

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengetahui respon imunitas seluler pada mencit galur BALB/c yang diinjeksi dengan *Outer Membrane Protein* dan yang tidak diinjeksi dengan *Outer Membrane Protein* yang dibuktikan dengan mengukur kadar sel T CD4⁺ di limpa mencit.

Menurut Abbas dan Lichman (2004), makrofag mampu mengenali mikroba asing melalui antigen pada mikroba. Makrofag akan memfagosit mikroba asing tersebut dan mempresentasikannya ke limfonodi. Di limfonodi, kelas MHC yang dipresentasikan oleh makrofag akan menentukan jenis sel T yang akan dirangsang, yaitu mikroba intraseluler akan merangsang pembentukan MHC kelas I dan protein hasil fagositosis akan merangsang pembentukan MHC kelas II. MHC kelas I akan merangsang aktivasi sel T CD8⁺. Pada penelitian ini digunakan *Outer Membrane Protein* yang mengandung protein, sehingga akan terjadi fagositosis makrofag dan hasil fagositosis tersebut akan merangsang peningkatan jumlah sel CD4⁺.

Pada penelitian ini, jalur pemberian injeksi adalah 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 + ajuvan dengan volume 0,05-0,7ml (AALAS,2005). Konsentrasi yang digunakan adalah 100 mikrogram OMP dalam 100 mikroliter, oleh karena dosis pada mencit adalah antara 50-100 mikrogram dengan volume maksimal adalah 100 mikroliter (Harlow dan Lane, 1998).

Pada penelitian ini digunakan ajuvan oleh karena ajuvan dapat meningkatkan respon imun terhadap antigen. Ajuvan CFA mengandung

Mycobacterium Tuberculosis yang telah dimatikan, sehingga mampu menstimulasi respon imun yang lebih kuat dibanding ajuvan IFA. Pada vaksinasi ulangan berikutnya, barulah digunakan ajuvan IFA oleh karena penggunaan ajuvan CFA lebih dari satu kali dapat menginduksi respon inflamasi yang hebat (AALAS, 2005). Pada penelitian ini injeksi pertama dan kedua menggunakan CFA selanjutnya menggunakan IFA untuk stimulasi respon imun yang adekuat.

Dinding sel *M. tuberculosis* memiliki *outer membrane* yang memiliki permeabilitas yang sangat rendah dan mengandung protein-protein untuk menyokongnya, disebut OMP (*Outer Membrane Protein*). OMP merupakan β -barrel protein, yang dicirikan dengan susunan asam amino hidrofilik dan hidrofobik yang saling berselang-seling dalam rantai-rantai β membentuk β -barrel (Song, 2008). *Outer Membrane Protein* (OMP) merupakan komponen penting pada dinding sel *M. tuberculosis* (Niederweis *et al.*, 2010). Protein-protein disekresikan ke ruang sekitar plasma dan masuk ke *outer membrane* yang nantinya berfungsi sebagai *channel* (Faller *et al.*, 2004). Oleh karena itu, *outer membrane* merupakan target penting untuk terapi antibakteri dan sebagai objek studi mengenai mekanisme patogenesis *M. tuberculosis* (Niederweis, 2008). OMP merupakan perlindungan utama dari bakteri TB secara keseluruhan. Pada patogenesis TB, fungsi OMP memainkan peranan penting, terjadi interaksi sel penjamu yang terus menerus. OMP adalah target obat, bukan hanya pada pasien TB dan Lepra, tapi juga pada pasien-pasien yang mengalami penurunan sistem kekebalan tubuh dan semakin dipersulit adanya infeksi lain seperti HIV dan resistensi obat (Meya and Mcadan, 2007). Selain itu, *outer membrane* sebagai antigen stimulasi IFN- γ yang mampu menginduksi makrofag (Agger *et al.*, 2003).

Karakteristik rekombinan kloning *M. tuberculosis* isolasi dari bakteri TB dengan poliklonal antisera kelinci, mengungkapkan bahwa ekspresi klon *M.*

tuberculosis dengan berat molekul 71 kDa antigen terdeteksi, yang menunjukkan bahwa homolog dengan p70 *M. tuberculosis* yang sangat imunogenik (Young, 1985). Dinding sel protein *M. tuberculosis* dengan berat molekul 71 kDa memiliki reaktifitas imun yang tinggi dan memberikan proteksi yang lebih banyak dari pada BCG pada mencit yang diberi ajuvan IFA (Dhiman, 1997). Pada penelitian ini, digunakan OMP hasil pemotongan bakteri *tuberculosis*. Hasil pemotongan kemudian diuji dengan elektroforesis SDS-PAGE untuk melihat berat molekul dari OMP tersebut dan dilakukan uji protein spesifik menggunakan Western Blot. Didapatkan jumlah terbanyak adalah berat molekul 71 kDa. Artinya, *Outer Membrane Protein* (OMP) yang digunakan memiliki kandungan OMP dengan berat molekul sesuai dengan OMP yang bersifat imunogenik pada penelitian Dhiman.

Pada penelitian ini, digunakan OMP (*Outer Membrane Protein*) *M. tuberculosis*. OMP yang masuk ke dalam subkutan akan difagosit oleh makrofag atau sel dendrit. Hasil fagositosis ini akan menghasilkan fragmen-fragmen antigen. Oleh sel dendrit dan makrofag, fragmen antigen ini akan dipresentasikan dalam bentuk MHC kelas II. Sel dendrit dan makrofag akan aktif dan menuju limfonodi regional ataupun limpa sebagai APC (*antigen presenting cell*). Di limfonodi regional maupun limpa, APC akan merangsang sel T CD4⁺ untuk mengalami proliferasi yang diikuti dengan ekspansi klonal dan diferensiasi sel T CD4⁺, sesuai dengan antigen yang dipresentasikan. Kadar sel T CD4⁺ akan meningkat di dalam limfonodi ataupun limpa. Sel T CD4⁺ lalu akan beredar di dalam sirkulasi darah dan menuju daerah injeksi OMP. Di daerah injeksi, sel T CD4⁺ akan mengaktifkan makrofag dengan mengeluarkan sitokin IFN- γ . Sitokin ini akan merangsang factor-faktor transkripsi yang mengkode *lysosomal protease* dan enzim-enzim yang penting dalam reaksi fagositosis, sehingga proses fagositosis akan meningkat. Sel T CD4⁺ yang berada di sirkulasi akan beredar

secara sistemik. Dari peredaran sistemik, sel T CD4⁺ akan menuju organ-organ, salah satunya adalah paru. Hal ini terlihat pada hasil *flowcytometry*, yaitu ada perbedaan jumlah sel T CD4⁺ antara kelompok perlakuan.

Jenis antigen OMP mampu merangsang respon imunitas humoral. Pada vaksinasi pertama, digunakan ajuvan CFA oleh karena ajuvan CFA mengandung bakteri *M. tuberculosis* yang telah dimatikan, sehingga mampu menstimulasi respon imun yang lebih kuat dibandingkan ajuvan IFA. Namun penggunaan ajuvan CFA hanya boleh satu kali karena ajuvan CFA dapat menginduksi respon inflamasi, sehingga pada vaksinasi ulangan selanjutnya, digunakan ajuvan IFA. Menurut Petrovsky dan Aguliar (2004), ajuvan IFA juga dapat merangsang pembentukan sel plasma. Ajuvan IFA bekerja dengan cara membentuk depot antigen dan menstimulasi pelepasan antigen secara perlahan sehingga mampu memicu respon imun yang berlangsung lama (AALAS, 2005). Seharusnya pemberian perlakuan dengan vaksin OMP dibandingkan dengan perlakuan tanpa vaksin OMP, akan menunjukkan respon imun yang berbeda. Pemberian dengan vaksin OMP seharusnya semua merata lebih tinggi terhadap respon imun dari pada perlakuan tanpa vaksin OMP. Namun, pada hasil *flocytometry* beberapa sampel tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan terhadap jumlah sel T CD4⁺. Penyebabnya kemungkinan adalah penginjeksian yang tidak tepat, banyak vaksin yang bocor dan terbuang, sehingga tidak benar-benar masuk ke dalam tubuh mencit, mencit dengan lemak subkutan yang sedikit dan tipis, sehingga vaksin mudah bocor keluar.

Untuk memastikan apakah terjadi aktivitas system imunitas seluler atau humoral, perlu adanya data tambahan berupa kadar IL-4, IL-12, dan IFN- γ . Kadar IL-4 akan meningkat jika terjadi aktivasi system imun humoral dan kadar IL-12 dan IFN- γ akan meningkat jika terjadi aktivitas sistem imun selular.