

JURNAL
RESPIROLOGI
INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology



Status Respirasi Pasien Asma yang Mendapatkan Nebulisasi Menggunakan Jet Nebulizer
Dibandingkan dengan Nebulizer Menggunakan Oksigen

Pengaruh Ekstrak Ginseng Terhadap Kadar Interleukin 8 Plasma, Skor *COPD Assessment Test*,
dan Lama Rawat Inap Pasien PPOK Eksaserbasi

Perilaku Merokok dan Analisis Kadar Karbon Monoksida pada Siswa di Desa Sukatani, Kabupaten Purwakarta
Tiotropium pada Pasien Bekas TB Paru dengan Kelainan Obstruksi Terhadap Fungsi Paru dan Kualitas Hidup

Uji Immunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP-10 *Mycobacterium Tuberculosis*
(Galur Indonesia): Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD8+ pada Kultur PBMC

Perubahan Kadar Interleukin 17 pada Pasien TB Paru BTA Positif Setelah 2 Bulan
Pengobatan Anti Tuberkulosis

Prevalensi Hipertensi Pulmoner pada Pasien Luluh Paru Karena Tuberkulosis dan
Hubungannya dengan Kapasitas Latihan

Riwayat Merokok dan Keberhasilan Pengobatan Fase Intensif Pasien Tuberkulosis Paru
di RSU Dr. Zainoel Abidin Banda Aceh

Peran Ultrasonografi dalam Diagnosis Pneumotoraks

JURNAL RESPIROLOGI INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology

SUSUNAN REDAKSI

Penasehat

M. Arifin Nawas

Faisal Yunus

Penanggung Jawab / Pemimpin Redaksi

Feni Fitriani

Wakil Pemimpin Redaksi

Winariani

Anggota Redaksi

Amira Permatasari Tarigan

Jamal Zaini

Farih Raharjo

Mia Elhidsi

Ginangjar Arum Desianti

Irandi Putra Pratomo

Sekretariat

Yolanda Handayani

Suwondo

SST : Surat Keputusan Menteri Penerangan RI

No.715/SK/DitjenPPG/SST/1980 Tanggal 9 Mei 1980

Alamat Redaksi

PDPI Jl. Cipinang Bunder, No. 19, Cipinang Pulo Gadung

Jakarta Timur 13240 Telp: 02122474845

Email : editor@jurnalrespirologi.org

Website : <http://www.jurnalrespirologi.org>

Diterbitkan Oleh

Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)

Terbit setiap 3 bulan (Januari, April, Juli & Oktober)

Jurnal Respiriologi Indonesia

Akreditasi A

Sesuai SK Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan

Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia

Nomor: 2/E/KPT/2015 Tanggal 1 Desember 2015

Masa berlaku 15 Desember 2015 - 15 Desember 2020

JURNAL RESPIROLOGI INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology

VOLUME 38, NOMOR 4, Oktober 2018

DAFTAR ISI

Artikel Penelitian

- Status Respirasi Pasien Asma yang Mendapatkan Nebulisasi Menggunakan Jet Nebulizer
Dibandingkan dengan Nebulizer Menggunakan Oksigen 187
Agus Santosa, Endiyono
- Pengaruh Ekstrak Ginseng Terhadap Kadar Interleukin 8 Plasma, Skor *COPD Assessment Test*,
dan Lama Rawat Inap Pasien PPOK Eksaserbasi 192
Aslani Threestiana Sari, Suradi, Jatu Aphridasari
- Profil Perilaku Merokok dan Analisis Kadar Karbon Monoksida pada Siswa di Desa Sukatani,
Kabupaten Purwakarta 199
Cindra Paskaria, Fransisca, Jeanastasia Kurnia, Zaneth Gunawan, Decky Gunawan
- Pengaruh Tiotropium pada Pasien Bekas TB Paru dengan Kelainan Obstruksi Terhadap
Fungsi Paru dan Kualitas Hidup 203
Romaito Nasution, Irvan Medison, Deddy Herman, Masrul Basyar
- Uji Immunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP-10 *Mycobacterium Tuberculosis*
(Galur Indonesia): Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD8+ pada Kultur PBMC 210
**Anung Sri Handayani, Tri Wahyu Astuti, Teguh Rahayu Sartono,
Maimun Zulhaidah Arthamin, Fransisca Srietami Tanoerahardjo**
- Perubahan Kadar Interleukin 17 pada Pasien TB Paru BTA Positif Setelah 2 Bulan
Pengobatan Anti Tuberkulosis 219
Andy Sulaiman Siregar, Soedarsono
- Prevalens Hipertensi Pulmoner pada Pasien Luluh Paru Karena Tuberkulosis dan
Hubungannya dengan Kapasitas Latihan 227
**Diana Septiyanti, Astari Pranindya Sari, Wahyu Aniwidyaningsih, Budhi Antariksa,
Bambang Budi Siswanto**
- Hubungan Riwayat Merokok dan Keberhasilan Pengobatan Fase Intensif Pasien Tuberkulosis Paru
di RSUD Dr. Zainoel Abidin Banda Aceh 232
Risa Fitriani, Feni Fitriani Taufik, Dewi Behtri Yanifitri
- ### Tinjauan Pustaka
- Peran Ultrasonografi dalam Diagnosis Pneumotoraks 239
Mia Elhidsi, Budhi Antariksa, Dianiaty Kusumosutoyo

Uji Immunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP-10 *Mycobacterium Tuberculosis* (Galur Indonesia): Ekspresi IFN- γ dan Jumlah Limfosit T CD8⁺ pada Kultur PBMC

Anung Sri Handayani¹, Tri Wahyu Astuti¹, Teguh Rahayu Sartono¹, Maimun Zulhaidah Arthamin²,
Fransisca Srioetami Tanoerahardjo³

¹Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

²Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum Saiful Anwar, Malang

³Pusat Penelitian dan Pengembangan Kementerian Kesehatan Indonesia

Abstrak

Latar belakang: Vaksinasi Bacille Calmette Guérin (BCG) adalah salah satu cara untuk mengendalikan tuberkulosis (TB) yang kemampuan proteksinya bervariasi sehingga diperlukan pengembangan vaksin baru. Kandidat vaksin harus melalui uji immunogenitas. Tujuan penelitian ini untuk menguji apakah protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) dapat merangsang respons imun seluler, terutama ekspresi sel interferon (IFN)- γ dan sel T CD8⁺ dalam kultur peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Metode: Penelitian ini dilakukan melalui laboratorium eksperimental pada kultur PBMC dari 3 kelompok (pasien TB, kontak TB, subjek sehat endemik) di RSUD Dr. Saiful Anwar pada bulan April-Juli 2017. Masing-masing kelompok sebanyak 8 subjek. Setiap kelompok diinduksi oleh fusi protein rekombinan ESAT-6/CFP-10 Mtb. Sel T CD8⁺ dan IFN- γ yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ diukur dengan flowcytometry.

Hasil: Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dapat merangsang stimulasi sel T CD8⁺ dan ekspresi IFN- γ yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ pada semua kelompok subjek. Presentase stimulasi jumlah sel T CD8⁺ pada fusi ESAT-6/CFP-10 didapatkan pada kelompok subjek sehat ($37,533 \pm 7,264$) dan presentase ekspresi tertinggi IFN- γ yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ pada fusi ESAT-6/CFP-10 ditemukan pada kelompok subjek sehat ($7,908 \pm 4,457$). Terdapat peningkatan yang bermakna presentase stimulasi jumlah sel T CD8⁺ ($p=0,001$) pada kelompok subjek sehat sedangkan peningkatan presentase ekspresi IFN- γ yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ namun tidak bermakna ($p=0,217$) dibandingkan dengan PPD dan yang tidak diberikan antigen.

Kesimpulan: Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 M.tb dapat merangsang stimulasi sel T CD8⁺ dan ekspresi IFN- γ yang diekspresikan oleh sel T CD8⁺ pada kelompok subjek sehat. (*J Respir Indo.* 2018; 38: 210-8)

Kata kunci: Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10, *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ , sel T CD8⁺.

Immunogenicity Test of ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium Tuberculosis* (Indonesian Strain) Recombinant Protein Fusion: IFN- γ and CD8⁺ T Cells Expression in PBMC Culture

Abstract

Background: BCG vaccination is one way to control tuberculosis (TB) but still poor in efficacy thus new vaccine development is needed. Immunogenicity test is needed in developing new vaccine. The aim of this study was to understand whether the recombinant protein fusion of ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) can stimulate cellular immune response, especially IFN- γ and CD8⁺ T cell expression in PBMC cultures.

Methods: This study was an experimental laboratory research conducted on PBMC cultures of 3 groups of subjects (TB patients, latent TB patients and healthy subjects) at RSUD Dr. Saiful Anwar in April-July 2017. The sample of each groups was 8 subjects. Each groups induced by recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 M. tuberculosis as a standard protocol and to establish the immunogenicity status. CD8⁺ T cells IFN- γ expressed by C8⁺ were measured by flowcytometry.

Result: Recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 can stimulate CD8⁺ T cells and IFN- γ expressed by CD8⁺ T cells in all group. The highest stimulation of CD8⁺ percentage was found in healthy subject (37.533 ± 7.264) and IFN- γ expressed by CD8⁺ T cells was found in healthy subject (7.908 ± 4.457); There are increase significantly CD8⁺ T cells ($p=0.001$) and IFN- γ expressed by CD8⁺ T cells ($p=0.217$) not significantly in healthy subject compared in PPD and without antigen.

Conclusion: Recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 M. tuberculosis can stimulate CD8⁺ T cells and IFN- γ expressed by CD8⁺ T cells in healthy subject. Recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 M. tuberculosis potential as a new vaccine candidate. (*J Respir Indo.* 2018; 38: 210-8)

Keywords: Recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ , CD8⁺ T cells.

Korespondensi: Anung Sri Handayani

Email: anungsrihandayani@gmail.com

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang penting di seluruh dunia bahkan penyakit ini telah ada sejak 3000 tahun sebelum Masehi. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) menginfeksi 2 miliar orang di seluruh dunia dan berkontribusi besar terhadap angka kesakitan dan kematian terutama di negara berkembang.¹ Indonesia merupakan salah satu dari 6 negara (India, Cina, Nigeria, Pakistan, Indonesia dan Afrika Selatan) penyumbang 60% dari keseluruhan kasus TB baru.² Laporan *World Health Organization* (WHO) memperkirakan jumlah kasus TB di Indonesia sebesar 1 juta kasus baru TB pertahun. Prevalens penderita TB di Indonesia cukup tinggi yaitu 399 kasus per 100.000 jiwa dengan angka kematian 69.000 jiwa/tahun.³

Masih tingginya angka kematian karena TB ini disebabkan ketiadaan vaksin yang efektif sehingga penelitian terhadap vaksin TB terus dilakukan. Penelitian terutama difokuskan pada komponen antigenik yang tidak terdapat pada *Bacille Calmette Guerin* (BCG) tetapi dapat merangsang perlindungan sistem kekebalan tubuh terhadap infeksi TB. Fokus pemberian vaksin tetap pada penguatan limfosit *cluster of differentiation* (CD)-4⁺ *T-helper* (Th)1 pada *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II namun vaksin juga diharapkan terdapat protein MHC kelas I untuk memperkuat respons limfosit T CD8⁺. Kandidat vaksin TB yang ideal dan efektif adalah vaksin yang dapat menginduksi respons protektif yang kuat, baik terhadap limfosit T CD4⁺ maupun limfosit T CD8⁺.⁴ Respons protektif terhadap TB melibatkan sekresi sitokin proinflamasi seperti interferon (IFN)- γ untuk mencegah kerusakan berlebihan yang disebabkan oleh faktor proinflamasi tersebut.⁵

Vaksin BCG yang digunakan saat ini merupakan galur turunan dari galur BCG awal. Arthamin meneliti uji immunogenitas protein 38 kDa rekombinan *MM. tb* galur Malang dan menemukan bahwa protein tersebut dapat menginduksi ekspresi Interleukin-2 (IL-2) dan IL-4 limfosit T CD3⁺ pada

subjek sehat kontak dan pasien TB serta terdapat perbedaan yang bermakna pada ekspresinya di semua kelompok. Walaupun berbeda bermakna, uji immunogenitas tersebut tidak spesifik terhadap sitokin masing-masing subset sel T.⁶ Berdasarkan latar belakang tersebut dan untuk melengkapi rangkaian penelitian pengembangan vaksin sebelumnya maka perlu dilakukan uji immunogenitas protein rekombinan fusi *early secreted antigenic target 6 kDa protein* (ESAT-6) dan *culture filtrate protein 10* (CFP-10) *M. tuberculosis* dalam menginduksi respons imun seluler berdasarkan produksi limfosit T CD8⁺ dan sitokin IFN- γ dari pasien TB, kontak TB positif dan kontrol sehat.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental laboratory*) di laboratorium secara *ex vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* yang meneliti protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M. tuberculosis* pada kultur *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Penelitian ini dilaksanakan di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Subjek dibagi menjadi tiga kelompok sampel (pasien TB, kontak dan sehat endemik) kemudian diukur ekspresi IFN- γ dan jumlah limfosit T CD8⁺.

Jumlah sampel pada tiap kelompok adalah 8 subjek, yang diperoleh dari rumus: $p(n-1) \geq 16$ dengan n adalah jumlah sampel tiap-tiap perlakuan dan p adalah jumlah perlakuan.⁷ Total jumlah sampel pada penelitian ini yaitu 24 subjek penelitian (8 subjek pasien TB, 8 subjek kontak positif, dan 8 subjek sehat). Sampel diambil secara *consecutive sampling* mulai bulan April sampai Juli 2017. Kriteria umum inklusi subjek penelitian yaitu usia antara 18-50 tahun, tidak mengidap infeksi *human immunodeficiency virus* (HIV), kadar fungsi hati, ginjal dan gula darah dalam batas normal, tidak ada infeksi paru lainnya, tidak dalam pengobatan immunosupresan. Kriteria inklusi pasien TB yaitu pasien TB paru yang terdiagnosis secara bakteriologis melalui hasil sputum basil tahan asam (BTA) positif yang belum pernah mendapatkan

obat anti tuberkulosis (OAT) kategori 1 sebelumnya atau mendapatkan OAT kategori 1 kurang dari 2 minggu. Kriteria eksklusi TB yaitu pasien *multi drug resistant tuberculosis* (MDR TB), mempunyai komorbid lain seperti keganasan, diabetes, dan sedang hamil. Kriteria inklusi kontak TB yaitu tidak mempunyai riwayat TB, merupakan subjek sehat yang mempunyai kontak dengan pasien TB selama lebih dari 6 bulan dan pada pemeriksaan sputum BTA negatif atau hasil tes cepat molekuler (TCM) tidak ditemukan *M. tuberculosis*, foto toraks dalam batas normal, hasil tes *mantoux* positif dan memiliki riwayat imunisasi BCG.

Setiap subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak terdapat kriteria eksklusi serta bersedia ikut penelitian dan menandatangani lembar persetujuan penelitian dimasukkan sebagai subjek penelitian. Subjek penelitian yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok sampel (pasien TB, kontak TB dan sehat endemik) diambil sampel darah vena dan dibuat biakan isolasi PBMC dari ketiga kelompok. Masing-masing sampel darah dari ketiga kelompok subjek diberikan 3 perlakuan yaitu tanpa diberikan antigen, diberikan *purified protein derivate* (PPD) 2 $\mu\text{g/ml}$ dan diberikan protein rekombinan fusi *early secretory antigenic target* (ESAT)-6/*culture filtrate protein* (CFP)-10 *M.tuberculosis* 2 $\mu\text{g/ml}$. Setelah itu biakan diinkubasi selama 48 jam kemudian diperiksa kadar IFN- γ dan jumlah sel T CD8+ dengan *flowcytometry* dan dilakukan analisis data dengan metode ANOVA.

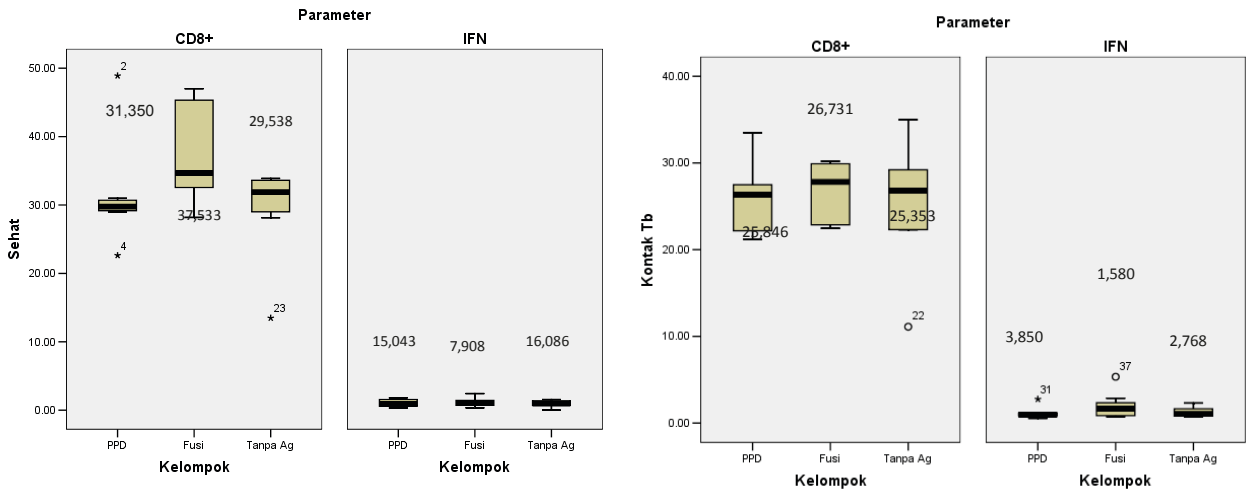
HASIL

Pada keseluruhan sampel, pada pasien TB didapatkan jumlah laki-laki 6 subjek dari 8 subjek pasien TB. Kelompok usia pasien terbanyak pada usia 41-50 tahun yaitu 4 orang. Sebagian besar subjek mempunyai tingkat pendidikan sekolah menengah umum (SMU) sebanyak 5 orang. Berdasarkan perhitungan indeks massa tubuh (IMT) sebagian besar subjek pasien TB memiliki IMT <18,5 kg/m^2 yaitu 5 subjek. Sebanyak 2 subjek memiliki

Tabel 1. Karakteristik Subjek Penelitian

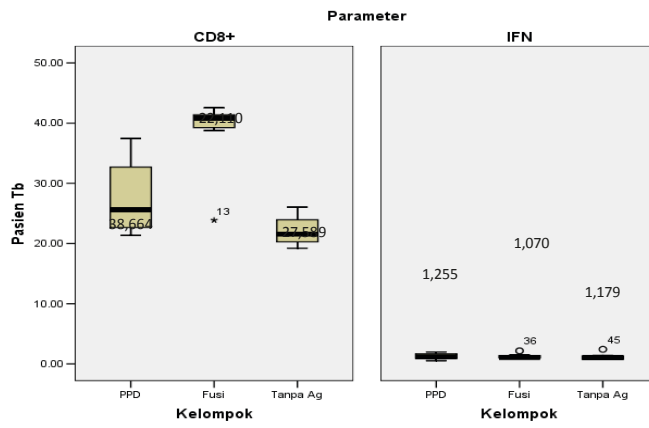
Karakteristik	Pasien (n=8)	Kontak (n=8)	Sehat (n=8)
Usia			
< 20 tahun	1	0	0
21 – 30 tahun	2	3	4
31 – 40 tahun	1	4	4
41 – 50 tahun	4	1	0
Jenis kelamin			
Laki-laki	6	4	2
Perempuan	2	4	6
Pendidikan			
Sekolah Dasar	2	-	-
Sekolah Menengan Pertama	1	-	-
Sekolah Menengah Umum	5	1	-
Diploma	-	3	1
Sarjana	-	4	7
Pekerjaan			
Petani	1	-	-
Mahasiswa	1	-	1
Buruh bangunan	1	-	-
Napi narkoba	1	-	-
Ibu rumah tangga	1	-	1
Pedagang	1	-	-
Montir	1	-	-
Wiraswasta	1	-	1
Perawat	-	2	2
Program Pendidikan Dokter Spesialis	-	6	2
Pustakawan	-	-	1
Indeks massa tubuh			
< 18,5 kg/m^2	5	1	0
18,5 – 23 kg/m^2	2	2	6
> 23 kg/m^2	1	5	2
Riwayat merokok			
Merokok	6	0	0
Tidak	2	8	8
Parut BCG (+)	6	8	8
Hasil tes <i>Mantoux</i>	8	8	0
Gejala klinis			
Batuk	8	-	-
Batuk darah	2	-	-
Sesak	1	-	-
Nyeri dada	1	-	-
Demam	7	-	-
Keringat malam	6	-	-
Penurunan berat badan	5	-	-
Foto toraks			
Lesi minimal	0	Normal	Normal
Lesi sedang	2		
Lesi luas	6		
Hasil sputum basil tahan asam			
+1	3	(-)	(-)
+2	3		
+3	2		
Hasil tes cepat molekuler			
Terdeteksi sedikit	3	-	-
Terdeteksi sedang	3		
Terdeteksi tinggi	2		

BCG: *Bacille Calmette Guerin*



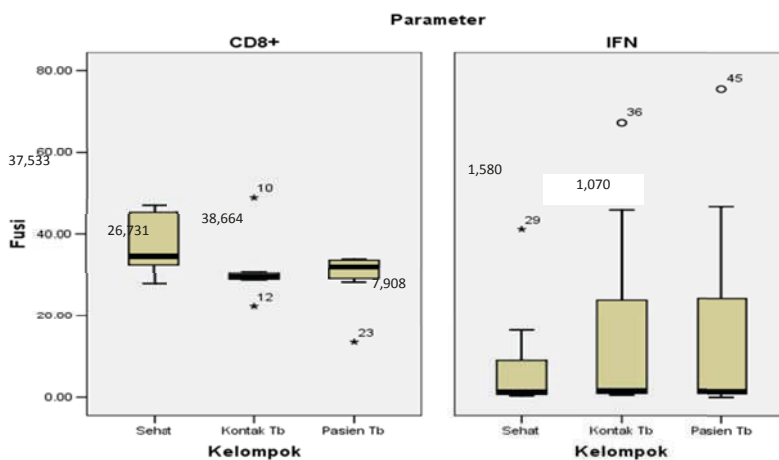
a. Subjek sehat

b. Subjek kontak TB



c. Subjek pasien TB

Gambar 1. Grafik *boxplot* pada kelompok (a) subjek sehat, (b) kontak TB dan (c) pasien TB.



d. Fusi ESAT-6/CFP-10

Gambar 2. Grafik *boxplot* fusi ESAT-6/CFP-10.

IMT antara 18,5-23 kg/m² dan tidak ada subjek yang memiliki IMT >23 kg/m².

Hanya 2 subjek penelitian pada kelompok pasien TB yang tidak memiliki parut BCG. Pemeriksaan *mantoux* dilakukan pada seluruh subjek kelompok pasien dan kelompok kontak TB. Gejala TB hanya didapatkan pada kelompok pasien TB. Gejala yang diteliti merupakan gejala respiratorik dan sistemik yang sering terjadi pada penderita penyakit TB dan merupakan salah satu kriteria diagnosis. Gejala klinis yang paling banyak ditemukan pada kelompok subjek TB adalah batuk yang dialami oleh 8 subjek, diikuti oleh demam yang dialami oleh 7 subjek, keringat malam 6 subjek dan penurunan berat badan 5 subjek. Keluhan lain yang ditemukan yaitu batuk darah 2 subjek, sesak dan nyeri dada masing masing 1 subjek. Gambaran foto toraks terbanyak yang ditemukan pada pasien adalah gambaran TB paru lesi luas sebanyak 6 dari 8 subjek pasien TB dan tidak didapatkan lesi minimal pada subjek penderita TB. Pasien dengan hasil pemeriksaan sputum bakteri tahan asam (BTA) positif dimasukkan dalam kelompok pasien TB. Pemeriksaan sputum BTA didapatkan hasil sputum BTA positif 1 dan positif 2 masing-masing sebanyak 3 subjek dan BTA positif 3 didapatkan pada 2 orang subjek.

Sampel darah vena dari ketiga kelompok subjek diperiksa kadar IFN- γ dan jumlah sel T CD8⁺ dengan *flowcytometry*. Hasil pemeriksaan ekspresi IFN- γ dan jumlah sel T CD8⁺ dapat dilihat pada Gambar 1. Gambar 1a menunjukkan parameter sel T CD8⁺ pada subjek sehat endemik dan didapatkan bahwa kelompok fusi ESAT-6/CFP-10 memiliki hasil yang lebih besar dibandingkan kelompok tanpa antigen ataupun PPD. Pada pemeriksaan kadar IFN- γ ditemukan bahwa kelompok fusi ESAT-6/CFP-10 memiliki hasil yang lebih kecil dibandingkan kelompok tanpa antigen atau PPD.

Hasil pemeriksaan kadar IFN- γ dan sel T CD8⁺ pada kelompok subjek kontak TB dapat dilihat pada Gambar 1b. Kelompok yang diberikan fusi ESAT-6 CFP-10 menunjukkan jumlah sel T CD8⁺ yang lebih besar dibandingkan tanpa antigen atau PPD.

Pada parameter IFN- γ bahwa kelompok fusi ESAT-6/CFP-10 memiliki hasil yang lebih kecil dibandingkan tanpa antigen atau dengan PPD. Hasil pemeriksaan ekspresi IFN γ dan sel T CD8⁺ pada kelompok subjek pasien TB dapat dilihat pada Gambar 1c.

Hasil pemeriksaan kadar IFN- γ dan jumlah sel T CD8⁺ merupakan respons terhadap antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10. Hasil pemeriksaan IFN- γ dan sel T CD8⁺ pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 1d. Pada gambar tersebut terlihat bahwa ditemukan ekspresi sel T CD8⁺ lebih tinggi pada kelompok sehat dibandingkan kontak TB pada pemberian rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 sebagai antigen. Hasil ini berbeda bermakna dengan kelompok kontak dan pasien ($p=0.001$). Jumlah sel T CD8⁺ pada kelompok fusi ESAT-6/CFP-10 yang lebih besar dibandingkan kelompok tanpa antigen atau PPD. Kadar IFN- γ pada kelompok fusi ESAT-6/CFP-10 lebih kecil dibandingkan tanpa antigen atau PPD. Pada uji statistik dengan *Tukey range test*, didapatkan hasil a-b pada perhitungan jumlah sel T CD8⁺ pada 3 kelompok sehingga kelompok pasien TB memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontak TB dan kelompok sehat. Kadar IFN- γ pada kelompok sehat lebih tinggi dibandingkan kelompok kontak TB dan pasien TB pada pemberian rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 sebagai antigen. Pada pemeriksaan *Tukey range test* pada 3 kelompok didapatkan hasil a-a yang menunjukkan bahwa perbedaan ekspresi ketiganya tidak bermakna.

PEMBAHASAN

Jumlah pasien TB paru berjenis kelamin laki-laki yang diikutsertakan dalam penelitian ini lebih banyak daripada perempuan (6 subjek laki-laki dan 2 subjek perempuan). *Global Tuberculosis Report* 2016 menyatakan bahwa rasio pasien TB paru pada laki-laki 1,7 kali lebih besar dibandingkan pada perempuan secara global. Sekitar 95% kasus TB yang dilaporkan ditemukan pada pasien laki-laki dengan prevalens 2,3 kali lebih banyak dibandingkan pasien perempuan terutama pada negara berkembang.² Kasus TB dengan hasil sputum BTA positif pada

laki-laki 1,5 kali lebih tinggi daripada perempuan di Indonesia.³

Sebaran pasien TB berdasarkan kelompok umur dalam penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum kasus TB ditemukan pada kelompok usia 41-50 tahun yaitu 4 orang. Pada daerah dengan jumlah kejadian TB yang sedang sampai tinggi, TB sering ditemukan pada kelompok usia muda. Laporan WHO menyebutkan 75% pasien TB paru di negara berkembang sering ditemukan pada kelompok umur produktif yaitu antara 15–50 tahun. Penelitian Nofizar dkk juga menemukan hal yang serupa yaitu rerata terkena TB pada usia 36,46 tahun dan juga lebih banyak ditemukan pada kelompok usia produktif.⁸

Sebagian besar pasien TB yang diikutsertakan pada penelitian ini mengalami gizi kurang dengan IMT <18,5 kg/m² yaitu sebanyak 5 orang, diikuti dengan subjek yang mempunyai IMT 18,5-23 kg/m² (3 orang). Tidak ada pasien TB yang memiliki IMT >23. Sitienei dkk melaporkan sebanyak 43% dari 1298 pasien TB paru BTA positif di Kenya mempunyai IMT <18,5. Malnutrisi atau kekurangan gizi dinilai dengan pengukuran nilai IMT. Keadaan gizi kurang sangat berhubungan dengan penyakit TB. Malnutri merupakan faktor risiko penting berkembangnya TB karena malnutrisi mempengaruhi respons imun terhadap TB. Sebaliknya penyakit TB aktif dapat menyebabkan keadaan malnutrisi karena pada TB terjadi penurunan nafsu makan dan peningkatan kebutuhan nutrisi karena peningkatan metabolisme tubuh.⁹⁻¹¹

Penelitian ini menemukan bahwa terdapat 6 subjek merokok dan semuanya pasien laki-laki yang terkena TB. Merokok berhubungan secara bermakna terhadap peningkatan risiko terkena TB. Rokok dapat menyebabkan pemanjangan waktu konversi sputum BTA pada pasien TB yang sedang mendapat terapi OAT. Paparan asap rokok jangka panjang akan menyebabkan gangguan akumulasi *antigen presenting cell* (APC) dan produksi *tumor necrosis factor* (TNF)- α , IL-12 dan *regulated on activation, normal t cell expressed and secreted* (RANTES) yang selanjutnya menyebabkan penurunan *recruitment* sel T CD4⁺ dan IFN- γ ke paru kemudian

memacu terbentuknya granuloma. Merokok dapat menghambat ekspresi imunitas anti TB Th1 melalui hambatan imunitas bawaan dan *recruitment* sel T ke paru.¹²

Pasien yang pernah diimunisasi BCG memiliki parut bekas vaksin BCG. Jumlah subjek yang mempunyai parut BCG yaitu 6 dari 8 subjek di kelompok subjek TB. Penelitian karakteristik TB anak dengan biakan *M. tuberculosis* positif menemukan bahwa sebagian besar subjek (63,2%) memiliki parut BCG. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mekanisme proteksi vaksin BCG melawan TB yaitu dengan menurunkan penyebaran hematogen pada infeksi primer. Tidak ada bukti yang menunjukkan bahwa vaksin BCG menurunkan risiko terinfeksi *M. tuberculosis*. Penghambatan penyebaran hematogen ini akan menurunkan risiko penyakit primer diseminata dan penyakit diseminata saat reaktivasi.^{13,14} Tingkat perlindungan yang diberikan vaksin BCG sangat bervariasi mulai dari tidak ada perlindungan sampai memberikan perlindungan sebesar 80%.¹⁵

Berdasarkan keluhan pasien pada kelompok penderita TB, didapatkan keluhan batuk pada 8 subjek. Batuk merupakan keluhan yang paling banyak ditemukan dan diikuti dengan demam sebanyak 7 subjek, keringat malam 6 subjek, penurunan berat badan 5 subjek, batuk darah 2 subjek, sesak dan nyeri dada masing-masing 1 subjek. Batuk terjadi karena iritasi bronkus akibat proses inflamasi dan merupakan usaha untuk mengeluarkan dahak dari saluran pernapasan.^{16,17} Respons inflamasi pada infeksi *M. tuberculosis* berupa produksi mukus yang banyak dan menyebabkan batuk dengan secara mekanis menstimulasi jaras aferen dari refleksi batuk. Peningkatan sensitivitas jaras aferen dari refleksi batuk merupakan hal yang penting pada mekanisme patogenesis pasien dengan batuk non produktif.¹⁸

Pada kelompok subjek sehat ditemukan hasil ekspresi yang lebih tinggi pada pemberian antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan tanpa antigen dan PPD. Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 mampu menginduksi sistem

imunitas seluler pada subjek yang belum pernah terpajan antigen *M. tuberculosis* sebelumnya.¹⁹⁻²¹ Dalam respons imunitas adaptif, CD4⁺ dan CD8⁺ sangat penting untuk mengendalikan infeksi yang disebabkan oleh *mycobacterial*, walaupun beberapa penelitian mengatakan kontribusi CD8⁺ untuk perlindungan terhadap infeksi TB kurang dominan.²²

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada subjek sehat terdapat peningkatan ekspresi IFN- γ . Stimulasi pada PBMC menghasilkan ekspresi IFN- γ . Ekspresi IFN- γ akan meningkat secara fisiologis terhadap inflamasi apapun. IFN- γ mampu menginduksi limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ sehingga meningkatkan ekspresi IFN- γ pada subjek sehat pada penelitian ini.²³

Penelitian kami menemukan hasil ekspresi sel T CD8⁺ yang lebih tinggi pada kelompok yang diberikan antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan kelompok tanpa antigen dan PPD. Stimulasi oleh antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 menyebabkan aktivasi respons imunitas seluler yang menyebabkan sensitisasi sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺. Sel T selanjutnya akan melepaskan mediator yang akan memobilisasi monosit dan subset sel T lainnya. Sel T CD8⁺ juga mampu mensekresikan sitokin seperti IFN- γ , memediasi sitotoksitas seluler, mengaktifkan proses lisis makrofag *M. tuberculosis*, serta memproduksi granulin yang dapat membunuh *M. tuberculosis* intraseluler.²³

Penelitian yang dilakukan oleh Vidal dkk pada kontak TB menunjukkan bahwa kadar IFN- γ pada subjek yang diberikan induksi antigen protein rekombinan fusi ESAT-6 lebih tinggi dari kadar pada pasien TB. Penelitian tersebut menunjukkan peran potensial sel T CD8⁺ dalam respons imun terhadap TB.²⁴ Penurunan sekresi IFN- γ menunjukkan pasien yang menderita TB memiliki respons dominan pada jenis Th2 dalam darah perifer, sedangkan pada pasien dengan hasil tuberkulin positif memiliki respons tipe Th1. Sodhi dkk menunjukkan bahwa kadar IFN- γ yang rendah dalam darah perifer terkait dengan klinis TB yang berat.²² Kadar IFN- γ pada pasien TB lebih rendah secara bermakna dan

diduga karena kurangnya perlindungan terhadap *M. tuberculosis*.²³

Penelitian ini mendapatkan hasil ekspresi sel T CD8⁺ pada kelompok subjek sehat setelah inkubasi dengan pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M. tuberculosis* lebih tinggi daripada kelompok kontak dan pasien TB. Hal ini menunjukkan ekspresi sel T CD8⁺ pada kelompok sehat memberikan respons terhadap pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M. tuberculosis* jika dibandingkan dengan kelompok kontak TB dan pasien TB. Pada kontak TB didapat ekspresi sel T CD8⁺ yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok subjek sehat. Hal ini menunjukkan pada kontak TB setelah masa inkubasi pemberian protein rekombinan fusi ESAT 6/CFP-10 *M. tuberculosis*, keseimbangan respons imun lebih didominasi oleh ekspresi Th1. Sel T CD8⁺ memainkan peran protektif pada infeksi intraseluler.^{20,24} Penelitian oleh Ginsberg dkk²⁴ menyatakan bahwa jumlah sel T CD8⁺ secara *ex-vivo* pada pasien TB sebelum terapi lebih rendah dari subjek dengan infeksi laten namun meningkat setelah empat bulan terapi dengan persentase yang sebanding antara subjek pasien TB dan infeksi TB laten.²⁵

Penelitian ini juga menemukan bahwa ekspresi IFN- γ limfosit T CD8⁺ pada subjek sehat lebih tinggi dari subjek kontak TB dan pasien TB. Namun perbedaan antara ketiganya tidak bermakna. Penelitian ini sesuai dengan penelitian lainnya yang mengemukakan bahwa kadar IFN- γ , TNF α dan IL-10 pada kelompok subjek sehat lebih tinggi dari kontak TB dan pasien TB namun setelah pengobatan kadar sitokin tersebut akan meningkat secara bermakna dan progresif seiring waktu. Peningkatan tersebut terjadi karena kadar IFN- γ , TNF α dan IL-10 terhadap fusi ESAT-6/CFP-10 mengalami depresi selama infeksi TB kemudian meningkat setelah terdiperbaiki klinis. ESAT-6 dan CFP-10 berperan sebagai faktor virulensi pada proses infeksi TB. Penghambatan APC oleh ESAT-6 terjadi melalui penurunan produksi IL-12 oleh makrofag. Ketidakstabilan fagolisom dapat menyebabkan

bakteri *M. tuberculosis* dapat menghindari proses fagosom. Produksi IFN- γ , TNF α , IL-10 dan IL-17 oleh sel T CD8+ juga dapat dihambat oleh ESAT-6.²⁶

Penelitian lain juga mengemukakan bahwa sel mononuklear pada darah perifer yang dirangsang secara *in vitro* dengan antigen *M. tuberculosis* menghasilkan IFN- γ lebih sedikit dibandingkan dengan subjek sehat. Penurunan produksi IFN- γ pada sel darah perifer yang distimulasi IFN- γ disebabkan oleh sekuestrasi sel yang memproduksi IFN- γ disertai dengan kondisi penekanan imunitas sistemik.²⁸

Penelitian Tores dkk²³ yang meneliti biakan PBMC pada pasien TB menunjukkan kegagalan limfosit T untuk menghasilkan IFN- γ . Kegagalan ini mengakibatkan penurunan IFN- γ pada pasien TB dengan lesi luas. Penurunan produksi IFN- γ terkait dengan berkurangnya IL-12 yang menginduksi Th1. Kemungkinan lain yaitu IFN- γ yang diproduksi terlokalisasi di paru. Sitokin IL-10 yang dihasilkan oleh sel *T-helper* dan sel NK menekan IFN- γ dan menghambat APC pada Th1. Murray dkk menunjukkan bahwa pada tikus sekresi IL-10 oleh sel T menginduksi efek negatif pada BCG melalui fungsi antagonis makrofag sehingga terjadi penurunan IFN- γ . Pada pasien TB yang telah mendapat pengobatan terjadi hal yang sebaliknya yaitu penurunan IL-10 sehingga terjadi peningkatan IFN- γ .²⁴

Sintesis IFN- γ tertinggi dengan protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 pada kelompok sehat menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 cukup imunogenik dalam menginduksi sintesis IFN- γ dibandingkan pada kelompok kontak TB dan pasien TB.

KESIMPULAN

Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M. tuberculosis* alur lokal dapat meningkatkan jumlah sel T CD8+ pada subjek sehat, kontak TB dan pasien TB. Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *M. tuberculosis* galur lokal dapat meningkatkan ekspresi IFN- γ pada subjek sehat, kontak TB dan pasien TB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tang XL, Zhou YX, Wu SM, Pan Q, Xia B, Zhang XL. CFP10 dan ESAT6 aptamers as effective Mycobacterial antigen diagnostic reagents. *J. Infect.* 2014;69:569–80.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. [Online]. 2016 [Cited 2016 Mar 1]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary.pdf
3. Kementerian Kesehatan RI. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Jakarta: 2014.p.6–7.
4. Kaplan G. Rational vaccine development - A new trend in tuberculosis control. *N Engl J Med.* 2005;353:16245.
5. Cooper AM. Cell mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Re Immunol.* 2009;27:393–422.
6. Arthamin Z, Didiet T, Fransisca. Uji imunogenitas protein rekombinan fusi 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* galur Malang pada ekspresi IL-2 dan IL-4 limfosit T CD3+ Pada Kultur PBMC. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical.* 2015;21:244-9.
7. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi 5. Sagung Seto. Jakarta. 2014. hal. 281.
8. Nofizar D, Nawas A, Burhan E. Identifikasi faktor risiko tuberculosis multidrug resistant (TB-MDR). *Maj Kedokt Indon* 2010; 60: 537-45.
9. Podewils LJ, Holtz T, Riestina V, Skripeonokav, Zarovska E, Kirvelaite G, *et al.* Impact of malnutrition on clinical presentation, Clinical course and mortality In MDR TB patients. *Epidemiol Infect.* 2011; 139: 113-20.
10. Gupta KB, Gupta R, Atreja A, Verma M, Vishkroma S. Tuberculosis and nutrition. *Lung India.* 2009; 26: 9-16.
11. Pratomo IP, Burhan E, Tambunan V. Malnutrition and tuberculosis. *J Indon Med Assoc.* 2012; 62:230-7.
12. Bates MN, Khalakdina A, Pel M, Chang L, Lessa F, Smith KR. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke. *Arch intern Med*; 2007; 167: 335-42.

13. Suprayitno B, Rahajoe NN, Rahajoe N, Boediman I, Said M, Setyanto DB. Karakteristik tuberculosis anak dengan biakan positif. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2002;13:22-5.
14. World Health Organization. The immunological basis for immunization series. Module 5: Tuberculosis. WHO Press. 2011. p 1-30.
15. Martin C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J*. 2005;26:162-7.
16. Tiwari S, Amood K, Kapoor SK. Relationship between sputum smear grading and smear conversion rate and treatment outcome in the patient of pulmonary tuberculosis undergoing DOTS - A prospective cohortsStudy. *Indian J. Tuberc*. 2012;59:132-40.
17. Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. 5th Ed. McGraw-Hill Medical. New York. 2015. p 3971-4010.
18. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia. Tuberculosis. 2016. hal 3.
19. Orme I. Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr opin immunol*. 2004;7:58-61.
20. Hanecom WA, Abel B, Scriba TJ. Immunological protection against tuberculosis. *SAMJ*. 2007; 97:973-7.
21. Raja A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004;120:213-32.
22. Skold M, Behar SM. Role of CD1d restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect Immun*. 2003;71:5447-55.
23. Nagata T, Koide, Y. 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. 2012.
24. Eley BS, Beatty DW. The basic immunology of tuberculosis. Saunders; 2009. p. 75-86.
25. Tores M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998;66:176-80.
26. Ginsberg AM. A proposed national strategy for tuberculosis vaccine development. *Clin Infect Dis* ;30(Suppl 3);S233-42.
27. Samten B, Wang X, Barnes PF. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses. *Tuberculosis*. 2009; 89(Suppl 1):S74-S76.
28. Wang X, Barnes PF, Huang F, Alvarez IB, Neuenschwander PF, Sherman DR, et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* primes dendritic cells to stimulate Th17 and inhibit Th1 immune responses. *J Immunol*. 2012;189: 3092-103.
29. Dawson R, Condos R, Huie ML, Ress S, Tseng CH, Brauns C, et al. Immunomodulation with recombinant interferon-gamma1b in pulmonary tuberculosis. *PLos One*. 2009;4: e6984.