

BAB 6

PEMBAHASAN

Sistem imun tubuh adaptif manusia terdiri atas sistem imun selular dan humoral. Sistem imun selular berguna untuk mengeliminasi bakteri yang hidup di dalam sel, sedangkan sistem imun humoral berguna untuk mengeliminasi bakteri yang ada dalam darah. Untuk melawan infeksi *M.tuberculosis*, sistem imun yang bekerja adalah sistem imun selular, karena *M.tuberculosis* dapat hidup didalam makrofag dan kemampuannya dalam menghambat fusi fagolisosom, sedangkan sistem imun humoral tidak mempunyai peran yang penting dalam melawan infeksi *M.tuberculosis*. Manusia yang baru pertama kali terinfeksi antigen dari *M.tuberculosis*, dapat disebut sebagai kontak primer. Pada kontak primer, sistem imunnya baru pertama kali mendeteksi antigen *M.tuberculosis*. Antigen yang masuk akan dieliminasi oleh makrofag terlebih dahulu dengan cara fagositosis. Makrofag kemudian akan mempresentasikan antigen *M.tuberculosis* kepada Sel T naif (Th0). Tidak hanya makrofag, APC lainnya yang mendeteksi antigen juga mempresentasikan antigen kepada sel T naif. Bila antigen yang dideteksi dipresentasikan bersama MHC I maka, sel T naif akan berdiferensiasi menjadi sel T CD8+, sedangkan bila bersama MHC II, maka sel T naif akan berdiferensiasi menjadi Sel T CD4+. Sel CD4+ kemudian akan berdiferensiasi lagi menjadi sel efektor dan memori. Sel efektor CD4+ dapat berubah menjadi T Helper (Th) 1 atau T Helper 2 tergantung dari sitokin yang dikeluarkan oleh APC atau makrofag. Diferensiasi menjadi Th1 dipengaruhi oleh Interleukin (IL)-12, dan diferensiasi menjadi Th2 dipengaruhi oleh IL-4. Pada infeksi *M.tuberkulois*, diferensiasi sel CD4+ lebih dominan menjadi Th1, meskipun tidak dapat dikesampingkan juga bahwa *M.tuberculosis* dapat menstimulasi terbentuknya sel

Th2. Kontak dengan *M.tuberculosis* dapat meningkatkan sistem imun selular dan humoral (zagorka, 2012). Sel Th1 kemudian akan mengeluarkan IFN γ yang berfungsi untuk mengaktifkan makrofag. IFN γ juga berfungsi untuk menghambat diferensiasi CD4+ menjadi Th2. Dalam sistem imun selular, Th2 berfungsi untuk membatasi aktivitas makrofag agar tidak terjadi kerusakan pada jaringan. Jumlah makrofag yang terlalu banyak dalam jaringan dapat merusak jaringan itu sendiri. Th2 mengeluarkan IL-4 yang berfungsi untuk menghambat diferensiasi sel T CD4+ menjadi Th1, bila jumlah Th1 berkurang maka produksi IFN γ akan berkurang juga, sehingga makrofag yang teraktivasi menjadi menurun (Abbas dan Litchman, 2004).

Dalam menghadapi infeksi *M.tuberculosis* keseimbangan antara sel Th1 dan Th2 adalah hal yang penting, karena jika diferensiasi limfosit CD4+ menjadi Th2 lebih dominan dan diferensiasi CD4+ menjadi Th1 berkurang, maka aktivasi respon imun selular yang dibutuhkan untuk eliminasi bakteri intraselular juga berkurang. Berdasarkan konsep tersebut, maka pada individu yang terinfeksi TB yang intraselular apabila respon imun yang ditunjukkan dengan aktivasi CD4+ lebih banyak memproduksi IL-4, menunjukkan respon imun yang kurang efektif untuk eliminasi infeksi *M.tuberculosis* yang intraselular. Meskipun respon imun humoral secara umum dapat mengikat antigen ekstraselular, namun dengan pengaruh IL-4 yang menginduksi diferensiasi isotip kearah IgE, menjadikan tidak efektif untuk eliminasi *M.tuberculosis* di dalam sirkulasi darah yang berpotensi dalam penyebaran *M.tuberculosis* (Abbas *et al.*, 2007).

Berbeda dengan sistem imun kontak primer, pada kontak sekunder terdapat sel memori yang terbentuk akibat paparan antigen (penyebab infeksi) sebelumnya. Pada individu yang respon imunnya baik, ketika terjadi paparan

antigen *M.tuberculosis* yang kedua kalinya, sel memori akan berdiferensiasi menjadi sel Th1 lebih cepat dan lebih banyak. Sel Th1 yang terbentuk lebih banyak ini, akan mengeluarkan IFN γ lebih banyak juga, sehingga diferensiasi sel CD4+ menjadi sel Th2 semakin terhambat, IL-4 yang diproduksi akan semakin sedikit pula. Ketika tubuh semakin banyak terpapar dengan antigen yang sama, maka antigen yang beredar dalam tubuh juga semakin banyak sehingga produksi antibodi juga semakin banyak. Namun jika sistem imun selular bekerja dengan baik, antigen yang ada cepat dieliminasi, sehingga induksi produksi antibodi berkurang. Disisi lain, pada individu yang respon imunnya baik, terdapat mekanisme *antibody feedback* yang dapat mengatur agar tidak terjadi *excessive antibody*. Mekanisme *antibody feedback* terjadi apabila terdapat sisa-sisa antigen yang dapat berikatan dengan antibodi membentuk antigen-antibodi kompleks dan Fc antibodi dari antigen-antibodi kompleks berikatan dengan receptor Fc γ RII pada membran sel B yang kemudian akan memberikan induksi sinyal ke sistem sitoplasmik dan nuclear sel B untuk menurunkan produksi antibodi. Sel B yang mengurangi produksi antibodinya memberikan respon kepada sel Th2 untuk mengurangi produksi IL-4. Jadi pada individu yang sistem imunnya baik apabila ada antigen yang berlebih, produksi IL-4 akan semakin sedikit karena selain terdapat supresi dari Th1, terdapat juga mekanisme *antibody feedback* dari sel B (Abbas dan Litchman, 2004).

Pada pasien TB sistem imun tidak berjalan secara normal, terjadi ketidakseimbangan regulasi Th1 dan Th2 yang menyebabkan sistem imun selular tidak bisa berjalan dengan maksimal. Hal ini bisa disebabkan beberapa faktor. Faktor pertama adalah penurunan respon makrofag untuk mengeluarkan IL-12 sehingga diferensiasi sel CD4+ menjadi Th1 tidak dominan lagi (Guo, 2012).

Diferensiasi kearah Th1 yang menurun menyebabkan produksi $IFN\gamma$ menjadi turun juga. Karena produksi $IFN\gamma$ turun, supresi sel CD4+ menjadi sel Th2 tidak maksimal dan menyebabkan peningkatan respon Th2 (Mohammed, 2005). Faktor kedua adalah hubungan timbal balik respon imun Th1 dan Th2. Respon Th2 yang meningkat karena tidak ada lagi yang mensupresinya, menyebabkan produksi sitokin-sitokin sel Th2 termasuk IL-4 meningkat juga. Interleukin-4 yang meningkat akan semakin menghambat diferensiasi CD4+ menjadi sel Th1, sel Th1 yang semakin berkurang jumlahnya tidak bisa lagi mensupresi sel Th2, pada akhirnya respon Th2 dan produksi IL-4 akan meningkat secara signifikan. Keparahan dari manifestasi klinis infeksi *M.tuberculosis* mempunyai hubungan positif terhadap banyaknya produksi IL-4, semakin parah penyakit semakin tinggi pula IL-4 yang dihasilkan. Respon Th2 yang meningkat menjadi faktor signifikan dalam perkembangan dan patogenesis TB (Guo, 2012). Peningkatan IL-4 juga mempunyai hubungan positif dengan tingkat keparahan penyakit TB paru (Ghatole, 2005)

Pada subyek sehat, kontak dan pasien setelah diinduksi protein 38 kDa terdapat perbedaan ekspresi IL-4 yang signifikan. Produksi IL-4 (gated %) masing-masing subyek berjumlah sehat=0,72, kontak=0,44 dan pasien=2,59. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing subyek, dengan p-value sebagai berikut; subyek sehat dengan kontak=0.047, subyek sehat dengan pasien=0,00 dan subyek kontak dengan pasien=0,00 Subyek sehat dengan induksi protein 38 kDa dalam penelitian ini merupakan kontak sekunder, karena sudah 2 kali terpapar oleh antigen *M.tuberculosis*. Paparan pertama didapat ketika tes tuberkulin dengan menggunakan PPD yang merupakan antigen poliklonal, hasil DTH yang negatif menunjukkan bahwa subyek sehat belum

pernah terpapar antigen sebelumnya atau penderita TB aktif (karena respon imun selular sudah rusak). Perlakuan induksi protein 38 kDa dalam penelitian ini merupakan paparan yang kedua kalinya (diasumsikan bahwa didalam PPD yang poliklonal terdapat juga epitop protein 38 kDa) sehingga respon imun baik selular maupun humoral meningkat. dengan demikian termasuk adanya peningkatan IL-4 yang merupakan representasi respon imun humoral. Pada subyek kontak yang diinduksi dengan protein 38 kDa memproduksi paling sedikit IL-4, ini dikarenakan subyek kontak dengan respon imun yang baik dan sudah terpapar antigen *M.tuberculosis* berkali-kali, baik limfosit Th0 maupun sel memori limfosit T mendapatkan induksi aktivasi berulang-ulang. Induksi protein 38 kDa, menstimulasi diferensiasi CD4+ menjadi sel Th1 secara cepat dan banyak, walaupun protein 38 kDa juga mampu menstimulasi CD4+ menjadi Th2, tetapi jumlahnya tidak banyak. Pada individu yang sistem imunnya baik diferensiasi limfosit CD4+ kearah Th2 dihambat oleh banyaknya IFN γ yang diproduksi oleh sel Th1, serta adanya mekanisme *negative feedback* pereaksi tersebut. Pada subyek pasien, terjadi kerusakan pada sistem imun selular. APC yang mempresentasikan protein 38 kDa kepada sel CD4+ tidak lagi dominan mengeluarkan IFN γ sehingga produksi IL-4 oleh sel CD4+ teraktivasi lebih dominan yang menyebabkan diferensiasi CD4+ lebih condong kearah Th2. Sel Th2 dalam hal ini lebih banyak memproduksi IL-4 sehingga mampu untuk menekan diferensiasi CD4+ menjadi Th1 (Abbas *et al.*, 2007).

Juga dilakukan analisis statistik tentang perbedaan produksi IL-4 pada kelompok yang diinduksi protein 38 kDa, PPD atau tanpa Induksi apapun (kontrol). Pada subyek sehat, ekspresi IL-4 pada pemberian protein 38 kDa atau PPD lebih sedikit daripada pada perlakuan kontrol, hasil analisis juga menunjukkan perbedaan

yang signifikan dengan p-value kelompok induksi protein 38 kDa dengan kontrol=0,013. Masing-masing jumlah IL-4 yang diekspresikan (gate %) adalah sebagai berikut; protein 38 kDa=0,72, PPD=0,62, kontrol=1,00. Pada subyek sehat dengan induksi Protein 38 kDa atau PPD merupakan kontak sekunder, sedangkan subyek sehat dengan kontrol merupakan kontak primer. Subyek sehat dengan kontrol memproduksi paling banyak IL-4 dibandingkan 2 kelompok lainnya. Kelompok kontrol hanya sekali terpapar antigen *M.tuberculosis* yaitu PPD saat tes tuberkulin, dan pada waktu kultur tidak ada induksi dari antigen apapun sehingga sel-sel imun yang ada pada PBMC tidak terinduksi untuk aktivasi ulang. Pada kelompok yang diinduksi dengan protein 38 kDa atau PPD, berdasarkan analisis statistik, perbedaan ekspresi IL-4 dari kelompok ini menunjukkan hasil yang signifikan dengan p-value 0,013. Meskipun sama-sama kontak sekunder, kelompok dengan induksi PPD lebih baik respon imunnya, karena paparan pertamanya adalah PPD, sehingga bila diinduksi dengan antigen (PPD) yang sama, maka sel T memori yang terbentuk sebelumnya dapat merespon dengan sempurna. PPD yang merupakan gabungan dari beberapa antigen mycobacterium, seperti *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.sacrofulaceum* dan sebagainya dan dipaparkan saat pertama kali adalah antigen poliklonal yang dalam proses produksinya dikondisikan untuk lebih mengaktifkan jalur respon selular (Th1) (Black *et al.*, 2003). Diamsusikan bahwa dalam PPD terdapat juga protein 38 kDa. Ketika protein 38 kDa diinduksikan, sel T memori yang merespon dengan cepat adalah sel T memori yang sebelumnya terbentuk karena deteksi antigen protein 38 kDa saja (monoklonal), sedangkan sel T yang terbentuk karena deteksi antigen lain yang ada dalam PPD tidak ikut merespon. Pada kelompok yang diinduksi oleh protein 38 kDa, IL-4 terekspresi lebih banyak. Karena jumlah sel T memori yang merespon berbeda

antara kelompok dengan Induksi protein 38 kDa dan PPD, maka jumlah diferensiasi sel T CD4+ menjadi sel T helper akan berbeda, sehingga menyebabkan produksi IL-4 juga berbeda.

Pada subyek kontak juga dibandingkan perbedaan produksi IL-4 dengan kelompok yang diinduksi protein 38 kDa, PPD atau tanpa Induksi apapun (kontrol). Semua kelompok pada subyek kontak diasumsikan bahwa terjadi paparan berkali-kali sehingga terjadi jumlah antigen yang berlebih. Kelompok kontrol memproduksi IL-4 paling tinggi berjumlah (gate %) 0,91, dibandingkan 2 kelompok lainnya (induksi protein 38 kDa 0,44, induksi PPD 0,61), karena meskipun terpapar berkali-kali, pada waktu kultur kelompok kontrol tidak diinduksi lagi dengan antigen, sehingga tidak ada respon imun yang baru, IL-4 yang diproduksi merupakan hasil dari respon imun paparan sebelumnya. Jika ada antigen yang masuk dalam tubuh, maka sel CD4+ naif akan merespon dan berdiferensiasi menjadi Th1 atau Th2 dengan memproduksi IL-12 atau IL-4. IL-4 dan IL-12 bekerja dengan cara menempel pada reseptor CD4+, sehingga CD4+ akan berdiferensiasi menjadi Th1 atau Th2. Perbedaan produksi IL-4 pada kelompok induksi protein 38 kDa dengan kelompok kontrol menunjukkan hasil yang signifikan, dengan p-value 0,002. Pada subyek kontak sudah terjadi *excessive antigen*, sehingga menyebabkan terjadinya *antibody feedback*. *Antibody feedback* terjadi karena antigen yang berlebih yang menyebabkan sel B berproliferasi menjadi banyak, sudah berhasil dieliminasi oleh sistem imun selular, sehingga sel B yang sudah tidak dibutuhkan lagi melakukan apoptosis. Ikatan antibodi-antigen yang berada dalam darah berikatan dengan sel B, dan memberikan sinyal negatif untuk tidak memproduksi antibodi lagi. Untuk menghentikan produksi antibodi, sel B memberikan sinyal kepada sel T untuk mengurangi produksi IL-4. Kelompok dengan induksi protein 38 kDa

mengekspresikan IL-4 lebih sedikit daripada kelompok dengan induksi PPD, tetapi berdasarkan hasil statistik dengan $p\text{-value}=0,227$ menunjukkan bahwa perbedaannya tidak terlalu signifikan. Pada kelompok dengan induksi protein 38 kDa dapat memproduksi IL-4 lebih sedikit dikarenakan kemungkinan protein 38 kDa mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap reseptor sel B atau MHC II daripada PPD sehingga menyebabkan antibodi/immunoglobulin (sistem imun humoral) yang terbentuk lebih banyak dengan protein 38 kDa daripada dengan PPD. Disisi lain banyaknya ikatan antibodi-antigen yang terbentuk karena isi antigen dan antibodi teraktivasi berpengaruh dalam sinyal negatif yang dikirimkan, sehingga semakin banyak antibodi-antigen kompleks yang terbentuk menyebabkan sinyal negatif yang dikirimkan kepada sel B semakin banyak pula, yang kemudian akan menyebabkan kebutuhan akan IL-4 akan berkurang juga (Abbas dan Litchman, 2004).

Sedangkan pada subyek pasien, menunjukkan yang berlawanan dengan subyek sehat dan kontak. Pada subyek pasien IL-4 terekspresikan paling banyak pada kelompok dengan induksi protein 38 kDa yang berjumlah (gate %)=2,59 dan kemudian berturut PPD dengan jumlah=2,08 dan kontrol=1,60. Perbedaan yang signifikan hanya terjadi pada perbandingan kelompok dengan induksi protein 38 kDa dan kontrol saja dengan $p\text{-value}=0,001$, sedangkan perbandingan kelompok Induksi protein 38 kDa dan PPD dengan $p\text{-value}=0,069$ tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Pada dasarnya pada imunitas pasien TB sudah terjadi ketidakseimbangan respon Th1 dan Th2. Pada pasien TB respon Th1 akan tersupresi, dan sistem imun akan lebih dominan pada respon Th2. Induksi dari Protein 38 kDa dan PPD tidak memberikan stimulasi pada CD4+ menjadi Th1, karena sistem imun selularnya sudah rusak, induksi malah akan membuat CD4+ berdiferensiasi menjadi sel Th2, sel Th2 kemudian akan memproduksi IL-4 lebih

banyak lagi, ini yang menyebabkan jumlah IL-4 yang terekspresi pada kelompok dengan Induksi protein 38 kDa dan PPD lebih banyak daripada kelompok kontrol. Jumlah ekspresi IL-4 dari kelompok protein 38 kDa lebih banyak daripada kelompok PPD. Ini terjadi karena protein 38 kDa lebih kemungkinan immunogenik daripada PPD, sehingga sel CD4+ lebih terstimulasi untuk menjadi Th2 pada kelompok dengan induksi protein 38 kDa daripada kelompok dengan induksi PPD (Abbas *et al.*, 2007).

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada individu sehat dan kontak yang sistem imunnya baik induksi protein 38 kDa bisa mensupresi respon imun Th2 yang ditunjukkan dengan rendahnya ekspresi IL-4, selain itu IL-4 juga mempunyai diduga afinitas yang lebih tinggi terhadap receptor sel B dan MHC II daripada PPD. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mauricio (2005), menunjukkan bahwa tikus yang telah diberi protein 38 kDa mempunyai daya hidup lebih lama daripada yang diberi vaksin BCG. Setelah di paparkan dengan *M.tuberculosis* yang sama, tikus dengan vaksin BCG memproduksi IL-4 empat kali lebih banyak daripada tikus yang diinjeksikan protein 38 kDa. Tikus yang diberi protein 38 kDa juga memproduksi antigen IgG2 lebih banyak daripada tikus yang diberi vaksin BCG. Tidak beda dengan penelitian Mauricio, Fonseca (2001) menggunakan tikus pada penelitiannya, dari darah tikus yang sudah diinjeksikan protein 38 kDa secara subkutan, didapatkan produksi IFN γ meningkat, dan antibody IgG2 tidak meningkat pada injeksi awal, tetapi kemudian meningkat secara signifikan setelah injeksi booster. Regulasi antibody IgG2 pada tikus dipstimulasi oleh IFN γ dan dihambat oleh IL-4. Jumlah IgG2 yang banyak mengindikasikan bahwa IFN γ lebih banyak terproduksi daripada IL-4 (Coffman, 2006).

Penelitian ini memiliki kelemahan, yaitu tidak digunakannya marker CD4 untuk melihat ekspresi IL-4 sehingga masih bisa diragukan apakah IL-4 yang diekspresikan merupakan produksi dari sel Th2 saja, karena IL-4 dapat diproduksi oleh sel-sel lain seperti eosinofil, basofil, sel mast, dan sebagainya. Walaupun ekspresi IL-4 dihasilkan dari kultur PBMC, masih ada kemungkinan sel-sel lain masih ada dalam kultur tersebut. Selain itu kelemahan pada penelitian ini adalah tidak terdeskripsikan subyek kontak sebagai kontak primer, kontak sekunder atau *excessive antigen* karena masing-masing jenis kontak sistem imunnya berbeda .

