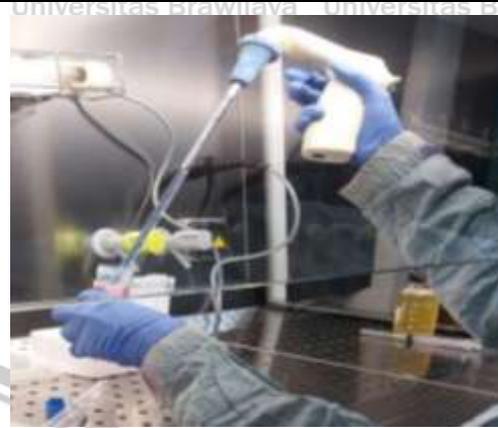




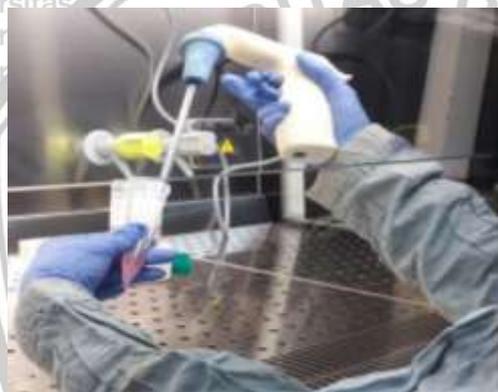
Lampiran 7. Foto-Foto Penelitian



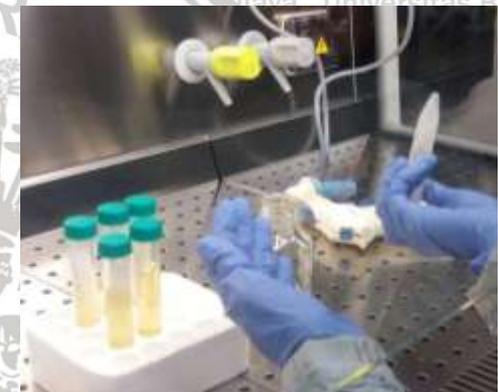
Botol sentrifus 15 mL



Sampel dicampur dengan PBS



Sampel dicampur dengan *Ficoll*



Homegenisasi



Proses sentrifus



Terbentuk 5 lapisan



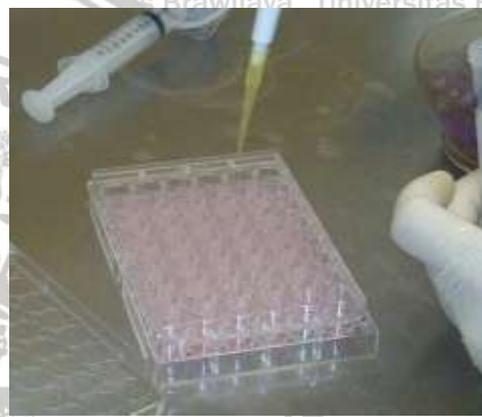
Cincin PBMC



Pelet PBMC (Pada dasar tabung)



Kultur PBMC



Induksi antigen



Cell Staining



Cell Staining