

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

2.1.1 Etiologi

Tuberkulosis adalah penyakit radang paru kronis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Tidak hanya menyerang paru-paru, namun bakteri ini dapat juga mengenai organ lain. Penularan langsung terjadi melalui inhalasi mikroaerosol ekspektorasi (droplet). Selain *M. tuberculosis*, *M. bovis* juga menyebabkan TB orofaring dan usus yang berjangkit melalui susu sapi perah yang mengidap tuberkulosis. Namun di antara keduanya, *M. tuberculosis* merupakan penyebab tersering (Maitra, 2007).

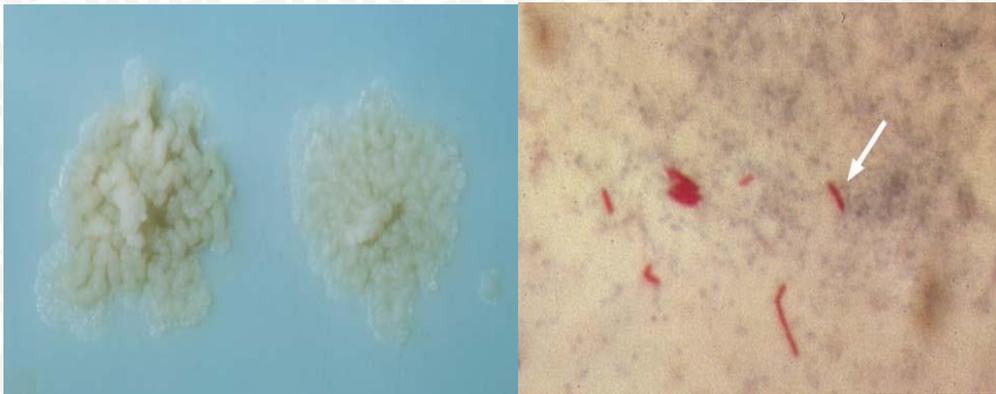
M. tuberculosis berbentuk batang, lurus atau sedikit bengkok dengan ujung tumpul, memiliki panjang antara 1-4 μm dan lebar antara 0.2-0.5 μm , bersifat tahan asam dan bersifat aerobik. Disebut basil tahan asam karena sukar didekolorisasi dengan alkohol ataupun asam. Karena bakteri ini sukar didekolorisasi dengan alkohol (95% etil alkohol yang mengandung 3 % asam hidrokolat), bakteri ini tidak dapat di golongan sebagai gram positif maupun negatif. Pengecatan bakteri ini dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Ziehl Neelsen*. Mikobakteri memperoleh energi dari oksidasi senyawa karbon sederhana dengan peningkatan pCO_2 . Pembelahan biner bakteri TB Selama 18 jam cenderung lebih lambat dari bakteri lainnya (Jawetz, 2007).

Dinding sel *M. tuberculosis* mengandung asam mikolat, yang merupakan asam lemak berantai panjang (C60 – C90) yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan dengan peptidoglikan oleh jembatan

fosfodiester. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks tersebut menyebabkan bakteri *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan alkohol asam. Komponen antigen yang ditemukan di dinding sel dan sitoplasma yaitu komponen lipid, polisakarida, dan protein (Jawetz, 2007).

Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* bersifat fakultatif intraseluler, terutama terhadap fagosit mononuklear seperti makrofag. Saat fagosit menengesti bakteri *M. tuberculosis*, fagosom akan mengalami fusi dengan lisosom. pH di dalam fagolisosom akan turun dari 6,2 menjadi 4,5 dan enzim lisosom akan mendegradasi bakteri (Kasper *et al.*, 2005).

Waktu generasi *Mycobacterium tuberculosis* sangat lambat, yaitu 15-20 jam. Untuk menumbuhkan bakteri ini, digunakan medium *Middlebrook*, medium yang berbasis agar atau *Lowenstein-Jensen* yang merupakan medium berbasis telur. Kedua medium tersebut mempunyai *inhibitors* yang berfungsi melindungi terhadap kontaminan. Waktu yang dibutuhkan untuk menumbuhkan koloni *M. tuberculosis* pada medium LJ adalah 4-6 minggu. Koloni bakteri ini berbentuk kecil dan berwarna kekuning-kuningan pada medium pertumbuhannya (Todar, 2008).



(a)

(b)

Gambar 2.1 (a) Koloni *Mycobacterium tuberculosis* pada medium Lowenstein Jensen. (b) Basil *Mycobacterium tuberculosis* dalam pewarnaan Ziehl Neelsen (Todar, 2008).

Karakteristik antigen *M. tuberculosis* dapat diidentifikasi dengan menggunakan antibodi monoklonal. Saat ini telah dikenal *purified antigens* dengan berat molekul 14 kDa (kiloDalton), 19 kDa, 38 kDa, 65 kDa yang memberikan sensitivitas dan spesifisitas yang bervariasi dalam mendiagnosis TB. Ada juga yang menggolongkan antigen *M. tuberculosis* dalam kelompok antigen yang disekresi dan yang tidak disekresi (somatik). Antigen yang disekresi hanya dihasilkan oleh basil yang hidup, contohnya antigen 30.000 Da, protein MTP 40, dan lainnya (Jawetz, 2007).

2.1.2 Virulensi *Mycobacterium tuberculosis*

Dinding sel *M. tuberculosis* sebagian besar disusun oleh lipid, protein, polisakarida. Mikobakteri kaya akan lipid khususnya asam mikolat yang memiliki rantai panjang (C78-C90) yang berperan pada bakteri untuk bertahan hidup dalam makrofag (Kumar dan Cotran, 2007).

2.1.3 Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Patogenesis individu imunokompeten yang belum pernah terpajan berpusat pada imunitas seluler yang menimbulkan resistensi terhadap organisme dan menimbulkan reaksi hipersensitifitas jaringan terhadap antigen *M. tuberculosis*. Hipersensitif jaringan yang destruktif memunculkan gambaran patologik granuloma perkejuan dan kavitas. Strain virulensi mikobakterium masuk ke dalam endosom makrofag diperantarai reseptor manosa makrofag yang mengenai glikolipid yang terselubung manosa di dinding sel mikobakteri. Setelah itu, organisme dapat menghambat respon mikrobisida normal dengan manipulasi pH endosom dan menghentikan pematangan endosom. Dengan terganggunya fagolisosom yang efektif, mikobakteri dapat berpoliferasi tanpa gangguan. Polimorfisme pada gen NRAMP1 (*Natural Resistance-Associated Makrofag Protein 1*) dibuktikan dengan peningkatan insiden tuberkulosis. Dipostulasikan bahwa variasi genotip NRAMP1 menurunkan fungsi mikrobisida. Berdasarkan proses ini, fase dini TB primer (<3 minggu) pada orang yang belum tersensititasi ditandai dengan proliferasi basil tanpa hambatan di dalam makrofag alveolus dan rongga udara sehingga terjadi bakteremia dan penyebaran ke berbagai tempat. Namun, pada tahap ini kebanyakan masih asimtomatik atau mengalami gejala mirip flu (Kumar dan Cotran, 2007).

Imunitas seluler umumnya muncul dalam 3 minggu setelah pajanan. Antigen mikobakterium diproses kemudian mencapai kelenjar getah bening regional dan disajikan dalam MHC kelas II oleh makrofag ke sel Th0 CD4⁺ yang memiliki reseptor sel Tαβ. Selanjutnya, sel tersebut akan mengalami pematangan menjadi sel T CD4⁺ subtype Th1 dengan bantuan IL-12 yang dihasilkan oleh makrofag yang menampilkan antigen *M. tuberculosis* tersebut.

Subtipe Th1 tersebut dapat mengeluarkan IFN- γ yang penting untuk mengaktifkan makrofag. Selanjutnya, makrofag akan mengeluarkan mediator seperti TNF (yang berperan untuk merekrut monosit) dan IFN- γ yang bersama TNF akan mengaktifkan gen *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). Monosit nantinya akan mengalami pengaktifan dan diferensiasi menjadi histiosit epiteloid yang menandai respon granulomatososa. Sementara itu, iNOS akan menyebabkan peningkatan nitrat oksida di tempat infeksi. Nitrat oksida dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada beberapa konstituen mikobakteri, dari dinding sel sampai DNA. Selain mengaktifkan makrofag, sel T CD4⁺ juga mempermudah terbentuknya sel T sitotoksik CD8⁺ yang dapat mematikan makrofag yang terinfeksi *M. tuberculosis*. Selain sel T $\alpha\beta$, ada juga sel T $\gamma\delta$ yang tidak hanya mengeluarkan IFN- γ tetapi juga sebagai sel efektor sitotoksik. Defek atau gangguan pada setiap langkah pada respon Th1 (termasuk pembentukan IL-12, IFN- γ atau nitrat oksida) menyebabkan granuloma tidak terbentuk sempurna, tidak ada resistensi dan dapat terjadi perkembangan penyakit (Kumar dan Cotran, 2007).

Pada kasus-kasus tertentu, respon aktivitas makrofag tidak muncul atau lemah dan pertumbuhan bakteri hanya dapat dihambat oleh reaksi DTH secara intensif. Lesi akan membesar dan jaringan 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 *M. tuberculosis* dapat menyebar didalam paru-paru atau ke jaringan tubuh lainnya

melalui sistem limfatik atau melalui pembuluh darah. Jika bakteri *M. tuberculosis* telah menyebar keluar 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 sistem imun adalah mencegah dan mengeradikasi infeksi yang timbul (Abbas and Lichtman, 2004).

Mekanisme pertahanan tubuh ini dibagi menjadi dua, 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 suatu mikroba tersebut (Abbas and Lichtman, 2004). Meskipun respon imun adaptif tidak secepat imunitas natural, namun daya hancur dari sistem pertahanan ini lebih kuat dibandingkan dengan imunitas natural (Kumar *et al.*, 2010).

2.2.1 Imunitas Natural

Sel-sel sistem imun berasal dari sel induk yang pluripoten dalam sumsum tulang yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel premyeloid, sel limfosit (T dan B) dan sel pre-monosit makrofag. Komponen utama sistem imun nonspesifik adalah *epithelial barrier*, sel-sel terutama neutrofil dan makrofag, sel dendrit, dan *natural killer (NK cell)* (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

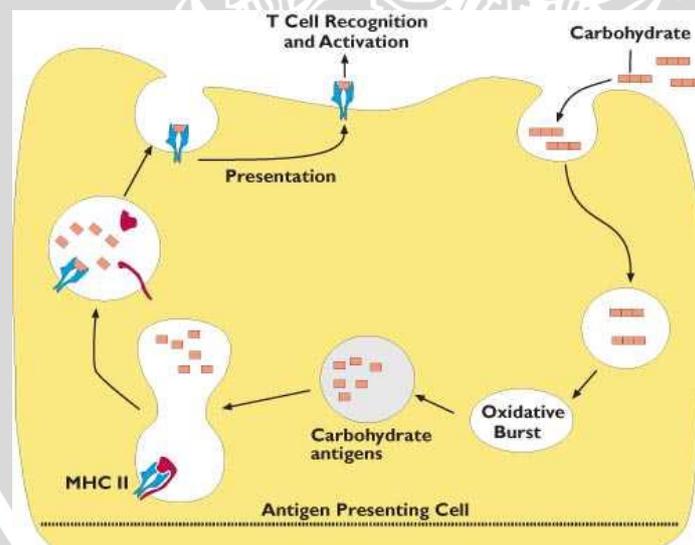
2.2.1.1 Fagositosis

Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan yang dilakukan oleh sel-sel fagosit. Sel-sel fagosit terdiri dari dua macam, yaitu mononuklear dan polimorfonuklear. Fagosit mononuklear terdiri dari monosit berada di darah dan jika bermigrasi ke jaringan menjadi makrofag. Fagosit polimorfonuklear contohnya adalah granulosit, yang terdiri dari neutrofil, basofil dan eosinofil yang berada dalam jaringan. Proses fagosit adalah dimana fagosit memanjangkan membran plasmanya mengelilingi mikroba dan mengingesti mikroba tersebut dalam satu vesikel yang disebut fagosom. Fagosom akan berdifusi dengan lisosom menjadi fagolisosom. Di dalam fagolisosom, terdapat *lysosomal proteasae* 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. Mikroba akan mengalami degenerasi di dalam fagolisosom (Abbas and Lichtman, 2004).

2.2.1.2 Antigen Presenting Cells (APCs)

APC berperan pada awal pengenalan protein asing, mengawali respons imunitas selular dan humoral yang mengaktifasi sel naif, Th, CTL dan sel B. Aktivasi sel Th perlu diatur dengan baik oleh karena respon terhadap antigen dapat fatal. Salah satu pengamanan aktivasi sel Th tersebut adalah melalui TCR yang hanya mengenal antigen yang dipresentasikan melalui MHC-II oleh APC seperti makrofag, sel B dan SD. SD merupakan APC paling efektif karena letaknya yang strategis di tempat-tempat mikroba dan antigen masuk tubuh serta organ-organ yang mungkin dikolonisasi mikroba. SD ditemukan di kulit, epitel hampir semua organ, kelenjar limfoid sebagai sel interdigit, parakorteks sinus

marginal limfatik aferen. SD yang merupakan APC professional terpenting, mempresentasikan fragmen peptida dengan bantuan molekul kostimulator B7 yang secara terus menerus diekspresikan dalam kadar tinggi dan dapat mempresentasikannya ke sel T. Kostimulator atau koreseptor adalah protein permukaan sel yang meningkatkan sensitivitas respon antigen terhadap antigen melalui ikatan dengan ligan yang sesuai dan memfasilitasi aktivasi sinyal. APC mempresentasikan peptida ke sel T CD4+ melalui MHC-II atau ke sel T CD8+ melalui MHC-I, sehingga dapat mengaktifkan sel CD4 dan CD8 secara langsung. Molekul CD4 dan CD8 adalah koreseptor sel T yang mengikat bagian nonpolimorfik dan molekul MHC secara bersamaan dengan ikatan TCR dan residu polimorfik dan peptida (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).



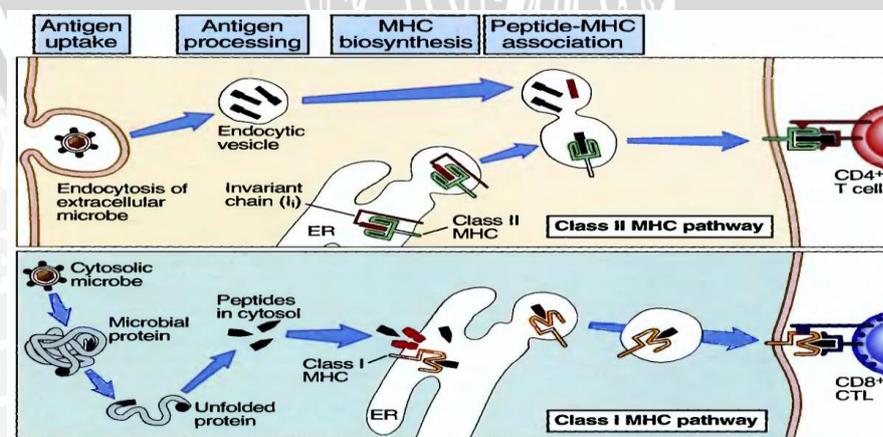
Gambar 2.2 Proses Presentasi Antigen Oleh APC (Cobb, 2004)

2.2.1.5 MHC (*Major Histocompatibility Complex*)

Setelah mengalami fagositosis, protein ekstrasel yang telah diingesti akan diproses dan dipresentasikan oleh APC dalam bentuk MHC. MHC adalah molekul yang dipresentasikan oleh APC. Terdapat 2 tipe MHC yaitu MHC-I dan

MHC-II. Mikroba yang difagosit oleh sel dendrit ataupun makrofag akan dipresentasikan dalam bentuk MHC-II. MHC ini dihasilkan di retikulum endoplasma APC. MHC-II ini akan disekresikan dalam vesikel dan akan mengalami fusi dengan vesikel endosom yang telah berisi hasil fagositosis. Hasil fusi ini menyebabkan peptida 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+ (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Selain MHC-II, terdapat MHC-I. MHC-I diproduksi pada saat ada infeksi intrasel seperti virus, atau karena adanya mikroba yang berhasil menghancurkan fagolisosom dan berhasil lolos kedalam sitoplasma fagosit, misal *M. tuberculosis* di dalam sitosol virus atau mikroba yang bereplikasi akan menghasilkan protein yang dikenal 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 TAP ke dalam RE dan di RE peptida hasil degenerasi akan menempati celah pada MHC-I, MHC lalu dikeluarkan dalam bentuk vesikel permukaan APC dan MHC-I akan mengaktivasi sel T CD8+ CTL (*cytolytic*) (Abbas and Lichtman, 2004).



Gambar 2.3 Ekspresi MHC kelas I dan II pada permukaan makrofag (Abbas and Lichtman, 2004)

2.2.2 Imunitas Adaptif

Respon imun adaptif adalah respon imun yang dimediasi oleh limfosit dan akan aktif jika mikroba mampu melewati *epithelial barrier* dan dipresentasikan ke limfosit di organ limfoid oleh APC (Abbas and Lichtman, 2004). Sel limfosit merupakan sel yang berperan utama dalam sistem imun spesifik, sel T pada imunitas seluler dan sel B pada imunitas humoral. Pada imunitas humoral, sel T CD4⁺ berinteraksi dengan sel B dan merangsang proliferasi dan diferensiasi sel B. Pada imunitas seluler, sel T CD4⁺ mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba atau CD8⁺ untuk membunuh mikroba intraselular yang menginfeksi sel. Kedua sistem spesifik dan non-spesifik bekerja sangat erat satu dengan yang lainnya (Baratawidjaja dan Rengganis, 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 Oxford (2012), makromolekul adalah molekul yang terdiri atas atom-atom dengan berat molekul diatas 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 sel bakteri dan antigen yang larut (*soluble*). Imunitas humoral dimediasi oleh antibodi, yang dihasilkan oleh limfosit B. Antibodi disekresikan dalam sirkulasi dan cairan mukosa. Fungsi antibodi adalah untuk mengeliminasi mikroba dan toksin yang terdapat di dalam darah dan lumen mukosa (Abbas and Lichtman, 2004).

Sistem imunitas humoral diaktifkan melalui dua jalur, yaitu jalur T-*dependent* dan jalur T-*independent*. Pada jalur T-*dependent* antigen-antigen

akan diproses oleh APC dan akan mengaktifkan sel T CD4⁺. Sel CD4⁺ akan teraktivasi menjadi Th1 dan Th2. Th2 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 reseptor sel B (Abbas and Lichtman, 2004).

2.2.2.2 Imunitas Seluler

Imunitas seluler dimediasi oleh limfosit T. Sel limfosit T hanya dapat mengenal fragmen peptida dari antigen protein mikroba dan hanya jika fragmen peptida ini dipresentasikan oleh APC. Fragmen peptida mengacu pada fragmen dari protein hasil degenerasi enzimatik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Limfosit T dibagi menjadi 3, yaitu sel T CD4⁺ (T helper), sel T CD8⁺ (T *cytolytic*) dan *Natural Killer Cells* (NK cells). Sel T CD4⁺ dan CD8⁺ mampu mengenali fragmen peptida dari antigen mikroba pada MHC yang dipresentasikan APC. Sel T CD4⁺ memiliki reseptor terhadap MHC-II dan sel T CD8⁺ memiliki reseptor terhadap MHC-I (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

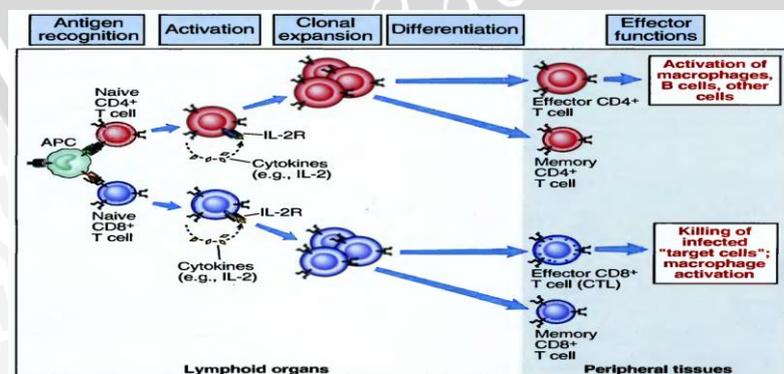
2.2.2.3 Aktivasi Sistem Imunitas Seluler

Inisiasi respon sel T membutuhkan reseptor yang ada di sel T untuk mengenali ligannya yang ada di APC. TCR mengenali ligannya yang terdapat pada MHC. Sel T CD4⁺ akan mengenali ligannya yang akan difagositosis dan disajikan oleh MHC-II, sedangkan sel T CD8⁺ akan mengenali peptida yang berasal dari sitoplasma sel yang disajikan oleh MHC-I. Setelah TCR berikatan dengan fragmen peptida, CD4 akan melekat pada molekul MHC dan mengenali kelas MHC yang menyajikan antigen yaitu MHC-II. Sel T CD4⁺ juga mengekspresikan molekul adesi (LFA-1) yang berfungsi menstabilkan ikatan sel

T CD4⁺ dengan APC. Setelah berikatan secara kuat, pengenalan kostimulator di APC sel T CD4⁺ akan menginduksi pengeluaran sinyal kedua yang akan merangsang aktivasi sel T naif. Dua kostimulator yang diekspresikan oleh APC adalah B7-1 dan B7-2 yang dikenali oleh sel CD28 yang dikenali oleh sel T CD4⁺ (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Kemudian sel dendrit dan makrofag akan terangsang dan mengeluarkan sitokin, terutama IL-4 dan IL-12 yang berfungsi untuk diferensiasi sel T. IL-4 akan merangsang proliferasi sel T CD4⁺ menjadi Th1 dan IL-12 akan merangsang proliferasi sel T menjadi Th2. Jika terjadi peningkatan IL-12 maka akan produksi IL-4 akan menurun, dan begitu sebaliknya (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

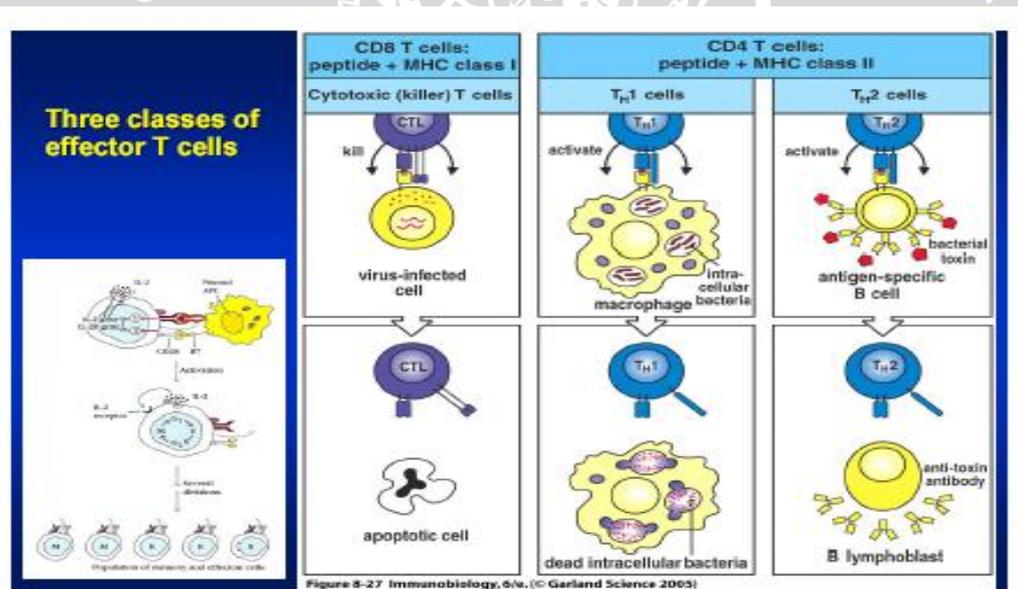
Sel T yang terangsang IL-4 atau IL-12 akan mensekresikan IL-2 dan reseptor IL-2. IL-2 atau *T Cells Growth Factor*, akan menginduksi proliferasi sel T naif. Hasil proliferasi ini adalah peningkatan secara cepat jumlah sel limfosit yang secara spesifik terhadap antigen, atau yang biasa disebut *clonal expansion*. Ekspansi klonal terjadi setelah 1-2 hari infeksi. Jumlah sel T akan meningkat sebanyak 100 sampai 1000 kali lipat. Setelah terjadi ekspansi klonal, akan terjadi proses diferensiasi sel T efektor dan sel T memori. Diferensiasi terjadi 3-4 hari setelah infeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).



Gambar 2.4 Diferensiasi set T naif CD4⁺ menjadi sel T efektor dan memori CD4⁺ dan CD8⁺ (Abbas and Lichtman, 2004).

Th1 berfungsi untuk mengaktivasi makrofag dan Th1 mengaktivasi limfosit B. Sel Th1 dan Th2 mengekspresikan CD40L yang reseptornya terdapat di makrofag, sel dendrit, dan juga sel B. Setelah berikatan, Th1 akan mensekresikan IFN- γ yang mampu meningkatkan fungsi fagositosis makrofag, sedangkan Th2 menghasilkan beberapa sitokin, terutama IL-4 yang merangsang sel plasma untuk memproduksi IgE (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

IFN- γ dan penempelan CD40L pada makrofag akan menginduksi pembentukan faktor-faktor transkripsi. Faktor transkripsi ini menginduksi gen-gen transkripsi yang mengkode *lysosomal protease* dan enzim-enzim yang penting untuk reaksi fagositosis (Abbas and Lichtman, 2004).



Gambar 2.5 Tiga kelas pada perubahan sel T efektor (Abbas and Lichtman, 2004). Sebagian sel T yang berproliferasi akibat respon terhadap antigen akan berkembang menjadi sel T memori, yang akan terus ada meski patogen infeksi sudah tidak ada. Sel T memori ini terdapat di organ limfoid, *mucosa barrier*, dan di sirkulasi. Dengan adanya sel memori paparan antigen yang sama akan menyebabkan respon imun adaptif yang lebih cepat (Abbas and Lichtman, 2004).

Sistem limpa merupakan bagian pelengkap dari sistem imunitas dan berperan penting dalam pertahanan tubuh terhadap penyakit. Bagian system imun ini adalah cairan limfa yang awalnya berupa cairan interstisial yang terkumpul dari sel-sel di seluruh tubuh. Cairan itu mengalir ke kapiler kecil di sela-sela jaringan yang kemudian menyatu dan membentuk pembuluh yang lebih besar yang disebut limfatik (pembuluh limpa). Nodus (kelenjar limpa) adalah daerah penyaring dan penyimpan dalam sistem ini, dan tersebar di sepanjang jalur limpa (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

2.3 Vaksinasi

2.3.1 Pengertian

Imunisasi adalah pemberian kekebalan tubuh terhadap suatu penyakit dengan memasukkan sesuatu ke dalam tubuh agar tubuh tahan terhadap penyakit yang berbahaya bagi seseorang (Depkes RI, 2005). Imunisasi dapat dibedakan menjadi dua kelas utama yaitu imunisasi aktif dan imunisasi pasif. Imunisasi aktif atau vaksinasi 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 ajuvan, 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 Vaksinasi

Terdapat enam jenis imunisasi aktif yaitu vaksin yang menggunakan mikroba yang dilemahkan (*live attenuated*), vaksin inaktif, vaksin subunit, vaksin toksoid, vaksin konjugat, vaksin DNA, dan vaksin yang menggunakan vektor rekombinan (NIAID, 2009). Untuk pencegahan tuberkulosis, dua jenis vaksin yang potensial adalah vaksin *live attenuated* dan vaksin subunit (Palma, 2011).

Vaksin *live attenuated* mampu menginduksi respon imun yang bertahan lama. Vaksin ini diharapkan untuk menyebabkan timbulnya fase subklinis dan respon imun yang persisten seperti infeksi alamiah oleh mikroba yang infeksius. Namun, vaksin *live attenuated* kemungkinan bisa kembali ke bentuk yang virulen, seperti sifat makhluk hidup yang selalu berubah/mutasi yang dapat menyebabkan penyakit. Tidak semua bisa menerima vaksin hidup, seperti orang yang sedang mengalami kemoterapi atau orang yang terkena infeksi HIV. Perlu ditempatkan pada pendingin untuk terapi yang kuat. Agen mikroba di dalam vaksin 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).

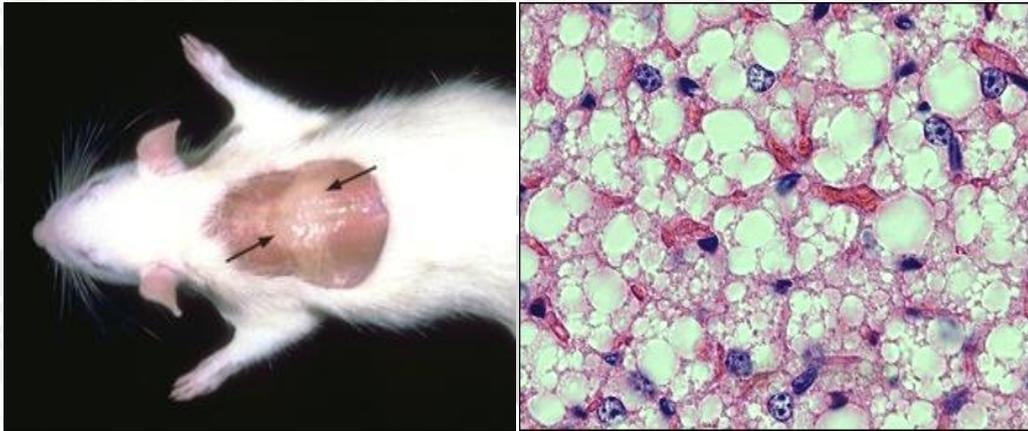
Vaksin subunit tidak menggunakan mikroba utuh, melainkan antigen mikroba. Berbeda dengan vaksin *live attenuated*, kemungkinan untuk timbulnya reaksi samping adalah lebih rendah, oleh karena komponen dalam subunit vaksin tidak mampu melakukan replikasi. Vaksin ini menggunakan antigen-antigen yang diketahui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

Vaksin dapat juga menggunakan DNA hasil rekayasa dan vaksin disebut vaksin subunit rekombinan. Contoh vaksin subunit adalah vaksin toksoid, vaksin kapsul polisakarida bakteri, *Bacillus pertussis* dan *Streptococcus pneumoniae*, glikoprotein virus, protein patogen yang dibuat dengan teknik rekombinan dan peptida sintetik. Vaksin subunit dapat menggunakan satu atau lebih komponen patogen penyebab penyakit (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

2.3.3 Vaksinasi Subkutan Pada Mencit

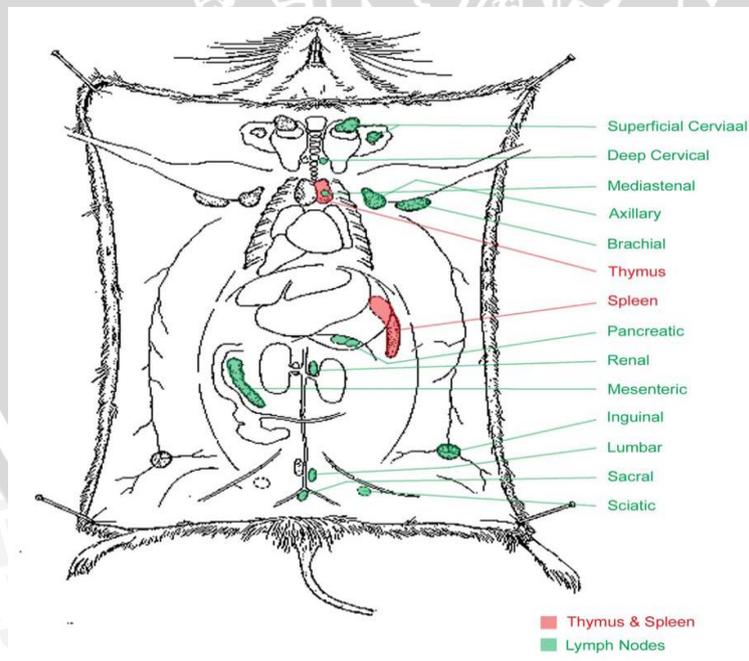
Rute pemberian menentukan kecepatan respon imun terhadap vaksin. Empat rute pemberian vaksin adalah melalui oral, intranasal, subkutan, dan intramuskular. Pemilihan rute pemberian menjadi penting oleh karena rute pemberian yang tepat akan merangsang respon imun yang tepat, tergantung pada tempat utama terjadi invasi patogen (Belyakov and Ahlers, 2009). Salah rute pemberian yang banyak memiliki kelebihan adalah melalui jalur subkutan. Daerah subkutan memiliki banyak kapiler sehingga memungkinkan untuk terjadinya absorpsi obat. Injeksi subkutan biasanya merupakan metode pilihan 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 (Kiessling, 2010).

Terdapat dua jenis jaringan adiposa, yaitu lemak putih dan lemak coklat. Keduanya mengandung trigliserida, namun lemak coklat memiliki vaskularisasi yang lebih banyak dibandingkan lemak putih, sehingga vaksinasi pada daerah lemak mampu merangsang respon imun yang lebih adekuat dibandingkan daerah lemak putih. Pada mencit, lokasi lemak coklat didapatkan di dorsal thorax, di antara skapula, dan di antara hilus ginjal (Austgen and Bowen, 2009).



Gambar 2.6 Lokasi lemak coklat pada mencit dan gambaran histologi lapisan lemak coklat mencit (Austgen and Bowen, 2009)

Pada daerah subkutan juga terdapat limfonodi. Limfonodi pada mencit banyak tersebar dan sulit dibedakan dengan jaringan adiposa sekitarnya. Di antaranya adalah limfonodi aksilar dan submandibular.



Gambar 2.7 Distribusi Limfonodi Pada Mencit (Harrel *et al.*, 2007)

Volume injeksi yang dapat diberikan maksimal adalah 0,1 ml per mencit dewasa (> 25 gram) dengan ukuran spuit 23 ga (*gauge*) atau lebih besar lagi

(Harkness and Wagner, 2007). Dosis antigen yang dapat diberikan adalah sebesar 50-100 μg protein murni (Harlow and 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 K \ddot{u} pffer, 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 kelas II. Selama proses fagositosis ini, makrofag akan berjalan melalui pembuluh limfatik menuju organ limfonodi perifer ataupun limpa, untuk mengaktifkan respon imun adaptif. Di organ limfonodi perifer ataupun limpa, sel T CD4⁺ naif akan mengenali APC melalui MHC kelas 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 CD4⁺ menjadi sel T efektor, yaitu sel *T helper 1* (Th1), sedangkan IL-4 akan merangsang proliferasi sel T CD4⁺ menjadi sel efektor Th2. Setelah sel T CD4⁺ menerima sinyal sitokin tersebut, sel T CD4⁺ akan mensekresi IL-2 atau *T Cell Growth Factor*. IL-12 akan berikatan dengan reseptornya di sel T CD4⁺ dan kemudian akan terjadi ekspansi klonal dan diferensiasi sel T CD4⁺ menjadi sel T efektor (Th1 atau Th2) dan sel memori. Sel Th1 berfungsi mengaktifasi makrofag, melalui sitokin IFN- γ yang dihasilkannya, sehingga kemampuan fagositosis makrofag akan meningkat, sedangkan sel Th2 berfungsi mengaktifasi produksi imunoglobulin melalui sitokin IL-4 yang dihasilkannya. Hasil diferensiasi lainnya dari sel T adalah sel 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, pajanan antigen yang sama akan menyebabkan respon imun adaptif yang lebih cepat (Abbas and Lichtman, 2004).

2.3.5 Keberhasilan Vaksinasi

Vaksinasi bertujuan untuk memberikan imunitas yang efektif dengan menciptakan ambang mekanisme efektor imun yang adekuat dan sesuai, beserta populasi sel memori yang dapat berkembang cepat pada kontak baru dengan antigen dan memberikan proteksi terhadap infeksi. Kadang-kadang seperti polio diperlukan titer antibodi yang tinggi dalam darah dan pada infeksi mikobakteria seperti *M. tuberculosis* imunitas selular yang mengaktifkan makrofag adalah yang paling efektif, sedang pada infeksi virus influenza antibodi dan Tc memegang peranan penting (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Lokasi respon imun juga sangat penting, misalnya pada kolera, yang memerlukan antibodi dalam lumen untuk mencegah adheren dan kolonisasi di dinding saluran cerna. Sejumlah kondisi harus dipenuhi untuk memperoleh vaksin yang berhasil. Antigen harus dengan cepat dibaca, preparat harus stabil pada penyimpanan, harga murah, mudah pemberiannya dan tentunya aman (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

2.3.6 Kegagalan Vaksinasi

Kegagalan pemberian vaksin secara subkutan dapat disebabkan oleh banyak hal. Menurut Funk (1996), penyebab kegagalan vaksinasi adalah karena penyimpanan yang tidak tepat, temperatur yang tidak sesuai, sinar ultraviolet,

dosis yang tidak tepat, ukuran spuit yang salah, higienitas jarum, ataupun stres pada hewan lab.

Penyebab kegagalan vaksin lainnya adalah karena antigen yang diberikan terlalu sedikit atau terlalu banyak. Pemberian antigen yang terlalu banyak, misalnya, dapat merangsang pembentukan antibodi yang pada titik tertentu, dapat menimbulkan efek supresi. Pemberian dosis *booster* yang terlalu cepat juga dapat menimbulkan efek supresi (Hanly *et al.*, 1995).

2.3.7 Ajuvan

Ajuvan adalah substansi yang ditambahkan ke dalam vaksin dengan tujuan untuk meningkatkan respon imun terhadap vaksin (CDC, 2010). Ajuvan pertama kali diciptakan karena terdapat vaksin-vaksin yang tingkat imunogenitas yang rendah. Ajuvan bekerja dengan cara membentuk depot antigen pada daerah injeksi dan melepaskan antigen secara perlahan-lahan sehingga meminimalkan efek supresi (Hanly *et al.*, 1995). Cara kerja ajuvan yang lainnya adalah dengan merangsang ekspresi kostimulator pada APC dan menstimulasi APC untuk mensekresi sitokin untuk mengaktifasi sel T (Abbas and Lichtman, 2004).

Ajuvan diklasifikasikan berdasarkan asalnya (natural, sintetik, atau endogenous), mekanisme aksi, ataupun kandungan fisik atau kimianya. Salah satu contoh ajuvan adalah *Freund's adjuvant*. Ajuvan ini dibagi menjadi dua, yaitu *complete freund's adjuvant* (CFA) dan *incomplete freund's adjuvant* (IFA). CFA mengandung *mannide monooleate*, minyak paraffin, dan bakteri *M. tuberculosis* yang telah dimatikan, sedangkan IFA hanya mengandung *mannide monooleate* dan minyak paraffin, sehingga IFA tidak seefektif CFA dalam

menginduksi respon imun, namun juga tidak seperti CFA yang bersifat menginduksi inflamasi, jika diberikan lebih dari satu kali (AALAS, 2005).

Konsentrasi IFA yang digunakan adalah 1:1 dengan antigen. Jalur penyuntikan antigen-ajuvan 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).

Pada prinsipnya, ajuvan IFA digunakan pada vaksinasi ulangan. 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. Ajuvan IFA bekerja dengan cara membentuk depot antigen dan menstimulasi pelepasan antigen secara perlahan sehingga mampu memicu respon imun yang berlangsung lama (AALAS, 2005).

Menurut Linblad *et al.*, 1997, pemberian CF (*Culture Filtrat*) bakteri *M. tuberculosis* ditambah dengan ajuvan IFA dapat merangsang respon sel limfosit T, menjadi subset Th1. Pada penelitian tersebut didapatkan mencit yang diinjeksi dengan vaksin yang ditambahkan dengan IFA akan merangsang pembentukan Th1, dilihat dari sekresi IFN- γ yang meningkat. Selain itu, pemberian IFA memberikan hasil peningkatan IFN- γ yang lebih besar dibandingkan dengan jenis ajuvan yang lainnya. Namun, pemberian ajuvan IFA juga dapat merangsang pembentukan sel plasma (Petrovsky and Agullar, 2004).

2.4 Bacille Calmette Guerin (BCG)

Salah satu metode pencegahan TB adalah penggunaan vaksin BCG (*Bacillus Calmette Guerin*), yang diberikan sudah 4 milyar kali selama 90 tahun terakhir (Kaufmann *et al.*, 2010). Vaksin ini ditemukan oleh Albert Calmette dan Camille Guerin pada tahun 1912. Vaksin ini bekerja merangsang aktifitas imun adaptif pada tubuh manusia (Amin dan Bahar, 2007). Bacille Calmette Guerin (BCG) merupakan bakteri hidup yang dilemahkan dengan strain *Mycobacterium bovis*. Pada awalnya diisolasi dari sapi dengan tuberkulosis oleh Calmette dan Guren yang bekerja di Paris di Institut Pasteur. Strain ini dengan hati-hati disubkultur setiap tiga minggu selama bertahun-tahun. Selama tiga belas tahun banyak perubahan genetik terdefinisi terjadi untuk mengubah materi genetika asli *M. bovis*. Organisme yang sudah ditemukan itu disebut BCG. Koloni *M. bovis* memiliki penampilan granular kasar sedangkan koloni BCG lembab dan halus.

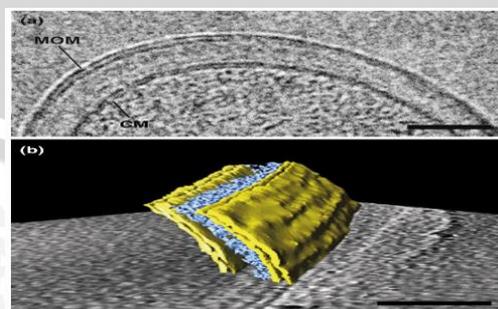
Untuk saat ini, vaksin BCG efektif untuk anak-anak untuk mencegah infeksi meningitis TBC dan TBC miliar. Ini dikarenakan bayi atau anak masih rentan terinfeksi *Mycobacterium Tuberculosis* penyebab penyakit TBC, akibat adanya kontak dengan penderita TBC yang ada di sekitarnya, seperti: orang tua, keluarga, pengasuh, dan lain sebagainya. Namun, vaksin ini tingkat efektifitasnya sangat bervariasi. Vaksin BCG untuk pencegahan TB pada anak-anak seringkali masih efektif, tapi tidak efektif untuk orang dewasa dengan penyakit paru dan sistem imunitas yang buruk (Von, 2002).

Pada studi penelitian saat ini, dalam bidang genetika mengidentifikasi daerah perbedaan tunggal DNA, yaitu RD1 (Region of Differentiation 1) yang tidak ada dalam semua strain BCG dan ada di semua strain *Mycobacterium tuberculosis* (*MTB*) (Lewis *et. al*, 2003). RD1 telah dihapus dari *MTB* galur

H37Rv dan virulensi H37Rv, Δ RD1 mampu menginfeksi makrofag manusia seperti sel THP - 1 , sehingga pada darah perifer manusia jumlah monosit makrofag turun. Dalam setiap sistem ini, H37Rv : Δ RD1 sangat kurang virulen dibandingkan MTB dan sangat mirip dengan kontrol BCG. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa gen yang dikendalikan oleh RD1 sangat penting untuk virulensi MTB dan kerugian yang dari RD1 sangat penting dalam vaksinasi BCG (Lewis *et. al*, 2003).

2.5 Outer Membrane Protein (OMP) *Mycobacterium tuberculosis*

Dinding sel merupakan faktor virulensi utama *Mycobacterium tuberculosis* dan berkontribusi terhadap resistensi obat secara intrinsik. Secara khusus, mikobakteri memiliki dinding sel yang sangat kompleks, terdiri dari membran sitoplasma, yang merupakan penghalang permeabilitas dan sebagai perlindungan dalam kondisi yang tidak memungkinkan (Agger *et al.*, 2003). *Mycobacterium* memiliki lapisan bilayer lipid kedua yang dibentuk oleh sebuah lapisan asam mikolik (kovalen terikat pada peptidoglikan) dan lapisan luar lipid yang bebas (Minnikin,1982). *M. tuberculosis* memiliki dinding sel yang terutama terdiri dari rantai panjang (C60-C90) asam lemak *mycolic* dengan glikolipid interkalasi dan kovalen dihubungkan ke lapisan arabinogalactan-peptidoglikan.



Gambar 2.8 Kapsul *M. tuberculosis* a) Outer membrane *M. tuberculosis* dalam mikroskop cryo electron dan b) dalam gambaran 3D (Niederweis, 2010).

Outer membrane diwakili oleh dua model, dengan struktur asam mikolik yang secara fungsional penting. Mutasi pada *Mycobacterium* yang baik mempengaruhi modifikasi (Bhatt *et al.*, 2008) panjang asam mikolik menghasilkan fenotipe dengan perubahan morfologi koloni dalam sel inang, atau dalam struktur luar-membran yang belum stabil dengan sifat permeabilitas yang berubah. Sementara mutasi yang mengakibatkan hilangnya asam mikolik yang lengkap, mematikan mikobakteria mutan yang sesuai terkait erat dengan corynebacteria (Portevin, 2004). Mikroskop Cryo-elektron dari mutan yang kekurangan asam mikolik *Corynebacterium glutamicum* menunjukkan bahwa membran luar bilayer hilang (Hoffmann, 2008). Amplop sel mutan ini juga lebih menyerap obat, melihat pentingnya membran luar sebagai penghalang permeabilitas (Gebhardt, 2007).

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). 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). Selain itu, *outer membrane* sebagai antigen stimulasi IFN- γ yang mampu menginduksi makrofag (Agger *et al.*, 2003).