

**PENGARUH CRUDE PILI *Mycobacterium tuberculosis*
(MTP) SECARA SUBKUTAN MENGGUNAKAN AJUVAN IFA
(*INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT*) TERHADAP JUMLAH
SEL T CD8+ PADA MENCIT BALB/C**

TUGAS AKHIR

**Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Guna
Meraih Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:
Ilham Eka Prasetya Bakti
0810713069**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH CRUDE PILI *Mycobacterium tuberculosis* (MTP) SECARA SUBKUTAN MENGGUNAKAN AJUVAN IFA (*INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT*) TERHADAP JUMLAH SEL T CD8+ PADA MENCIT BALB/C

Oleh:

Ilham Eka Prasetya Bakti
NIM. 0810713069

Telah diuji pada

Hari : Kamis
Tanggal : 20 September 2012
Telah dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



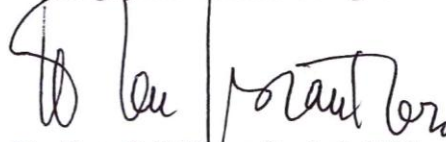
dr. Soemardini, M.Pd
NIP. 110446417

Penguji II / Pembimbing I



dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes
NIP. 19660323 199703 2 001

Penguji III / Pembimbing II



Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, MSi
NIP. 19540823 198103 2 001

Mengetahui :
Ketua Jurusan Kedokteran



Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono DTMH, MSc, SpPark
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Pengaruh *Crude Pili Mycobacterium tuberculosis* (MTP) secara subkutan menggunakan ajuvan IFA (*incomplete freund's adjuvant*) terhadap jumlah sel T CD8+ pada mencit Balb/C"

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta bahwa penyakit tuberculosis masih menjadi permasalahan kesehatan global bahkan di Indonesia dan masih banyak kandidat vaksin terhadap *Mycobacterium tuberculosis* sampai saat ini belum diteliti, salah satunya adalah dengan ditemukannya pili *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh vaksinasi *crude pili Mycobacterium tuberculosis* secara subkutan dengan IFA sebagai ajuvan, terhadap jumlah sel T CD8⁺ pada mencit.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr.dr. Karyono Mintaroem, SpPA., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono DTMH, MSc, SpPark. sebagai Ketua Jurusan Pendidikan Dokter Universitas Brawijaya yang telah membimbing penulis untuk menempuh pendidikan dengan baik di jurusan pendidikan dokter.
3. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan banyak sekali bantuan dalam penelitian ini, yang dengan sabar membimbing untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si. sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, membantu

menumbuhkan pola berfikir ilmiah, dan senantiasa memberi semangat, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

5. dr. Soemardini, MPd sebagai ketua tim penguji Tugas Akhir.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
7. Para analis di Laboratorium Biomedik dan Mikrobiologi yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Yang tercinta ibu dan bapak penulis, ibu Nike Wasiati dan bapak Adi Sudjatmoko, adik-adik saya Nano dan Rama, juga Evan serta mbak Tuti atas segala pengertian, dukungan, doa dan kasih sayangnya yang tak pernah henti.
9. Teman-temanku yang terbaik Lutfi, Maulana, Soni, Cahya, Zaki, Roni, Dicky, Kamim, Faradiani, Neshya dan teman-teman lain yang pernah secara langsung maupun tidak langsung menyemangati, terimakasih atas konsultasi, saran, *support*, semangat, doa, dan masukannya.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 20 September 2012

Penulis

ABSTRAK

Prasetya, Ilham E. 2012. *Pengaruh Crude Pili Mycobacterium tuberculosis (MTP) secara Subkutan Menggunakan Ajuvan IFA (INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT) Terhadap Jumlah Sel T CD8+ pada Mencit BALB/C*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes (2) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

Tuberkulosis (TB) adalah salah satu penyakit infeksi paru yang menjadi permasalahan kesehatan global, termasuk di Indonesia. Salah satu metode pencegahan TB adalah penggunaan vaksin BCG. Namun, diketahui bahwa BCG memiliki tingkat keberhasilan yang bervariasi antara 0-80%. Penelitian menunjukkan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) memproduksi pili yang memiliki sifat imunogenik. IFA adalah ajuvan berbasis emulsi minyak yang terdiri dari *paraffin oil* dan *mannide monooleate* sebagai surfaktan. Sel T CD8⁺ memiliki peran penting dalam keberhasilan sistem pertahanan tubuh terhadap MTB. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh *crude* pili MTB dengan IFA yang diberikan secara subkutan terhadap jumlah sel T CD8⁺ pada organ paru, limpa, dan darah mencit. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test control group design*. Sampel terdiri dari 18 ekor tikus yang dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, perlakuan I kontrol negatif (PBS), perlakuan II (*crude* pili), dan perlakuan III (*crude* pili + ajuvan). Variabel yang diukur adalah jumlah sel T CD8⁺ dalam bentuk prosentase dari total sel limfosit pada organ paru, limpa, dan darah mencit setelah 2 kali dilakukan perlakuan dengan interval 2 minggu. Hanya didapatkan data dari 3 ekor mencit pada penelitian ini dan didapatkan hasil bahwa tidak terjadi peningkatan jumlah sel T CD8⁺ yang signifikan pada masing-masing perlakuan berdasarkan uji statistik ANOVA dan *independent T-test* ($p > 0,05$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa vaksinasi *crude* pili MTB yang diberikan secara subkutan sebagai vaksin tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan dari sistem imun sel T CD8⁺ pada organ paru, limpa, dan darah mencit.

Kata Kunci : *crude pili MTB, IFA, subkutan, sel T CD8⁺*

ABSTRACT

Prasetya, Ilham E. 2012. *The effect of Mycobacterium tuberculosis's Crude Pili H37rv by Subcutan Vaccination with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) toward The Number of CD8⁺ T Cell in BALB/c Mice*. Final Assignment, Medical Programme, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes (2) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si.

Tuberculosis (TB) is one of the infection lung disease which becomes a global health problem including in Indonesia. One method of preventing TB is the use of BCG vaccine. However, BCG has not good protection yet to Tuberculosis. Research showed that *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) produces pili which has immunogenic properties. IFA is an oil emulsion-based adjuvant consisting of paraffin oil and mannide monooleate as surfactant. CD8⁺ T cell has an important function of the body immunity from MTB infection. The goal of this study is to know the effect of the MTB's crude pili subcutan vaccination with IFA to the number of CD8⁺ T cell in the mice's lung, spleen, and blood. The design of this experiment was "true experimental design with the post test only control group". The samples consisted of 18 mice that were divided into 3 treatment groups, treatment I negative control (PBS), treatment II (crude pili), and treatment III (crude pili + adjuvant). The variables measured were the number of CD8⁺ T cells in percentage of the total lymphocyte cells counted in the mice's lung, spleen, and blood after two treatment in two-weeks intervals. Only the data from the 3 mice were obtained of this research and obtained the result that there was no increase in the number of CD8 + T cells significantly in each treatment based on the statistical tests ANOVA and independent T-test ($p > 0.05$). From this study it could be concluded that CD8⁺ cells in the mice's lung, spleen, and blood couldn't increased significantly after MTB's crude pili administration through subcutan route as vaccine.

Keywords : *MTB's crude pili, IFA, subcutan, CD8⁺ T cells*

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xi
Daftar Singkatan.....	xii
Daftar Grafik	xiii
Daftar Lampiran	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penulisan	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tuberkulosis	5
2.1.1 Virulensi Mycobacterium tuberkulosis.....	5
2.1.2 Patofisiologi Tuberculosis	5
2.2 Sistem Imun.....	7
2.2.1 Imunitas Natural	7
2.2.1.1 Fagositosis.....	8
2.2.1.2 Antigen Presenting Cells (APCs).....	8
2.2.2 Imunitas Adaptif.....	9
2.2.2.1 Imunitas Humoral.....	10
2.2.2.2 Imunitas Seluler	11
2.2.2.3 Aktivasi Sel T	11

2.2.2.4	Peran Sel T CD8+ dalam Penyakit TB	15
2.3	Imunisasi.....	18
2.3.1	Pengertian	18
2.3.2	Jenis-jenis Imunisasi Aktif.....	18
2.3.3	Rute Pemberian Imunisasi.....	19
2.3.4	Cara Kerja Vaksin.....	20
2.3.5	Ajuvan	21
2.3.5.1	Pengaruh Pemberian IFA Terhadap Sistem Imun.....	22
2.4	Mycobacterium tuberculosis Pili	22
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	25
3.2	Hipotesis Penelitian	26
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Desain Penelitian	27
4.2	Populasi Dan Sampel Penelitian	27
4.2.1	Pemilihan Sampel.....	27
4.2.2	Estimasi Jumlah Sampel	27
4.3	Variabel Penelitian	28
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	28
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	29
4.5.1	Alat dan Bahan Elektrofesis SDS-PAGE	29
4.5.2	Alat dan Bahan Untuk Vaksinasi Subkutan.....	29
4.5.3	Alat dan Bahan Untuk Pembedahan dan Pengambilan Organ Mencit.....	29
4.5.4	Alat dan Bahan Persiapan Sampel Untuk Flowcytometry	29
4.6	Definisi Operasional.....	29
4.7	Prosedur Penelitian.....	30
4.7.1	Prosedur Elektrofesis SDS-PAGE	30
4.7.2	Prosedur Vaksinasi Subkutan.....	31
4.7.3	Prosedur Pembedahan.....	32
4.7.4	Prosedur Persiapan Sampel untuk Flowcytometri.....	33
4.8	Analisis Data.....	33



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian	34
5.1.1 Profil Crude Pili Mycobacterium tuberculosis H37Rv	34
5.1.2 Jumlah Sel T CD8 ⁺	35
5.2 Analisis Data	38
5.2.1 Uji One Way ANOVA (Sampel Limpa dan Paru)	38
5.2.2 Uji Kruskal-Wallis (Sampel Darah)	39

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Sistem Imun Natural Mampu Mengeradikasi Antigen Sejak Awal	42
6.2 Penggunaan Ajuvan dan Preparasi Pemberian Adjuvan	42
6.3 Penghitungan Dosis Vaksin dan Kadar Pili yang Tepat dalam Pemberian Injeksi	44
6.4 Perbedaan Respon Sel T Naif terhadap Jumlah dan Sifat Ligan yang Dipresentasikan oleh APC	44

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	46
7.2 Saran	46

DAFTAR PUSTAKA	47
----------------------	----

LAMPIRAN	50
----------------	----

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	53
-----------------------------------	----



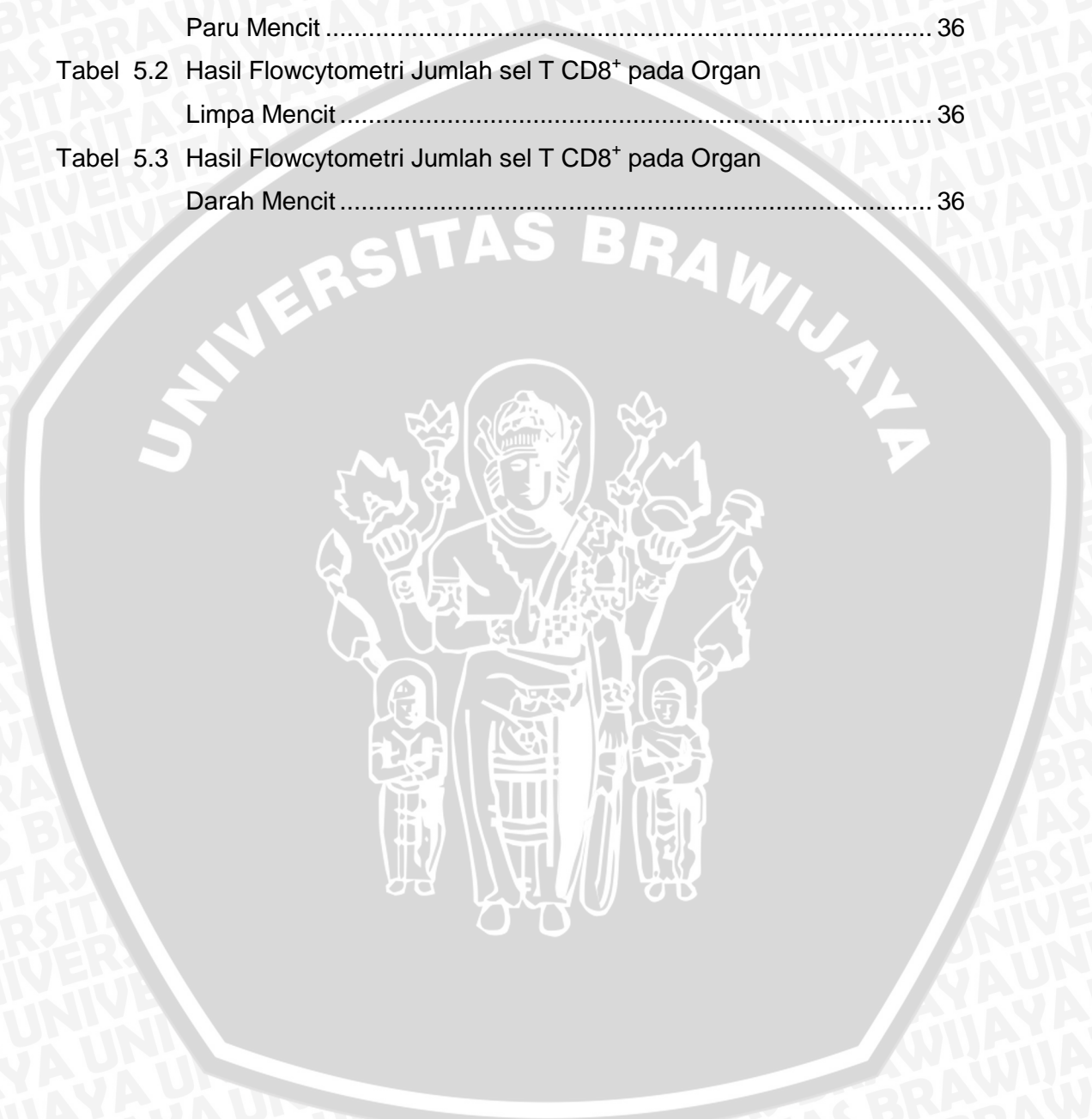
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Proses Fagositosis Dan Penghancuran Mikroba Dalam Fagolisosom	12
Gambar 2.2	Proses MHC II Mempresentasikan Antigen.....	13
Gambar 2.3	Proses MHC I Mempresentasikan Antigen.....	15
Gambar 2.4	(A) Sel T CD8 ⁺ Menghasilkan Sitokin IFN- γ dan TNF- α Yang Dapat Mengaktivasi Makrofag Untuk Dapat Lebih Kuat Dalam Menghancurkan MTB seperti CD4 ⁺	17
	(B) Aktivitas sitotoksik sel T CD8 ⁺	17
Gambar 2.5	MTP Yang Terlihat Pada Mikroskop Elektron.....	24
Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	25
Gambar 5.1	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Crude Pili.....	35



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8 ⁺ pada Organ Paru Mencit	36
Tabel 5.2 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8 ⁺ pada Organ Limpa Mencit	36
Tabel 5.3 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8 ⁺ pada Organ Darah Mencit	36



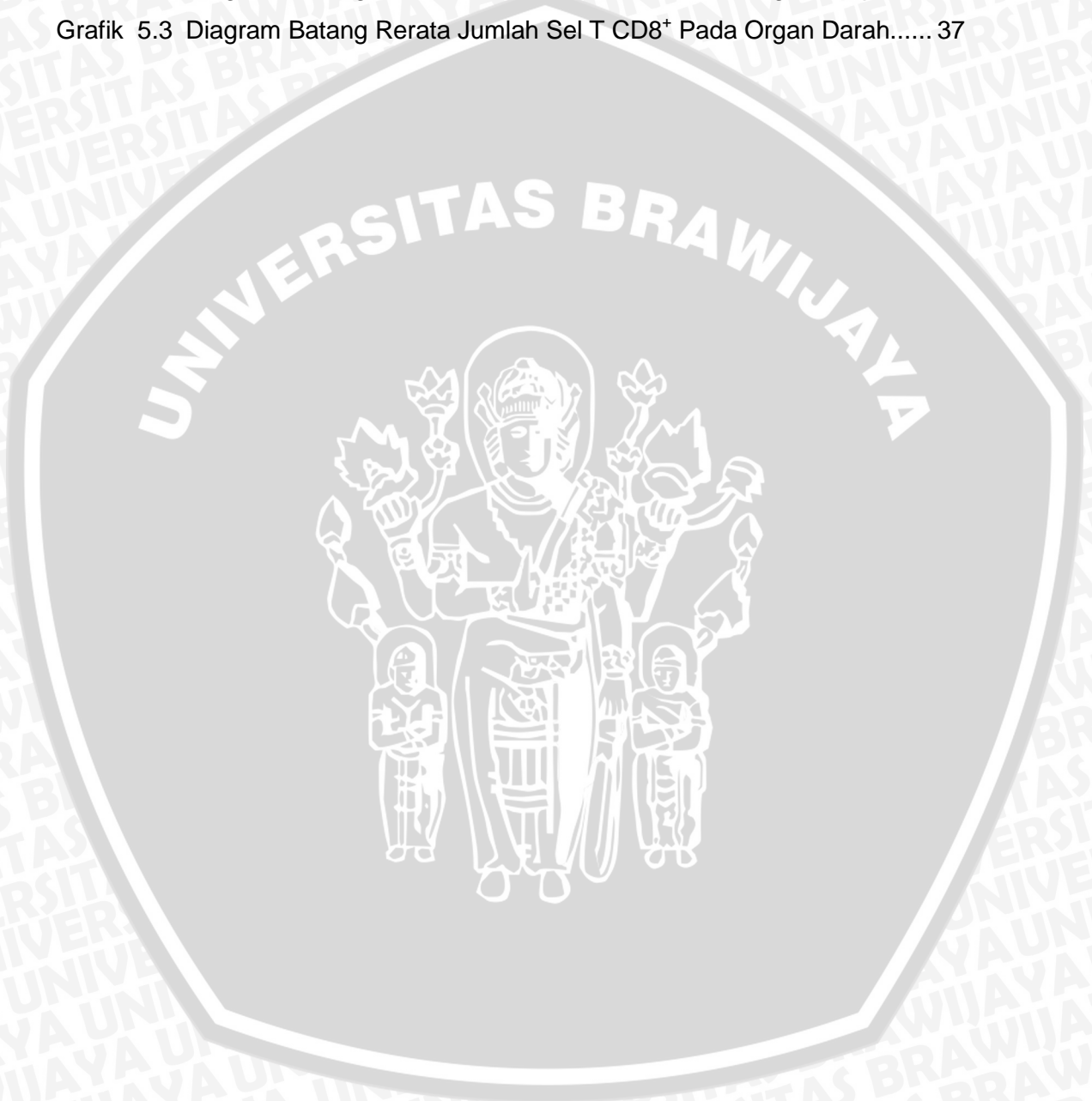
DAFTAR SINGKATAN

MTB	: Mycobacterium tuberculosis
IFA	: Incomplete Freund Adjuvant
BCG	: <i>Bacillus Calmette Guerin</i>
MHC	: Major histocompatibility complex
APC	: Antigen presenting cell
TBC	: Tuberculosis
BTA	: Basil tahan asam
CFA	: Complete Freund adjuvant
NK cell	: Natural killer cell
ROIs	: Reactive oxygen intermediates
TCR	: T cell receptor
RE	: Reticulum endoplasm
NO	: Nitric oxide
IFN	: Interferon
MTP	: Mycobacterium tuberculosis pili



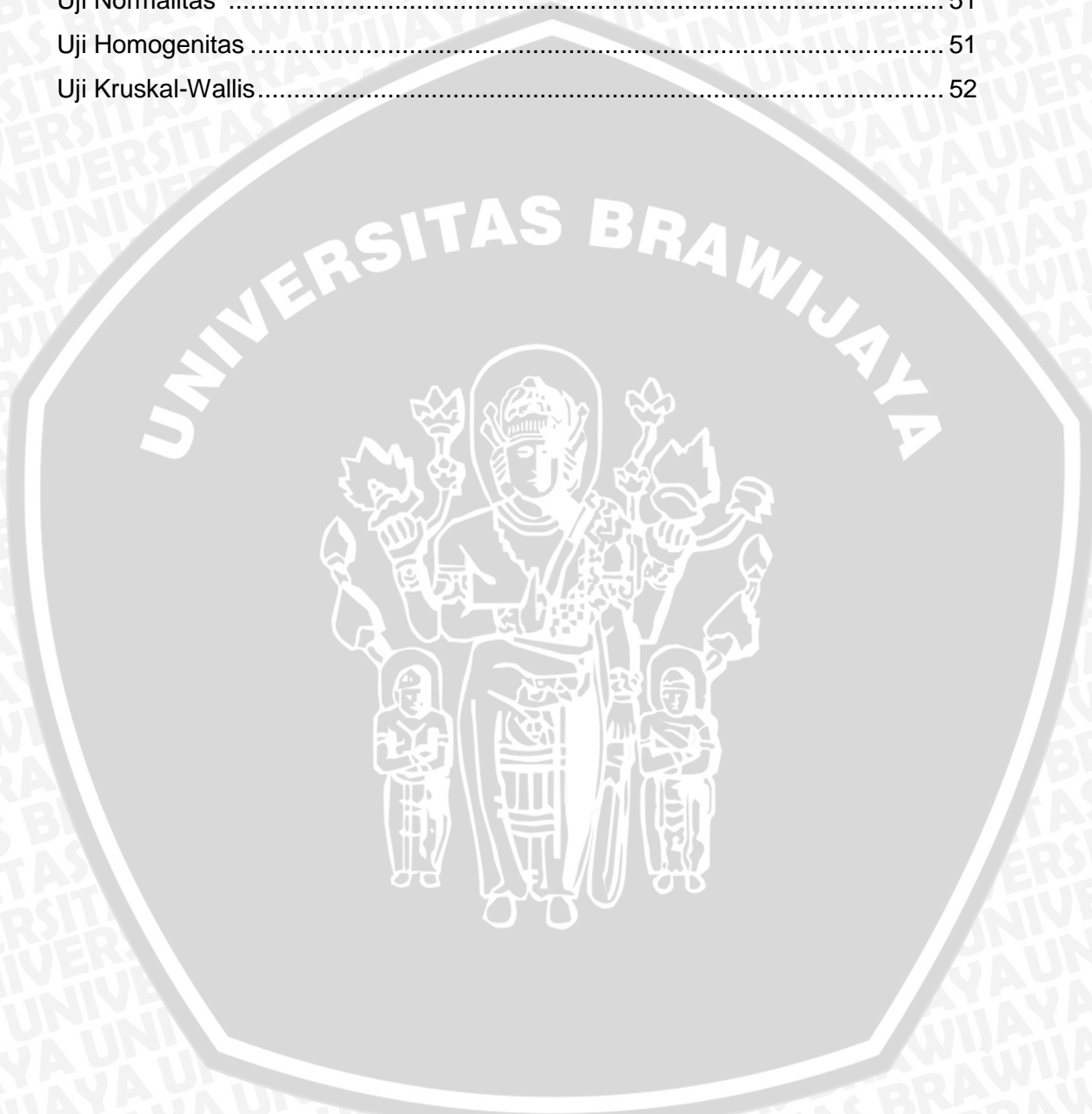
DAFTAR GRAFIK

- Grafik 5.1 Diagram Batang Rerata Jumlah Sel T CD8⁺ Pada Organ Paru..... 37
- Grafik 5.2 Diagram Batang Rerata Jumlah Sel T CD8⁺ Pada Organ Limpa..... 37
- Grafik 5.3 Diagram Batang Rerata Jumlah Sel T CD8⁺ Pada Organ Darah..... 37



DAFTAR LAMPIRAN

Penghitungan Berat Moleku <i>Crude Pili</i>	50
Uji Normalitas	51
Uji Homogenitas	51
Uji Kruskal-Wallis.....	52



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sepertiga penduduk dunia terinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), yang dikenal dengan penyakit tuberculosis (Palma, 2011). Sebanyak 80% dari kasus diperkirakan terjadi di 22 negara berkembang termasuk Indonesia (Lantos-Hyde, 2010). Indonesia menduduki peringkat kelima setelah India, Cina, Afrika Selatan, dan Nigeria dari 22 negara yang memiliki angka penyakit TB tertinggi (U.S. Global Health Policy, 2010). *Global Tuberculosis Control Report* milik WHO tahun 2009 melaporkan bahwa di Indonesia terdapat 528.063 kasus baru terjadi dengan *incident rate* 102 sputum positif BTA (basil tahan asam) baru per 100.000 populasi di tahun 2007 (USAID, 2009), dan mengalami peningkatan yakni 139 kasus baru per 100.000 populasi di tahun 2008 (Lantos-Hyde, 2010).

Salah satu metode pencegahan TB adalah penggunaan vaksin BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) yang ditemukan pada tahun 1921 oleh Albert Calmette dan Camille Guerin (Amin dan Bahar, 2006). Vaksin ini dibuat dari *Mycobacterium bovis* yang sudah dilemahkan. Vaksin ini bekerja dengan merangsang imunitas adaptif pada tubuh manusia (Amin dan Bahar, 2006). Ada dua tipe imunitas adaptif yakni imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas humoral dimediasi oleh sel limfosit B dan produknya yaitu antibodi, sedangkan imunitas seluler dimediasi oleh sel limfosit T dan makrofag (Kumar *et al.*, 2010). Sel T mengenali antigen spesifik melalui *T cell receptor* (TCR) terhadap antigen peptida yang dipresentasikan oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC) pada permukaan *antigen presenting cell* (APC) (Krogsgaard dan Davis,

2005). Sel T juga mengekspresikan protein lainnya yang membantu respon fungsional kompleks TCR, yaitu CD2, CD4, CD8, dan CD28 (Davis *et al.*, 2003). Imunitas anti MTB dimediasi oleh sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ (Pramod and Gopal, 2008).

Vaksin BCG dinilai memiliki banyak kekurangan dan memiliki efektivitas yang bervariasi, yaitu antara 0-80%. Penyebabnya adalah karena adanya lokus yang mengalami delesi pada galur vaksin BCG. Lokus yang hilang di antaranya adalah RD1-RD16. Lokus ini mengandung faktor-faktor virulensi *Mycobacterium*. Kemungkinan lokus ini mengalami delesi selama proses untuk mendapatkan galur *M. bovis* yang tidak lagi virulen (Raekiansyah, 2005). Selain itu, hasil penelitian vaksin ini pada 360.000 orang di Chingleput, India, membuktikan bahwa vaksinasi BCG pada masa anak-anak tidak memberikan perlindungan terhadap tuberkulosis pada usia dewasa (Kaufmann dan Hahn, 2003). Selain itu, vaksin BCG tidak mampu mencegah reaktivasi infeksi laten paru yang merupakan sumber utama penyebaran bakteri MTB di masyarakat. Oleh karena itu dampak vaksinasi BCG pada transmisi MTB bersifat terbatas (WHO, 2011).

Selain jenis vaksin *live attenuated*, terdapat 5 jenis vaksin lainnya, salah satunya adalah jenis vaksin subunit. Vaksin subunit tidak menggunakan mikroba utuh, melainkan antigen mikroba. Berbeda dengan vaksin *live attenuated*, kemungkinan untuk timbulnya reaksi samping adalah lebih rendah, oleh karena komponen di dalam subunit vaksin tidak mampu untuk mengalami replikasi. Vaksin ini menggunakan antigen-antigen yang diketahui merangsang respon imun terhadap mikroba tersebut. Jenis vaksin ini dapat mengandung 1-20 jenis antigen. Contoh antigen yang dapat digunakan adalah polisakarida, pili, atau protein mikroba (NIAID, 2009).

Penelitian Alteri (2007) menunjukkan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* memproduksi pili. Melalui pengamatan menggunakan mikroskop electron didapati semacam jaring yang terdiri dari kumpulan serat tipis (lebar 2-3 nm) yang tergulung menyerupai pili yang memanjang beberapa mikron dari permukaan bakteri. Diketahui pili ini bersifat imunogenik terbukti dengan terjadinya peningkatan antibody spesifik (IgG anti-MTP) pada pemeriksaan serum penderita TB (Alteri *et al.*, 2007)

Untuk memperoleh hasil penelitian yang signifikan tentang imugenitas pili MTB terhadap sel T CD8+, maka perlu juga dilihat reaksi imun tubuh terhadap pemberian pili plus ajuvan (Abbas and Lichtmann, 2004). Ajuvan yang dipakai adalah ajuvan IFA untuk menghindari bias dari kemungkinan respon imun yang disebabkan antigen yang terdapat pada ajuvan CFA (AALAS, 2005).

Telah diketahui pula bahwa terdapat empat rute utama pemberian vaksin, yaitu oral, subkutan, intramuskular, dan intranasal. Rute pemberian menentukan kecepatan respon imun terhadap vaksin. Pemilihan rute pemberian menjadi penting oleh karena rute pemberian yang tepat akan merangsang respon imun yang tepat, tergantung pada tempat utama terjadi invasi patogen (Belyakov and Ahlers, 2009). Selain itu, jumlah sel dendrit banyak didapatkan di dermis. Pemberian secara subkutan disebutkan mampu menginduksi respon imun yang baik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah *crude pili M. tuberculosis* dapat menginduksi sel T CD8+ pada limpa, paru, dan darah mencit setelah pemberian secara subkutan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa *Crude pili M. tuberculosis* dapat menginduksi peningkatan jumlah sel T CD8+ pada limpa, paru, dan darah mencit pada pemberian secara subkutan.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui persentase sel T CD8+ pada limpa, paru, dan darah mencit setelah pemberian *Crude pili M. tuberculosis* melalui jalur subkutan.

1.3.2.2 Mengetahui persentase sel T CD8+ pada limpa, paru, dan darah mencit setelah pemberian *Crude pili M. tuberculosis* dengan ajuvan IFA melalui subkutan.

1.3.2.3 Membandingkan persentase sel T CD8+ setelah pemberian *Crude pili M. tuberculosis* pada limpa, paru, dan darah mencit dengan ajuvan IFA dan tanpa ajuvan IFA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi dasar untuk penelitian lanjutan mengenai vaksin *M. tuberculosis* yang lebih baik.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat menunjukkan bahwa *crude pili M.tbc* dapat digunakan sebagai bahan vaksin subunit untuk mencegah penyakit tuberculosis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberculosis (TB)

2.1.1 Virulensi *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis (MTB) mengandung tiga konstituen utama yang berperan pada reaksi imun tubuh, yang terdapat pada dinding sel bakteri, yaitu lipid, protein, dan polisakarida. Lipid adalah penyusun terbesar dari dinding sel bakteri. Salah satunya adalah asam mikolat (asam lemak rantai panjang C78-C90) yang berperan pada kemampuan bakteri untuk bertahan hidup di dalam makrofag. Selain asam mikolat, *mycobacterium* mengandung berbagai macam protein yang mampu merangsang reaksi imun seperti pada uji tuberkulin. (Brooks *et al.*, 2007).

Antigen-antigen *M. tuberculosis* yang telah diketahui adalah sebagai berikut; bakteri *M. tuberculosis* memiliki lipoprotein dengan berat molekul 38 kDa (Immunol, 2009). *M. tuberculosis* mempunyai 60 kDa chaperonin 1, protein yang berfungsi menginduksi pembentukan polipeptida (Fleishmann *et al.*, 2002).

2.1.2 Patofisiologi Tuberculosis

Tempat masuk bakteri *M. tuberculosis* adalah saluran pernafasan, saluran pencernaan (GI), dan luka terbuka pada kulit. Kebanyakan infeksi TB terjadi melalui udara, yaitu melalui inhalasi droplet yang mengandung bakteri-bakteri basil tuberkel yang berasal dari orang yang terinfeksi. Gumpalan basil yang lebih besar cenderung tertahan di saluran hidung dan cabang besar bronkus, sedangkan sekitar 10% mencapai alveoli (Sylvia, 2002).

Setelah berada di dalam ruang alveolus, bakteri MTB akan diingesti oleh makrofag alveolar. Aktivitas bakterisidal makrofag dan virulensi MTB menentukan berhasil tidaknya proses fagositosis oleh makrofag. MTB yang tidak resisten terhadap fagositosis akan dihancurkan oleh enzim proteolitik yang dihasilkan oleh makrofag dan MTB yang resisten terhadap fagositosis akan bermultiplikasi di dalam makrofag, dan menyebabkan makrofag mengalami lisis. MTB yang terfagosit oleh makrofag akan dipresentasikan ke sel T naif di limfonodi regional dan merangsang respon imun seluler. Sel T akan teraktivasi dan akan mengaktifkan makrofag, yang berasal dari monosit dari peredaran darah. MTB yang terlepas dari makrofag akan difagosit oleh makrofag yang telah teraktivasi ataupun dihambat perkembangannya dengan respon kerusakan jaringan. Limfosit akan meningkat di daerah lesi tersebut, dan bersama-sama dengan makrofag dan basil-basil tuberkel, membentuk sebuah lesi granulomatosa. Lesi ini mampu menghambat pertumbuhan MTB di dalam makrofag. MTB yang berada di lesi akan menghasilkan produk bakteri yang akan menghancurkan makrofag dan juga menyebabkan terbentuknya daerah nekrosis di tengah-tengah lesi. Tingkat oksigen dan pH yang rendah akan menghambat pertumbuhan MTB. Sebagian lesi akan mengalami fibrosis dan kalsifikasi. (Kasper *et al.*, 2007).

Pada kasus-kasus tertentu, respon aktivasi makrofag tidak muncul atau lemah, dan pertumbuhan bakteri hanya dapat dihambat oleh reaksi DTH secara intensif. Lesi akan membesar, dan jaringan di sekitar lesi akan mengalami kerusakan secara progresif dan struktur kaseosa pada sentral lesi akan mencair. Materi kaseosa yang mencair dan mengandung bakteri dalam jumlah yang besar akan mengalir menuju bronkus. Di sana bakteri akan tumbuh dengan sangat baik dan tersebar ke udara melalui sputum yang dikeluarkan dari jalan nafas (Kasper

et al., 2005). Kaseosa yang mengalami pengenceran juga menyebabkan basil MTB dapat menyebar di dalam paru-paru, atau ke jaringan tubuh lainnya melalui sistem limfatik atau melalui pembuluh darah. Jika bakteri MTB telah menyebar ke luar paru-paru, maka ini akan menjadi tuberkulosis miliar (Steinberg, 2008).

2.2 Sistem Imun

Imunitas adalah ketahanan terhadap penyakit, terutama penyakit infeksi. Sistem imun adalah sel-sel, jaringan, dan molekul yang memediasi ketahanan terhadap infeksi dan reaksi yang terkoordinasi dari sel-sel dan molekul ini disebut dengan respon imun. Fungsi dari sistem imun ini adalah untuk mencegah dan mengeradikasi infeksi yang timbul (Abbas dan Lichtman, 2004).

Mekanisme pertahanan tubuh ini dibagi menjadi 2, yaitu imunitas natural dan imunitas spesifik. Imunitas natural (*innate immunity*) adalah suatu mekanisme pertahanan awal yang berlangsung cepat dan tidak spesifik terhadap patogen. Sedangkan imunitas spesifik (*adaptive immunity*) responnya timbul lebih lama namun bersifat spesifik, yaitu mengenali ciri khas dari suatu mikroba tersebut (Abbas dan Lichtman, 2004). Meskipun respon sistem imun adaptif tidak secepat imunitas natural, namun daya hancur dari sistem pertahanan ini lebih kuat dibandingkan dengan imunitas natural (Mitchell dan Kumar, 2007).

2.2.1 Imunitas natural

Imunitas natural adalah sistem pertahanan tubuh awal yang mampu mengontrol dan juga mengeradikasi infeksi sebelum sistem imun adaptif aktif. Selain itu, sistem imun natural juga akan mengaktifkan sistem imun adaptif untuk membentuk suatu sistem imun yang bersifat spesifik terhadap mikroba (Abbas

dan Lichtman, 2004). Komponen utama sistem imun natural adalah *epithelial barriers*, sel-sel fagosit terutama neutrofil dan makrofag, sel dendrit, *natural killer cell (NK cell)*, dan beberapa protein plasma misalnya komplemen (Kumar *et al.*, 2010).

2.2.1.1 Fagositosis

Sel-sel yang memiliki kemampuan fagositosis adalah netrofil, monosit, makrofag, dan sel dendrit. Fagositosis adalah proses di mana fagosit memanjangkan membran plasmanya mengelilingi mikroba, dan mengingesti mikroba tersebut dalam satu vesikel yang disebut fagosom (Abbas dan Lichtmann, 2004). Fagosom kemudian akan berdifusi dengan lisosom, menjadi fagolisosom. Di dalam fagolisosom, terdapat *lysosomal protease* yang berfungsi menghancurkan protein mikroba. Selain itu, molekul oksigen akan diubah menjadi RIOs (*Reactive Oxygen Intermediates*) yang bersifat toksik terhadap mikroba. Di dalam fagolisosom juga terdapat NO yang bersifat mikrobisida dan pH di dalam fagolisosom yang sangat asam. Mikroba akan mengalami degradasi di dalam fagolisosom (Abbas dan Lichtmann, 2004).

2.2.1.2 Antigen Presenting Cells (APCs)

Respon imun adaptif akan muncul ketika reseptor antigen di limfosit mengenali antigen. Limfosit B dan limfosit T mengenali antigen yang berbeda. Pada limfosit B, reseptor antigennya adalah antibodi, dan antigen yang dikenalnya adalah berbagai jenis makromolekul (protein, polisakarida, lemak, dan asam nukleat), bahan kimia yang bersifat larut, dan permukaan mikroba. Limfosit T hanya mampu mengenali fragmen peptida dari protein antigen.

Jenis reseptor dan antigen dari masing-masing respon imun adalah berbeda. Sebagian besar limfosit T mengenali peptida antigen yang terikat dan ditampilkan oleh molekul MHC yang ada di APC. APC adalah sel yang terspesialisasi untuk menangkap antigen mikroba dan menyajikannya untuk dikenali oleh sel limfosit T yang ada di organ limfoid perifer.

Contoh APC adalah sel dendrit, makrofag, dan limfosit B. APC utama adalah sel dendrit. Sel dendrit terdapat di epitel, jaringan ikat, organ parenkim, limfonodi (terhadap antigen yang ada di pembuluh limfe), dan di limpa (terhadap antigen yang terdapat di pembuluh darah). Sel dendrit menangkap antigen dengan cara fagositosis. Sel dendrit kemudian akan mengalami penurunan kemampuan adhesifnya dan lalu akan meninggalkan epitel dengan membawa antigen menuju limfonodi perifer (Abbas dan Lichtmann, 2004).

Sel dendrit juga mengekspresikan reseptor terhadap kemoatraktan yang diproduksi di daerah limfonodi. Sel dendrit akan tertarik dan menuju limfonodi. Selama proses migrasi, sel dendrit akan mengalami maturasi dari sel yang didesain untuk menangkap antigen, menjadi APC yang mampu menstimulasi sel T. Maturasi ini terlihat dari peningkatan sintesis dan ekspresi molekul MHC serta kostimulator (Abbas dan Lichtmann, 2004).

2.2.2 Imunitas adaptif

Respon Imun adaptif adalah respon imun yang dimediasi oleh limfosit dan akan aktif jika mikroba dan atau antigen dari mikroba mampu melewati *epithelial barriers* dan dipresentasikan ke limfosit di organ limfoid, oleh APC. (Abbas dan Lichtman, 2004). Ada 2 tipe imunitas adaptif, yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas humoral bekerja terhadap mikroba ekstraseluler dan toksin,

sedangkan imunitas seluler bekerja terhadap mikroba intraseluler atau sudah difagosit oleh makrofag. Imunitas humoral dimediasi oleh sel limfosit B dan produknya yaitu antibodi (imunoglobulin), sedangkan imunitas seluler dimediasi oleh sel limfosit T (Kumar *et al.*, 2010).

2.2.2.1 Imunitas Humoral

Sel limfosit B memiliki reseptor yang mengenali antigen yang berbeda dengan reseptor limfosit T. Limfosit B mampu mengenali makromolekul (protein, polisakarida, lemak, dan asam nukleat). Menurut kamus biokimia Oxford (2012), makromolekul adalah molekul yang terdiri atas atom-atom, dengan berat molekul di atas 10 kDa. Selain itu, imunitas humoral dapat mengenali bentuk zat kimia yang terlarut, dan permukaan dinding mikroba. Itu sebabnya respon imun humoral dapat muncul terhadap dinding bakteri dan antigen yang larut (*soluble*). Imunitas humoral dimediasi oleh antibodi, yang dihasilkan oleh limfosit B. Antibodi disekresikan ke dalam sirkulasi dan cairan mukosa. Fungsi antibodi adalah untuk mengeliminasi mikroba dan toksin yang terdapat di dalam darah dan lumen mukosa (Abbas dan Lichtman, 2004).

Sistem imunitas humoral diaktifkan melalui dua jalur, yaitu jalur *T-dependent* dan jalur *T-independent*. Pada jalur *T-dependent*, antigen-antigen protein akan diproses oleh APC dan akan mengaktifkan sel T CD4⁺. Sel T CD4⁺ akan teraktivasi menjadi Th1 dan Th2. Th2 adalah berfungsi mengaktifkan sel B menjadi sel plasma. Sedangkan pada jalur *T-independent*, polisakarida, lemak, dan antigen non-protein lainnya dapat langsung merangsang sel B dengan berikatan pada reseptor sel B. (Abbas dan Lichtmann, 2004).

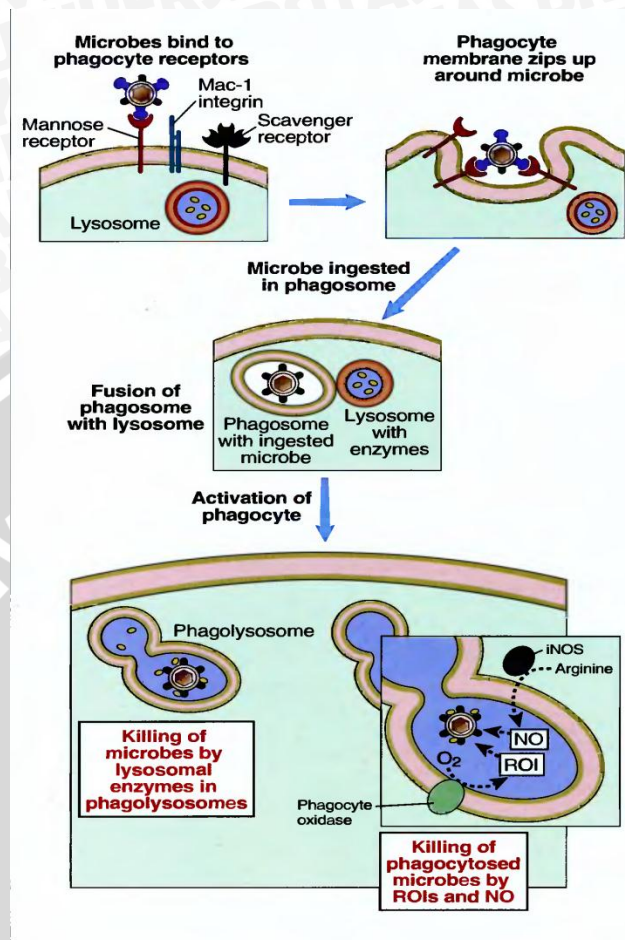
2.2.2.2 Imunitas Seluler

Imunitas seluler dimediasi oleh limfosit T. Sel limfosit T, hanya dapat mengenali fragmen peptida dari antigen protein mikroba, dan hanya jika fragmen peptida ini dipresentasikan oleh APC. Fragmen peptida mengacu pada fragmen dari protein hasil degradasi enzimatik (Webster dan Oxley, 2005).

Limfosit T dibagi menjadi tiga, yaitu sel T CD4+ (*T helper*), sel T CD8+ (*T cytotoxic*), dan *Natural Killer Cells (NK cells)*. Sel T CD4+ dan CD8+ mampu mengenali fragmen peptida dari antigen mikroba pada MHC yang dipresentasikan oleh APC. Sel T CD4+ mempunyai reseptor terhadap MHC kelas II dan sel T CD8+ mempunyai reseptor terhadap MHC kelas I (Abbas dan Lichtman, 2004).

2.2.2.3 Aktivasi Sel T

Antigen yang masuk ke dalam tubuh, akan dikenali oleh reseptor milik sel dendritik (APC) diantaranya adalah *N-formylmethionine-containing peptide receptor*, reseptor manosa, reseptor integrin (Mac-1), dan *scavenger receptor*. Setelah reseptor-reseptor tersebut berikatan dengan komponen infeksi mikroba, maka akan muncul reaksi seluler dan ekstraseluler untuk memfagosit mikroba tersebut. Fagositosis adalah proses di mana fagosit (APC) memanjangkan membran plasmanya mengelilingi mikroba, dan menengesti mikroba tersebut dalam satu vesikel yang disebut fagosom (Abbas dan Lichtmann, 2004).



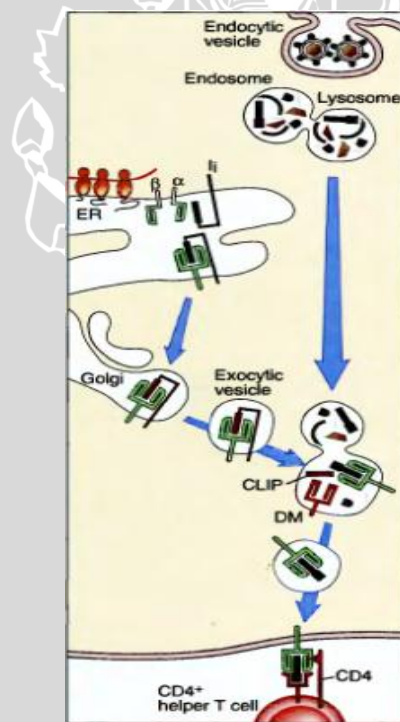
Gambar 2.1 Proses fagositosis dan penghancuran mikroba dalam fagolisosom (Abbas dan Lichtmann, 2004). Sel dendritik mengekspresikan berbagai macam reseptor yang mengenali mikroba yang akan mengakibatkan fagositosis terhadap mikroba tersebut. Mikroba akan bergabung dengan lisosom dan akan terjadi penghancuran oleh enzim dan substansi yang terdapat pada lisosom.

Fagosom kemudian akan berdifusi dengan lisosom, menjadi fagolisosom.

Di dalam fagolisosom, terdapat lysosomal protease yang berfungsi menghancurkan protein mikroba. Selain itu, molekul oksigen akan diubah menjadi ROIs (*Reactive Oxygen Intermediates*) yang bersifat toksik terhadap mikroba. Di dalam fagolisosom juga terdapat NO yang bersifat mikrobisida dan pH di dalam fagolisosom yang sangat asam. Akibatnya mikroba akan mengalami degradasi dan sebagian fragmen mikroba akan dipresentasikan oleh makrofag

dan diperkenalkan pada sel T yang terdapat di organ limfodi (Huynh dan Greinstein, 2007).

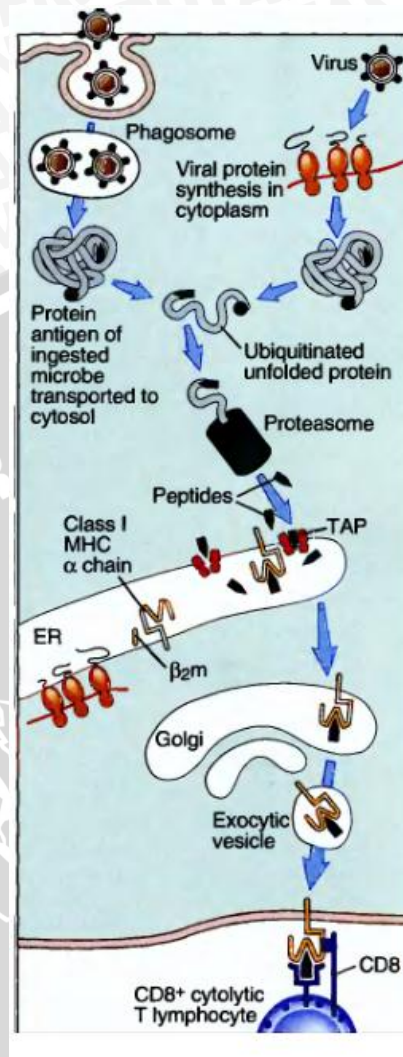
Dalam proses memperkenalkan fragmen mikroba pada sel T, fragmen mikroba tersebut akan dipresentasikan dalam bentuk MHC II. MHC ini, dihasilkan di retikulum endoplasma APC. MHC II ini akan disekresi dalam vesikel dan lalu akan mengalami fusi dengan vesikel endosom yang telah berisi peptide hasil fagositosis. Hasil fusi ini akan menyebabkan peptide menempati celah yang terdapat pada MHC II. Vesikel lalu akan menuju permukaan APC dan siap untuk menempel pada TCR (*T Cell Receptor*) dari sel T $CD4^+$ (Abbas dan Lichtmann, 2004).



Gambar 2.2 Proses MHC II mempresentasikan antigen (Abbas dan Lichtmann, 2004). Antigen protein yang difagosit oleh APC masuk ke dalam vesikel yang selanjutnya akan terjadi degradasi menjadi peptida. Kemudian MHC II memasuki vesikel tersebut dan mengikat peptida yang sudah di degradasi. Kompleks MHC II dan peptida bergerak menuju permukaan sel dan siap untuk dipresentasikan.

Selain itu, ada proses lain untuk memperkenalkan fragmen mikroba pada sel T. Setelah mikroba mengalami degradasi, fragmen mikroba dapat lolos ke sitoplasma dan akan dipresentasikan dalam bentuk MHC I. MHC ini akan diproduksi pada saat ada infeksi intraseluler atau adanya protein asing yang masuk ke dalam sitoplasma APC dari hasil penghancuran mikroba di lisosom. Di dalam sitosol, protein antigen tersebut akan dibuka lipatnya melalui proses proteolisis yang kemudian akan dikenali oleh peptida khusus (*ubiquitin*) dan akan membawa protein tersebut ke dalam organela yang disebut dengan proteasome, yang akan mendegradasi protein tersebut. Hasil degradasi protein akan dibawa oleh pentransport (TAP) ke dalam RE dan di RE, peptida hasil degradasi akan menempati celah pada MHC I. MHC lalu dikeluarkan dalam bentuk vesikel ke permukaan APC dan MHC I akan mengaktifasi sel T CD8⁺ (CTL). (Abbas and Lichtmann, 2004).

Sel T lalu akan terangsang dan mensekresi IL-2 serta reseptor IL-2. IL-2, atau *T Cell Growth Factor*, akan menginduksi proliferasi sel T naif, 1-2 hari setelah infeksi. Hasil dari proliferasi ini adalah peningkatan secara cepat jumlah sel limfosit yang spesifik terhadap antigen, atau yang biasa disebut *clonal expansion*. Sebagian dari sel limfosit yang sudah teraktivasi ini mengalami suatu proses diferensiasi, yaitu konversi sel T naif menjadi populasi sel efektor yang berfungsi untuk mengeliminasi mikroba. Jenis lainnya dari sel T yang telah berproliferasi akibat respon terhadap antigen berkembang menjadi sel T memori, yang dapat hidup lama, inaktif, dan bersirkulasi selama berbulan atau bertahun-tahun serta dapat secara cepat berespon terhadap pajanan oleh mikroba yang sama (Abbas dan Lichtmann, 2007).



Gambar 2.3 Proses MHC I mempresentasikan antigen (Abbas dan Lichtmann, 2004). Protein atau antigen masuk ke dalam sitoplasma dari fagolisosom atau hasil sintesis di dalam sitoplasma. Selanjutnya protein tersebut dibuka lipatnya, berikatan dengan ubiquitin, dan didegradasi oleh proteasom menjadi peptida. Peptida ditransportasikan oleh TAP ke RE dan berikatan dengan MHC I. Kompleks MHC I dan peptida bergerak menuju permukaan sel dan siap untuk dipresentasikan.

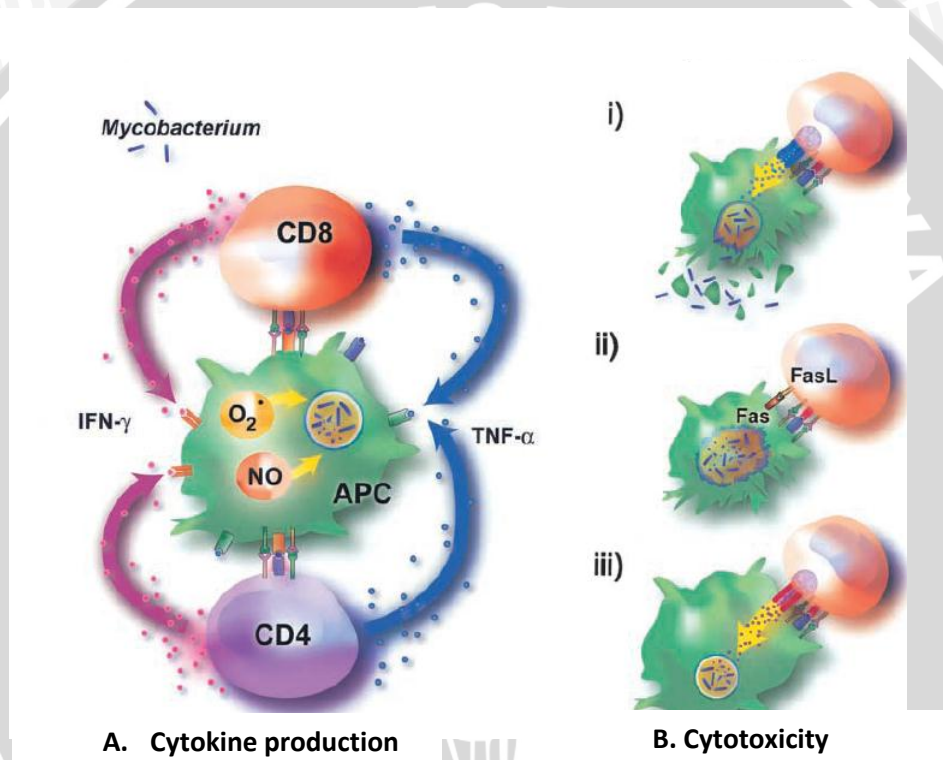
2.2.2.4 Peran Sel T CD8⁺ dalam Penyakit TB

Sel T CD8⁺ memiliki peran penting dalam keberhasilan sistem pertahanan tubuh terhadap MTB (Lewinsohn *et al.*, 2003). Sel T CD8⁺ memiliki beberapa mekanisme dalam melawan MTB yaitu melalui jalur produksi sitokin dan melalui

jalur sitotoksik. Pada jalur produksi sitokin, sel T CD8⁺ mengeluarkan sitokin tipe 1 yaitu IFN- γ dan TNF- α yang dapat mengaktivasi makrofag untuk dapat lebih kuat dalam menghancurkan MTB dengan menghasilkan *reactive nitrogen intermediates* seperti *nitric oxide* (NO). *Reactive nitrogen intermediates* bersama dengan *reactive oxygen intermediates* memberikan efek antibakteri dengan menciptakan kondisi yang tidak viabel terhadap MTB. Namun hanya sekitar kurang dari 5% sel T CD8⁺ yang mengeluarkan IFN- γ dengan produksi yang cukup (Lazarevic and Flynn, 2002).

Pada jalur sitotoksik, ada 3 mekanisme sel T CD8⁺ dapat membunuh sel yang terinfeksi MTB. Pertama dengan *granule-dependent exocytosis pathway*, yaitu sel T CD8⁺ mengeluarkan protein yang bernama perforin (Lewinsohn *et al.*, 2003). Perforin ini akan membuat lubang pada membran sel makrofag sehingga granzim A dan granzim B (serin protease) yang merupakan molekul efektor dapat masuk ke dalam sel. Selanjutnya akan terjadi apoptosis ataupun lisis pada sel tersebut. Lisis yang tidak responsif akibat mekanisme ini akan menyebabkan makrofag yang terinfeksi MTB akan mengeluarkan MTB tersebut ke ekstraseluler. Selanjutnya MTB akan difagosit oleh makrofag lain yang telah aktif dan telah dipersenjatai lebih kuat sehingga akan lebih baik dalam membunuh MTB (Lazarevic and Flynn, 2002). Mekanisme kedua adalah *Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity*, yaitu dengan bergabungnya Fas ligand yang terdapat pada sel T CD8⁺ dengan Fas yang terdapat pada membran sel makrofag. Dengan bergabungnya antara Fas ligand dan Fas akan mengakibatkan mengaktifkan *Fas-associated death domain* dan caspase 8 yang memprogram apoptosis sel target. Mekanisme ketiga adalah *direct microbicidal activity*, yaitu sel T CD8⁺ mengeluarkan molekul protein antibakteri (granulisin) yang masuk ke dalam

makrofag melalui lubang yang dibuat oleh perforin. Granulisin adalah protein yang mirip dengan saposin yang berinteraksi dengan membran lipid bakteri dan mengaktifkan enzim degradasi lemak sehingga granulisin ini memiliki efek mikrobisida secara langsung terhadap MTB intraseluler. Granulisin menginduksi lesi pada permukaan bakteri, meningkatkan permeabilitas membran bakteri, dan memicu akumulasi cairan pada periplasma MTB (Lazarevic and Flynn, 2002).



Gambar 2.4 Mekanisme sel T CD8⁺ dalam penyakit TB (Lazarevic dan Flynn, 2002). (A) Sel T CD8⁺ menghasilkan sitokin IFN-γ dan TNF-α yang dapat mengaktifasi makrofag untuk dapat lebih kuat dalam menghancurkan MTB seperti CD4⁺. (B) Aktivitas sitotoksik sel T CD8⁺ yaitu: (i) sel T CD8⁺ menghancurkan sel yang terinfeksi MTB melalui *granule-dependent exocytosis pathway*, (ii) sel T CD8⁺ menghancurkan sel yang terinfeksi MTB melalui jalur *Fas/Fas ligand-mediated cytotoxicity*, (iii) sel T CD8⁺ menghancurkan sel yang terinfeksi MTB melalui jalur *direct microbicidal activity*.

2.3 Imunisasi

2.3.1 Pengertian

Imunisasi adalah suatu proses menstimulasi respon imun adaptif terhadap mikroba, baik secara aktif ataupun pasif. Imunisasi aktif adalah pemberian substansi antigen ke dalam tubuh sedangkan imunisasi pasif adalah pemberian substansi imun eksogen ke dalam tubuh (Kasper *et al.*, 2005). Pada imunisasi aktif, antigen mikroba, dengan atau tanpa adjuvan, diberikan untuk menginduksi respon imun terhadap infeksi mikroba. Antigen yang digunakan dapat berupa mikroorganisme yang tidak virulen, yang sudah dimatikan, ataupun komponen mikroorganisme yang telah dimurnikan, misalnya protein dan polisakarida. Pemberian vaksin ini akan merangsang pembentukan antibodi dan sel memori yang spesifik terhadap mikroba tertentu. (Abbas and Lichtman, 2004).

2.3.2 Jenis-jenis imunisasi aktif

Imunisasi aktif disebut juga dengan vaksinasi (Kasper *et al.*, 2005). Terdapat enam jenis imunisasi aktif, yaitu vaksin yang menggunakan mikroba yang dilemahkan, vaksin inaktif, vaksin subunit, vaksin toksoid, vaksin konjugat, vaksin DNA, dan vaksin yang menggunakan vektor rekombinan (NIAID, 2009).

Vaksin *live attenuated* mampu menginduksi respon imun yang bertahan lama. Vaksin ini diharapkan untuk menyebabkan timbulnya fase subklinis dan respon imun yang persis seperti infeksi alamiah oleh mikroba yang infeksius. Agen mikroba di dalam vaksin mampu bereplikasi di dalam tubuh, sehingga ekspresi antigennya banyak dan mampu menginduksi respon imun dengan satu dosis pemberian saja. Contoh vaksin ini adalah BCG (Kasper *et al.*, 2005). Namun, efektivitas BCG memiliki tingkat yang bervariasi, yaitu antara 0-80%.

Salah satu penyebabnya adalah karena hilangnya sejumlah lokus yang mengandung faktor-faktor virulensi. (Raekiansyah, 2005).

Vaksin subunit tidak menggunakan mikroba utuh, melainkan antigen mikroba. Berbeda dengan vaksin *live attenuated*, kemungkinan untuk timbulnya reaksi samping adalah lebih rendah, oleh karena komponen di dalam subunit vaksin tidak mampu untuk mengalami replikasi. Vaksin ini menggunakan antigen-antigen yang diketahui merangsang respon imun terhadap mikroba tersebut. Jenis vaksin ini dapat mengandung 1-20 jenis antigen (NIAID, 2009)

2.3.3 Rute Pemberian Imunisasi

Rute pemberian imunisasi menentukan kecepatan respon imun terhadap vaksin. Empat rute pemberian vaksin adalah melalui oral, intranasal, subkutan, dan intramuskular. Pemilihan rute pemberian menjadi penting oleh karena rute pemberian yang tepat akan merangsang respon imun yang tepat, tergantung pada tempat utama terjadi invasi patogen (Belyakov dan Ahlers, 2009). Salah satu rute pemberian yang banyak memiliki kelebihan adalah melalui jalur subkutan. Daerah subkutan memiliki banyak kapiler sehingga memungkinkan untuk terjadinya absorpsi zat. Injeksi subkutan biasanya merupakan metode pilihan pada hewan-hewan laboratorium yang kecil, oleh karena tingkat kemudahan dari metode ini, pilihan daerah subkutan yang banyak, dan peneliti juga dapat mendeposit volume yang besar (Kieślting, 2010).

Volume injeksi yang dapat diberikan maksimal adalah 0,1 ml per mencit dewasa (> 25 gram) dengan ukuran spuit 23 ga atau lebih besar lagi (Harkness dan Wagner, 2007). Dosis antigen yang dapat diberikan adalah sebesar 50-100 µg (Harlow dan Lane, 1988).

2.3.4 Cara Kerja Vaksin

Pemberian vaksin akan merangsang respon imun yang spesifik terhadap antigen (Kasper *et al.*, 2005). Prinsip kerja vaksin adalah seperti infeksi pada umumnya. Vaksin yang diberikan akan difagosit oleh makrofag ataupun sel dendrit. Misalnya di paru-paru, terdapat makrofag alveolar, di hepar terdapat sel kupffer, dan di kulit terdapat Langerhans. Selain berfungsi sebagai fagosit, sel dendrit dan makrofag juga berfungsi sebagai APC (*Antigen Presenting Cells*). Setelah difagosit, peptida hasil degradasi akan dipresentasikan melalui MHC II. Selama proses fagositosis ini, makrofag akan berjalan melalui pembuluh limfatik menuju organ limfodi perifer ataupun limpa, untuk mengaktifkan respon imun adaptif. Di organ limfodi perifer ataupun limpa, sel T naif akan mengenali APC melalui MHC II di permukaannya. Setelah berikatan dengan APC, makrofag akan terstimulasi untuk mengeluarkan sitokin, yaitu IL-12 ataupun IL-4. IL-12 berfungsi merangsang proliferasi sel T menjadi sel T efektor, yaitu sel *T helper 1* (Th1), sedangkan IL-4 akan merangsang proliferasi sel T menjadi sel efektor Th2. Setelah sel T menerima sinyal sitokin tersebut, sel T akan mensekresi IL-2 atau *T Cell Growth Factor*. IL-12 akan berikatan dengan reseptornya di sel T dan kemudian akan terjadi ekspansi klonal dan diferensiasi sel T menjadi sel T efektor (Th 1 atau Th2) dan sel memori. Sel Th 1 berfungsi mengaktifasi makrofag, melalui sitokin IFN- γ yang dihasilkannya, sehingga kemampuan fagositosis makrofag meningkat, sedangkan sel Th2 berfungsi mengaktifasi produksi imunoglobulin melalui sitokin IL-4 yang dihasilkannya. Hasil diferensiasi lainnya dari sel T adalah sel T memori, yang akan terus ada meski patogen penyebab infeksi sudah tidak ada. Sel T memori ini terdapat di organ limfoid, *barrier* mukosa, dan di sirkulasi. Dengan adanya sel memori, paparan antigen

yang sama akan menyebabkan respon imun adaptif yang lebih cepat. (Abbas and Lichtman, 2004).

2.3.5 Ajuvan

Ajuvan adalah substansi yang ditambahkan ke dalam vaksin dengan tujuan untuk meningkatkan respon imun terhadap vaksin (CDC, 2010). Adjuvan pertama kali diciptakan karena terdapat vaksin-vaksin yang memiliki tingkat imunogenitas yang rendah. Fungsi utama adjuvan adalah merangsang ekspresi kostimulator pada APC dan menstimulasi APC untuk mensekresi sitokin untuk mengaktivasi sel T (Abbas and Lichtmann, 2004).

Ajuvan diklasifikasikan berdasarkan asalnya (natural, sintetik, atau endogenous), mekanisme aksi, ataupun kandungan fisik atau kimiawinya. Salah satu ajuvan adalah *Freund's adjuvan*. Ajuvan ini dibagi menjadi dua, yaitu *complete freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete freund's adjuvant* (IFA). CFA mengandung *mannide monooleate*, minyak parafin, dan bakteri *M. tuberculosis* yang telah dimatikan, sedangkan IFA hanya mengandung *mannide monooleate* dan minyak parafin, sehingga IFA tidak seefektif CFA dalam menginduksi respon imun, juga tidak seperti CFA yang bersifat menginduksi inflamasi (AALAS, 2005).

Konsentrasi IFA yang digunakan adalah 1:1 dengan antigen. Jalur penyuntikan antigen-adjuvan yang biasa dipakai adalah subkutan dengan dosis antara 0,05 – 0,2 ml. Injeksi secara intradermal dapat menyebabkan nyeri akibat penimbunan cairan dalam kulit ditambah dengan cairan tubuh dan sel-sel darah putih yang juga masuk ke daerah injeksi. Injeksi secara intraperitoneal dapat menyebabkan peritonitis, granuloma, ataupun nyeri (AALAS, 2005).

2.3.5.1 Pengaruh Pemberian IFA Terhadap Sistem Imun

Menurut Linblad *et al.* (2007), pemberian adjuvan dapat merangsang respon sel limfosit T, menjadi Th1 atau Th2. Pada penelitian tersebut, didapatkan mencit yang diinjeksi dengan vaksin yang dikombinasi dengan IFA akan merangsang pembentukan Th1, dilihat dari sekresi IFN- γ yang meningkat, dibandingkan sekresi IL-4 ataupun IL-10 (penanda aktivasi Th2). Pada penelitian itu juga dijelaskan, bahwa pemberian IFA mampu merangsang pembentukan IFN- γ dan IgG dengan kadar yang tinggi.

Tabel 2.1 Jumlah IFN- γ dari limfonodi mencit yang diinjeksi dengan vaksin + ajuvan (Linblad *et al.*, 1997)

Vaccine	Cellular reactivity ^b	
	cpm (10 ³)	IFN- γ (pg/ml)
Saline-ST-CF	9.54 \pm 0.27	395 \pm 47.6
IFA-ST-CF^c	28.40 \pm 1.19	1,065 \pm 299.0
DDA-ST-CF	34.30 \pm 2.63	295 \pm 24.6
RIBI-ST-CF	30.20 \pm 0.38	760 \pm 48.1
Saponin-ST-CF	7.71 \pm 0.38	321 \pm 21.0
Al(OH) ₃ -ST-CF	28.20 \pm 0.28	465 \pm 42.5
BCG	6.13 \pm 0.68	405 \pm 36.1
Control	1.57 \pm 0.00	175 \pm 67.5

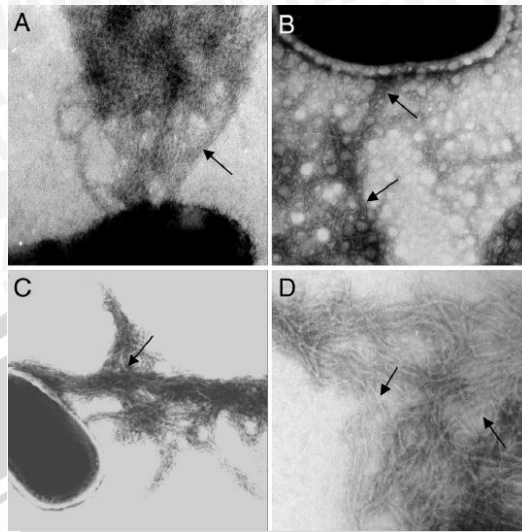
Meskipun pemberian IFA mampu merangsang peningkatan IFN- γ dan IgG, penggunaan IFA diketahui memiliki resiko menimbulkan efek inflamasi.

2.4 *Mycobacterium tuberculosis* Pili (MTP)

Banyak bakteri yang infeksi pada tanaman dan hewan memproduksi organela polimer yang bersifat adhesif yang bernama pili atau fimbriae untuk memperantarai perlekatan dan kolonisasi pada sel host (Finlay and Falkow,

1997). Pili merupakan struktur yang bersifat polimer, hidrofobik, dan tersusun dari protein yang biasanya terdiri dari subunit mayor berulang yang disebut pilin dan, terkadang, subunit minor pada ujungnya yang disebut adhesin. Pili terlibat dalam banyak fungsi virulensi seperti aglutinasi eritrosit manusia dan hewan, agregasi bakteri, pembentukan biofilm, perlekatan dan kolonisasi pada mukosa (Finlay and Falkow, 1997).

Pili terdapat pada banyak bakteri yang menyebabkan penyakit pada saluran respirasi manusia termasuk bakteri gram positif Group B *Streptococcus* dan *Corynebacterium diphtheria* (Ton-That and Schneewind, 2003). Belakangan ini diketahui bahwa *M. tuberculosis* juga memproduksi pili. Pada penelitian Alteri (2007), pengamatan dengan mikroskop elektron diketahui bahwa *M. tuberculosis* memproduksi semacam jaring yang terdiri dari kumpulan serat tipis (lebar 2-3 nm) yang tergulung menyerupai pili yang memanjang beberapa mikron dari permukaan bakteri. Bentuk ini disebut *Mycobacterium tuberculosis* Pili (MTP). MTP yang berhasil diisolasi memiliki berat molekul dibawah 30 kDa. MTP ini disandi oleh gen ORF RV3312A pada *M. tuberculosis* (Alteri *et al.*, 2007).



Gambar 2.5 MTP yang terlihat pada mikroskop elektron (panah hitam) (Alteri *et al.*, 2007). Diketahui bahwa *M. tuberculosis* memproduksi semacam jaring yang terdiri dari kumpulan serat tipis (lebar 2-3 nm) yang tergulung menyerupai pili yang memanjang beberapa mikron dari permukaan bakteri.

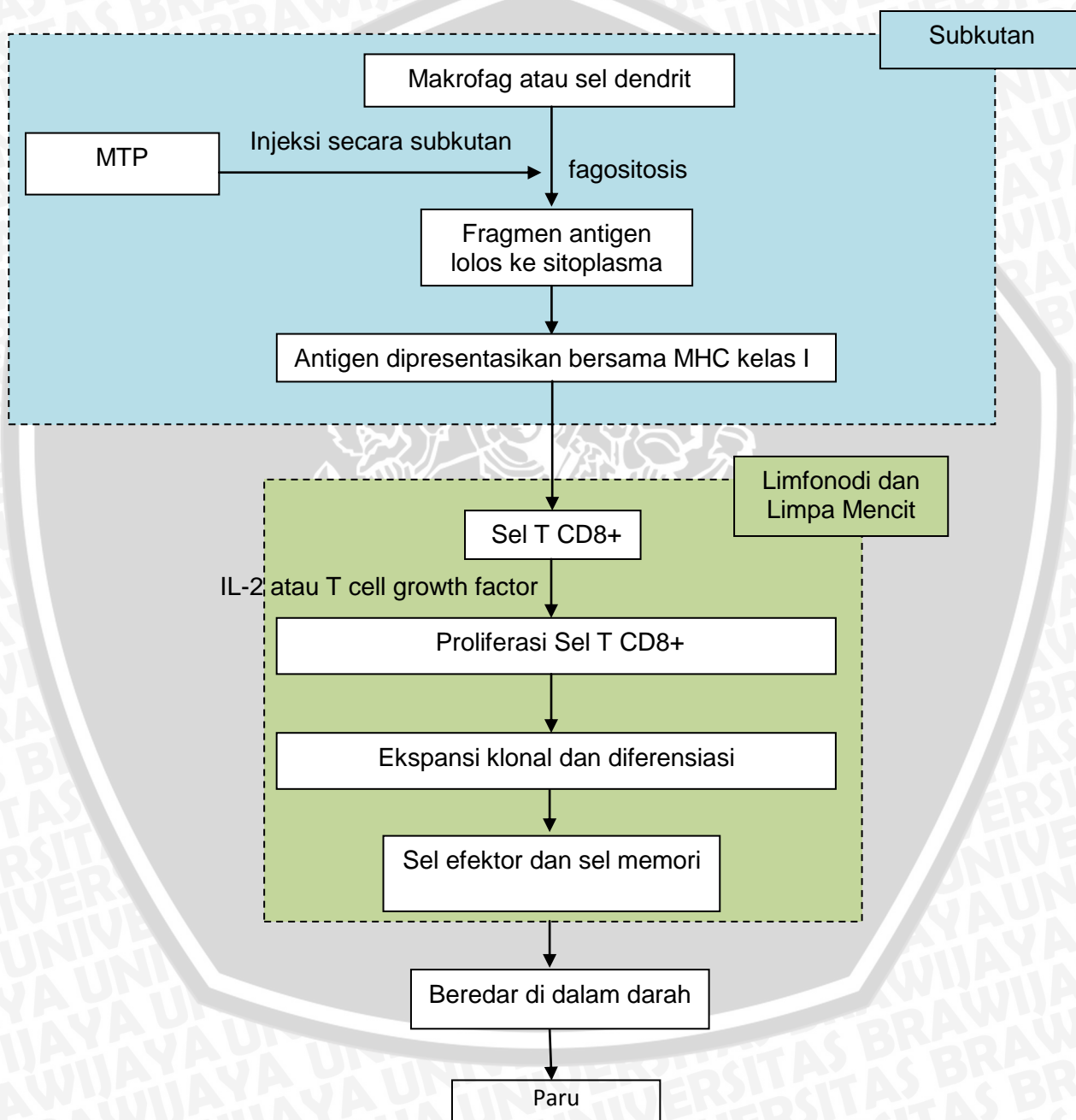
Studi menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* lebih cenderung untuk melekat dan menginvasi area yang rusak pada mukosa saluran nafas (Middleton *et al.*, 2002). Pada kondisi kerusakan jaringan ini protein ekstraseluler matriks (ECM) akan lebih terekspose daripada jaringan yang sehat. MTP diketahui memiliki afinitas yang kuat terhadap liminin yang termasuk komponen dari ECM (Alteri *et al.*, 2007). Hal ini akan memfasilitasi interaksi langsung antara *M. tuberculosis* dengan epitel host selama infeksi TB. MTP juga memiliki sifat imunogenik, hal tersebut dibuktikan dengan adanya antibodi spesifik (IgG anti-MTP) pada pemeriksaan serum penderita TB (Alteri *et al.*, 2007).

Di antara database genom mikobakteri yang ada, gen pengkode MTP hanya ditemukan pada *M. tuberculosis*, *M. bovis* dan *M. avium ssp paratuberculosis*, tetapi tidak ditemukan pada *M. smegmatis*. Hal ini menunjukkan bahwa MTP hanya diproduksi oleh mikobakteri yang patogen (Alteri *et al.*, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

MTP yang masuk ke dalam subkutan akan difagosit oleh makrofag atau sel dendrit. Kedua sel ini memiliki fungsi sebagai penyaji antigen (APC). Di dalam makrofag dan dendrit sel ini terjadi degradasi antigen yang menghasilkan fragmen antigen. Fragmen ini memiliki kemungkinan lolos ke sitoplasma. Fragmen yang lolos ke sitoplasma akan dibawa oleh MHC I ke permukaan APC. APC akan menuju organ limfonodi dan limpa. Di limpa dan organ limfonodi, APC dengan MHC I yang ada pada permukaannya ini akan mengaktifasi sel T CD8+. Sel T akan terangsang sehingga mensekresi IL-2. IL-2 atau *T Cell Growth Factor*, akan menginduksi proliferasi sel T naif yang mengakibatkan peningkatan dengan cepat jumlah sel limfosit CD8+ yang spesifik terhadap antigen, atau disebut juga *clonal expansion*. Dari hasil proliferasi ini, sel T akan berdiferensiasi, sebagian ada yang menjadi sel efektor, sebagian yang lain menjadi sel T memori. Sel efektor dan sel T memori akan ikut dalam peredaran darah ke seluruh tubuh, termasuk menuju paru, Diharapkan mampu melakukan perlawanan bila ada bakteri MTB yang masuk ke paru.

3.2 Hipotesis Penelitian

Crude pili *M. tuberculosis* secara subkutan menginduksi peningkatan sel T CD8+ pada limpa, paru, dan darah pada mencit

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Rancangan penelitian berupa penelitian analitik eksperimental laboratorium menggunakan hewan coba mencit untuk melihat respon imun seluler sel T CD8+ setelah pemberian *crude pili M. tuberculosis* secara subkutan, dengan desain *post test only control group*. Penelitian ini menggunakan 3 macam grup perlakuan, yaitu mencit yang diinduksi dengan ajuvan IFA (sebagai kontrol), mencit yang diinduksi dengan *crude pili M. tuberculosis*, dan mencit yang diinduksi dengan *crude pili M. tuberculosis*+ajuvan IFA.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Pemilihan Sampel

Hewan coba yang digunakan adalah mencit galur BALB/c jenis kelamin jantan, usia 6-8 minggu dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif. Hewan coba didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sampel dalam penelitian ini adalah limpa, paru, dan darah mencit yang telah dipapar *crude pili M. tuberculosis* secara subkutan.

4.2.2 Estimasi Jumlah Sampel

Penelitian ini menggunakan 3 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (kelompok yang diberi ajuvan saja), perlakuan I (kelompok dengan perlakuan vaksinasi *crude pili MTB*), dan perlakuan II (kelompok dengan perlakuan

vaksinasi *crude pili Mycobacterium tuberculosis* yang ditambahkan IFA). Estimasi besar sampel per kelompok diperoleh dengan rumus:

$$p(n-1) \geq 15 \text{ (Solimun, 2001)}$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

$$n = 6$$

Keterangan: p = jumlah perlakuan

n = besar sampel (jumlah sampel per kelompok)

Berdasarkan hasil perhitungan di atas didapat jumlah sampel paling sedikit pada setiap kelompok perlakuan adalah 6 ekor mencit, sehingga jumlah sampel seluruhnya 18 ekor mencit.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel tergantung : persentase sel T CD8+ pada paru, limpa, dan darah mencit.

Variabel bebas : *crude pili* MTB, *crude pili* MTB+IFA, IFA

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Waktu penelitian pada bulan Juli 2011 sampai dengan selesai.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Elektroforesis SDS-PAGE

Alat-alat yang diperlukan adalah Ependorf, Alat elektroforesis, Shaker, dan Pipet mikro. Bahan-bahan yang diperlukan adalah Acrylamida 30%, Tris HCl 1.5, pH 8.8, Aquades steril, SDS 10%, APS 10%, Temed, dan sampel.

4.5.2 Alat dan Bahan Untuk Vaksinasi Subkutan

Bahan-bahan yang diperlukan adalah Crude Pili *M. tuberculosis*, PBS (phosphate buffer saline), dan Ajuvan IFA. Alat-alat yang diperlukan adalah Pipet mikro, Spuit 5 cc, Spuit 1 cc, Ependorf, Vortex, Falcon, Alkohol 70%, Kapas steril, dan Handscoon.

4.5.3 Alat dan Bahan Untuk Pembedahan dan Pengambilan Organ Mencit

Alat-alat yang diperlukan adalah Gunting, Cawan petri, Toples, Spuit 5 cc, dan Kapas. Bahan-bahan yang diperlukan adalah Ether dan PBS.

4.5.4 Alat dan Bahan Persiapan Sampel Untuk Flowcytometry

Alat-alat yang diperlukan adalah Mortir, Mikropipet dan tip, Cawan petri, Falcon, Alat sentrifugasi, Tabung flowcytometri, dan Kertas label. Bahan-bahan yang diperlukan adalah Vikool, PBS, PBS + FBS 2%, Antibodi CD8+, paru, darah, dan limpa mencit.

4.6 Definisi Operasional

- *Crude pili Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan adalah dari strain H37Rv milik Dwi Yuni Nur Hidayati yang diisolasi di Laboratorium

Mikrobiologi FKUB dengan metode isolasi tanpa kloroform-methanol yang dimodifikasi dari penelitian Alteri *et al.* (2007). Perlakuan pertama menggunakan *crude pili* dengan konsentrasi 100 mikrogram dalam 100 mikroliter. Perlakuan kedua menggunakan *crude pili* dengan konsentrasi 100 mikrogram dalam 50 mikroliter.

- Pengukuran jumlah sel T CD8⁺ dilakukan dengan alat *flowcyometry*, kemudian dilihat persentase sel T CD8⁺ dari seluruh sel limfosit yang ada.
- Ajuvan yang dipakai adalah *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) yang memiliki komposisi 85% *paraffin oil* dan 15% *mannide monooleate*.
- Anestesi yang dipakai adalah ketamin dengan dosis sebesar 0,1ml per mencit disuntikkan secara intramuskular.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Elektroforesis SDS Page

- a) Sampel sebanyak 20 μ l ditambahkan dengan 20 μ l RSB kemudian dimasukkan ke dalam eppendorf.
- b) Kemudian dipanaskan selama 5 menit pada air mendidih.
- c) Kemudian sampel dimasukkan pada sumuran gel elektroforesis.
- d) Sampel kemudian di *running* pada 120 V selama 90 menit.
- e) Kemudian gel diangkat dan dilakukan staining di atas shaker selama 20-30 menit (dengan *Commase brilliant blue R 250*).
- f) Kemudian gel dipindahkan ke dalam larutan destaining 1-2 jam sambil tetap dilakukan shaker.
- g) Destaining dilakukan semalam sampai gel terlihat bersih.

- h) Kemudian berat molekul protein pada pita protein yang tampak pada gel dihitung.

4.7.2 Prosedur Vaksinasi Subkutan

- a) Crude *pili* diencerkan sesuai jenis perlakuan. Perlakuan pertama menggunakan *crude pili* dengan konsentrasi 100 mikrogram dalam 100 mikroliter. Perlakuan kedua menggunakan *crude pili* dengan konsentrasi 100 mikrogram dalam 50 mikroliter.

- b) Pada perlakuan pertama, konsentrasi *crude pili* yang diinjeksikan adalah sebesar 100 mikrogram protein *pili* dalam 100 mikroliter. Total mencit yang diinjeksi adalah 6 ekor, dan setiap mencit diinjeksikan dengan 0,1 ml, sehingga volume total yang dibutuhkan adalah 0,6 ml. Namun, agar tiap mencit tepat diinjeksi sebesar 0,1 ml, maka volume yang ingin dicapai menjadi 0,8 ml (dari 0,6 ml). Dilakukan pengenceran menggunakan PBS dengan rumus

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1 \cdot 1,6 = 0,8 \cdot 1 \text{ mg/ml}$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

Keterangan :

V1 = Volume *pili* yang diambil (ml).

M1 = Konsentrasi *pili* hasil *nanodrop* (1.6 mg/ml)

V2 = Volume akhir setelah diencerkan

M2 = Konsentrasi yang ingin dicapai (100 µg dalam 100 µL atau 0,1 mg/ml)

- c) Pada perlakuan kedua (*pili* + *ajuvan*), konsentrasi *pili* yang diinjeksikan adalah sebesar 100 µg dalam 50 µL. Total mencit yang diinjeksi adalah 6

ekor, dan setiap mencit diinjeksikan dengan 0,1 ml. Dilakukan pengenceran menggunakan PBS dengan rumus:

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1 \cdot 1,6 = 0,8 \cdot 2$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

Keterangan :

V1 = Volume asli yang diambil (ml)

M1 = Konsentrasi asli hasil *nanodrop*

V2 = Volume akhir setelah diencerkan

M2 = Konsentrasi yang ingin dicapai (100 µg dalam 50 µL atau)

- d) Pada perlakuan ketiga (adjuvan), setiap mencit diinjeksikan dengan 0,1 ml adjuvan IFA.
- e) Setiap mencit disuntikkan secara subkutan pada daerah tengkuk.

4.7.3 Prosedur Pembedahan

- a) Mencit dimasukkan ke dalam toples berisi ether
- b) Ditunggu hingga mencit tidak sadar.
- c) Setelah terbius, mencit dipindahkan ke papan pembedahan kemudian dibedah.
- d) Limpa dan paru diambil lalu digerus sedangkan darah diambil kemudian dimasukkan ke dalam vacutainer yang berisi EDTA.
- e) Kemudian ketiganya disimpan dalam suhu 4 derajat Celcius.

4.7.4 Prosedur Persiapan Sampel untuk Flowcytometri

- a) Paru dan Lien dimasukkan ke dalam PBS+FBS 2% sebanyak 2cc. Kemudian digerus dan disaring dengan cell strainer. Hasilnya kemudian dimasukkan ke dalam falcon 15cc. Kemudian dilakukan sentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang, dan peletnya ditambahkan FBS+PBS 2% 800 μ l. Kemudian diketuk-ketuk dan siap untuk distaining.
- b) Darah diambil dengan spuit 1cc kemudian dimasukkan ke dalam falcon yang telah berisi ficol 1cc, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit. Setelah itu diambil lapisan tengah yang mengandung PBMC dan dimasukkan ke dalam ependorf, kemudian diberi PBS sampai 5 – 10x volume dan disentrifus 1000 rpm selama 10 menit. Diulangi sampai tiga kali, kemudian pelet diambil dan diberi PBS+FBS 2% sebanyak 400 μ l dan dilakukan staining dengan antibodi CD8+.
- c) Sampel kemudian dilakukan staining dengan antibodi CD8+.
- d) Setiap sampel membutuhkan 3,75 μ l antibodi CD8+ yang telah diencerkan ke dalam 25 μ l PBS+FBS 2%.
- e) Kemudian ditunggu selama 20 menit lalu sampel dibaca di alat flowcytometer.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif yaitu jumlah (%) sel T CD8+ dari limpa, paru, dan darah. Analisis data menggunakan analisis varian One Way ANOVA pada $\alpha = 0.05$ dengan software SPSS versi 16.0.

BAB 5

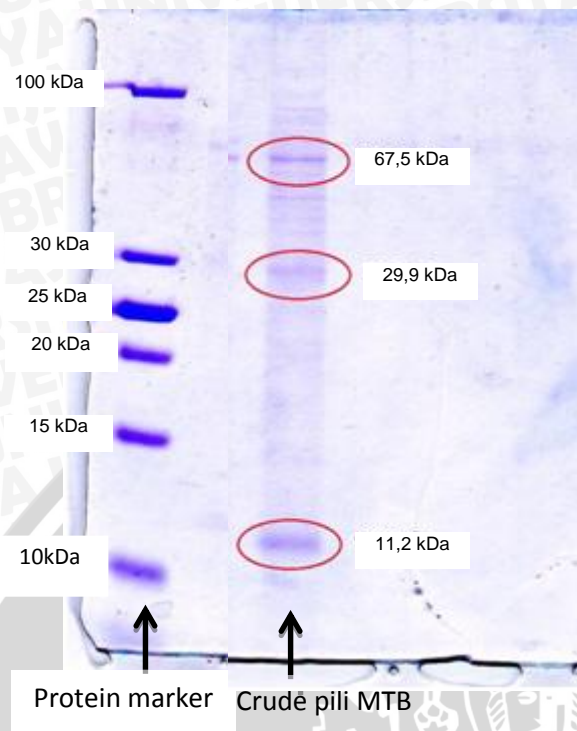
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati respon imun selular pada mencit terhadap crude pili *Mycobacterium tuberculosis*. Pada penelitian ini respon imun selular yang diamati adalah Sel T CD8+ pada limpa, paru-paru, dan darah. Respon imun diinduksi melalui tiga perlakuan, yaitu crude pili, crude pili+adjuvant, adjuvant. Pemberian dengan adjuvant adalah sebagai kontrol negatif.

5.1.1 Profil Crude Pili *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Crude pili didapat dari pemotongan *Mycobacterium tuberculosis*. Dilakukan uji elektroforesis SDS Page untuk melihat berat molekul dari crude pili. Crude pili yang digunakan pada elektroforesis terdapat 3 macam, yaitu crude pili, crude pili + kloroform methanol, crude pili + PBS kloroform. Pemberian kloroform bertujuan untuk menghilangkan lemak dan agar dapat melihat protein.pada crude pili. Dari hasil elektroforesis *crude pili* tersebut, didapatkan adanya 3 jenis protein dominan dengan berat molekul yang berbeda, yaitu protein dengan berat molekul 67.5 kDa, 29.9 kDa, 11.2 kDa. Pada penelitian ini, yang digunakan adalah *crude pili* tanpa kloroform methanol.



Gambar 5.1 Hasil Elektroforesis *Crude Pili*+kloroform methanol. Pada gambar garis-garis biru paling kiri adalah marker berat protein dalam satuan kilo Dalton (kDa) dan gambar garis-garis biru yang dilingkari merah pada gambar bagian tengah adalah protein *crude pili*. Tampak pada *crude pili* menunjukkan 3 protein dominan yang memiliki berat molekul masing-masing 67,5 kDa, 29,9 kDa, dan 11,2 kDa.

5.1.2 Jumlah Sel T CD8⁺

Untuk mengetahui peningkatan jumlah sel T CD8⁺ pada paru, limpa, dan darah mencit, dilakukan pengukuran jumlah sel T CD8⁺ dengan metode flowcytometri. Data yang didapat dari flowcytometri pada tabel di bawah ini hanya didapat dari 3 mencit dari seharusnya 6 mencit. Hal ini disebabkan terjadi kerusakan mesin flowcytometri saat running data. Akibatnya data yang terpakai hanya data 3 mencit di awal yang telah lebih dulu diukur. Sedangkan data 3 mencit yang belum diukur kondisinya tidak lagi ideal saat mesin flowcytometri dapat dipakai kembali.

Tabel 5.1 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8⁺ pada Organ Paru Mencit.

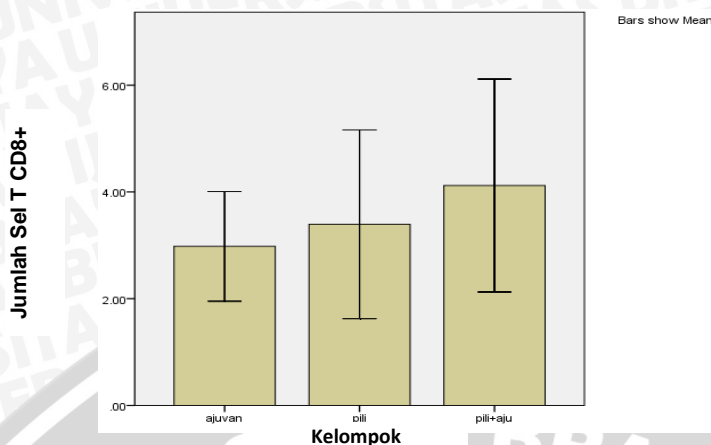
Jumlah Sel T CD8+ (%)			
n	Kontrol	Pili	Pili+Ajuvan
1	2,76	1,91	3,19
2	2,08	5,35	6,41
3	4,1	2,92	2,76
Rerata	2,98	3,3933	4,12
St. Deviasi	± 1,027	± 1,76	± 1,99

Tabel 5.2 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8⁺ pada Organ Limpa Mencit.

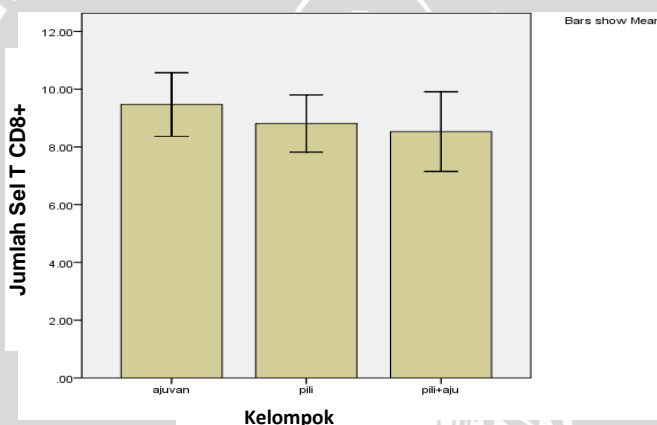
Jumlah Sel T CD8+ (%)			
n	Kontrol	Pili	Pili+Ajuvan
1	10,57	8,16	7,22
2	8,37	8,32	8,4
3	9,47	9,95	9,97
Rerata	9,47	8,81	8,53
St. Deviasi	± 1,1	± 0,99	± 1,37

Tabel 5.3 Hasil Flowcytometri Jumlah sel T CD8⁺ pada Organ Darah Mencit.

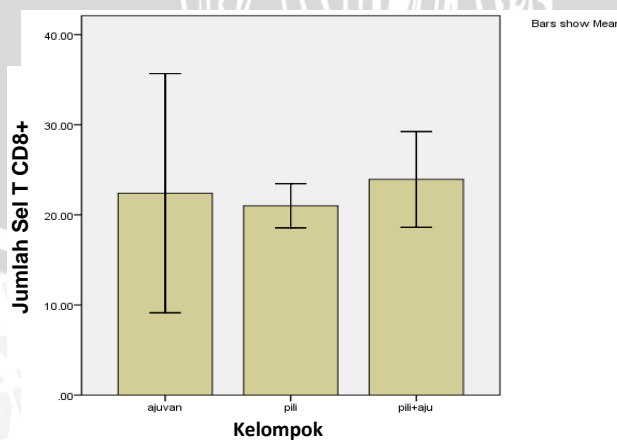
Jumlah Sel T CD8+ (%)			
n	Kontrol	Pili	Pili+Ajuvan
1	29,84	19,19	19,91
2	7,09	20,04	29,97
3	30,31	23,81	21,95
Rerata	22,4133	21,0133	23,9433
St. Deviasi	± 13,27	± 2,45	± 5,31



Grafik 5.1 Diagram batang rerata jumlah sel T CD8⁺ pada organ paru. Diagram di atas menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel T CD8⁺ seperti yang diharapkan.



Grafik 5.2 Diagram batang rerata jumlah sel T CD8⁺ pada organ limpa. Diagram di atas memiliki variasi hasil yang kecil terlihat dari SD yang kecil dari ketiga perlakuan.



Grafik 5.3 Diagram batang rerata jumlah sel T CD8⁺ pada darah. Pada perlakuan kontrol diperoleh variasi hasil yang besar terlihat dari SD yang besar.

5.2 Analisis Data

Berdasarkan data jumlah sel T CD8+ hasil flowcytometry, kemudian dianalisis dengan menggunakan uji statistic SPSS versi 16.0. Setelah dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas, didapati sampel limpa dan paru yang sebaran datanya normal dan homogen, sedangkan sampel darah memenuhi uji normalitas tapi tidak memenuhi uji homogenitas. Lalu dilakukan transformasi pada data sampel darah. Hasil transformasi tetap tidak memenuhi homogenitas. Oleh karena itu dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk sampel darah. Sedangkan untuk sampel limpa dan paru dilakukan uji One Way ANOVA. Hasil uji normalitas dan uji homogenitas serta transformasi sampel darah dapat dilihat pada lampiran 2.

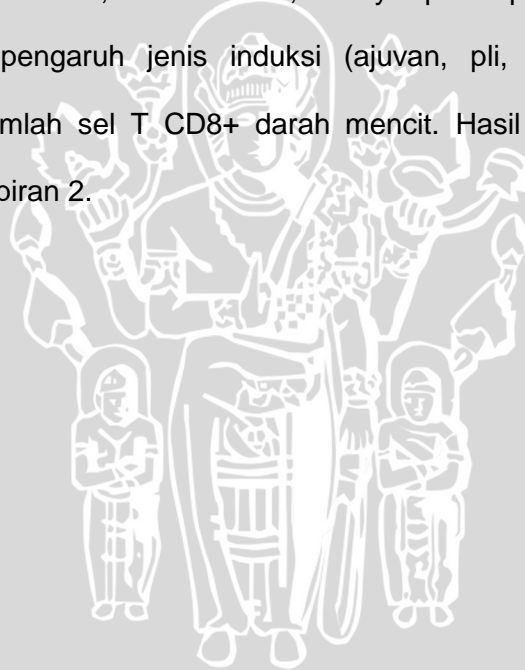
5.2.1 Uji One Way ANOVA (Sampel Limpa dan Paru)

Pada uji One Way ANOVA, H_0 diterima bila diperoleh $\alpha > 0.05$ dan H_0 ditolak bila $\alpha < 0.05$. H_0 pada penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pili, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ di paru dan limpa mencit, sedangkan H_1 adalah terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pili, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ pada paru dan limpa mencit.

Berdasarkan hasil uji *One way* ANOVA, didapatkan nilai signifikansi (α) yang besar, yaitu pada paru 0.707, pada limpa 0.623. Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak. Artinya, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pili, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ pada paru dan limpa mencit. Hasil analisis ANOVA dapat dilihat pada lampiran 2.

5.2.2 Uji Kruskal-Wallis (Sampel Darah)

Ho diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh > 0.05 , sedangkan Ho ditolak bila nilai signifikansi yang diperoleh < 0.05 . Ho pada penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pili, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ darah mencit, sedangkan H1 adalah terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pili, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ pada darah mencit. Pada penelitian ini didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.733, artinya nilai signifikansi lebih besar dari 0.05. Dengan demikian, Ho diterima, artinya pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan pengaruh jenis induksi (ajuvan, pli, pili+ajuvan) yang signifikan terhadap jumlah sel T CD8+ darah mencit. Hasil uji Kruskal-Wallis dapat dilihat pada lampiran 2.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon imun seluler pada mencit strain BALB/c yang diinjeksi dengan *crude pili*, *crude pili + adjuvan*, dan dengan adjuvan saja, yang dibuktikan dengan mengukur kadar sel T CD8 + di limpa, darah, dan paru mencit.

Menurut penelitian Alteri (2007), bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menghasilkan pili (MTP) yang memanjang dari permukaan bakteri dengan berat molekul di bawah 30 kDa. Pili ini berperan dalam patogenesis tuberkulosis dan juga bersifat imunogenik. Namun, pada penelitian ini, tidak digunakan MTP dengan berat molekul di bawah 30 kDa oleh karena proses pemurniannya yang memakan waktu yang sangat lama. Peneliti menggunakan *crude pili* hasil pemotongan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil pemotongan kemudian diuji dengan elektroforesis SDS PAGE untuk melihat berat molekul dari *crude pili* tersebut. Didapatkan *crude pili* mengandung berat molekul di bawah 100 kDa, dengan jumlah terbanyak adalah dengan BM 67.5 kDa, 29.9 kDa, dan 11.2 kDa. Pada penelitian ini, jalur pemberian injeksi adalah secara subkutan, oleh karena metode ini mudah, pilihan daerah injeksi yang banyak, dan banyaknya suplai kapiler di daerah subkutan (Kiessling, 2010). Selain itu, jalur subkutan merupakan jalur pilihan pada penyuntikan antigen+adjuvan dengan volume 0,05 - 0,2 ml (AALAS, 2005). Konsentrasi injeksi yang digunakan adalah 100 mikrogram *crude pili* dalam 100 mikroliter, oleh karena dosis pada mencit adalah antara 50-100 mikrogram dengan volumenya maksimal adalah 100 mikroliter.

Pada penelitian ini digunakan adjuvan oleh karena adjuvan dapat meningkatkan respon imun terhadap antigen. Adjuvan yang digunakan adalah IFA oleh karena CFA mengandung bakteri *M. tuberculosis* yang telah dimatikan, sehingga pemberian CFA dapat menjadi faktor perancu.

Dari hasil flowcytometry sampel paru, limpa, dan darah, didapatkan rerata jumlah sel T CD8⁺ masing-masing perlakuan pada satu sampel tidak jauh berbeda. Hasil rerata jumlah sel T CD8⁺ di paru dari kelompok adjuvan, pili, dan pili+adjuvan, secara berurutan adalah 2.98, 3.393, 4.12. Lalu pada sampel limpa, secara berurutan adalah 9.47, 8.81, 8.53. Kemudian pada sampel darah, secara berurutan adalah 22.41, 21.01, 23.94. Didapatkan hasil pada paru, terdapat peningkatan persentase sel T CD8⁺ dari perlakuan adjuvan ke perlakuan pili lalu meningkat lagi pada perlakuan pili+adjuvan. Namun, secara perhitungan analisis statistika peningkatan yang terjadi tidak signifikan dengan nilai signifikansi 0,707. Secara keseluruhan hasil penelitian tidak signifikan menunjukkan peningkatan sel T CD8⁺. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh eradikasi yang lebih awal dan adekuat oleh sistem imun natural dan humoral, jumlah sampel yang kurang, juga kemungkinan kecenderungan teraktivasinya sistem imun humoral akibat beragamnya ukuran protein pili pada *crude pili* yang diinjeksikan.

6.1 Sistem Imun Natural Mampu Mengeradikasi Antigen Sejak Awal

Menurut Abbas dan Lichtmann (2004), syarat aktifnya sistem imun seluler adalah jika terdapat fragmen peptida, dan hanya ketika disajikan oleh APC. Di dalam sistem imun manusia, terdapat sistem imun natural yang harus dilewati sebelum akhirnya sistem imun adaptif teraktivasi. Tidak semua sistem imun natural merupakan APC, melainkan hanya makrofag dan sel dendrit. Makrofag berasal dari monosit yang menetap di jaringan dan jika dibandingkan dengan

netrofil, jumlah makrofag amatlah sedikit. Jumlah netrofil adalah sebanyak 4.000 – 10.000 per mm^3 darah dan dapat meningkat hingga 20.000 per mm^3 . Jumlah monosit hanyalah 500 – 1.000 per mm^3 darah. Selain itu, pada infeksi akut, sel imun yang pertama kali mendatangi daerah infeksi adalah netrofil. Berdasarkan hal ini, dapat disimpulkan bahwa besar kemungkinan salah satu penyebab tidak berbedanya jumlah sel limfosit T CD8^+ adalah karena sistem imun natural mencit mampu menghentikan antigen sebelum mampu mengaktifkan sistem imun adaptif.

6.2 Penggunaan Ajuvan dan Preparasi Pemberian Adjuvan

Pemberian adjuvan bertujuan untuk meningkatkan respon imun tubuh terhadap vaksin yang diberikan, oleh karena imunogenitas antigen yang rendah (CDC, 2010). Menurut Hanly *et al.* (1995), adjuvan digunakan pada antigen dengan imunogenitas yang rendah, yaitu antigen dengan ukuran <10 kDa, antigen nonprotein, ataupun pada antigen dengan jumlah yang sedikit.

Pada penelitian ini, *crude pili* yang digunakan memiliki sifat imunogenitas yang tinggi, oleh karena berat molekulnya di atas 11.2 kDa, mengandung protein (dilihat dari hasil elektroforesis SDS Page yang menunjukkan adanya protein), dan juga menggunakan jumlah yang banyak (oleh karena menggunakan jalur subkutan), yaitu sebanyak 100 μg . Dengan imunogenitas yang tinggi seharusnya dapat menginduksi respon imun yang lebih tinggi dibanding perlakuan tanpa adjuvan. Untuk mendapatkan respon imun yang baik, perlu diperhatikan juga langkah-langkah yang benar saat menyiapkan bahan perlakuan.

Selain persiapan bahan yang benar, injeksi subkutan juga harus dilakukan dengan baik, agar antigen dapat masuk semua ke dalam subkutan. Terutama

saat melakukan injeksi *Crude Pili + Ajuvan*, yang campuran keduanya bersifat kental. Bahan yang kental ini mengakibatkan injeksi lebih sulit dibanding perlakuan yang tanpa ajuvan. injeksi perlu dilakukan dengan baik agar bahan dapat masuk dengan adekuat. Pada penelitian ini, beberapa kali bahan sempat tidak masuk dengan baik ke lapisan subkutan mencit. Juga saat jarum dicabut, beberapa saat masih ada bahan yang keluar dari ujung jarum, dapat diasumsikan dosis yang diinjeksikan tidak lagi sesuai.

Pada penelitian ini, jumlah sampel yang kurang juga dapat menjadi penyebab hasil yang ada tidak signifikan. Menurut perhitungan, sampel yang dibutuhkan adalah minimal 6 buah sampel. Sampel yang masuk hanya 3 disebabkan kerusakan mesin flowcytometri.

6.3 Penghitungan Dosis Vaksin dan Kadar Pili yang Tepat dalam Pemberian Injeksi

Injeksi yang diberikan pada penelitian ini adalah sebanyak 0.1ml tiap mencit. Komponen injeksi yang diberikan pada penelitian ini adalah crude pili MTB murni, artinya selain pili dengan berat molekul di bawah 30 kDa yang mampu menginduksi imun, di dalamnya juga masih banyak komponen-komponen lain yang ikut diinjeksikan. Komponen-komponen selain pili inilah yang juga dapat merancukan respon imun yang muncul.

Selain itu, dalam 0.1 ml yang diinjeksikan, terdapat 100mikrogram pili. Banyaknya pili yang diikutkan ini yang perlu dihitung jumlah optimumnya, karena bila jumlah pili yang ada dalam injeksi lebih sedikit dibanding komponen-komponen lainnya maka kemungkinan respon imun yang dihasilkan juga tidak adekuat, begitu juga sebaliknya. Bila kadar pili yang ada dalam injeksi terlalu

banyak maka akan terjadi supresi dari sistem imun yang pada akhirnya juga tidak terjadi peningkatan yang signifikan.

6.4 Perbedaan Respon Sel T Naif terhadap Jumlah dan Sifat Ligan yang Dipresentasikan oleh APC

Perbedaan densitas ligans dapat mempengaruhi respons sel T naif. Jumlah yang besar dari peptida yang menimbulkan densitas yang tinggi pada permukaan APC cenderung merangsang terjadinya sel Th1, sedang presentasi antigen dengan densitas rendah cenderung menghasilkan respons Th2. Demikian juga, peptida yang berinteraksi secara kuat dengan reseptor sel T cenderung merangsang respons Th1, sedang peptida yang berikatan secara lemah menghasilkan respons Th2 (Janeway *et al.*, 1999).

Pada penelitian ini, digunakan crude pili sebagai bahan injeksi. Pada *crude pili* selain protein pili juga terdapat berbagai macam komponen lain, diantaranya adalah lemak dan protein *M. tuberculosis* lainnya. Pada *crude pili* ini juga terdapat tiga jenis protein pili dengan berat molekul yang berbeda. Beragamnya komponen antigen ini kemungkinan mengakibatkan respon yang tidak adekuat bagi Th1

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa:

- 7.1.1 Respon imunitas seluler sel T CD8⁺ tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan terhadap injeksi *crude pili M. tuberculosis* pada mencit melalui subkutan.
- 7.1.2 Persentase sel T CD8⁺ setelah pemberian *crude pili M. tuberculosis* secara subkutan pada limpa rerata sebesar 8,81; paru rerata sebesar 3,39; dan darah mencit rerata sebesar 21,01.
- 7.1.3 Persentase sel T CD8⁺ setelah pemberian *crude pili M. tuberculosis* dan ajuvan IFA secara subkutan pada limpa rerata sebesar 8,53; pada paru rerata sebesar 4,12; pada darah rerata sebesar 23,94.
- 7.1.4 Secara keseluruhan persentase sel T CD8⁺ setelah pemberian *crude pili M. tuberculosis*, baik dengan ajuvan IFA maupun tanpa ajuvan IFA, pada limpa, paru, dan darah mencit tidak ada perbedaan bermakna.

7.2 Saran

- Disarankan untuk melakukan penelitian sejenis, yang bertujuan untuk menentukan dosis dari (vaksin) *antigen crude pili M. tuberculosis* yang dapat menginduksi respon imun secara adekuat.
- Disarankan untuk melakukan penelitian sejenis, dengan menggunakan pili murni dengan berat molekul yang seragam, yang bertujuan untuk memperoleh respon yang adekuat dari Th1 berdasarkan buku yang ditulis oleh Janeway dkk.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A K. and Litchman, Andrew H. 2004. Basic Immunology : Function and Disorder of the Immune System. 2nd Ed., Elsevier, Philadelphia, US.
- Alteri, C. J., Xicohtencati-Cortes, J., Hess, S., Caballero-Olin, G., Giron, J. A., dan Friedman, R. L. Mycobacterium tuberculosis produces pili during human infection. *PNAS*. 2007 (104) no. 12: 5145–5150
- Amin, Z and Bahar, A. 2007. Tuberkulosis Paru. Buku ajar Ilmu Penyakit Dalam. Edisi 4. FKUI, Jakarta hlm 988-994.
- Belyakov, I M. and Ahlers Jeffrey D. 2009. *What Role Does the Route of Immunization Play in the Generation of Protective Immunity against Mucosal Pathogens?* <http://www.jimmunol.org/content/183/11/6883.full>. diakses tanggal 1 juli 2011.
- Brooks, G.F., Janet S.B., dan Stephen A.M. 2007. *Jawetz, Melnick & Adelberg Medical Microbiology (24th Ed)*. United States of America: Mc-Graw Hill Companies.
- Chen, L., Wang, J., Zganiacz, A., dan Xing, Z. Single Intranasal Mucosal Mycobacterium bovis BCG Vaccination Confers Improved Protection Compared to Subcutaneous Vaccination against Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2004 (72) No. 1: 238-246
- Ciabattini, A., Pettini, E., Andersen, P., Pozzi, G., dan Medaglini, D. Primary Activation of Antigen-Specific Naive CD4 and CD8 T Cells following Intranasal Vaccination with Recombinant Bacteria. *Infection and Immunity*,. 2008 (76) No. 12: 5817–5825
- Davis, S. S, Nasal Vaccine. *Adv. Drug Beliv. Rev* . 2001 (51): 21-42.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997 (61) : 136 - 169.
- Herchline, T. E. 2011. Tuberculosis. <http://emedicine.medscape.com/article/230802-overview>. Diakses tanggal 4Februari 2012
- Holmgren, J and Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*, 2005 (11) 4:545-553.
- Huynh, K.K. dan Grinstein S. 2007. *Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 71: 452-462.
- Kasper, L., Anthony S. Fauci, Dan L. Longo, Eugene Braunwald, Stephen L. Hauser, dan J. Larry Jameson. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (16th ed.). United States of America: McGraw-Hill Companies.

- Kiessling, F. 2010. *Small Animal Imaging: Basics and Practical Guide*. Springer, London.
- Krogsgaard M. dan Davis MM: How T cell "see" antigen. *Nat Immunol* 6:293, 2005
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., dan Aster, J. C. 2010. *Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease. International Edition*. Elsevier: Philadelphia, US, p 184-190
- Lantos-Hyde United States Government Tuberculosis Strategy. 2010. Overview of Global TB Situation. 24 Maret 2010.
- Marino, S. and Kirschner, Denise E. The Human Immune Response to Mycobacterium tuberculosis in Lung and Lymph Node. *Journal of Theoretical Biology*. 2003 (227): 463–486.
- Middleton AM; Chadwick MV; Nicholson AG; Dewar A; Groger RK; Brown EJ; Ratliff TL; Wilson R. Interaction of Mycobacterium tuberculosis with human respiratory mucosa. *Tuberculosis (Edinb)*. 2002 (82):69-78.
- NIAID, 2011. Vaccines. <http://www.niaid.nih.gov/topics/vaccines/understanding/pages/typesvaccines.aspx>. diakses tanggal 13 Juli 2011.
- Olsen, A.W., Ann W., Limei M.O., Graham H., dan Peter A..Protective Effect of a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion of Antigen 85B and ESAT-6 in the Aerosol Guinea Pig Model. *Infection and Immunity*, 2005 (72):6148-6150.
- Palma, S.D. 2011. *Tuberculosis and The BCG Vaccine: Not Quite Good Enough*. <http://www.scg.ubc.ca/tuberculosis-and-the-bcg-vaccine-not-quite-good-enough/>. Diakses tanggal 8 Februari 2012..
- Pramod K. Giri dan Gopal K. Khuller. 2008. Is Intranasal Vaccination a Feasible Solution for Tuberculosis?: Mucosal Adjuvants/Delivery Systems. http://www.medscape.com/viewarticle/583217_8
- Raekiansyah, Muhareva. 2005. *MeracikUlangVaksin BCG*. <http://iptek-kesehatan.blogspot.com/2009/12/meracik-ulang-vaksin-bcg-efektifitas.html>. diakses tanggal 10 Juli 2011
- Satthaporn, S. dan O. Eremin, 2001. *Dendritic Cells (I): Biological Functions*. <http://www.rcsed.ac.uk/journal/vol46/1/4610003.htm>. diakses tanggal 15 Januari 2012.
- Siegrist, C.A.. 2006. *Vaccine immunology*. http://www.who.int/immunization/documents/elsevier_vaccine_immunology.pdf. diakses tanggal 31 Januari 2012.

Steinberg, B.E. dan Sergio G. 2008. *Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinan*. <http://www.jci.org/articles/view/35433/pdf>. Diakses tanggal 23 Desember 2011.

Todar, K.. 2008. *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*. <http://www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>. Diakses tanggal 7 Juli 2011.

Ton-That, H and Schneewind, O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*, 2003(50): 1429–1438.

U.S. Global Health Policy. 2010. The Global Tuberculosis Epidemic. Fact sheet, June 2010. Page 1.

USAID, 2009. Indonesia Tuberculosis Profile. www.usaid.gov. diakses tanggal 6 Juli 2011.

WHO. 2011. *BCG vaccine*. <http://www.who.int/biological/areas/vaccines/bcg/en/>



LAMPIRAN

Lampiran 1: Penghitungan Berat Molekul Hasil Elektroforesis SDS PAGE dengan Cara Interpolasi

MARKER			
BM MARKER	JARAK TRACKING	RF	LOG BM
100	2,1	0,127273	2
30	6,4	0,387879	1,477121
25	7,8	0,472727	1,39794
20	8,9	0,539394	1,30103
15	11	0,666667	1,176091
10	14,5	0,878788	1
SAMPEL			
	JARAK TRACKING	RF	LOG BM
Protein 1	3,5	0,212121	1,807844
Protein 2	6,4	0,387879	1,565085
Protein 3	13,5	0,818182	0,970743

Rumus:

$$\text{LogBM sampel} = \frac{(\text{RF marker kecil} - \text{RF sampel})}{(\text{RF marker kecil} - \text{RF marker besar})} \times (\text{log BM marker besar} - \text{log BM marker kecil}) + \text{log BM marker kecil}$$

$$\text{BM sampel} = 10^{\text{LogBM sampel}}$$

Hasil Perhitungan:

- Protein 1

$$\text{LogBM sampel} = \frac{(0,387879 - 0,212121)}{(0,393979 - 0,127273)} \times (2 - 1,477121) + 1,477121$$

$$\text{Log BM sampel} = 1,82975$$

$$\text{BM sampel} = 67,5\text{kDa}$$

- Protein 2

$$\text{LogBM sampel} = \frac{(0,472727 - 0,387879)}{(0,472727 - 0,387879)} \times (1,477121 - 1,39794) + 1,39794$$

$$\text{Log BM sampel} = 1,477121$$

$$\text{BM sampel} = 29,9\text{kDa}$$

- Protein 3

$$\text{LogBM sampel} = \frac{(0,878788 - 0,818182)}{(0,878788 - 0,666667)} \times (1,176091 - 1) + 1$$

$$\text{Log BM sampel} = 1,050311$$

BM sampel = 11,2kDa

LAMPIRAN 2: Uji Statistik

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		paru	limpa	darah
N		9	9	9
Normal Parameters ^a	Mean	3.4978	8.9367	22.4567
	Std. Deviation	1.51339	1.09467	7.36426
Most Extreme Differences	Absolute	.247	.244	.218
	Positive	.247	.244	.143
	Negative	-.147	-.156	-.218
Kolmogorov-Smirnov Z		.742	.731	.653
Asymp. Sig. (2-tailed)		.641	.660	.788
a. Test distribution is Normal.				

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
paru	1.138	2	6	.381
limpa	.133	2	6	.878
darah	6.899	2	6	.028

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
paru	1.138	2	6	.381
limpa	.133	2	6	.878
trans_darah2	10.917	2	6	.010



ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
paru	Between Groups	1.998	2	.999	.367	.707
	Within Groups	16.324	6	2.721		
	Total	18.323	8			
limpa	Between Groups	1.398	2	.699	.512	.623
	Within Groups	8.189	6	1.365		
	Total	9.586	8			
darah	Between Groups	12.886	2	6.443	.092	.914
	Within Groups	420.972	6	70.162		
	Total	433.858	8			

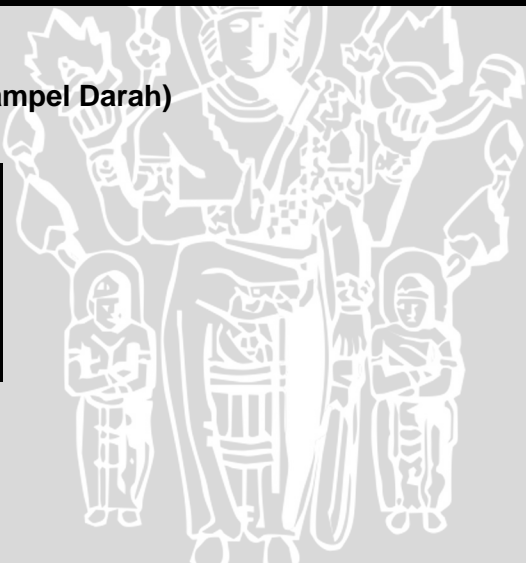
Uji Kruskal-Wallis (Sampel Darah)

Test Statistics ^{a,b}	
	darah
Chi-Square	.622
df	2
Asymp. Sig.	.733

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

perlakuan



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ilham Eka Prasetya Bakti

NIM : 0810713069

Program Studi : Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 05 Maret 2013
Yang membuat pernyataan,

Ilham Eka Prasetya Bakti
NIM. 0810713069

