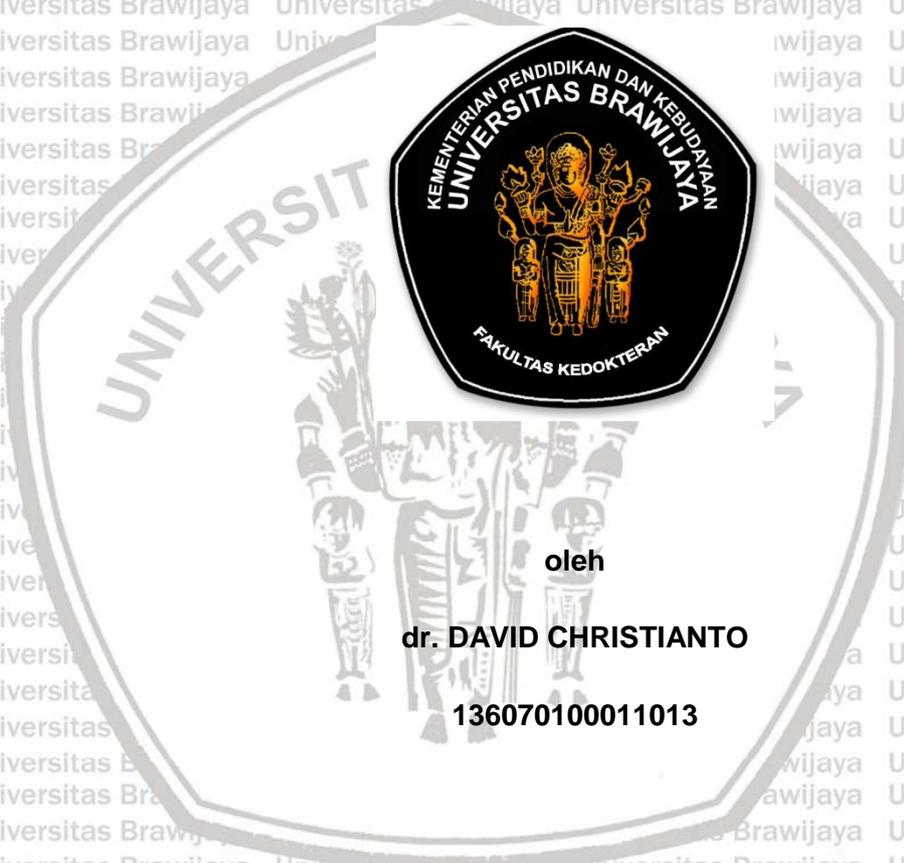


**EFEK PEMBERIAN PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT6-CFP10  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP PERSENTASE IL2 DAN  
IL10 YANG DIPRESENTASIKAN SEL T CD8 PADA KULTUR PBMC**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister Ilmu Biomedik**



oleh

**dr. DAVID CHRISTIANTO**

**136070100011013**

**PROGRAM PASCA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

Judul Tesis :

**EFEK PEMBERIAN PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT6-CFP10  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP PERSENTASE IL2 DAN  
IL10 YANG DIPRESENTASIKAN SEL T CD8 PADA KULTUR PBMC**

Nama : dr. David Christianto

NIM : 136070100011013

Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik

Peminatan : Imunologi

**KOMITE PEMBIMBING**

Ketua : Dr.rer.nat Tri Yudani MR., M.App.Sc

Anggota : Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM, Sp.MK(K)

**KOMITE PENGUJI**

Penguji 1 : Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS., DMM, Sp.MK(K)

Penguji 2 : Prof.Dr.dr. Teguh WS., DTMH, M.Sc,Sp.Park

**KOMITE MONEV**

Monev : Dr. dr. Endang Sriwahyuni, M.S

Tanggal Ujian : 17 Januari 2019

Keputusan : Lulus

## RINGKASAN

**David Christianto**, NIM. 136070100011013. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Efek Pemberian Protein Rekombinan Fusi ESAT6-CFP10 *Mycobacterium tuberculosis* terhadap Persentase IL2 dan IL10 yang Dipresentasikan Sel T CD8 pada Kultur PBMC. Ketua Komisi Pembimbing: Tri Yudani Mardining Raras, Anggota: Sumarno.

Sampai saat ini keberhasilan vaksin BCG dalam memberikan perlindungan terhadap tuberkulosis (TB) pada orang dewasa di Indonesia sebesar 37%, oleh karena itu diperlukan vaksin alternatif yang lebih efektif. Protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 merupakan kandidat vaksin yang potensial. Vaksin subunit merupakan vaksin yang paling banyak diteliti, salah satunya adalah protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10. IL2 dan IL10 sel T CD8 memainkan peran penting dalam respon imun melawan TB. Untuk memenuhi tujuan tersebut persentase IL2 dan IL10 sel T CD8 diukur sebagai respon terhadap paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 pada PBMC dari kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB. Setiap kelompok diberi perlakuan tanpa antigen, PPD, dan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10. Setelah dipapar protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10, terjadi peningkatan persentase IL2 yang signifikan ( $p = 0,019$ ) antar kelompok, namun demikian sama yang terjadi pada kelompok tanpa paparan antigen ( $p = 0,026$ ) antar kelompok. Sebaliknya peningkatan persentase IL2 antar kelompok yang dipapar PPD tidak signifikan secara statistik ( $p = 0,396$ ). Persentase IL10 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompoknya baik tanpa paparan antigen ( $p = 0,617$ ), PPD ( $p = 0,351$ ), maupun protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 ( $p = 0,257$ ). Didapatkan persentase IL2 yang tidak berbeda secara signifikan antar perlakuan pada kelompok sehat ( $p = 0,309$ ), kelompok kontak TB ( $p = 0,318$ ), dan kelompok pasien TB ( $p = 0,424$ ). Demikian juga dengan persentase IL10 yang tidak berbeda secara signifikan antar perlakuan pada kelompok sehat ( $p = 0,908$ ), kelompok kontak TB ( $p = 0,352$ ), dan kelompok pasien TB ( $p = 0,776$ ). Studi ini menunjukkan bahwa protein fusi rekombinan ESAT6-CFP10 dapat meningkatkan persentase IL2 tetapi tidak dengan IL10. Akan tetapi peningkatan persentase IL2 akibat paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 tidak berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan tanpa antigen ataupun dengan paparan PPD.

**Kata kunci** : *Mycobacterium tuberculosis*, protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10, IL2, IL10, CD8, kultur PBMC.

## SUMMARY

**David Christianto**, NIM. 136070100011013. Postgraduate Programs Faculty of Medicine University of Brawijaya Malang. Effect of *Mycobacterium tuberculosis*'s ESAT6-CFP10 Recombinant Fusion Protein addition on IL2 and IL10 percentages which presented by CD8 T Cell in PBMC Culture. Ketua Komisi Pembimbing: Tri Yudani Mardining Raras, Anggota: Sumarno.

Until now, the success of the BCG vaccine in providing protection against tuberculosis (TB) in adults in Indonesia is 37%, therefore it urges to find more effective alternative vaccines. ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein is a potential vaccine candidate. The subunit vaccine is the most studied vaccine, one of which is the ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein. ESAT6 and CFP10 can stimulate IL2 and IL10 CD8 T cells which play an important role against TB. To meet these objectives, the expression of IL2 and IL10 CD8 T cells was measured in response of ESAT6-CFP10 recombinant fusion proteins in the healthy group, TB contacts, and TB patients. Each group was treated without antigen, PPD, and ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein. Comparison between groups after exposure to ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein, showed a significant difference in the percentage of IL2 ( $p = 0.019$ ), as well as the percentage of IL2 between groups without antigen exposure ( $p = 0.026$ ) can be seen a significant increase from healthy group, TB contact, to TB patients. Conversely, an increase in the percentage of IL2 between groups exposed to PPD was not statistically significant ( $p = 0.396$ ). Unfortunately the percentage of IL10 did not show a significant difference between groups either without antigen exposure ( $p = 0.617$ ), PPD ( $p = 0.351$ ), and ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein ( $p = 0.257$ ). The percentage of IL2 was not significantly different between treatments in the healthy group ( $p = 0.309$ ), contact group TB ( $p = 0.318$ ), and groups of TB patients ( $p = 0.424$ ). Likewise with the percentage of IL10 which did not differ significantly between treatments in the healthy group ( $p = 0.908$ ), the TB contact group ( $p = 0.352$ ), and the TB patients group ( $p = 0.776$ ). This shows that the ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein can increase the percentage of IL2 but not IL10. However, the increase in the percentage of IL2 due to exposure to ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein was not significantly different when compared to without antigen or PPD exposure.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT6-CFP10 recombinant fusion protein, IL2, IL10, CD8, PBMC culture.

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur bagi Tuhan YME atas berkat dan rahmatNya yang melimpah sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul **“EFEK PEMBERIAN PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT6-CFP10 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP PERSENTASE IL2 DAN IL10 YANG DIPRESENTASIKAN SEL T CD8 pada Kultur PBMC”**.

Ketertarikan penulis akan topik ini didasari karena kurang berhasilnya imunisasi BCG dalam menurunkan kejadian tuberkulosis paru. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan protein yang dapat menggantikan peran BCG sebagai pilihan vaksinasi untuk mencegah tuberkulosis paru.

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

1. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS sebagai rektor Universitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang memfasilitasi terselenggaranya penelitian ini.
3. dr Hidayat Suyuti, PhD, Sp.M sebagai ketua Program Magister Ilmu Biomedik yang mengijinkannya terselenggaranya penelitian ini.
4. Dr.rer.nat Tri Yudani MR., M.App.Sc sebagai pembimbing pertama yang dengan sabar membimbing untuk bisa menulis dengan baik, membantu dalam penyelesaian setiap masalah yang berhubungan dengan penelitian, dan senantiasa memberi semangat sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.
5. Prof.Dr.dr. Sumarno, DMM,Sp.MK(K) sebagai dosen pembimbing kedua yang memberikan banyak masukan mengenai alur berpikir dan konsep dalam pengerjaan penelitian ini.
6. Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS., DMM,Sp.MK(K) sebagai penguji 1 yang dengan murah hati memberikan saran dan masukan dalam penulisan.

7. Prof.Dr.dr. Teguh WS., DTMH,M.Sc,Sp.ParK sebagai penguji 2 yang dengan penuh kesabaran membimbing dalam penulisan karya ilmiah dan memberikan semangat.

8. dr. Maimun. Z. Arthamin, M.Kes,Sp.PK dan segenap staf, dokter PPDS di bagian Ilmu Patologi Klinis yang telah membantu dan mengizinkan seluruh rangkaian penelitian kami sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

9. dr. Tri Wahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K) dan segenap staf, dokter PPDS di bagian Ilmu Paru FKUB/RSSA yang telah membantu dan mengizinkan seluruh rangkaian penelitian kami sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

10. Seluruh subyek penelitian yang bersedia untuk ikut terlibat dalam penelitian ini.

11. Keluarga dan orang terdekat saya atas doa dan segala macam dukungan yang telah dicurahkan tak henti-hentinya bagi penulis.

12. Teman-teman satu tim penelitian vaksin tuberkulosis: dr. Modestus La'a, dr. Anung Sri Handayani, dr. Eko Prasetyo Novianto, dr. Yeti Indrawati, dan dr. Jessica Santoso atas kerjasama dan dukungannya.

13. Teman-teman Program Magister Ilmu Biomedik yang sering memotivasi penulis.

14. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya 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 tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang,

Penulis

**DAFTAR ISI**

Halaman

Daftar Isi.....	i
Daftar Gambar.....	v
Daftar Tabel.....	vi
Daftar Singkatan.....	vii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Tuberkulosis.....	6
2.1.1 Definisi Tuberkulosis.....	6
2.1.2 Epidemiologi Tuberkulosis.....	6
2.1.3 Mikrobiologi ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ).....	7
2.1.4 Patogenesis Tuberkulosis.....	8
2.2 Vaksin Tuberkulosis.....	13
2.3 Protein ESAT6-CFP10 dari Mtb.....	18





2.4 Respon Imun.....	21
2.4.1 Interleukin-2.....	22
2.4.2 Interleukin-10.....	24
<b>BAB III KERANGKA KONSEP.....</b>	<b>26</b>
3.1 Kerangka Teori.....	26
3.2 Kerangka Konsep.....	28
3.3 Hipotesis Penelitian.....	29
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>	<b>30</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	30
4.2 Sampel Penelitian.....	30
4.2.1 Subyek Penelitian.....	30
4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	30
4.2.3 Cara Pengambilan Sampel.....	31
4.2.4 Jumlah Sampel.....	32
4.3 Variabel Penelitian.....	32
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian.....	32
4.5 Bahan dan Alat Penelitian.....	33
4.5.1 Pemeriksaan Umum.....	33
4.5.2 Penghitungan Sel Secara Menyeluruh.....	33
4.6 Definisi Operasional.....	34
4.7 Prosedur dan Alur Penelitian.....	35
4.7.1 Prosedur Penelitian.....	35
4.7.1.1 Pemeriksaan Umum.....	35



4.7.1.2 Isolasi PBMC .....	36
4.7.1.3 Kultur PBMC .....	37
4.7.1.4 Pewarnaan Dengan Marker Ekstraselular CD8 .....	38
4.7.1.5 Pewarnaan Dengan Marker Intraselular IL2 dan IL10 .....	39
4.8 Alur Penelitian .....	40
4.9 Analisis Data .....	41
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....</b>	<b>42</b>
5.1 Karakteristik Subyek Penelitian .....	42
5.2 Hasil Pengukuran Persentase IL2 dan IL10 Sel T CD8 .....	44
<b>BAB VI PEMBAHASAN .....</b>	<b>50</b>
6.1 Karakteristik Subyek Penelitian .....	50
6.2 Pengaruh Paparan Protein Rekombinan Fusi ESAT6-CFP10 terhadap Persentase IL2 dan IL10 sel T CD8 .....	52
<b>BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>56</b>
7.1 Kesimpulan .....	56
7.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>57</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>63</b>
Lampiran 1. Uji Plagiarisme .....	63
Lampiran 2. Bukti Accepted Jurnal .....	64
Lampiran 3. Lembar Informasi Penelitian .....	65
Lampiran 4. Lembar Persetujuan Kesiediaan Dalam Penelitian .....	67
Lampiran 5. Profil Data Subyek Penelitian .....	68

Lampiran 6. Analisis Data.....	69
Lampiran 7. Foto-foto Penelitian.....	73



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Mtb pada *direct smear* mikroskopik berdasarkan teknik, Ziehl-Neelsen..... 8

Gambar 2.2 Patogenesis tuberkulosis ..... 10

Gambar 2.3 Perjalanan infeksi *Mycobacterium tuberculosis*..... 11

Gambar 2.4 Mekanisme utama dalam proses imunitas alamiah dan adaptif..... 12

Gambar 2.5 IL10 sebagai pencegah kerusakan jaringan..... 24

Gambar 3.1 Kerangka teori ..... 26

Gambar 3.2 Kerangka penelitian ..... 28

Gambar 4.1 Alur penelitian..... 40

Gambar 5.1 Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok tanpa paparan antigen..... 44

Gambar 5.2 Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok setelah paparan PPD..... 45

Gambar 5.3 Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok setelah paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10..... 46

Gambar 5.4 Diagram persentase IL2 pada PBMC kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang dipapar dengan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen..... 48

Gambar 5.5 Diagram persentase IL10 pada PBMC kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang dipapar dengan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen..... 49

DAFTAR TABEL

Halaman

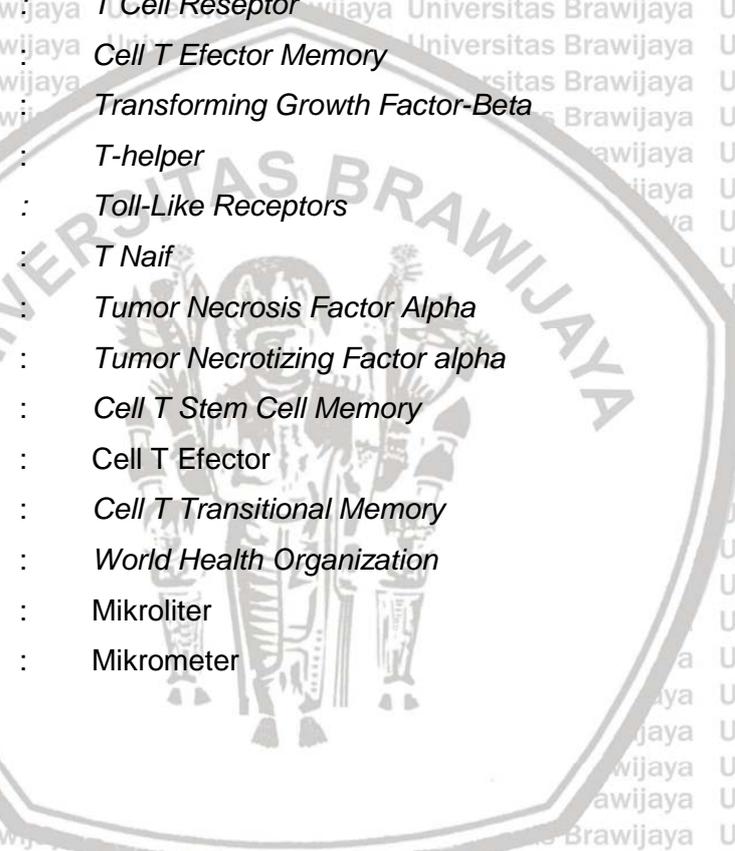
Tabel 2.1	Profil penyakit tuberkulosis Indonesia .....	7
Tabel 5.1	Karakteristik subyek penelitian.....	42
Tabel 5.2	Persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 pada PBMC yang dipaparkan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.....	48
Tabel 5.3	Persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada PBMC yang dipaparkan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.....	49



**DAFTAR SINGKATAN**

APC	:	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BCG	:	<i>Bacillus of Calmette and Guerin</i>
BTA	:	<i>Basil Tahan Asam</i>
CCR	:	<i>C-C Chemokine Receptor</i>
CFP-10	:	<i>Culture Filtrate Protein 10</i>
CR	:	<i>Complement Receptors</i>
CXC	:	<i>Cystein X Cystein</i>
Cy	:	<i>Cyanines</i>
ELISA	:	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESAT-6	:	<i>Early Secreted Antigenic Target Protein 6 kDa</i>
FBS	:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	:	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	:	<i>Forward Scatter</i>
g	:	<i>Gram</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	<i>gugus Hidroksil Peroksida</i>
HIV	:	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN-γ	:	<i>Interferon gamma</i>
Ig	:	<i>Immunoglobulin</i>
IL	:	<i>Interleukin</i>
iNOS2	:	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LAM	:	<i>Lipoarabinomannan</i>
MDR-TB	:	<i>Multi Drugs Resistant Tuberculosis</i>
mg	:	<i>Miligram</i>
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	:	<i>Mililiter</i>
Mtb	:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	:	<i>Natural Killer Cells</i>
NO	:	<i>Nitric Oxide</i>
NOS2	:	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
Nramp	:	<i>Natural Resistance Associated Macrophage Protein</i>
PBMC	:	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	:	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PE	:	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>

PerCP	:	<i>Peridin Chlorophyll Protein</i>
PGL-I	:	<i>Phenolic-Glycolipid I</i>
PPD	:	<i>Purified Protein Derivative</i>
RD	:	<i>Region of Difference</i>
RNI	:	<i>Reactive Nitrogen Intermediates</i>
ROI	:	<i>Reactive Oxygen Intermediates</i>
SSC	:	<i>Side Scatter</i>
TB	:	<i>Tuberculosis</i>
TCM	:	<i>Cell T Central Memory</i>
TCR	:	<i>T Cell Reseptor</i>
TEM	:	<i>Cell T Efector Memory</i>
TGF- $\beta$	:	<i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
Th	:	<i>T-helper</i>
TLR	:	<i>Toll-Like Receptors</i>
TN	:	<i>T Naif</i>
TNF- $\alpha$	:	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNF- $\alpha$	:	<i>Tumor Necrotizing Factor alpha</i>
TSCM	:	<i>Cell T Stem Cell Memory</i>
TTE	:	<i>Cell T Efector</i>
TTM	:	<i>Cell T Transitional Memory</i>
WHO	:	<i>World Health Organization</i>
$\mu$ l	:	<i>Mikroliter</i>
$\mu$ m	:	<i>Mikrometer</i>



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) paru merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) yang menginfeksi paru-paru (Kasper *et al.*, 2015). *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri gram positif berbentuk batang lurus sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul dengan lebar 0,3 – 0,5  $\mu\text{m}$  dan panjang 1 – 4  $\mu\text{m}$  (Cook *et al.*, 2009). Penularan Mtb dapat terjadi karena percik renik yang menyebar melalui udara saat penderita TB batuk. Percik renik ini dapat bertahan beberapa jam diudara sebelum kemudian terhirup (Kasper *et al.*, 2015). Berdasarkan laporan WHO pada tahun 2016 diketahui bahwa Mtb menginfeksi anak-anak sebanyak 1 juta orang dan dewasa sebesar 9,4 juta orang. Pada tahun 2015 diperkirakan terdapat 1,4 juta kasus meninggal yang disebabkan oleh TB (WHO, 2016).

Upaya untuk mencegah kasus baru TB dan terjadinya kematian oleh karena TB sudah dilakukan di seluruh dunia dengan vaksinasi BCG yang mencakup 88% populasi dunia dan pemberian obat-obatan untuk pasien TB (Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, 2014). Vaksin TB yang digunakan secara luas saat ini adalah *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) yang berasal dari *Mycobacterium bovis* (Mbovis) galur Paris yang hidup dan dilemahkan (Hu *et al.*, 2018). Vaksin adalah produk biologi atau antigen yang diberikan dengan tujuan agar terbentuk kekebalan spesifik terhadap suatu penyakit (WHO, 2016). Vaksin BCG memiliki efektivitas perlindungan terhadap TB yang berbeda-beda tergantung daerahnya dengan rentang 0 – 85%. Di Indonesia

efektivitas dari vaksin BCG dalam mencegah terjadinya infeksi TB sekitar 37% (Das *et al.*, 2016).

Masih banyak didapatkan infeksi TB paska imunisasi BCG baik pada anak-anak maupun dewasa (Handzel, 2013). Selain efektivitas perlindungan yang rendah, suatu saat BCG dapat bermanifestasi menjadi penyakit aktif apabila bakteri mengalami mutasi karena bahan dasar vaksin BCG berupa bakteri hidup yang dilemahkan (Tang *et al.*, 2014). Jika dibandingkan dengan Mtb, maka BCG yang berasal dari Mbovis juga memiliki genetik yang cukup berbeda. Pada BCG tidak didapatkan gen yang berfungsi mensekresikan faktor virulensi dari Mtb seperti gen *ESAT6 Specialized Secretion System – A* (EsxA) yang mensekresikan *Early Secreted Antigenic Target - 6* (ESAT6) dan *ESAT6 Specialized Secretion System – B* (EsxB) yang mensekresikan *Culture Filtrate Protein – 10* (CFP10) (Gröschel *et al.*, 2016). Protein ESAT6 dan CFP10 diketahui memiliki banyak epitop yang imunodominan terhadap sel T dan sel B, sehingga tanpa kedua protein ini diduga menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi menurunnya efektivitas perlindungan vaksin BCG (Kumar & Raja, 2010). Rendahnya efektivitas vaksin BCG di Indonesia mendorong kebutuhan akan ditemukannya kandidat vaksin TB baru.

Salah satu protein yang diharapkan dapat menjadi vaksin dengan memberikan respon imun yang baik berasal dari antigen filtrat kultur Mtb (Brandt *et al.*, 2000). Terdapat beberapa antigen filtrat kultur seperti ESAT6 dan CFP10. ESAT6 merupakan protein Mtb yang diketahui memiliki efek inhibisi autofagi, menginduksi apoptosis makrofag melalui aktivasi ekspresi kaspase, dan melisiskan membran fagosom, dimana kerusakan pada ESAT6 berhubungan dengan perbaikan fusi fago-lisosom dari sel dendrit terhadap Mtb (Dong *et al.*, 2016). Sedangkan CFP10 bekerja dengan menurunkan produksi *Nitric Oxide* (NO)

dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan oleh makrofag, sehingga menghambat kemampuan membunuh makrofag (Handzel, 2013). Pada BCG yang ditambahkan *Regio of Difference-1* (RD1) yang mengkode ESAT6 dan CFP10 didapatkan peningkatan imunogenitas dari vaksin tersebut (Guo *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa ESAT6 dan CFP10 memiliki peran besar dalam merangsang respon imun. Vaksin yang dibuat dengan antigen filtrat kultur *Mtb* dapat disebut sebagai vaksin subunit, sedangkan penggunaan dua atau lebih protein yang digabungkan disebut vaksin rekombinan. ESAT6 dan CFP10 merupakan 2 buah protein yang disekresikan bersama-sama melalui transport khusus dalam bentuk kompleks heterodimer, agar epitop imunodominan dapat memberikan respon imun multi antigenik dengan baik maka diperlukan kedua protein dalam bentuk alaminya yaitu kompleks heterodimer atau sebagai vaksin rekombinan (Tang *et al.*, 2014).

Respon imun dapat diukur dengan melihat kemampuan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 dalam menginduksi respon imun berupa peningkatan produksi interleukin-2 (IL2) dan interleukin-10 (IL10) dari sel T CD8. IL2 merupakan sitokin pertumbuhan yang bertanggung jawab atas proliferasi dan diferensiasi dari sel CD4 dan CD8 serta meningkatkan produksi immunoglobulin dari sel plasma (Abbas *et al.*, 2016). Selain itu IL2 juga berperan sebagai faktor pertumbuhan dan diferensiasi dari sel NK, sel limfosit B, dan sel *limphokine-activated killer* (LAK) (Prayitno & Putra, 2014). Keberadaan IL2 diketahui turut meningkatkan kadar interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) yang diproduksi oleh sel T CD8 (Sa & Suzuki, 2013). IL10 merupakan sitokin anti-inflamasi poten dengan peran penting dalam membatasi respon pro-inflamasi dan mencegah penyakit autoimun (Abbas *et al.*, 2016). Selain itu IL10 yang diproduksi mampu meningkatkan

aktivitas sitotoksik dari sel NK dan sel CD8 serta merangsang terbentuknya sel T memori CD8 untuk menghadapi infeksi berikutnya (Zhang & Bevan, 2012).

Di konsorsium TB Indonesia sedang dikembangkan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 galur lokal yang memiliki kesamaan genetik dengan kuman Mtb di Indonesia. Diharapkan dengan adanya kesamaan genetik didapatkan respon imun yang lebih baik (Grange *et al.*, 2015). Pada penelitian ini protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 diuji efektivitasnya dalam menginduksi respon imun seluler yaitu berupa peningkatan persentase sitokin IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8. Pengujian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 dilakukan secara *in vitro* pada kultur PBMC dari pasien TB, kontak TB, dan sehat endemik TB dengan melihat persentase IL2 dan IL10 CD8.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, dan sehat.

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 baik pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, maupun sehat.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis persentase IL2 baik pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, dan sehat.
2. Menganalisis persentase IL10 baik pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, dan sehat.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Mengetahui bahwa protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 baik pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, maupun sehat.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb diharapkan dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 baik pada kultur B PBMC pasien TB, kontak TB, maupun sehat sehingga dapat dipertimbangkan sebagai kandidat vaksin TB.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tuberkulosis

##### 2.1.1 Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) adalah suatu penyakit menular yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) yang menginfeksi paru-paru. Akan tetapi TB juga dapat menginfeksi tempat lain sehingga menjadi TB ekstra paru. TB dapat ditularkan oleh orang yang terkena TB dengan cara dibatukkan (Kasper *et al.*, 2015).

##### 2.1.2 Epidemiologi Tuberkulosis

Tuberkulosis merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang berkontribusi besar terhadap angka kesakitan dan kematian terutama di negara berkembang (Tang *et al.*, 2014). Laporan *World Health Organization* (WHO) tahun 2015 menyatakan bahwa terdapat 10,4 juta penderita tuberkulosis baru di seluruh dunia, dimana 56% terjadi pada pria, 34% pada wanita, dan 10% pada anak-anak. Kasus TB dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) juga didapatkan sebesar 11% dari semua kasus TB baru. Diperkirakan pada tahun 2015 terdapat 1,4 juta kasus meninggal yang disebabkan oleh TB dan 0,4 juta kasus meninggal akibat TB dengan ko-infeksi HIV. Sekalipun terjadi penurunan angka kematian oleh karena TB sebesar 22% sejak tahun 2000 hingga 2015, akan tetapi TB tetap menjadi salah satu dari 10 penyakit penyumbang kematian terbanyak di dunia pada tahun 2015 (WHO, 2016).

Indonesia merupakan salah satu dari enam negara penyumbang kasus TB baru (WHO, 2016). Data yang dikumpulkan oleh Kementerian Kesehatan RI menunjukkan bahwa Indonesia berkesempatan untuk menurunkan angka

kesakitan dan kematian akibat TB sebesar 50%, dari sebelumnya 443 per 100.000 penduduk pada tahun 1990 menjadi 222 per 100.000 penduduk pada tahun 2015. Sebenarnya Indonesia sudah cukup baik dalam melakukan penanggulangan TB dengan mencapai beberapa target *Millenial Development Goals* (MDGs) sebelum waktunya, akan tetapi salah satu masalah yang ada adalah pada tahun 2012 diperkirakan masih terdapat 130.000 kasus TB yang belum dilaporkan (Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, 2014).

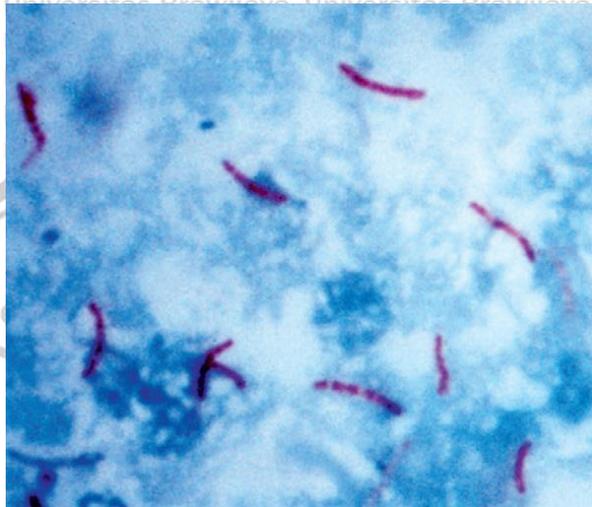
**Tabel 2.1. Profil Penyakit Tuberkulosis Indonesia (WHO, 2016)**

	Angka (ribuan)	Kejadian (tiap 100 000 populasi)
Mortalitas (Tanpa HIV+TB)	100 (67-150)	40 (26-57)
Mortalitas (HIV+TB saja)	26 (20-34)	10 (7.6-13)
Kejadian (Dengan HIV+TB)	1020 (658-1450)	395 (255-564)
Kejadian (HIV+TB saja)	78 (48-116)	30 (18-45)
Kejadian (MDR/RR-TB)	32 (19-45)	12 (7.4-17)

### 2.1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri gram positif yang memiliki struktur dinding sel yang sangat kompleks. Mtb berbentuk batang lurus sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul dengan lebar 0,3 – 0,5 µm dan panjang 1 – 4 µm (Cook *et al.*, 2009). Dinding Mtb tersusun dari 3 makromolekul yang saling berikatan erat (peptidoglikan, arabinogalaktan, dan asam mikolat), lipopolisakarida, dan lipoarabinomannan (LAM). Asam mikolat pada dinding sel berperan menjadikan Mtb sebagai bakteri tahan asam. Komponen antigen ditemukan di dinding sel dan sitoplasma yaitu komponen lipid, polisakarida dan protein (Serafino & Med, 2013).

Bakteri aerob ini bisa berkembang pesat pada kondisi 5-10% karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Mtb dapat dikultur pada media dengan kandungan lemak yang tinggi seperti Lowenstein-Jensen (LJ). Mtb membutuhkan 12-18 jam untuk berproliferasi, sehingga dibutuhkan waktu 3-6 minggu agar terlihat secara mikroskopis (Serafino & Med, 2013).



**Gambar 2.1** *Mycobacterium tuberculosis* pada *direct smear* mikroskopik berdasarkan teknik, Ziehl-Neelsen. Tampak gambaran basil tahan asam Mtb yang diisolasikan dari sputum pasien TB (Grange *et al.*, 2009).

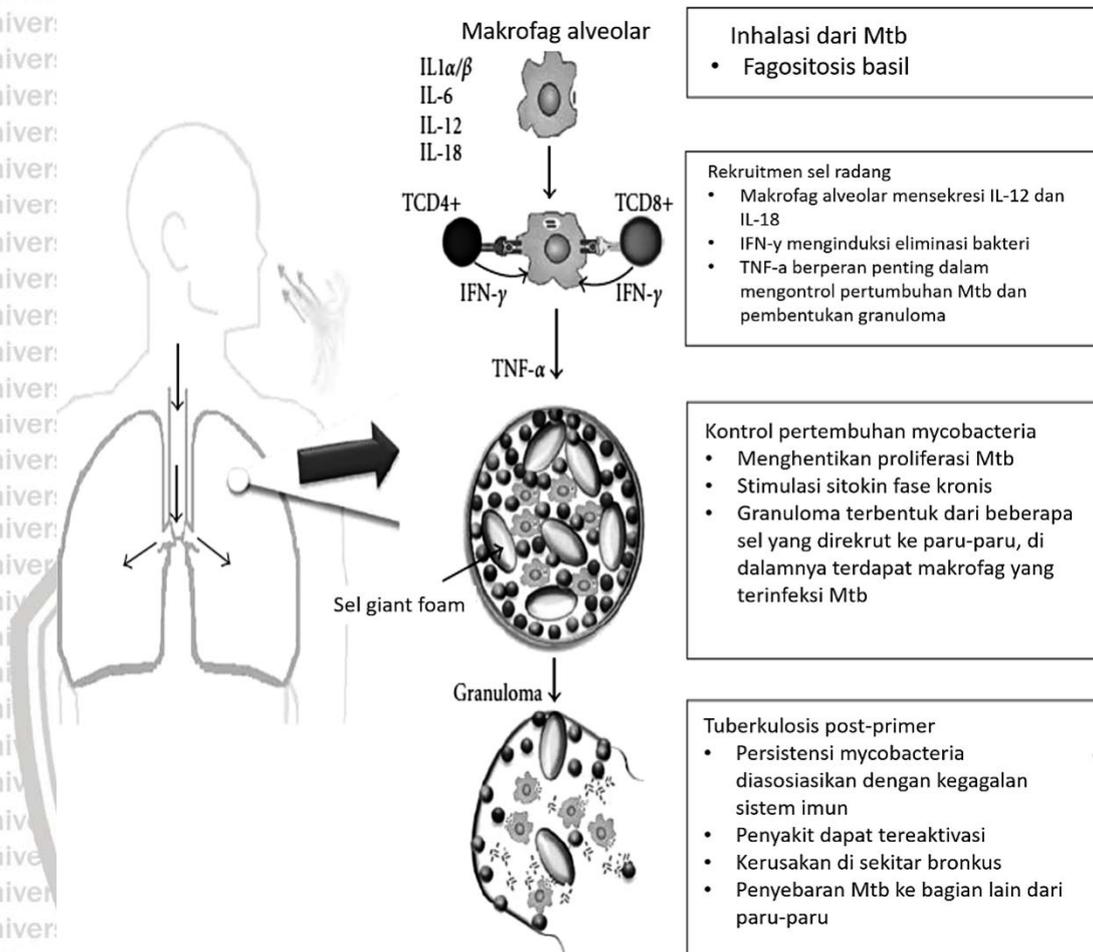
#### 2.1.4 Patogenesis Tuberkulosis

Paru-paru merupakan pintu masuk utama dari kasus infeksi TB. Transmisi TB biasanya melalui percik renik yang tersebar saat penderita TB batuk, bersin, ataupun berbicara. Terdapat sekitar 3000 nuklei infeksius yang tersebar setiap kali penderita TB batuk, nuklei infeksius ini dengan cepat mengering di udara dan bertahan di lingkungan tertutup selama beberapa jam sebelum terhirup dan mencapai alveolus (Kasper *et al.*, 2015). Terdapat mekanisme pertahanan alamiah seperti lapisan epitel, mukosa, sel-sel dan antibiotik lokal yang terdapat di epitel yang berfungsi untuk mencegah masuknya mikroba (Abbas *et al.*, 2016). Sesampainya di alveolus, makrofag dan sel dendrit submukosa mengenali Mtb melalui *Toll-Like Receptor 2* (TLR-2) yaitu *Pattern Recognition Receptors* (PRRs)

yang mampu mendeteksi *Pathogen Associated Molecular Paterns* (PAMPs) yang dimiliki oleh Mtb seperti *Mannosylated Lipoarabinomannan* (ManLAM), trehalose dimikolat dan N-glycolymuramyl dipeptida. Setelah terjadi proses pensinyalan, makrofag akan memulai proses fagositosis yang jika berhasil akan menangkap Mtb dalam vesikel atau fagolisosom dan mensekresi sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrotizing Factor – alpha* (TNF- $\alpha$ ) (Handzel, 2013). Akan tetapi tidak semua proses fagositosis berujung dengan eliminasi Mtb. Fusi fago-lisosom dapat dihindari dengan mencegah insersi proton-Adenosine Triphosphate (ATP)-ase ke dinding fagosom sehingga tidak terjadi asidifikasi yang diperlukan untuk fusi, sehingga Mtb tidak tereliminasi dan memungkinkan Mtb bereplikasi di dalam sel makrofag (Guo *et al.*, 2012). Selain makrofag, neutrofil berperan dengan mensekresikan protein anti-bakteri cathelicidin LL-37 dan memfagosit Mtb yang apabila sudah cukup banyak akan mengalami apoptosis sehingga memicu aktivasi makrofag. Saat makrofag dan sel dendrit bekerja, sel NK datang ke area infeksi untuk mengenali dan menghancurkan sel tubuh yang terinfeksi. Selama proses penghancuran sel tubuh yang terinfeksi, sel NK akan mensekresikan IFN- $\gamma$  untuk merangsang makrofag mensekresikan IL2, IL-15, dan IL-18 yang berfungsi membantu aktivasi sel T CD8. Teraktivasinya sel T CD8 akan menjadi penghubung ke respon imun adaptif (Handzel, 2013).

Tuberkulosis paru primer dimulai sejak Mtb melakukan infeksi pertama dan dapat timbul tanpa atau dengan gejala. Gejala yang dapat timbul antara lain adalah demam dan nyeri pleuritik. Pada tempat dengan tingkat transmisi TB yang tinggi, biasanya bentuk TB paru primer ini dijumpai pada anak-anak. Bedanya dengan TB post-primer, pada infeksi primer ini lesi TB akan terbentuk di area tengah dan bawah dari lobus paru sesuai dengan distribusi udara pernapasan. Lesi TB di

jaringan paru setelah infeksi pertama disebut fokus primer atau *Ghon focus* (Rahajoe & Supriyatno, 2008).

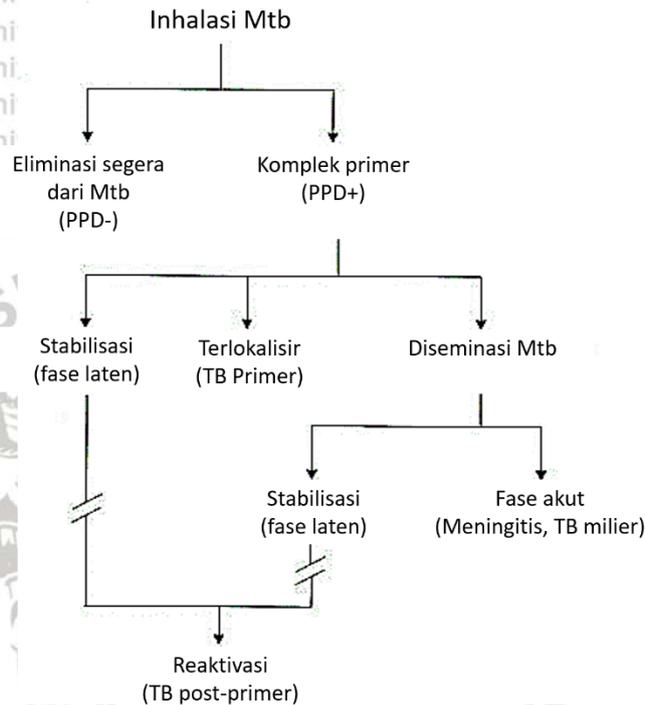


**Gambar 2.2 Patogenesis Tuberkulosis.** Terdiri dari 4 tahapan yaitu inhalasi Mtb, pengaktifan sel proinflamasi, kontrol pertumbuhan kuman Mtb dan setelah infeksi primer TB (Joaquin *et al.*, 2012).

Dari fokus primer, Mtb menyebar melalui saluran limfe menuju kelenjar limfe regional. Penyebaran ini akan menyebabkan terjadinya limfangitis dan limfadenitis. Apabila fokus primer terletak di lobus paru tengah atau bawah, maka kelenjar limfe yang terkena adalah kelenjar limfe parahilus, sedangkan bila fokus primer terletak di apeks paru, maka yang terlibat adalah kelenjar limfe paratrakeal.

Komplek primer atau *Ghon complex* merupakan gabungan antara fokus primer, saluran limfe yang meradang (limfangitis), dan kelenjar limfe regional yang

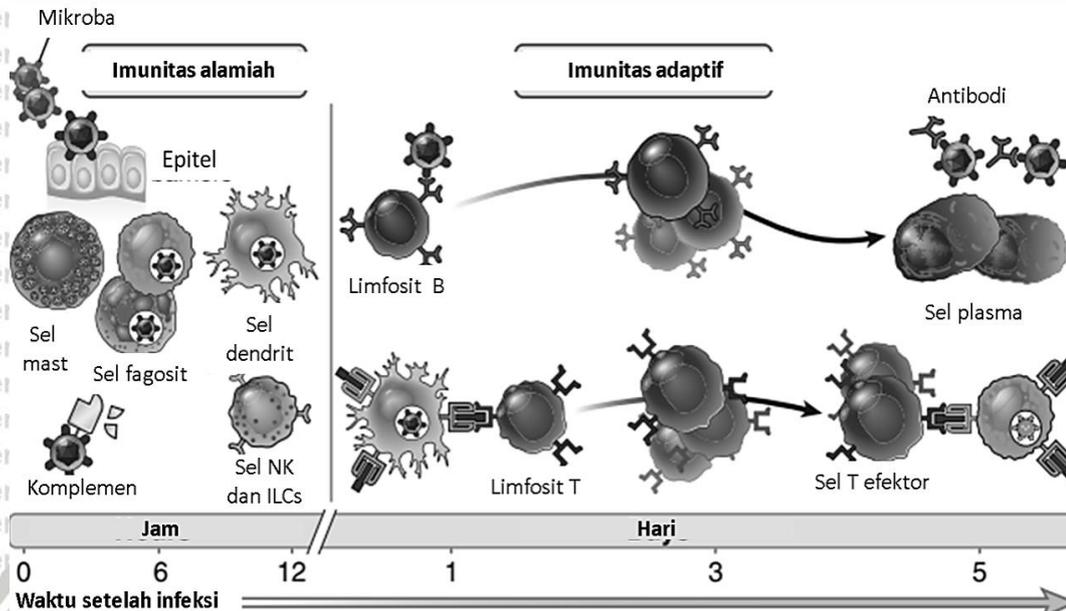
meradang (limfadenitis). Dengan terbentuknya kompleks primer inilah maka infeksi TB paru dapat dikatakan sebagai infeksi TB paru primer. TB paru primer dapat berkembang menjadi penyakit klinis dengan sangat cepat pada anak yang belum sempurna kekebalannya dan pada penderita gangguan kekebalan tubuh (Rahajoe & Supriyatno, 2008).



**Gambar 2.3 Perjalanan Infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.** Setelah Mtb terinhalasi terdapat beberapa kemungkinan, antara lain eliminasi total dari tubuh host, terbentuknya kompleks primer yang kemudian menjadi TB primer, TB laten, atau diseminasi dari kompleks primer ke organ lain hingga terjadi manifestasi meningitis TB dan juga TB milier (Crevel & Ottenhoff, 2002).

Tuberkulosis paru primer ditandai dengan terbentuknya hipersensitivitas terhadap tuberkuloprotein, yaitu timbulnya respon positif terhadap uji tuberculin atau tes mantoux. Uji tuberculin akan negatif selama masa inkubasi, setelah kompleks primer terbentuk, maka imunitas seluler tubuh terhadap TB juga telah terbentuk (Crevel & Ottenhoff, 2002). Pada sebagian besar individu dengan sistem imun yang berfungsi baik, disaat sistem imun seluler bekerja, proliferasi Mtb akan

terhenti, akan tetapi sebagian kecil Mtb akan tetap hidup dalam granuloma (Kasper *et al.*, 2015).



**Gambar 2.4 Mekanisme utama dalam proses imunitas alamiah dan adaptif.** Imunitas alamiah menjadi pertahanan pertama menghadapi infeksi, dengan mencegah terjadinya infeksi dan proses eliminasi mikroba. Respon imunitas adaptif berlangsung beberapa saat kemudian yang dimediasi oleh limfosit dan produk-produknya. Antibodi kemudian akan bekerja dengan menghambat infeksi dan mengeliminasi mikroba, sedangkan limfosit T bertugas mengeliminasi mikroba intraselular. Waktu terjadinya respon imun alamiah dan adaptif adalah perkiraan yang dapat berbeda-beda untuk tiap infeksi (Abbas *et al.*, 2016).

Tuberkulosis paru post-primer biasa disebut sebagai TB reaktif, TB sekunder, ataupun TB dewasa. TB post-primer biasanya memiliki fokus infeksi di apeks dari lobus paru atas, dikarenakan tingginya tekanan oksigen yang baik bagi pertumbuhan Mtb. Keterlibatan parenkim paru dapat bervariasi mulai dari lesi berukuran kecil hingga kavitas yang besar. Seperti pada penderita TB yang tidak mendapatkan pengobatan dapat jatuh pada kondisi yang lebih berat dalam beberapa bulan, sedangkan sisanya dapat mengalami remisi atau menjadi TB kronis dengan perburukan kondisi tubuh secara perlahan (Bezuidenhout & Schneider, 2009).

Sebagian besar pasien yang menerima pengobatan akan mengalami perbaikan kondisi seperti menghilangnya gejala demam, batuk, peningkatan berat badan, serta peningkatan kualitas hidup dalam beberapa minggu (Kasper *et al.*, 2015).

## 2.2 Vaksin Tuberkulosis

Vaksinasi sebenarnya merupakan upaya melindungi individu dari infeksi sehingga mencegah munculnya gejala penyakit. Beberapa vaksin menurunkan gejala penyakit yang ditimbulkan akibat infeksi semisal meningitis TB, beberapa vaksin lain bekerja dengan mengurangi tingkat penyebaran penyakit dari orang yang telah tervaksinasi. Program imunisasi dibuat dengan tujuan untuk mengontrol penyebaran penyakit, eliminasi, dan pemusnahan penyakit. Vaksin dapat dibagi menjadi beberapa golongan berdasarkan bahan penyusunnya, seperti virus/ bakteri yang dilemahkan, virus/ bakteri yang mati, toksoid, aseluler/ subunit, dan DNA rekombinan (Morrow *et al.*, 2012).

*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) adalah vaksin hidup yang dikembangkan oleh Calmette dan Guerin dari strain *Mycobacterium bovis* (Mbovis) yang dilemahkan setelah 231 turunan di laboratorium oratory antara tahun 1908 dan 1921. BCG diperkenalkan pada tahun 1921 pada manusia, dan imunisasi massal pertama dilakukan pada manusia dengan uji kulit tuberkulin (TST) negatif dimulai di Polandia pada tahun 1948. Pada tahun 1974, BCG termasuk dalam program imunisasi WHO, dengan perkiraan cakupan 3 miliar orang yang menerima vaksin tersebut. WHO saat ini merekomendasikan vaksinasi BCG neonatal di negara-negara endemik tuberkulosis tinggi. Vaksinasi BCG juga direkomendasikan untuk anak-anak dengan peningkatan risiko terpajan tuberkulosis di negara-negara dengan tingkat endemik rendah dan bagi mereka yang terpapar tuberkulosis *Multi Drug Resistant* (MDR) (Husain *et al.*, 2016).

Variasi genetik pada strain BCG yang digunakan untuk vaksinasi di seluruh dunia menyebabkan terjadinya penurunan efikasi. BCG ditemukan pada tahun 1908, dan pertama kali digunakan untuk vaksinasi pada tahun 1921 setelah 231 turunan selama periode 13 tahun. Selama tahun-tahun ini banyak perubahan genetik yang tidak teridentifikasi terjadi pada strain asal *M. bovis* (Mangtani *et al.*, 2013; Husain *et al.*, 2016)

Penghapusan dan perubahan pada BCG kode turunan IS6110 yang terjadi sejak penggunaannya pertama pada tahun 1921 kemungkinan telah menyebabkan perbedaan fenotipe dan imunologi pada BCG. Genetik *make up* populasi manusia di berbagai negara seiring dengan pola makan dan gaya hidup juga memiliki pengaruh kuat terhadap efektivitas BCG. Infeksi parasit pada saat vaksinasi BCG juga dapat mengganggu efikasi BCG dengan adanya respons imun tipe T-helper 2 (Th2), yang biasanya terkait dengan respons tipe Th1 yang spesifik terhadap antigen. Infeksi cacing juga menginduksi sel T regulator (Tregs), yang menghasilkan penghambat sitokin, seperti *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- $\beta$ ), sehingga menekan sitokin pro-inflamasi. BCG bacilli sangat peka terhadap paparan sinar *ultra violet* (UV), begitu juga sel Langerhans dermal, yang penting dalam presentasi antigen. Ini mungkin bisa menjelaskan kecenderungan perlindungan yang lebih rendah di daerah tropis daripada daerah beriklim sedang (Husain *et al.*, 2016).

Dengan penurunan efikasi dari BCG maka diperlukan alternatif vaksin TB yang lain. Vaksin TB yang efektif memerlukan tiga fungsi, yaitu mencegah infeksi baru, pengaktifan kembali TB laten dan menghilangkan infeksi *Mtb* sepenuhnya dalam jangka panjang. Saat ini vaksin profilaksis dan vaksin TB terapeutik terutama menargetkan fungsi pertama. Beberapa vaksin pencegahan berhasil dalam arti dengan menyediakan hewan percobaan dengan perlindungan yang

lebih baik daripada BCG. Vaksin ini terutama dibagi menjadi dua jenis yaitu vaksin mycobacterium hidup (*whole body*) dan vaksin subunit (sebagian protein kuman).

Sementara itu, vaksin terapeutik dirancang untuk terutama menargetkan mereka yang telah terinfeksi Mtb (Tang *et al.*, 2014).

Penelitian untuk menemukan vaksin TB paru yang lebih efektif terus dilakukan selama beberapa dekade terakhir ini. Pada tahun 2014 telah didapatkan 16 kandidat vaksin TB yang sedang dalam proses uji coba di laboratorium dan 12 kandidat vaksin yang memasuki tahap uji lapangan. *Modified vaccinia ankara 85A/AERAS-485* (MVA85A/AERAS-485) merupakan vaksin pertama yang sampai pada tahap uji klinis pada tahun 2013, sayangnya vaksin ini masih gagal dalam mencegah penularan TB (Kasper *et al.*, 2015).

Indonesia dalam dekade terakhir ini bergerak aktif dalam usaha pengembangan vaksin TB, dimulai dengan program pengembangan vaksin yang dimulai tahun 2011 dan direncanakan selesai pada tahun 2020. Program ini digagas oleh Kementerian Kesehatan dan Kementerian Riset dan Teknologi. Pengembangan vaksin ini dilakukan secara kolaboratif dimana 13 universitas di seluruh Indonesia ikut berperan dalam penelitiannya. Terdapat beberapa protein sub-unit yang menjadi fokus pengembangan vaksin antara lain, ESAT6, CFP10, *Antigen 85 complex* (Ag85), 38kDa protein (Ag38kD), protein PE17, protein PE41, protein (*resuscitation promoting factor*) RPF, dan lipoprotein LipY. Sedangkan untuk saat ini, secara global sedang berjalan pengembangan kandidat vaksin TB baru. Untuk kandidat vaksin TB yang sedang berada pada fase 1, *adenoviral vector expressing Ag85A* (AdAg85A), *Hybrid-1+cationic adjuvant formulation 01* (CAF01), H56+IC31, Hyvac4/AERAS-404+IC31, dan ID-93/GLA-SE. Untuk fase 2 antara lain, M72+AS01, VPM1002, Hybrid1+IC31, dan RUTI. Pada fase 3B antara lain, MVA85A/AERAS-485, dan AERAS-402/CrucellAd35. Pada fase 3 terdapat

Mw (*M. indicus pranii* (MIP)). Dari beberapa kandidat diatas dapat digolongkan menjadi beberapa jenis vaksin yang digunakan, seperti *viral-vectored* (MVA85A, AERAS-402, AdAg85A), protein (M72, Hybrid-1, Hyvac4, H56), rekombinan BCG (VPM1002, ID93/GLA-SE), sel mati (Mw, RUTI) (Tanoerahardjo, 2012).

Terdapat beberapa jenis vaksin yang dikembangkan, salah satunya adalah vaksin hidup yang dilemahkan (*Live Attenuated Vaccine*). Vaksin hidup yang dilemahkan merupakan vaksin yang dilemahkan dan didapatkan dengan cara mengkultur virus/ bakteri pada suatu media beberapa kali hingga kehilangan potensinya. Untuk vaksin yang berasal dari virus antara lain polio, campak, dan *yellow fever*. Sedangkan yang berasal dari bakteri yaitu vaksin *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) (Morrow *et al.*, 2012). Setelah itu terdapat vaksin subunit yang tidak mengandung komponen patogen hidup. Berbeda dengan vaksin inaktif yang berisi sel utuh, vaksin subunit hanya mengandung sebagian dari komponen patogen. Bagian dari patogen ini dapat merangsang pembentukan respon kekebalan. Sering kali respon kekebalan dapat diperoleh tetapi tidak ada jaminan bahwa memori kekebalan terbentuk dengan cara yang tepat dan benar. Vaksin subunit dianggap sangat aman karena tidak mengandung komponen hidup. Selain itu vaksin subunit juga dapat dikategorikan ke dalam vaksin subunit berbasis protein, vaksin polisakarida, dan vaksin subunit konjugasi (Morrow *et al.*, 2012).

Vaksin subunit yang berbasis protein, berisi protein spesifik yang diisolasi dari patogen, dan tidak mengandung partikel dari virus. Jenis bakteri tertentu apabila menginfeksi seseorang kerap kali diproteksi oleh kapsul polisakarida (gula) untuk bertahan dari sistem pertahanan tubuh seseorang, terutama pada bayi dan anak-anak. Vaksin jenis polisakarida dapat merangsang respon kekebalan terhadap molekul dalam kapsul patogen. Molekul ini sangat kecil dan sangat imunogenik. Vaksin subunit konjugasi merangsang terjadinya respon

terhadap molekul kapsul dari patogen. Jika dibandingkan dengan vaksin polisakarida murni, maka vaksin dengan teknologi subunit konjugasi ini dapat mengikat polisakarida dengan protein karier dan dapat menimbulkan respon kekebalan jangka panjang walaupun pada bayi. Sebagai contoh, sementara vaksinasi utama dengan BCG atau rBCG memastikan keefektifan minimum selama tahap bayi, vaksinasi booster dengan vaksin subunit dapat meningkatkan respons kekebalan jangka panjang untuk perlindungan pada orang dewasa (Tang *et al.*, 2014).

Terdapat pula vaksin DNA yang bekerja dengan memasukkan gen pemroduksi protein bagian dari patogen ke dalam tubuh manusia. Gen ini biasanya ditransfer melalui plasmid. Setelah menerima gen yang terkandung dalam plasmid maka sel imunitas akan memproduksi protein tersebut di dalam tubuh. Vaksin DNA mempunyai kelebihan-kelebihan dibandingkan dengan vaksin yang lain. Protein yang diekspresikan oleh host dalam bentuk aslinya tanpa mengalami denaturasi atau modifikasi. Respon imun akan ditujukan untuk antigen tepat seperti yang diekspresikan oleh patogen. Vaksin DNA mampu menginduksi respon humoral yang menghasilkan antibodi dan juga menginduksi sistem imun melalui sel sitotoksik yang mampu menghancurkan sel yang terinfeksi. Respon imun seperti ini biasanya hanya ditemui pada vaksin dari organisme yang dilemahkan. Vaksin DNA juga menghasilkan sel memori yang dapat memberikan perlindungan lebih lama terhadap organisme target. Vaksin DNA mempunyai potensi yang menjanjikan dalam tahun-tahun mendatang karena vaksin ini dapat melindungi terhadap antigen yang spesifik sehingga tidak berbahaya dibandingkan menggunakan organisme utuh (Morrow *et al.*, 2012).

Selanjutnya adalah vaksin rekombinan seperti vaksin rekombinan BCG (rBCG) yang merupakan vaksin TB pertama yang diklaim lebih baik daripada BCG

adalah rBCG30, yang menggunakan BCG dan protein sekresi utama M. tb 30 kDa, yang disebut Ag85B. Dasar pemikiran desain rBCG30 adalah bahwa antigen ekstraseluler Ag85B yang disekresikan oleh Mtb intraselular adalah target imunodominan sistem kekebalan tubuh. Vaksin ini menunjukkan perlindungan yang jauh lebih baik daripada BCG induk dalam model hewan marmut. Efikasi BCG yang buruk pada orang dewasa diperkirakan karena daerah genom yang terhapus mengandung gen (Region of Difference) RD1 yang virulen, yang tidak ada dalam vaksin BCG namun hadir pada semua strain *Mycobacterium tuberculosis* yang ganas. Dua antigen secretory (ESAT6, 6-kDa *Early Secretory Antigenic Target*, dan CFP10, *Culture Filtrate Protein 10 kDa*) di dalam wilayah genome RD1 diperkenalkan kembali ke strain BCG Pasteur untuk menghasilkan vaksin BCG RD1-2F9. Kelemahan dari vaksin ini adalah suatu saat vaksin hidup yang dilemahkan dapat mengalami mutasi yang mengakibatkan vaksin menjadi ganas (Tang *et al.*, 2014).

### 2.3 Protein ESAT6-CFP10 dari Mtb

Selama proses pembuatan BCG, *M. bovis* kehilangan 129 *Open Reading Frames* (ORFs) yang menkode beberapa antigen, salah satunya yang hilang adalah *Culture Filtrate Protein 10 kDa* (CFP10) dan *Early Secretory Antigenic Target 6 kDa* (ESAT6). Antigen ini dikodekan oleh gen *esxB* dan *esxA*, masing-masing yang berada di lokus *Region of Deletion 1* (RD1) (Meher *et al.*, 2007).

Sejak *Region of Difference* (RD) pada Mtb diidentifikasi pertama kali pada tahun 1996 oleh Mahairas *et al.*, telah ditemukan pula lima sistem *ESAT6 Specialized Secretion System* (ESX) pada Mtb (ESX-1, ESX-2, ESX-3, ESX-4 dan ESX-5) yang diidentifikasi secara paralel oleh studi genom komparatif dan fungsional yang melibatkan Mtb dan strain BCG yang dilemahkan (Gröschel *et al.*, 2016). *esxB* dan *esxA* berada dalam satu *operon* dan protein yang diekspresikan CFP10 dan

ESAT6, masing-masing membentuk kompleks heterodimerik 1:1. Baik CFP10 dan ESAT6 disekresikan pada tahap awal infeksi Mtb dan menyebabkan respon seluler dan humoral yang kuat (Meher *et al.*, 2007). Strain vaksin BCG tidak mengandung gen EsxA (ESAT6) dan EsxB (CFP10), karena penghapusan spontan dari bagian berbeda dari lokus *esx-1*, yang merupakan bagian dari *Region of Difference 1* (RD1). ESX-1 pada Mtb kemudian terbukti penting untuk kemampuan Mtb bertahan. Salah satu fungsi utama ESX-1 adalah perannya dalam induksi ruptur fagosomal, yang melepaskan bakteri dan/atau produk bakteri ke dalam sitosol host (Gröschel *et al.*, 2016).

*Early Secreted Antigenic Target* (ESAT6) dan *Culture Filtrate Protein* (CFP10) merupakan antigen pertama yang disekresikan pada tahap infeksi dan terdapat dalam jumlah besar pada media kultur Mtb. ESAT6 memiliki berat molekul 6-kDa sedangkan CFP10 memiliki berat sebesar 10-kDa (Bekmurzayeva, Syabekova and Kanayeva, 2013). ESAT6 dan CFP10 adalah protein imunodominan yang dikode di *Region of Difference-1* (RD1). RD1 diperkirakan memiliki peranan besar dalam virulensi Mtb yang tidak dijumpai pada vaksin BCG yang berasal dari *Mycobacterium bovis*, kedua protein ini terdapat juga pada *Mycobacterium kasasii*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium marinum*, dan *Mycobacterium riyadhense* (Li *et al.*, 2014). Sebenarnya RD1 merupakan salah satu dari 5 *type seven secretion system* (TSSS) yang merupakan sistem sekresi protein yang terspesialisasi dalam mengantarkan faktor virulensi dari Mtb kepada *host* melalui membran sel Mtb yang susah untuk ditembus (Philips & Ernst, 2012). Epitop imunodominan dari sel T dan sel B juga banyak terdapat pada ESAT6 dan CFP10, sehingga kedua protein ini banyak menarik perhatian untuk dikembangkan sebagai terapi atau alat diagnostik TB (Kumar & Raja, 2010). Sekresi CFP10 dan ESAT6 dilakukan secara aktif dan melibatkan mekanisme transport yang khusus

(Bekmurzayeva & Kanayeva, 2013). Kedua protein sekresi ini berikatan erat satu sama lain membentuk kompleks heterodimer dengan rasio 1:1 melalui interaksi hidropobik dan *Van der Waals* (Tang *et al.*, 2014).

ESAT6 diketahui memiliki efek inhibisi autofagi, dimana kerusakan pada ESAT6 berhubungan dengan perbaikan fusi autofago-lisosom dari sel dendrit terhadap Mtb (Dong *et al.*, 2016). Mekanisme yang digunakan ESAT6 dalam meregulasi autofagi masih belum diketahui dengan jelas hingga saat ini, sekalipun terdapat bukti bahwa protein fusi ESAT6 mampu mengurangi *Light Chain 3-II* (LC3- II) yang berhubungan dengan autofagosome dan autofagi (Dong *et al.*, 2016). Selain itu ESAT6 diketahui mampu menghambat interaksi protein MyD88-IRAK4 yang berakibat terganggunya pensinyalan TLR ke NFkB (Handzel, 2013).

CFP10 bekerja dengan menurunkan produksi *Nitric Oxide* (NO) dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan oleh makrofag, sehingga menghambat kemampuan membunuh makrofag (Handzel, 2013). CFP10 memiliki C-terminus yang merupakan tangan fleksibel untuk melekatkan diri pada permukaan sel. CFP10 dan ESAT6 merupakan protein penting untuk menstimulasi sel T dan juga digunakan pada *Interferon Gamma Releasing Assays* (IGRAs). Kombinasi BCG dengan gen ESAT6 menunjukkan terjadinya peningkatan virulensi pada mencit yang diinfeksi dengan aerosol dosis rendah. Kira-kira sepertiga dari pasien TB memiliki hasil seronegatif dari semua antigen Mtb, hal ini mengapa terus dilakukan studi pada kombinasi protein baik yang terpisah ataupun yang terfusi (Bekmurzayeva & Kanayeva, 2013).

ESAT6-CFP10 sebagai antigen fusi spesifik yang disekresikan hanya oleh Mtb pada awal masa kultur, menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap Mtb dibandingkan dengan ESAT6 atau CFP10 yang digunakan secara terpisah

(He *et al.*, 2016). Pada vaksin BCG yang ditambahkan regio RD1 yang menkode ESAT6 dan CFP10 didapatkan peningkatan imunogenitas dari vaksin tersebut.

Beberapa hal lain yang dilaporkan mengenai kemampuan kompleks ESAT6-CFP10 antara lain menghambat produksi IL12 dan TNF $\alpha$  makrofag (Guo *et al.*, 2012).

## 2.4 Respon Imun

Neutrofil berperan dengan mensekresikan protein anti-bakteri cathelicidin LL-37 dan memfagosit Mtb yang apabila sudah cukup banyak akan mengalami apoptosis sehingga memicu aktivasi makrofag. Saat makrofag dan sel dendrit bekerja, sel NK datang ke area infeksi untuk mengenali dan menghancurkan sel tubuh yang terinfeksi. Selama proses penghancuran sel tubuh yang terinfeksi, sel NK akan mensekresikan IFN- $\gamma$  untuk merangsang makrofag mensekresikan IL2, IL-15, dan IL-18 yang berfungsi membantu aktivasi sel T CD8. Teraktivasinya sel T CD8 sebagai pertanda dimulainya respon imun adaptif (Handzel, 2013).

Imunitas adaptif dapat dibagi dalam 2 kelompok yaitu imunitas humoral dan imunitas yang dimediasi oleh sel. Pada imunitas humoral, sel limfosit B bekerja dengan mensekresi antibodi yang mampu menetralkan toksin dan mencegah infeksi dari mikroba. Sedangkan pada imunitas yang dimediasi oleh sel, diperankan oleh sel limfosit T. Sel limfosit T dapat dibagi menjadi 2 lagi berdasarkan peranannya, sel T yang membantu mengaktivasi makrofag untuk mengeliminasi mikroba yang telah di fagositosis serta sel T yang mengeliminasi sel tubuh yang mengandung mikroba dalam sitoplasmanya (sel yang terinfeksi) (Abbas *et al.*, 2016).

*Antigen Presenting Cell* (APC) mempresentasikan Mtb di kelenjar getah bening paru sehingga terjadi aktivasi dari sel T naif (Handzel, 2013). Saat menerima antigen Mtb, sel T naif akan memproduksi sitokin yang berfungsi

sebagai growth factor untuk pertumbuhan sel limfosit dan berdiferensiasi menjadi sel T efektor yang bergegas ke fokus infeksi di paru-paru (Abbas *et al.*, 2016). Sel T efektor dapat dibagi menjadi 2 subset yaitu sel T CD4 dan sel T CD8. Sel T CD4 dapat dibagi lagi menjadi 2 berdasarkan sitokin yang diproduksi yaitu sel T helper 1 (Th1) dan sel T helper 2 (Th2) Setelah sampai di lokasi infeksi, masing-masing sel T efektor akan bekerja dengan mekanisme yang berbeda dalam melawan Mtb (Shi & Sugawara, 2013).

Setelah terjadi infeksi dan pemrosesan antigen oleh *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas 1, sel T CD8 naif di kelenjar getah bening lokal menerima banyak sinyal ekstraselular untuk memulai proses proliferasi dan diferensiasi dengan cepat (Kumar & Raja, 2010). Sebagian besar sel T naif akan menjadi sel T sitotoksik dimana sebagian lagi akan menjadi sel memori (Cox & Zajac, 2012).

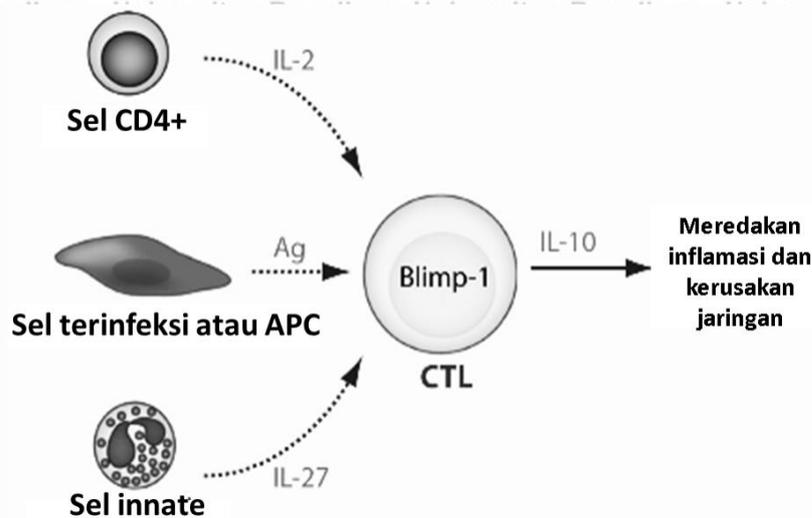
#### 2.4.1 Interleukin 2

Interleukin-2 atau IL2 merupakan sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh sel T helper CD4, sel T CD8, dan sel NK. IL2 bertanggung jawab atas pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi sel T menjadi sel T efektor dan sel memori setelah adanya paparan antigen (Abbas *et al.*, 2016). Pada kondisi tertentu, sel dendrit dan sel mast dapat mensekresi IL2. Selain itu IL2 juga berperan sebagai faktor pertumbuhan dan diferensiasi sel NK, sel limfosit B, dan sel *limphokine-activated killer* (LAK) (Prayitno & Putra, 2014). Keberadaan IL2 diketahui turut meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T CD8 (Sa & Suzuki, 2013). IL2 disekresikan pertama kali oleh sel dendritik yang kemudian akan digunakan untuk maturasi, diferensiasi, dan proliferasi dari sel limfosit naif (Feau *et al.*, 2011). Setelah maturasi maka sekresi IL2 diambil alih oleh sel T CD4 (Zhang & Bevan, 2012). Setelah diferensiasi sel T naif menjadi sel memori, maka

sekresi IL2 bersifat autokrin, dimana sel T memori baik CD4 ataupun CD8 dapat tercukupi kebutuhan IL2-nya dengan memanfaatkan IL2 yang diproduksi sendiri.

Sebagian besar IL2 yang dibutuhkan oleh sel T memori CD8 disekresikan oleh sel T CD8, dan sebagian kecil lainnya didapat dari IL2 yang disekresi oleh sel T CD4 (Feau *et al.*, 2011).

Sel T CD8 yang telah menjadi sel T sitotoksik kemudian akan kehilangan kemampuannya untuk mensekresi IL2, sehingga produksi IL2 akan digantikan oleh sel CD4 yang merupakan pemroduksi utama. Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada tahun 2012 oleh Boyman dan Sprent, diketahui bahwa maturasi dan proliferasi dari sel T CD8 lebih mengandalkan IL2 yang diproduksi secara autokrin dibanding IL2 yang diproduksi oleh sel T helper. Meskipun IL2 autokrin memiliki efek yang lebih baik, akan tetapi pada saat sinyal yang diterima oleh sel T CD8 belum cukup kuat untuk mensekresikan IL2, maka sel T CD4 lah yang memainkan peranan untuk mensekresikan IL2 yang berfungsi untuk aktivasi dan maturasi dari sel T CD8 (Boyman & Sprent, 2012). IL2 yang diproduksi oleh sel T CD8 naif, sebagian besar digunakan sendiri untuk mempercepat proliferasi sel, sedangkan IL2 yang diproduksi oleh sel T CD4 dapat digunakan oleh baik sel T CD4 sendiri maupun untuk diferensiasi dan proliferasi dari sel T CD8. Sel T CD8 atau biasa disebut sel sitotoksik memiliki peranan penting dalam respon imun tubuh melalui jalur eksositosis granul, jalur Fas-FasL, dan produksi sitokin pro-apoptosis (IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ ). Pada jalur eksositosis granul, molekul sitolitik (misal, perforin dan granzym) dan antimikroba (misal, granulin) dikeluarkan dari dalam granul ke sinaps intraselular antara sel sitotoksik dengan sel yang terinfeksi (Kumar & Raja, 2010).



**Gambar 2.5 IL10 sebagai pencegah kerusakan jaringan.** Pada jaringan perifer yang terinfeksi, sel T CD8 efektor atau CTL menerima pensinyalan lokal oleh antigen, IL2 dari sel T CD4, dan IL27 dari sel innate yang berakibat pada disekresinya IL10 untuk mengontrol kerusakan yang diakibatkan oleh inflamasi (Zhang & Bevan, 2012).

#### 2.4.2 Interleukin 10

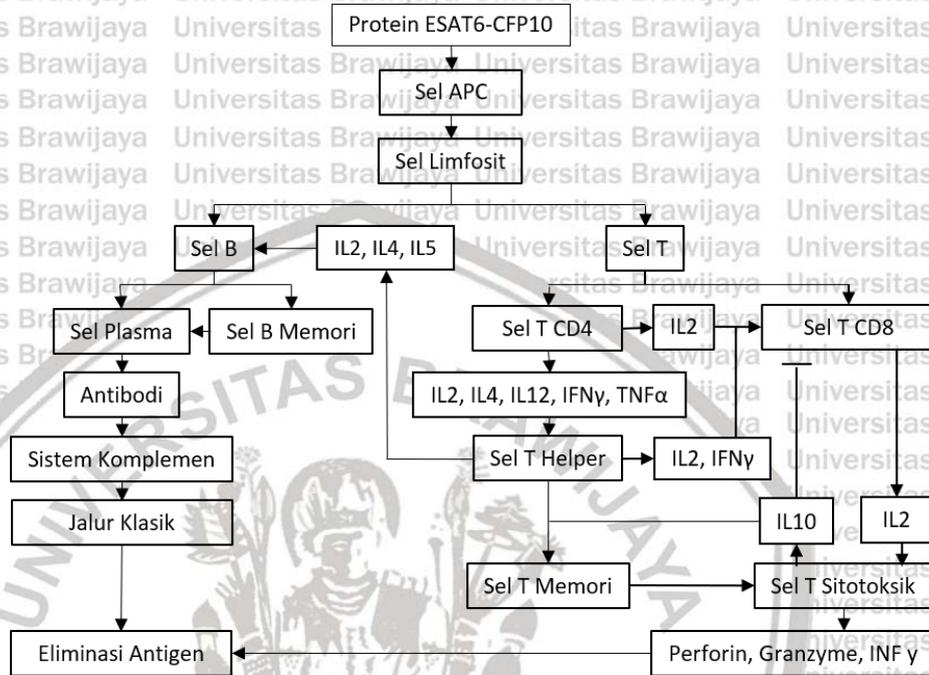
Interleukin-10 (IL10) merupakan sitokin yang berperan dengan memberikan efek supresi terhadap respon imun melalui efek pleiotropik. IL10 diproduksi oleh sel T CD4, sel T CD8, sel makrofag, sel dendrit, serta sel epitel pada saluran pencernaan (Abbas *et al.*, 2016). Produksi IL10 oleh sel Th1 ditentukan dari kuat stimulasi antigen, pada penelitian *in vitro* dibutuhkan jumlah peptida yang besar untuk meningkatkan produksi IL10 oleh sel Th1. Selain itu, produksi IL10 oleh sel T CD4 membutuhkan stimulasi oleh pensinyalan IL-12 dan STAT-4 dan memerlukan aktivasi dari jalur ERK-dependent. Sel T CD8 IL10+ memproduksi sitokin pro-inflamasi, kemokin, dan protein sitotoksik lebih banyak dibanding sel T CD8 IL10-. Sekalipun sel T CD8 IL10+ ini sangat pro-inflamasi, akan tetapi IL10 yang dihasilkan dapat berfungsi dengan baik. Selain itu IL10 yang diproduksi mampu meminimalkan kerusakan yang diakibatkan sistem imun (Zhang & Bevan, 2012).

Kemampuan autokrin dan parakrin dari IL10 dalam membentuk ikatan langsung dengan leukosit yang memberikan efek supresi, merupakan fungsi utama dari IL10. Ikatan IL10 yang disekresi sel Treg dengan reseptor IL10 pada makrofag dan sel dendrit menunjukkan penurunan kemampuan presentasi antigen dari sel APC dan anergi dari sel T. Sekresi IL10 juga diketahui menghambat maturasi sel Th1 dengan mengurangi sekresi dari sitokin (IL12 dan IFN- $\gamma$ ) yang berperan dalam maturasi sel Th1 dan meningkatkan aktifitas Th2 dengan menambah jumlah sitokin yang berperan dalam aktivasi Th2 (IL4, IL5, IL13). Selain itu peningkatan sekresi IL10 diketahui juga berhubungan dengan peningkatan aktivitas apoptosis dan penurunan fungsi sel T efektor. Beberapa sitokin proinflamasi juga terpengaruh dengan sekresi IL10 dalam darah seperti: IL2, IL6, IL1 $\beta$ , IL12, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , dan IFN- $\gamma$ , yang mengalami penurunan seiring dengan peningkatan sekresi IL10 (Bijiga & Martino, 2013). Berkurangnya sitokin proinflamasi tersebut menyebabkan terhambatnya proses inflamasi, serta maturasi dan rekrutmen dari sel leukosit. Produksi IL10 sebelum eliminasi patogen secara menyeluruh akan mengakibatkan infeksi yang persisten, sedangkan apabila IL10 tidak diproduksi setelah eliminasi patogen maka akan terjadi kerusakan akibat inflamasi yang berlebihan (Trandem *et al.*, 2011).

Sekalipun IL10 sering dianggap sebagai sitokin anti-inflamasi, sebenarnya IL10 juga memiliki peranan sebagai sitokin pro-inflamasi. IL10 yang diproduksi oleh sel Th2 dapat meningkatkan aktivitas sel B, sel NK, dan granulosit, yang banyak terjadi pada kasus kelainan autoimun. Selain itu sekresi IL10 juga diketahui meningkatkan aktivitas sel T sitotoksik (Bijiga & Martino, 2013).

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEP**

**3.1 Kerangka Teori**



**Gambar 3.1 Kerangka teori**

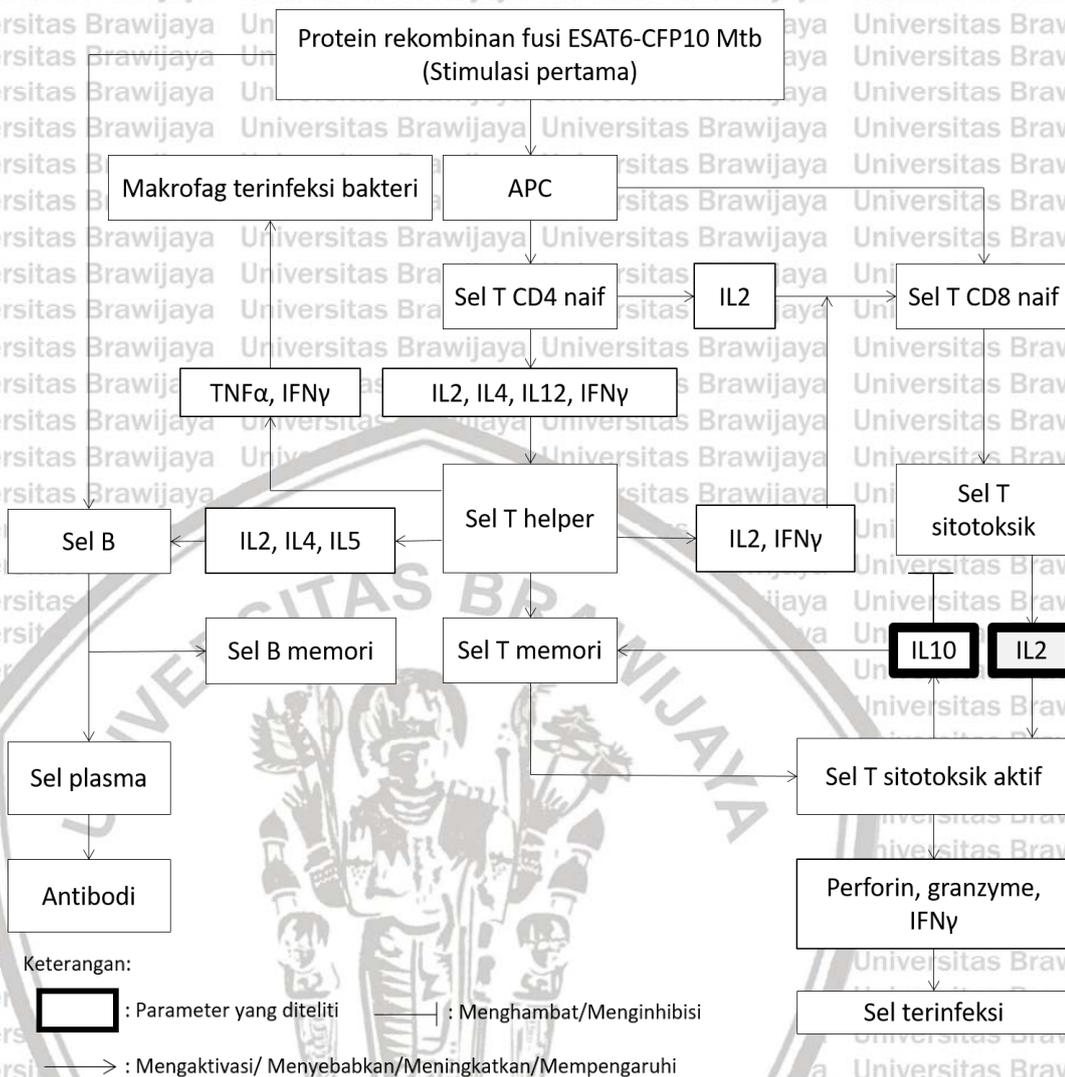
Pada saat protein rekombinan pertama kali masuk kedalam tubuh maka tubuh akan mengenalinya sebagai antigen asing. Protein rekombinan akan dipresentasikan kepada sel limfosit seperti sel T dan sel B. Sel T CD4 naif diaktivasi melalui MHC kelas 2 dan sel T CD8 naif diaktivasi melalui MHC kelas 1 di kelenjar getah bening oleh sel *antigen presenting cells* (APC) (Handzel, 2013).

Sel T CD4 naif yang teraktivasi kemudian mensekresi IL2, IL4, IL12, dan IFN $\gamma$  yang berfungsi untuk proliferasi dan diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel T helper (Abbas *et al.*, 2016). Setelah itu sel T helper yang aktif akan mensekresi IL2, IL4, dan IL5 untuk merangsang aktivasi dari sel limfosit B sehingga dapat berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan antibodi (Prayitno & Putra, 2014). Sel T CD8 naif selanjutnya mensekresi IL2 yang akan digunakannya sendiri

untuk mempercepat proliferasi dan diferensiasi menjadi sel T sitotoksik. Sel T sitotoksik mengeliminasi antigen dengan sekresi perforin, granzyme, dan IFN $\gamma$  yang berperan melisis antigen. Sedangkan sel memori didiferensiasi oleh IL10 berfungsi memberikan respon imunitas yang lebih kuat pada paparan antigen berikutnya (Feau *et al.*, 2011). Sebagian sel memori tersisa dan bersiap menghadapi paparan berikutnya dari antigen. Respon imun akan berakhir apabila tubuh sudah tidak dapat menemukan antigen di dalam tubuh (Bijiga & Martino, 2013).



### 3.2 Kerangka Penelitian



**Gambar 3.2 Kerangka penelitian**

**Keterangan:**

Pemberian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 (sebagai antigen) bersifat imunodominan akan diproses oleh APC yang kemudian dipresentasikan kepada sel T CD4 naif melalui MHC kelas 2 dan kepada sel T CD8 naif melalui MHC kelas 1 di kelenjar getah bening yang akan memicu terjadinya aktivasi sel T CD4 dan CD8 naif. Sebagian antigen yang lain akan mengaktivasi sel B sehingga teraktivasi menjadi sel plasma. Sel T CD4 naif yang teraktivasi kemudian mensekresi IL2 yang merangsang proliferasi dari sel T CD8 naif dan sitokin lainnya

yang berfungsi untuk diferensiasi sel T CD4 naif menjadi sel T helper. Sel T helper kemudian mensekresikan IL2, IL4, dan IL5 untuk membantu aktivasi dan diferensiasi dari sebagian sel B yang tidak terpapar antigen dan juga membantu makrofag dalam mengeliminasi bakteri. Sel T CD8 naif selanjutnya mensekresi IL2 yang akan digunakannya sendiri untuk mempercepat proliferasi dan diferensiasi menjadi sel T sitotoksik. Sel T sitotoksik mengeliminasi patogen intraselular dengan mensekresi perforin, granzyme, dan IFN $\gamma$  yang berperan melisis antigen sedangkan sel memori berfungsi memberikan respon imunitas yang lebih kuat pada infeksi berikutnya. Saat respon imun sampai pada puncaknya, sel T sitotoksik akan mensekresikan IL10 yang berperan dalam pencegahan kerusakan lebih lanjut yang diakibatkan oleh reaksi peradangan respon imun.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kultur PBMC.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Studi ini menggunakan model penelitian laboratorium sesungguhnya secara *in vitro* dengan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*

dimana protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb dipaparkan pada kultur PBMC.

#### 4.2 Sampel Penelitian

##### 4.2.1 Subyek Penelitian

Sampel yang digunakan adalah kultur PBMC dari darah pasien dan keluarga pasien TB serta dokter dan paramedis di lingkungan Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang memenuhi kriteria inklusi-eksklusi dan menyetujui informed consent. Kultur PBMC pasien TB kemudian menjadi sampel kelompok pasien TB, kultur PBMC keluarga pasien menjadi sampel kelompok kontak TB, kultur PBMC dokter dan paramedis yang sesuai dengan definisi operasional sehat endemik menjadi sampel kelompok sehat.

##### 4.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi :

- Pasien tuberkulosis didiagnosis berdasarkan klinis dan radiologis. Terdapat riwayat batuk, febris, kakeksia, dan gambaran foto dada menunjukkan lesi tuberkulosis (PDPI, 2011). Penyakit aktif dikonfirmasi dengan ditemukan lebih dari 2 bakteri per 10 lapang pandang pada pengecatan Ziehl-Neelsen atau ditemukan bakteri Mtb pada kultur dahak. Pasien baru didiagnosis atau baru mendapatkan terapi kurang dari 1 bulan.

- Subyek kontak TB positif adalah dokter/paramedis dan keluarga pasien TB yang telah melakukan kontak langsung dengan pasien TB atau sampel biologis atau kultur dari pasien TB selama lebih dari 6 bulan dan tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Pada gambaran foto dada dan sputum SPS tidak menunjukkan tuberkulosis dengan mantoux tes positif.
- Subyek kontrol endemik adalah dokter dan paramedis sehat yang tidak pernah kontak dengan pasien TB selama lebih dari 6 bulan sebelumnya dengan gambaran foto dada tidak terdapat gambaran lesi tuberkulosis, sputum SPS negatif, dan mantoux tes negatif.

**Kriteria Eksklusi :**

- Tidak terinfeksi Human Immunodeficiency Virus (HIV)
- Tidak terinfeksi virus hepatitis B
- Tidak terinfeksi virus hepatitis C
- Hasil pemeriksaan laboratorium darah lengkap dalam batas normal
- Hasil pemeriksaan laboratorium uji fungsi hati dalam batas normal
- Hasil pemeriksaan laboratorium uji fungsi ginjal dalam batas normal
- Wanita yang ikut terlibat dalam penelitian ini tidak sedang hamil atau merencanakan kehamilan
- Usia subyek penelitian antara 18 - 50 tahun

**4.2.3 Cara Pengambilan Sampel**

Subyek dipilih secara *consecutive sampling* mulai bulan Oktober 2017 hingga November 2017. Sampel darah diperoleh secara konsekutif pada subyek yang memenuhi kriteria inklusi di Poli Paru dan Ruang Rawat Inap RSUD Dr. Saiful Anwar Malang.

#### 4.2.4 Jumlah Sampel

Jumlah subyek untuk sampel setiap kelompok adalah 7 orang, yang diperoleh dari rumus:  $p(n-1) \geq 16$ ,  $n$  = jumlah sampel tiap-tiap perlakuan, dan  $p$  = jumlah perlakuan (Sastroasmoro & Ismael, 2014). Jadi total 21 subyek penelitian (7 penderita TB, 7 kontak positif, 7 kontrol normal/individu sehat).

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu:

Variabel bebas : Protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb

Variabel tergantung : IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD 8

#### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeriksaan skrining darah dilakukan di Laboratorium sentral RSSA, mantoux tes di poli Ilmu Kesehatan Anak, pemeriksaan dahak BTA di laboratorium mikrobiologi RSSA dan pemeriksaan foto toraks di instalasi radiologi RSSA. Kultur limfosit dan pemeriksaan persentase IL2 dan IL10 sel T CD8 dilakukan di laboratorium biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Penelitian dilaksanakan dengan rincian:

- Penyusunan Proposal : pada bulan Februari - Oktober 2017,
- Pelaksanaan Kegiatan : pada bulan Oktober - November 2017,
- Pengolahan Data : pada bulan Desember 2017,
- Penyusunan Hasil : pada bulan Desember 2017.

## 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.5.1 Pemeriksaan Umum

- Pengambilan darah dan urin

Vacutainer set dengan 2 tabung (EDTA dan SST) untuk pemeriksaan darah lengkap dan kimia klinik, serologi, manset, bantalan tangan. Untuk pengambilan urin menggunakan botol urin dan formulir permintaan pemeriksaan laboratorium.

- Foto Rontgen

Formulir permintaan foto, Foto Rontgen.

- Tes Mantoux

PPD RT 23-25 TU, spuit 1 ml, bantalan tangan, dan formulir, Mantoux tes.

- Pemeriksaan Sputum

Botol sputum 3 buah: 2 buah botol biasa dan 1 buah botol steril dan identitas sampel.

- Informed Consent

Formulir informed consent.

### 4.5.2 Penghitungan Sel Secara Menyeluruh

#### a. Isolasi PBMC

- Botol sentrifus 15 ml, mikropipet, sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*), *Bio Safety cabinet (Faster Safe Fast Elite 212-D 588)*

- Ficoll-Hipaque d=1.077 g/mL, *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, sampel darah yang dimasukkan dalam vacutainer Heparin dengan total volume 12 ml.

b. Kultur PBMC dan Pemberian Antigen

- Kultur PBMC ketiga kelompok sampel, protein rekombinan ESAT6 Mtb, PPD 1mg/ml (Statens Serum Institut Denmark), well plate, inkubator

c. *Staining Cell Surface Marker*

- Botol sentrifus 1,5 ml, mikropipet, sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*)
- Antibodi *cell surface marker anti-human CD8*, larutan sel *staining buffer*

d. *Staining Intracellular (Cytoplasmic) Marker*

- Botol sentrifus 1.5 ml, mikropipet, sentrifus suhu dingin (*Biosan LMC-3000*)
- Sel *staining buffer*, larutan *fix buffer*, larutan *perm wash buffer*, antibodi intraseluler *anti-human IL2* dan *IL10*

e. Flowcytometer BD FACS Calibur

**4.6 Definisi Operasional**

Subyek	Pasien TB didiagnosis berdasarkan klinis dan radiologis.
dengan	Terdapat riwayat batuk, febris, kakeksia, dan gambaran foto
tuberkulosis	dada menunjukkan lesi tuberkulosis. Penyakit aktif dikonfirmasi dengan ditemukan lebih dari 2 bakteri per 10 lapang pandang pada pengecatan Ziehl–Neelsen atau ditemukan bakteri Mtb pada kultur dahak. Pasien baru didiagnosis atau baru mendapatkan terapi kurang dari 1 bulan (PDPI, 2011)

Subyek Dokter/ paramedis dan keluarga pasien TB yang telah kontak dengan kontak langsung dengan pasien TB atau sampel biologis atau kultur TB positif dari pasien TB selama lebih dari 6 bulan dan tidak mempunyai riwayat TB sebelumnya. Pada gambaran foto dada dan sputum SPS tidak menunjukkan tuberkulosis dengan mantoux tes positif.

Subyek kontrol Dokter dan paramedis sehat yang tidak pernah kontak dengan endemik pasien TB selama lebih dari 6 bulan sebelumnya dengan gambaran foto dada tidak terdapat gambaran lesi tuberkulosis, sputum SPS negatif, dan mantoux tes negatif.

Fusi ESAT6-CPFP10 Penggabungan dua gen protein ESAT6-CPFP10. *Early secretory antigenic target 6* (ESAT6) dan *culture filtrate protein 10* (CFP10) merupakan antigen imunodominan yang spesifik, berasal dari filtrat kultur. Keduanya disandi oleh gen *region of difference 1* (RD-1) dan merupakan famili ESAT6.

#### 4.7 Prosedur dan Alur Penelitian

##### 4.7.1 Prosedur Penelitian

###### 4.7.1.1 Pemeriksaan Umum

###### a. Pengambilan darah dan urine

- 3 mL untuk *EDTA blood tube*, untuk pemeriksaan darah lengkap
- 5 mL untuk *serum separator tube* (SST),

Darah dalam SST, disentrifus 4.000 rpm, 20 menit. Serum yang terbentuk untuk dilakukan pemeriksaan ureum, kreatinin, SGOT, SGPT, gula darah acak dan serologis HIV.

- Sampel urine untuk tabung urine,
- Urine dalam tabung urine dilakukan pemeriksaan urine lengkap, disentrifus 4.000 rpm, 20 menit untuk pemeriksaan sedimen urine.

#### b. Foto X-Ray

Pada sampel kontrol atau sehat dilakukan foto toraks untuk menilai apakah terdapat lesi tuberkulosis pada paru sekaligus menentukan apakah masuk daftar inklusi atau eksklusi.

#### c. Tes Mantoux

Tes Mantoux dilakukan dengan menyuntikkan PPD RT 23-2 TU pada antebrachii area volar subyek penelitian. Lokasi kemudian diinterpretasi derajat indurasi dan eritema setelah 48-72 jam. Interpretasinya sebagai berikut: diameter 0-4mm (negatif), diameter 5-9 mm (meragukan), dan diameter >10mm (positif). Hasilnya kemudian dicatat (Kasper *et al.*, 2015).

#### d. Pemeriksaan Sputum

Pemeriksaan sputum dilakukan pada ketiga kelompok sampel. Masing-masing sampel diberi 3 botol sputum untuk mengumpulkan sputum secara SPS (sewaktu-pagi-sewaktu). Kemudian sputum dicat dengan Ziehl-Neelsen dan dikultur.

#### 4.7.1.2 Isolasi PBMC

1. Semua bahan yang diperlukan dikeluarkan dari lemari pendingin (LG Optifresh 4°C) dan dibiarkan sampai suhu ruang.
2. Disiapkan botol sentrifus 15 mL (Terumo) dan diisi dengan Ficoll-Hipaque  $d=1.077$  g/mL

3. Sampel darah tepi dalam vacutainer heparin sebanyak 12 mL yang akan diuji dibolak-balik perlahan agar homogen kemudian dicampur 1:1 dengan PBS. Kemudian diambil dengan mikropipet dan disalutkan secara perlahan pada dinding falcon yang sudah diisi Ficoll-Hipaque  $d=1.077$  g/mL. Perbandingan volume antara ficoll-hipaque dengan sampel darah adalah 1:1. Akan terbentuk 2 lapisan.

4. Disentrifus (Biosan LMC-3000) suhu ruang dengan kecepatan 1000 rpm, 30 menit sehingga terpisah menjadi 5 lapisan, yaitu plasma, PBMC, Ficoll-Hipaque, granulosit dan sel darah merah.

5. Cincin PBMC yang terbentuk diambil secara perlahan menggunakan mikropipet dan diletakkan dalam botol sentrifus 15 mL yang baru.

6. Larutan PBMC dicuci dengan PBS 10 mL dan disentrifus suhu ruang dengan kecepatan 1200 rpm, 10 menit.

7. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan disentrifus pada suhu ruang 1200 rpm (1000 – 1600 rpm) 10 menit, diulang dua kali terbentuklah pelet (PBMCs) di dasar botol sentrifus 15 ml.

#### 4.7.1.3 Kultur PBMC

- PBMC dikultur selama 48 jam dalam inkubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in triplicate. Supernatan diambil dan dimasukkan dalam 96 V bottom plate dan disimpan dalam -20°C. 4 jam sebelum dipanen diberikan Brefeldin A (Golgiplug) 10 µg/ml. Kultur dipanen pada jam ke 48.
- Sebanyak 10<sup>6</sup> PBMC (setelah dihitung) dalam 100 ul IMDM.
- Ada 3 perlakuan yaitu:

- Sebagai kontrol negatif sel dikultur tanpa protein rekombinan Mtb dan/atau PPD
- Sebagai kontrol positif sel dikultur dengan PPD 2 µg/ml,
- Sel dikultur dengan protein rekombinan ESAT6-CFP10 Mtb 2 µg/ml, dikultur dengan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb.

- Medium kultur

- RPMI 1640, natrium bicarbonat 0.2%, buffer Hepes 0.28%, Penstrep 0.25%, PBS10X

#### 4.7.1.4 Pewarnaan dengan Marker Ekstraselular CD8

1. Pelet PBMC ditambahkan dengan *cell staining buffer*, dan dibagi dalam beberapa eppendorf sesuai dengan banyaknya perlakuan. *Cell staining buffer* merupakan larutan yang dibuat dari 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dalam PBS.
2. Pelet siap untuk distaining dengan antibodi cell surface marker CD8 (yang telah diencerkan dengan *cell staining buffer* dengan perbandingan 1:100).
3. Antibodi CD8 (BioLegend) yang telah diencerkan kemudian diambil sebanyak 50 µl dan di campurkan dengan pelet PBMC dan dihomogenkan.
4. Pelet yang telah diberi antibodi CD8 diinkubasi selama 20 menit dalam gelap di suhu ruang.

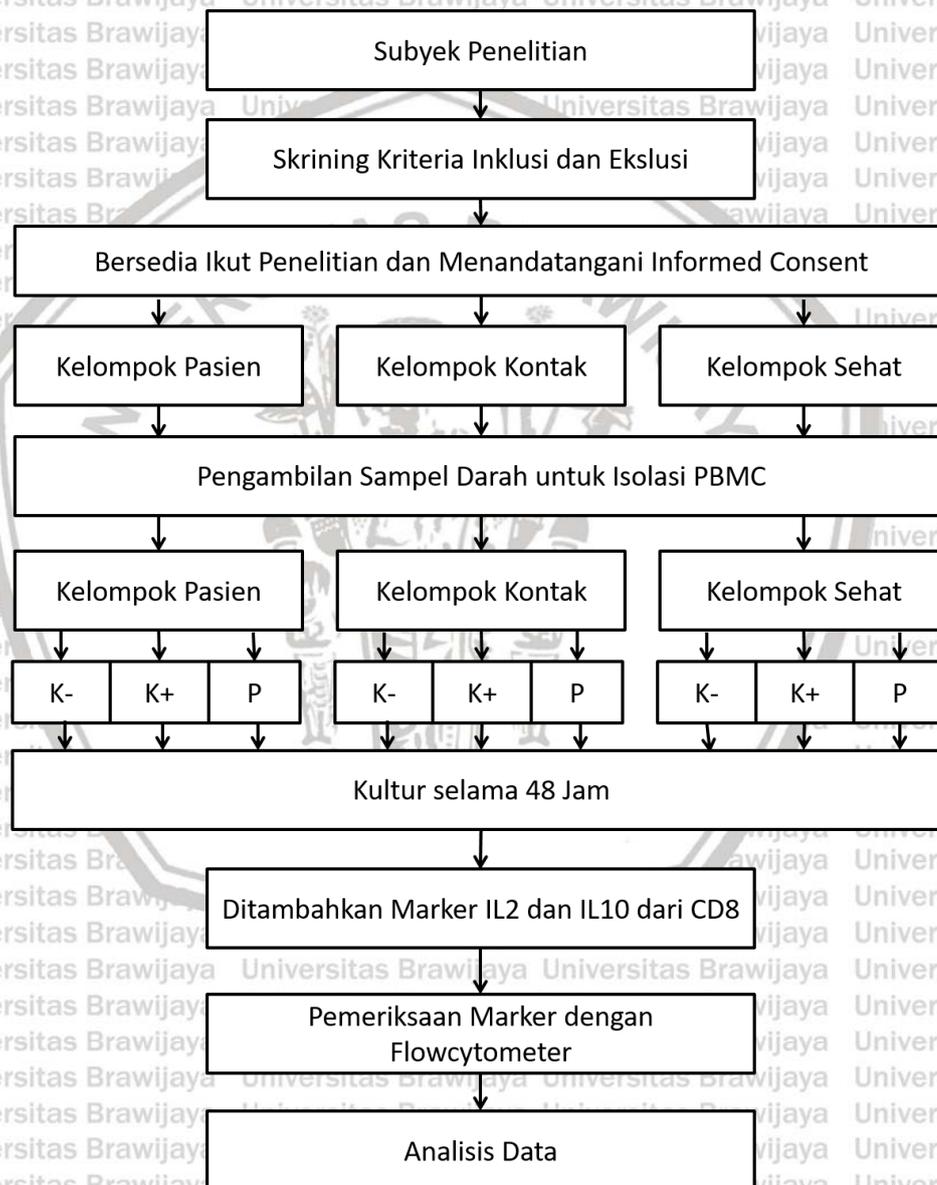
#### 4.7.1.5 Pewarnaan dengan Marker Intraselular IL2 dan IL10

1. Pelet yang telah diinkubasi dengan antibodi CD8 kemudian dicuci dengan 500  $\mu$ l *cell staining buffer* (BioLegend), disentrifus pada suhu 4°C, kecepatan 2500 rpm, 3 menit.
2. Supernatan dibuang, dan pelet yang terbentuk dicuci dengan 500  $\mu$ l larutan *fix buffer*, dihomogenkan dan disentrifus pada suhu 4°C, kecepatan 2500 rpm, 3 menit.
3. Supernatan dibuang, kemudian pelet difiksasi dengan 500  $\mu$ l *fix buffer* lalu diinkubasi 20 menit dalam gelap di suhu ruang.
4. Setelah inkubasi selesai, larutan disentrifus pada suhu 4°C, kecepatan 2500 rpm, 3 menit.
5. Supernatan dibuang, pelet yang terbentuk dicuci dengan larutan *permeable wash buffer* (BioLegend), kemudian disentrifus pada suhu 4°C, kecepatan 2500 rpm, 3 menit.
6. Supernatan dibuang, kemudian pelet siap untuk distaining dengan antibodi intraseluler IL2 dan IL10 (yang telah diencerkan dalam *permeable wash buffer* dengan perbandingan tertentu).
7. Masing-masing pelet distaining dengan 50  $\mu$ l antibodi (IL2 dan IL10) yang telah diencerkan, kemudian diinkubasi dalam gelap di suhu ruang selama 20 menit.
8. Setelah diinkubasi dicuci dengan menambahkan 500  $\mu$ l larutan *perm wash buffer* dan disentrifus pada suhu 4°C, kecepatan 2500 rpm, 3 menit.

9. Supernatan dibuang dan ditambahkan 350 µl sel *staining buffer* (BioLegend) dihomogenkan.

10. Kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *Flow cytometer*.

#### 4.8 Alur Penelitian



K- : Tanpa Antigen  
 K+ : +PPD 2 µg/mL  
 P : +Protein Rekombinan Fusi ESAT6-CFP10 2µg/mL

**Gambar 4.1 Alur penelitian**

#### 4.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dihitung untuk mendapatkan rerata dan standard deviasi. Perbedaan antar kelompok di analisis dengan one way ANOVA yaitu metode analisis statistika yang tergolong analisis komparatif (perbandingan) antara lebih dari dua rata-rata untuk melihat perbedaan persentase sitokin IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada tiap-tiap kelompok tergantung distribusi data yang nanti diperoleh, dengan tingkat kebermaknaan  $p < 0,05$ . Jika  $p < 0,05$  maka dianggap signifikan dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (Tukey's Test)* untuk melihat kelompok yang signifikan. Analisis statistik menggunakan SPSS software, version 19 for Windows.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Responden penelitian ini terdiri dari 24 subyek dengan masing masing kelompok studi terdiri dari 8 orang subyek sehat, subyek kontak TB, dan subyek pasien TB. Subyek penelitian telah memenuhi kriteria inklusi dan eklusi subyek penelitian dan telah menandatangani persetujuan (*informed consent*).

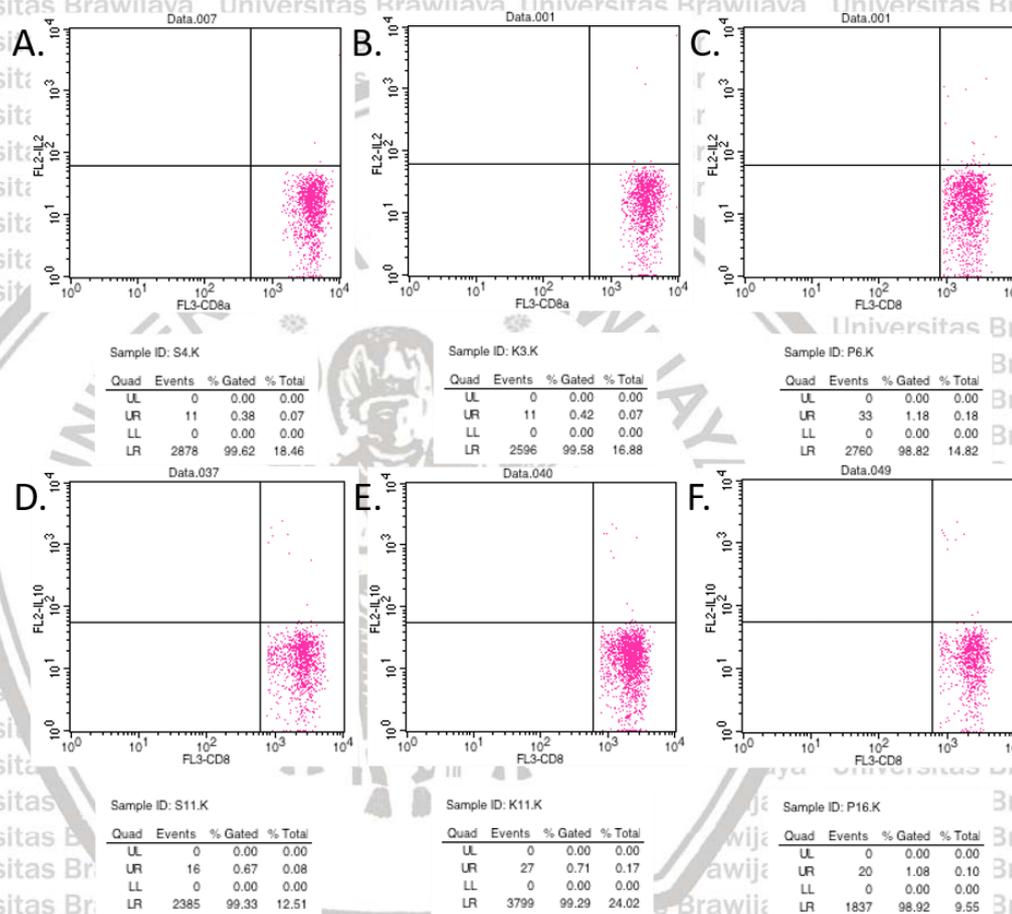
Tabel 5.1 Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik	Sehat (n=8)	Kontak (n=8)	Pasien (n=8)
Usia	< 20	1	0
	21 – 30	2	3
	31 – 40	1	4
	41 – 50	4	1
Jenis Kelamin	Laki-laki	6	4
	Perempuan	2	4
Riwayat merokok	Merokok	6	0
	Tidak	2	8
Indeks Masa Tubuh	< 18.5	5	1
	18.5 – 23	2	2
	> 23	1	5
BCG Scar (+)	6	8	8
Mantoux Test	8	8	0
Gejala Klinis	Batuk	8	-
	Batuk darah	2	-
	Sesak	1	-
	Nyeri Dada	1	-
	Demam	7	-
	Keringat Malam	6	-
	Penurunan BB	5	-
Foto Toraks	Minimal	0	N
	Moderate	2	N
	Far advanced	6	N
BTA	+1	3	Negatif (-)
	+2	3	Negatif (-)
	+3	2	Negatif (-)

Dari tabel 5.1 dapat dilihat karakteristik subyek penelitian dimana usia subyek berada pada rentang 21 – 50 tahun, dengan subyek pasien TB paling banyak terdapat pada rentang usia 40 – 50 tahun. Pada penelitian ini jumlah laki-laki dan perempuan berjumlah sama yaitu 12 orang. Dimana pada kelompok pasien jumlah laki-laki (6 orang) lebih banyak daripada perempuan (2 orang). Hal ini berbanding terbalik dengan jumlah perempuan (6 orang) yang lebih banyak daripada laki-laki (2 orang) pada kelompok sehat. Pada kelompok kontak didapatkan jumlah laki-laki sama dengan perempuan. Dari 6 orang laki-laki pasien TB diketahui bahwa semuanya merupakan perokok aktif, sedangkan 2 orang perempuan pasien TB bukan merupakan perokok aktif. Pada kelompok kontak dan sehat didapatkan bahwa tidak ada subyek yang perokok aktif. Berdasarkan Indeks Masa Tubuh (IMT) paling banyak pada subyek pasien TB memiliki IMT  $<18,5$  (5 orang), 2 orang memiliki IMT antara 18,5-23, tetapi tidak ada pasien yang memiliki IMT  $>23$ . Pada kelompok kontak TB dan kelompok sehat hampir semua responden memiliki IMT  $>18,5$ . Hampir seluruh responden memiliki scar BCG kecuali pada 2 subyek penelitian pada kelompok pasien TB tidak memiliki scar BCG. Pemeriksaan mantoux didapatkan pada seluruh subyek kelompok pasien dan kontak. Gejala klinis TB hanya didapatkan pada kelompok pasien TB yang merupakan gejala respiratorik dan sistemik yang sering terjadi pada penderita penyakit TB dan merupakan salah satu kriteria diagnosa. Batuk merupakan gejala yang paling banyak menyertai penyakit TB pada studi ini didapatkan pada seluruh kelompok subyek TB. Keluhan demam pada 7 orang subyek TB, keringat malam 6 orang dan penurunan berat badan 5 orang, merupakan keluhan terbanyak setelah batuk. Beberapa pasien juga mengeluhkan batuk darah 2 orang, sesak dan nyeri dada masing masing 1 orang. Grafik keluhan penderita TB dapat dilihat pada gambar 5.1. Pada gambaran foto toraks paling banyak (6 orang) didapatkan gambaran paru *Far Advanced Lesion* dari subyek penderita TB dan tidak didapatkan minimal

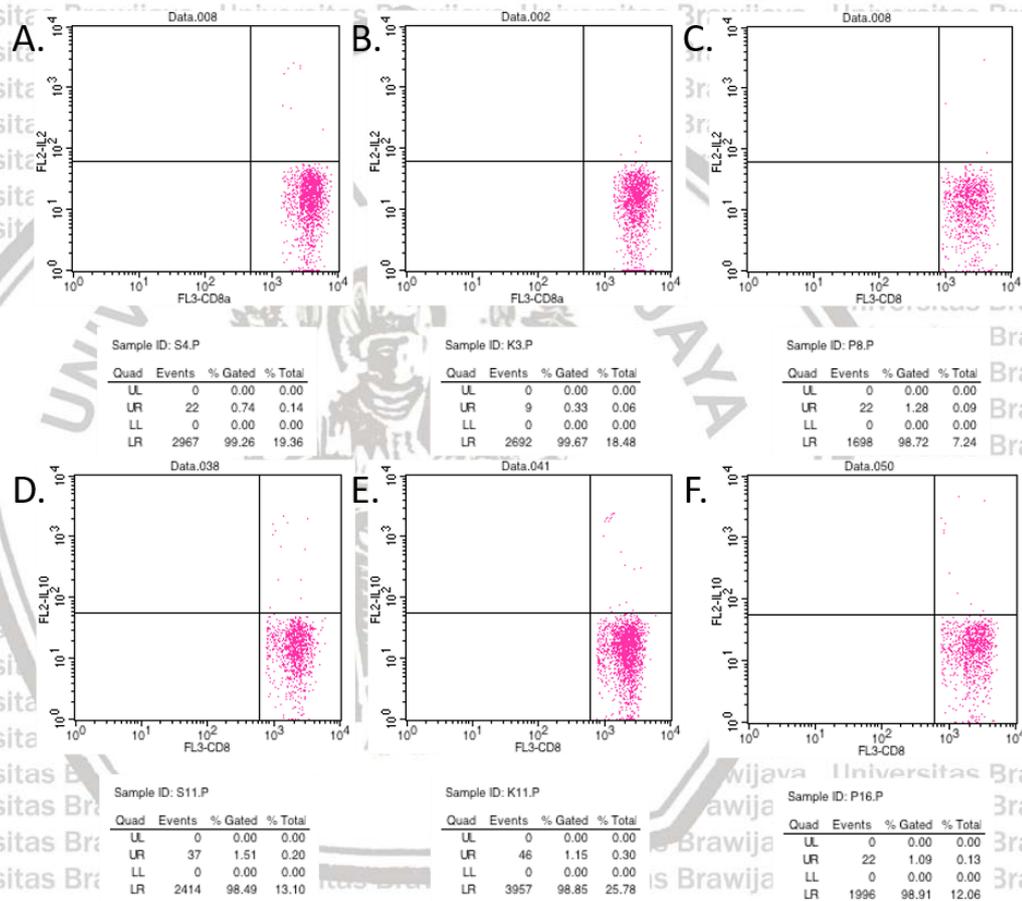
lesion pada subyek penderita TB (gambar 5.2). Pada keseluruhan subyek kelompok pasien didapatkan hasil pemeriksaan smear sputum BTA+ sesuai dengan syarat dalam kelompok Pasien TB. BTA +1 dan +2 didapatkan pada masing masing 3 subyek, BTA +3 didapatkan pada 2 orang pasien.

### 5.2 Hasil Pengukuran Persentase IL2 dan IL10 yang Dipresentasikan Sel T CD8 pada PBMC Kelompok Sehat, Kontak TB, dan Pasien TB.



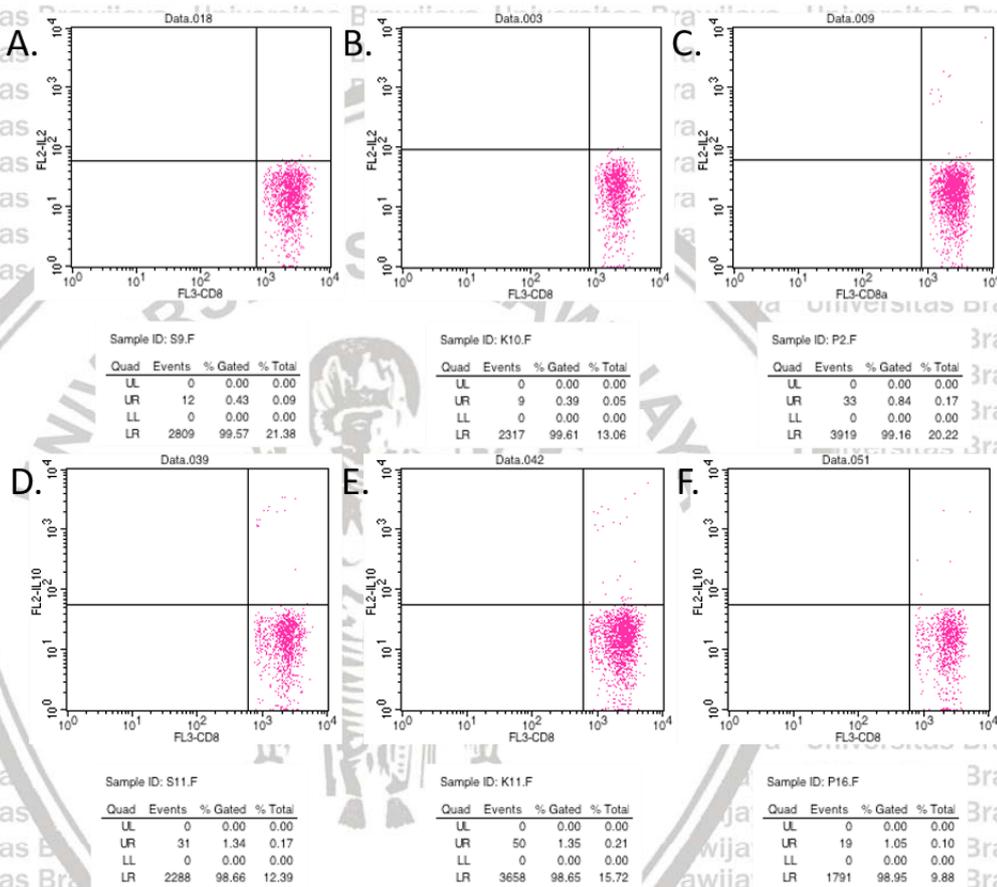
**Gambar 5.1 Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok tanpa paparan antigen.** Dari diagram ini didapatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kuadran kanan atas. Gambar (A) menunjukkan persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat tanpa paparan antigen, (B) persentase IL2 kelompok kontak tanpa paparan antigen, dan (C) persentase IL2 kelompok pasien tanpa paparan antigen. Gambar (D) menunjukkan persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat tanpa paparan antigen, (E) persentase IL10 kelompok kontak tanpa paparan antigen, dan (F) persentase IL10 kelompok pasien tanpa paparan antigen.

Dalam penelitian ini dilakukan analisis respon imun berupa pengukuran persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 dari PBMC terhadap paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 pada 3 kelompok subyek penelitian yaitu kelompok sehat, kontak TB dan pasien TB. Pengukuran dilakukan dengan flow cytometry menghasilkan data berupa diagram histogram yang dapat dilihat pada Gambar 5.1, Gambar 5.2, dan Gambar 5.3.



**Gambar 5.2 Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok setelah paparan PPD.** Dari diagram ini didapatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kuadran kanan atas. Gambar (A) menunjukkan persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat setelah paparan PPD, (B) persentase IL2 kelompok kontak setelah paparan PPD, dan (C) persentase IL2 kelompok pasien setelah paparan PPD. Gambar (D) menunjukkan persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat setelah paparan PPD, (E) persentase IL10 kelompok kontak setelah paparan PPD, dan (F) persentase IL10 kelompok pasien setelah paparan PPD.

Total sampel yang diukur adalah 72 sampel kultur PBMC. Dimana 72 sampel itu terbagi dalam 9 subgrup yang dipisahkan berdasarkan kelompok subyek (sehat, kontak TB, pasien TB) dan perlakuan (tanpa antigen, PPD, protein fusi rekombinan ESAT6-CFP10).



**Gambar 5.3** Diagram dot plot persentase IL2 dan IL10 berbagai kelompok setelah paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10. Dari diagram ini didapatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kuadran kanan atas. Gambar (A) menunjukkan persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat setelah paparan ESAT6-CFP10, (B) persentase IL2 kelompok kontak setelah paparan ESAT6-CFP10, dan (C) persentase IL2 kelompok pasien setelah paparan ESAT6-CFP10. Gambar (D) menunjukkan persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 kelompok sehat setelah paparan ESAT6-CFP10, (E) persentase IL10 kelompok kontak setelah paparan ESAT6-CFP10, dan (F) persentase IL10 kelompok pasien setelah paparan ESAT6-CFP10.

Setelah proses pewarnaan dengan marker maka selanjutnya dilakukan proses penghitungan sel dengan menggunakan flowcytometry. Dari diagram dot plot dapat dilihat bahwa PBMC pada mulanya dipisahkan dengan pengelompokan (*gating*) berdasarkan karakteristik sel T CD8. Sel T CD8 yang telah ditambahkan marker ekstraseluler akan memberikan karakteristik tertentu yang tertangkap oleh flowcytometry. Selanjutnya dilakukan pengelompokan sel T CD8 berdasarkan karakteristik yang dimiliki sel T CD8. Setelah dikelompokkan, selanjutnya dilakukan pengelompokan berdasarkan karakteristik yang dimiliki oleh sel T CD8 pemroduksi IL2 dan IL10. IL2 dan IL10 yang dipresentasikan oleh sel T CD8 akan menyebabkan sel tersebut nantinya tertangkap di dot plot berada di kuadran kanan atas. Persentase sel pada masing-masing kuadran dapat dilihat di tabel yang tersedia di bawah dot plot.

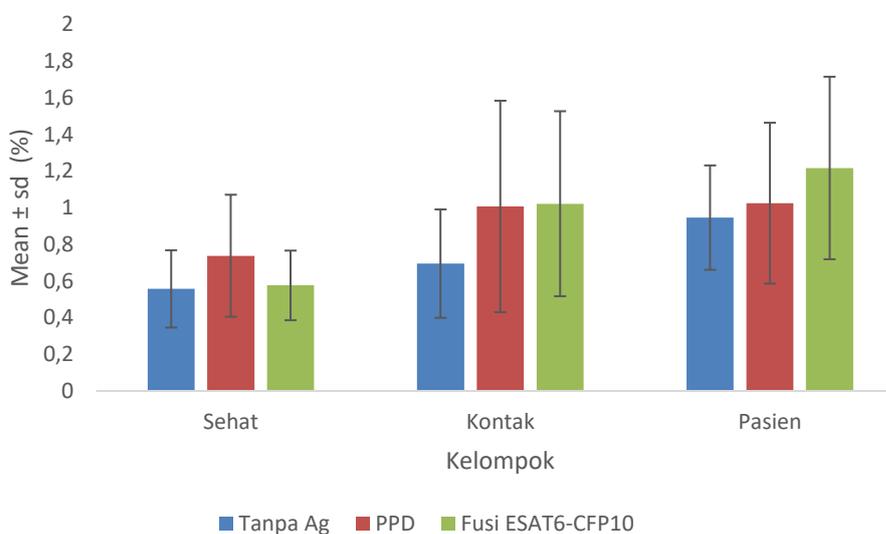
Hasil pengukuran IL2 sel T CD8 dari PBMC menunjukkan bahwa kelompok protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 memiliki persentase IL2 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa antigen baik pada kelompok sehat ( $0,576 \pm 0,190$ ), kontak ( $1,022 \pm 0,506$ ), atau pasien ( $1,217 \pm 0,498$ ). Persentase IL2 pada berbagai kelompok dapat dilihat pada tabel 5.2. Namun demikian analisis one-way ANOVA memperlihatkan bahwa perbedaan persentase IL2 pada kelompok sehat ( $p = 0,309$ ), kontak TB ( $p = 0,318$ ), atau pasien TB ( $p = 0,424$ ) tidak signifikan ( $p > 0,05$ ). Terdapat perbedaan persentase IL2 yang signifikan antar kelompok sehat, kontak, dan pasien TB yang dipaparkan dengan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 ( $p = 0,019$ ) dan pada kelompok tanpa antigen ( $p = 0,026$ ). Pada kelompok sehat, kontak, dan pasien TB yang dipaparkan dengan PPD tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari persentase IL2 ( $p = 0,396$ ).

**Tabel 5.2 Persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 pada PBMC yang dipaparkan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.**

Kelompok	IL2			p-value
	Sehat Mean ± sd (%)	Kontak Mean ± sd (%)	Pasien Mean ± sd (%)	
Tanpa Ag	0,557 ± 0,211	0,695 ± 0,296	0,946 ± 0,285	<b>0,026<sup>a</sup></b>
PPD	0,738 ± 0,333	1,007 ± 0,577	1,025 ± 0,439	<b>0,396<sup>b</sup></b>
ESAT6-CFP10	0,576 ± 0,190	1,022 ± 0,505	1,217 ± 0,498	<b>0,019<sup>a</sup></b>
<b>p-value</b>	<b>0,309<sup>b</sup></b>	<b>0,318<sup>b</sup></b>	<b>0,424<sup>b</sup></b>	

a) Terdapat perbedaan signifikan (p<0,05)

b) Tidak terdapat perbedaan signifikan (p>0,05)



**Gambar 5.2 Diagram persentase IL2 pada PBMC kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang dipapar dengan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.**

Sedangkan hasil pengukuran IL10 sel T CD8 dari PBMC memperlihatkan bahwa kelompok protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 memiliki persentase IL10 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa antigen baik pada kelompok sehat (0,617 ± 0,306), kontak TB (1,047 ± 0,689), atau pasien TB (0,857 ± 0,444).

Persentase IL10 pada berbagai kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3. Namun demikian analisis one-way ANOVA memperlihatkan perbedaan persentase IL10 pada kelompok sehat (p = 0,908), kontak TB (p = 0,352), atau pasien TB (p = 0,776) tidak signifikan (p > 0,05). Penambahan protein fusi ESAT6-CFP10 pada

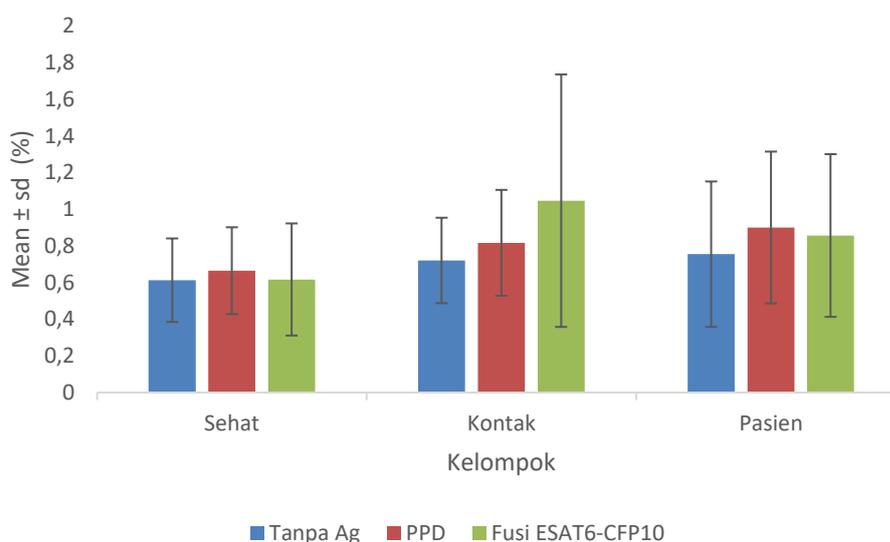
PBMC antar kelompok juga menunjukkan persentase IL10 yang tidak signifikan ( $p = 0,257$ ), diikuti oleh PPD ( $p = 0,351$ ), dan perlakuan tanpa antigen ( $p = 0,617$ ).

**Tabel 5.3 Persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada PBMC yang dipaparkan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.**

Kelompok	IL10			p- value
	Sehat	Kontak	Pasien	
	Mean ± sd (%)	Mean ± sd (%)	Mean ± sd (%)	
Tanpa Ag	0,613 ± 0,228	0,721 ± 0,233	0,755 ± 0,397	<b>0,617*</b>
PPD	0,665 ± 0,237	0,817 ± 0,289	0,901 ± 0,414	<b>0,351*</b>
ESAT6-CFP10	0,617 ± 0,306	1,047 ± 0,689	0,857 ± 0,444	<b>0,257*</b>
<b>p- value</b>	<b>0,908*</b>	<b>0,352*</b>	<b>0,776*</b>	

a) Terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ )

b) Tidak terdapat perbedaan signifikan ( $p > 0,05$ )



**Gambar 5.3 Diagram persentase IL10 pada PBMC kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang dipapar dengan protein ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen.**

## BAB VI PEMBAHASAN

### 6.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Dari 8 orang subyek dengan TB diantaranya 4 orang berusia diatas 40 tahun (rentang usia 41-50 tahun). Hal ini sesuai dengan penelitian yang sebelumnya dilakukan pada tahun 2011 oleh Zhang *et al.*, dimana Zhang berpendapat bahwa usia memiliki peranan penting dalam menentukan klinis dari pasien TB. Hal ini dapat dikarenakan semakin bertambahnya usia maka ketahanan tubuh terhadap penyakit semakin menurun (Zhang *et al.*, 2011). Pada studi ini jenis kelamin laki laki lebih mendominasi daripada perempuan (75%).

Berdasarkan Data Profil Kesehatan Indonesia tahun 2016 menunjukkan penderita tuberkulosis laki laki mencapai 95.382 jiwa (61%) dan wanita 61.341 jiwa (39%) (Kemenkes, 2016). Data tersebut menunjukkan laki laki lebih rentan menderita TB dibandingkan dengan wanita, salah satu faktor resikonya adalah kebiasaan merokok pada laki laki (Nhamoyebonde *et al.*, 2014; Corona *et al.*, 2006). Dari seluruh penderita TB, 6 orang memiliki Indek Masa Tubuh (IMT) <18 (rendah), sedangkan pada responden sehat dan kontak tidak ada yang memiliki IMT <18.

Semakin parah penyakit TB akan menurunkan nafsu makan dan semakin memperparah kondisi malnutrisi (Chang *et al.*, 2013). Scar BCG pada pasien TB menunjukkan pasien sudah pernah diimunisasi BCG. Pada penelitian ini didapatkan bahwa vaksinasi tidak menjamin seseorang kebal terhadap infeksi TB (Mangtani *et al.*, 2014; Husain *et al.*, 2016; Gowthaman *et al.*, 2012; Fletcher *et al.*, 2011).

Pada infeksi baru, responden yang datang berobat ke RSSA karena keluhan batuk yang tidak segera membaik dengan pengobatan biasa mencapai

100%. Responden TB yang datang juga memiliki keluhan klinis antara lain batuk darah, sesak, nyeri dada, demam, keringat malam, dan penurunan BB. Keluhan batuk merupakan respon tubuh dalam usaha melindungi diri dengan membersihkan mukocillari. Selama peradangan kronis, pembuluh darah di sekitar tempat yang terinfeksi membesar dan sangat rentan terjadi kerusakan. Kebocoran pembuluh darah menyebabkan pasien batuk tidak hanya mengandung secret purulen tetapi juga darah (Turner *et al.*, 2014). Pasien yang demam dengan keringat malam mendominasi, demam dan keringat malam yang terjadi merupakan respon pertahanan tubuh. Th1 akan menghasilkan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ ). Menariknya, TNF $\alpha$  ini diproduksi secara besar-besaran di malam hari dan beberapa studi ekstensif telah dilakukan dan diyakini bahwa peningkatan tajam dalam tingkat serum TNF menyebabkan rangsangan pada hipotalamus yang melibatkan prostaglandin yang menyebabkan peningkatan suhu badan, keringat malam pada pasien TB untuk melepaskan panas tubuh (Buyukoglan *et al.*, 2007).

Untuk pemilihan responden kedalam kelompok pasien TB, kontak TB dan sehat pada daerah endemik TB seperti Indonesia, skrining dilakukan melalui pemeriksaan bakteriologis. Foto toraks adalah alat skrining paling sensitif untuk mengidentifikasi subyek dengan probabilitas tinggi untuk terdiagnosis TB (CDC, 2013). Gabungan pemeriksaan foto toraks, kultur atau uji bakteriologis akan menghasilkan estimasi penyakit TB yang paling akurat. Untuk membedakan TB laten (kontak TB) dengan sehat endemik dilakukan *Tuberculin Skin Test* (TST) atau tes Mantoux. Hasil tes Mantoux >10mm (positif) pada subyek daerah endemik (tanpa adanya keadaan *imunocompromise*) akan dimasukkan kelompok kontak. Pada responden penelitian ini kelompok pasien TB seluruhnya memiliki hasil bakteriologi dahak positif baik dengan hapusan BTA mikroskopis maupun dengan

pemeriksaan molecular (GeneXpert) ditunjang dengan pemeriksaan foto toraks didapatkan kelainan pada paru yang khas pada penderita TB. Tes mantoux positif dengan diameter indurasi >10mm tanpa gangguan imun pada daerah endemik (subyek pasien TB dan kontak TB) menunjukkan riwayat paparan terhadap kuman Mtb (WHO, 2016; CDC, 2013).

## **6.2 Pengaruh Protein Rekombinan Fusi ESAT6-CFP10 terhadap Persentase IL2 dan IL10 yang Dipresentasikan Sel T CD8**

Pada penelitian ini dilakukan penilaian terhadap persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 pada kultur PBMC berbagai kelompok yang dipaparkan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 yang sangat penting dalam proses imunitas perlindungan terhadap TB. Studi yang dilakukan pada tahun 2007 oleh Meher *et al.*, menunjukkan bahwa ESAT6 dan CFP10 dapat merangsang respon sel T sitotoksik pada model hewan percobaan, dimana sel T sitotoksik diketahui memiliki peran besar dalam memberikan pertahanan terhadap TB. (Meher *et al.*, 2007).

Penelitian ini membagi sampel kedalam 3 kelompok dengan harapan mengetahui kemampuan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 selain sebagai vaksin profilaksis juga sebagai vaksin terapeutik. Vaksin terapeutik memiliki fungsi untuk melawan infeksi yang sedang berlangsung, sedangkan vaksin profilaksis berfungsi mencegah munculnya infeksi baru. Vaksin terapeutik bekerja dengan merangsang respon imun terhadap antigen tertentu untuk meningkatkan produksi sitokin dan antibodi yang berperan dalam proses melawan infeksi. Protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 selain sebagai kandidat vaksin (profilaksis atau terapeutik) tampaknya lebih tepat untuk meningkatkan imunogenitas vaksin BCG atau sebagai booster pada subyek yang telah divaksin BCG sebelumnya (Tanoerahardjo, 2012). Interaksi antara Mtb dan sel inang sendiri sangat kompleks

dan belum sepenuhnya dapat dijelaskan. Belum diketahui pasti mekanisme yang tepat bagaimana rekombinan fusi ESAT6 dan CFP10 meningkatkan ekspresi sitokin dan sel T polifungsional yang dominan pada percobaan hewan coba (Kleinnijenhuis *et al.*, 2011). Diharapkan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 yang baru dapat mempertahankan jumlah sel memori dalam waktu yang lama dan kualitas yang baik dalam arti mampu mengekspresikan sel T multifungsional pada paparan Mtb (Mauea *et al.*, 2007; Lindenstrom *et al.*, 2009).

Pada imunitas perlindungan tubuh terhadap infeksi Mtb, IL2 berguna untuk mempercepat proliferasi sel T CD8 dan diferensiasi menjadi sel T sitotoksik (Kumar & Raja, 2010). Selain itu IL2 juga berperan sebagai faktor pertumbuhan dan diferensiasi dari sel NK, sel limfosit B, dan sel *limphokine-activated killer* (LAK) (Prayitno *et al.*, 2014). Keberadaan IL2 diketahui ikut meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  yang diproduksi oleh sel T CD8 sehingga meningkatkan kemampuan tubuh dalam mengeradikasi kuman Mtb (Sa *et al.*, 2013). Sedangkan IL10 merupakan sitokin anti-inflamasi dengan banyak peran seperti supresi Treg, menurunkan TNF- $\alpha$  yang diproduksi makrofag, mengurangi sitokin yang diproduksi oleh Th1, dan menekan proliferasi sel T (Yapu *et al.*, 2013; Zhang & Buvan, 2012). Selain itu IL10 juga berperan dalam maturasi sel T CD8 sitotoksik serta diferensiasi sel T memori (Yuan *et al.*, 2017).

Pada studi ini persentase IL2 dan IL10 pada kelompok sehat, kontak TB, dan sakit TB yang mendapatkan paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10, PPD, dan tanpa antigen tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna secara statistik. Hal ini dapat disebabkan karena IL2 dan IL10 bukanlah respon imun spesifik yang ditimbulkan setelah paparan protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 seperti misalnya sel memori ataupun antibodi spesifik (Marrow *et al.*, 2012).

Selain itu perbedaan yang tidak signifikan bisa terjadi diduga karena protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 dipresentasikan oleh APC melalui MHC kelas 2 sehingga sitokin proinflamasi seperti IL2 yang dipresentasikan sel T CD8 tidak mengalami peningkatan yang signifikan. Kenaikan IL2 terjadi tergantung kuat tidaknya stimulasi yang diberikan oleh APC kepada sel limfosit naif. Pada infeksi TB, Mtb sebagai patogen intrasel dipresentasikan melalui MHC kelas 1 oleh APC yang kemudian mengaktifasi sel T CD8. Hal ini kemudian akan meningkatkan sitokin-sitokin yang berperan dalam maturasi dan proliferasi dari sel T CD8 seperti IL2 (Meher *et al.*, 2007).

Namun demikian yang menarik dari studi ini adalah tampak bahwa persentase IL2 sel T CD8 yang dipapar dengan ESAT6-CFP10 baik pada subyek sehat, kontak TB, dan pasien TB lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa paparan antigen. Perbedaan ini menunjukkan bahwa rekombinan fusi ESAT6 dan CFP10 mampu menginduksi terbentuknya sitokin IL2 meski bukan sebagai respon imun spesifik.

Selain itu persentase IL2 antara kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang dipaparkan dengan protein fusi ESAT6-CFP10 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan seperti pada perbedaan IL2 antar kelompok tanpa paparan antigen. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan persentase IL2 yang bermakna pada kelompok sehat, kelompok kontak TB, dan kelompok pasien TB yang dipaparkan dengan protein fusi ESAT6-CFP10. Perbedaan persentase IL2 yang signifikan antara kelompok sehat, kontak TB, dan pasien TB yang tidak dipaparkan antigen menunjukkan bahwa subyek dalam masing-masing kelompok memang betul sesuai dengan pembagian kelompok. Pada kelompok sehat, adalah betul subyek sehat yang didalam tubuhnya hanya ada sel memori yang terbentuk setelah vaksinasi BCG. Bukan pasien TB laten ataupun pasien TB yang telah

mengalami eradikasi Mtb sempurna. Sedangkan pada kelompok kontak sudah terdapat sel memori yang terbentuk paska infeksi TB seperti pasien TB akan tetapi tanpa adanya manifestasi gejala klinis.

Persentase IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 baik pada subyek sehat maupun kontak TB juga lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa pemberian antigen. Perbedaan ini menunjukkan bahwa rekombinan fusi ESAT6-CFP10 mampu menginduksi terbentuknya sitokin IL10 meskipun secara statistik tidak bermakna. Meskipun tidak bermakna hal ini menunjukkan persentase IL10 lebih tinggi setelah dipaparkan protein fusi rekombinan ESAT6-CFP10 dibandingkan dengan persentase IL10 setelah paparan PPD. Meskipun peningkatan yang didapat tidak bermakna secara statistik, akan tetapi protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 menunjukkan kemampuannya dalam meningkatkan persentase IL2 dan IL10 tidak jauh berbeda dengan PPD. Diharapkan akibat rangsangan awal oleh protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10, dapat tercipta kekebalan yang mirip dengan kondisi paska infeksi TB.

**BAB VII****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb tidak dapat meningkatkan persentase IL2 dan IL10 yang dipresentasikan sel T CD8 baik pada kultur PBMC pasien TB, kontak TB, maupun sehat.

**7.2 Saran**

1. Pengujian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb sebaiknya dilanjutkan dengan melihat terbentuknya antibodi spesifik terhadap protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb.
2. Pengujian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb sebaiknya dilanjutkan dengan melihat terbentuknya sel memori.
3. Pengujian protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10 Mtb lebih baik jika dilakukan secara *invivo* pada hewan coba untuk membuktikan respon imun terhadap Mtb setelah paparan antigen protein rekombinan fusi ESAT6-CFP10.

## DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2016) *Basic Immunology: Functions and Disorders*. doi: 978-1-4557-0707-2.

Bekmurzayeva, A., Sypabekova, M., Kanayeva, D. (2013) 'Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, 93(4), pp. 381–388. doi: 10.1016/j.tube.2013.03.003.

Bezuidenhout, J. and Schneider, J. W. (2009) 'Pathology and pathogenesis of tuberculosis', *Tuberculosis*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 117–128. doi: 10.1016/B978-1-4160-3988-4.00012-3.

Bijjiga, E. and Martino, A. T. (2013) 'Interleukin 10 ( IL-10 ) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences', *J Clin Cell Immunol S1*: 007. doi:10.4172/2155-9899.S1-007.

Boyman, O. and Sprent, J. (2012) 'The role of interleukin - 2 during homeostasis and activation of the immune system', *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nri3156.

Brandt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E. B., Andersen, P. (2000) 'ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis', *Infection and Immunity*, 68(2), pp. 791–795. doi: 10.1128/IAI.68.2.791-795.2000.

Cook, G. M., Berney, M., Gebhard, S., Heinemann, M., Cox, R. A., Danilchanka, O., Niederweis, M.. (2009) *Physiology of Mycobacteria, Advances in Microbial Physiology*. Elsevier. doi: 10.1016/S0065-2911(09)05502-7.

Cox, M. A., Harrington, L. E., Zajac, A. J. (2012) 'Cytokines and the Inception of



- CD8<sup>+</sup> T Cell Responses', 32(4), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.it.2011.01.004. Cytokines.
- Das, K., Thomas, T., Garnica, O., Dhandayuthapani, S. (2016) 'Recombinant *Bacillus subtilis* spores for the delivery of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-CFP10 secretory antigens', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.tube.2016.09.016.
- Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan (2014) 'Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis', *Katalog Dalam Terbitan : Kementerian Kesehatan Nasional*, pp. 1–210.
- Dong, H., Jing, W., Runpeng, Z., Xuewei, X., Min, M., Ru, C., Yingru, X., Shengfa, N., Rongbo, Z. (2016) 'ESAT6 inhibits autophagy flux and promotes BCG proliferation through MTOR', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 477(2), pp. 195–201. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.042.
- Feau, S., Arens, R., Togher, S., Schoenberger, S. P. (2011) 'Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells', *Immunity*, 34(1), pp. 129–140. doi: 10.1016/j.imm.2010.12.009.
- Grange, J. M., Kapata, N., Chanda, D., Mwaba, P., Zumla, A. (2009) 'The biosocial dynamics of tuberculosis', *Tropical Medicine and International Health*, 14(2), pp. 124–130. doi: 10.1111/j.1365-3156.2008.02205.x.
- Gröschel, M. I., Sayes, F., Simeone, R., Majlessi, L., Brosch, R. (2016) 'ESX secretion systems: Mycobacterial evolution to counter host immunity', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 14(11), pp. 677–691. doi: 10.1038/nrmicro.2016.131.

Guo, S., Xue, R., Li, Y., Wang, S. M., Ren, L., Xu, J. (2012) 'The CFP10/ESAT6 complex of Mycobacterium tuberculosis may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection', *Medical Hypotheses*, 78(3), pp. 389–392. doi: 10.1016/j.mehy.2011.11.022.

Handzel, Z. T. (2013) 'The Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection in Humans', *Department of Immunology*, 15(2), pp. 19–30. doi: 43706.

He, F., Xiong, Y., Liu, J., Tong, F., Yan, D. (2016) 'Construction of Au-IDE/CFP10-ESAT6 aptamer/DNA-AuNPs MSPQC for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 77, pp. 799–804. doi: 10.1016/j.bios.2015.10.054.

Hu, Y., Chen, Y., Liang, H., Wang, Y. (2018) 'An Overview of Coverage of BCG Vaccination and Its Determinants Based on Data from the Coverage Survey in Zhejiang Province'. doi: 10.3390/ijerph15061155.

Husain, A. A., Daginawala, H. F., Singh, L., Kashyap, R. S. (2016) 'Current perspective in tuberculosis vaccine development for high TB endemic regions', *Tuberculosis*. Elsevier Ltd, 98, pp. 149–158. doi: 10.1016/j.tube.2016.03.006.

Zuniga, J., Garcia, D. T., Mendoza, T. S., Reyna, T. S. R., Granados, J., Yunis, E. J. (2012) 'Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis', *Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology*. doi: 10.1155/2012/193923.

Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L. 1., Jameson, J. L., Loscalzo, J. (2015) *Harrison's 19th Edition Principles of Internal Medicine*.

Kumar, M. M. and Raja, A. (2010) 'Cytotoxicity responses to selected ESAT-6 and CFP-10 peptides in tuberculosis', *Cellular Immunology*, Elsevier Inc., 265(2), pp. 146–155. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.08.004.

Li, W., Deng, G., Li, M., Zeng, J., Zhao, L., Liu, X., Wang, Y. (2014) 'A recombinant adenovirus expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of Mycobacterium tuberculosis elicits strong antigen-specific immune responses in mice', *Molecular Immunology*, 62(1), pp. 86–95. doi: 10.1016/j.molimm.2014.06.007.

Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E. M., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., Sterne, J. A. (2013) 'Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials', *Clinical Infectious Diseases*, 58(4), pp. 470–480. doi: 10.1093/cid/cit790.

Morrow, W. J. W., Sheikh, N. A., Schmidt, C. S., Davies, D. H. (2012) *Vaccinology: Principles and Practice*, *Vaccinology: Principles and Practice*. doi: 10.1002/9781118345313.

Nugrahaini, I. T., Kusuma, H. M. S. C., Raras, T. Y. M., Arthamin, M. Z., Astuti, T., Tanoerahardjo, F. (2015) 'Eksresi IFN -  $\gamma$  dan IL - 4 CD4 + T Limfosit pada Tuberkulosis Kontak terhadap Antigen 38 Kda Mycobacterium tuberculosis Antigen of Mycobacterium tuberculosis', 28(4), pp. 302–308.

Rahajoe, N. N., Supriyatno, B., Setyanto, D. B. (2008) *Buku Ajar Respirologi Anak Edisi 1*. Available at: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/drought/docs/Community\\_Based\\_Early\\_Warning\\_System-Save\\_the\\_Children\\_UK.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/drought/docs/Community_Based_Early_Warning_System-Save_the_Children_UK.pdf).

Philips, J. A. and Ernst, J. D. (2012) 'Tuberculosis Pathogenesis and Immunity', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), pp. 353–384. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132458.

Prayitno, A., Astirin, O. P. and Putra, S. T. (2014) 'Immune Response Indicated by Expressing of IL-2 and IL-10 in Cervical Cancer', (April), pp. 420–426.

Crevel, R. V., Ottenhoff, T. H. M., Meer, J. W. M. V. D. (2002) 'Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis', *Clinical Microbiology Reviews*. doi: 10.1128/CMR.15.2.294.

Sa, Q., Woodward, J., Suzuki, Y. (2013) 'IL-2 produced by CD8+ immune T cells can augment their IFN- $\gamma$  production independently from their proliferation in the secondary response to an intracellular pathogen.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(5), pp. 2199–207. doi: 10.4049/jimmunol.1202256.

Serafino, R. L. and Med, T. (2013) 'Tuberculosis 2: Pathophysiology and microbiology of pulmonary tuberculosis', 6(1), pp. 10–12.

Shi, R. and Sugawara, I. (2013) 'Pathophysiology of Tuberculosis', *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*, p. 130. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/54961>.

Tang, X. L., Zhou, Y. X., Wu, S. M., Pan, Q., Xia, B., Zhang, X. L. (2014) 'CFP10 and ESAT6 aptamers as effective Mycobacterial antigen diagnostic reagents', *Journal of Infection*. Elsevier Ltd, 69(6), pp. 569–580. doi: 10.1016/j.jinf.2014.05.015.

Tanoerhardjo, F. S. (2012) 'Pengembangan Protein Sub-Unit Kandidat Vaksin TB'.

Trandem, K., Zhao, J., Fleming, E., Perlman, S. (2011) 'Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(6), pp. 3642–52. doi: 10.4049/jimmunol.1003292.

WHO (2016) 'Global Tuberculosis Report 2016'

Zhang, N. and Bevan, M. J. (2012) 'CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System', *Investigations*, 100(2), pp. 130–134. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.02.012.



Lampiran 1. Uji Plagiarisme



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755  
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

**SURAT KETERANGAN**

Nomor : 531 /UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

- Judul : Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi Esat6 Dan CFP10 *Mycobacterium tuberculosis* Terhadap Produksi IL2 Dan IL10 Sel T CD8 Pada Kultur PBMC
- Penulis : David Christianto
- NIM : 136070100011013
- Jumlah Halaman : 53
- Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Ilmu Biomedik)
- Kemiripan : 4 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

06 NOV 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



D. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes  
NID. 19761125 200501 2 001



Lampiran 2. Bukti Accepted Jurnal



[JKB] Editor Decision

1 message

Fri, Feb 1, 2019 at 3:21 PM

dr. Viera Wardhani, M.Kes <viera\_w@ub.ac.id>  
Reply-to: Viera Wardhani <viera.wardhani@gmail.com>  
To: David Christianto <dvidchristianto@gmail.com>  
Cc: Tri Yudani Mardining Raras <rarastriyudani@gmail.com>, Maimun Zulhaidah Arthamin <mymoonza@gmail.com>, Triwahju Astuti <triwahjuastuti@yahoo.co.id>, Teguh Wahyu Sardjono <teguhws52@yahoo.com>, Noorhamdani A S <dr.noorhamdani@gmail.com>

David Christianto:

Berdasarkan evaluasi revisi manuskrip penulis pada Jurnal Kedokteran Brawijaya dengan judul "EFEK PEMBERIAN PROTEIN REKOMBINAN FUSI ESAT6-CFP10 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TERHADAP PERSENTASE IL2 DAN IL10 YANG DIPRESENTASIKAN SEL T CD8 PADA KULTUR PBMC", ditetapkan naskah DITERIMA untuk dipublikasikan.

Naskah selanjutnya akan melalui tahap publikasi dengan proses editing, copy editing, layouting, proof reading sebelum tahapan publikasi yang masih memerlukan kerjasama penulis terutama dalam proses copy edit dan proof, sehingga penulis tetap perlu memantau perkembangan naskah melalui akun penulis. Biaya publikasi sebesar Rp. 750.000,00 harus dibayarkan sebagai pra syarat pemrosesan artikel pada tahap publikasi, melalui rekening BNI 0039649508, an Rektor UBM.

Publikasi naskah dilakukan sesuai dengan kecepatan penyelesaian masing-masing artikel. Perlu diketahui JKB terbit dua kali setahun, Februari dan Agustus, naskah yang telah siap akan diterbitkan dahulu secara online (online published first) sebagai satu naskah tunggal sebelum diterbitkan bersama dalam satu nomor penerbitan

Terima kasih telah mempublikasikan naskah anda bersama JKB

Viera Wardhani  
<https://scholar.google.co.id/citations?user=TkieHskAAAAJ&hl=id&oi=ao>,  
Faculty of Medicine Universitas Brawijaya  
Phone +62-341-551611 ext 130  
[viera.wardhani@gmail.com](mailto:viera.wardhani@gmail.com)

Editor in Chief  
Jurnal Kedokteran Brawijaya  
JL Veteran Malang 65145



### Lampiran 3. Lembar Informasi Penelitian

#### **INFORMASI**

#### **“ Uji Imunogenitas Protein Sub-unit Kandidat Vaksin TB ”**

Peneliti dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, dan Rumah Sakit ini sedang menguji kandidat vaksin TB pada darah pasien TB dan kontak TB yang dibandingkan dengan orang sehat.

#### **Tujuan :**

Pencegahan penyakit tuberkulosis (TB) saat ini dilakukan dengan pemberian vaksinasi BCG, namun efektivitas vaksin BCG hingga saat ini masih diperdebatkan. Dalam upaya untuk mendapatkan vaksin TB yang lebih efektif, peneliti membuat kandidat vaksin TB. Menilai sifat imunogenitas kandidat vaksin TB tersebut memerlukan uji antibodi maupun produksi sitokin pada pasien TB, kontak TB, dan orang sehat.

#### **Mengapa Bapak / Ibu/Saudara / i terpilih :**

Bapak/Ibu terpilih untuk diikutkan dalam penelitian ini oleh karena Bapak/ Ibu/ Saudara/ i termasuk dalam salah satu kelompok penderita TB, kontak TB atau orang sehat, yang akan diuji keadaan sistem kekebalannya terhadap kandidat vaksin TB yang telah dibuat. Pemeriksaan ini bermanfaat bagi Bapak/ Ibu/ Saudara/ i karena akan dapat mengetahui apakah mempunyai kekebalan terhadap penyakit TB atau tidak berdasarkan hasil pemeriksaan ini.

Penentuan kelompok akan ditentukan berdasarkan pemeriksaan klinis, radiologis berupa foto dada dan laboratorium berupa pemeriksaan dahak dan darah vena.

#### **Tata Cara / Prosedur :**

Bila Bapak/ Ibu/ saudara/ i bersedia, maka petugas laboratorium akan memberitahukan tata cara pengambilan dahak dan darah vena.

#### **1. Pengambilan dahak**

Pengambilan dahak akan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu pada saat pertama kali datang dan keesokan harinya. Bapak/ Ibu/ Saudara/ i akan diberi pot dahak untuk pengambilan dahak ke dua yang dilakukan di rumah pada saat bangun tidur, sedangkan pemeriksaan dahak ke tiga diambil pada saat berkunjung ulang ke rumah sakit esok harinya.

#### **2. Pengambilan darah vena**

Pengambilan darah vena dilakukan dua kali apabila Bapak/ Ibu/ Saudara/ i memenuhi persyaratan mengikuti penelitian ini. Pengambilan darah vena pertama kali dilakukan saat penentuan kelompok subyek yang terlibat dalam penelitian, yaitu sebanyak 6 cc (2 tabung). Darah ini digunakan untuk pemeriksaan laboratorium antara lain, darah lengkap (Hb, leukosit, trombosit), urin lengkap, tes fungsi hati (SGOT & SGPT), tes fungsi ginjal (ureum & kreatinin) dan tes HIV. Darah diambil dari pembuluh darah vena di lengan dengan peralatan pengambilan darah sistem vakum, yang dilakukan oleh petugas kesehatan atau dokter yang sudah terlatih.

Pengambilan darah vena yang ke dua dilakukan apabila Bapak/ Ibu/ Saudara/ i memenuhi persyaratan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini, yaitu, tidak menderita gangguan fungsi hati dan ginjal, serta tidak terinfeksi HIV. Pengambilan darah ini dilakukan pada hari ke 3-5 setelah pengambilan yang

pertama. Darah sebanyak 11 cc, diambil dari pembuluh darah vena di lengan dengan peralatan pengambilan darah sistem vakum, yang dilakukan oleh petugas kesehatan atau dokter yang sudah terlatih. Darah tersebut selanjutnya dipergunakan untuk kultur sel mononuclear darah tepi, pemeriksaan sitokin limfosit, dan imunoglobulin (antibodi).

**Risiko dan ketidaknyamanan :**

Tentu saja pengambilan darah menyebabkan kurang nyaman bagi Bapak/ Ibu/ Saudara/ i, namun prosedur ini tidak membahayakan dan merupakan satu-satunya cara untuk mendapatkan diagnosis yang tepat. Pengambilan darah vena dilakukan 2 kali, oleh petugas laboratorium dan/atau dokter yang telah terlatih flebotomi. Pengambilan darah menimbulkan rasa tidak nyaman dan sedikit rasa sakit, berisiko kecil dengan komplikasi yang tidak membahayakan bagi kesehatan.

**Manfaat :**

Keuntungan yang dapat diperoleh dari penelitian ini ialah ditemukannya diagnosis penyakit TB dan status respons imun/kekebalan terhadap penyakit TB. Jasa dan peran Bapak/Ibu/Saudara/i sangat besar dalam penelitian ini. Penemuan ini juga akan membantu untuk lebih mengerti efektifitas vaksinasi.

**Prosedur alternatif :**

Sampai saat ini belum ada prosedur pengambilan bahan pemeriksaan yang lain.

**Kesukarelaan :**

Keikutsertaan Bapak / Ibu / Saudara/i dalam penelitian ini bersifat sukarela disertai tanggung jawab sampai selesainya penelitian ini. Bapak / Ibu / Saudara/i bebas menolak ikut dalam penelitian ini. Bila Bapak / Ibu / Saudara/i telah memutuskan untuk ikut serta, Bapak / Ibu / Saudara/i juga dapat mengundurkan diri tanpa menyebabkan berubahnya kualitas pelayanan dokter bila dalam keadaan sakit. Namun bila Bapak / Ibu / Saudara/i tidak mengikuti dan memenuhi prosedur yang diberikan oleh peneliti, keikutsertaan dalam penelitian ini akan berakhir.

**Kerahasiaan data :**

Selama Bapak / Ibu / Saudara/i ikut dalam penelitian ini, setiap informasi dan data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan untuk diketahui oleh orang lain. Bahan pemeriksaan berupa spesimen dahak dan darah yang diambil dari Bapak / Ibu / Saudara/i akan dipergunakan untuk penelitian ini akan dijaga penggunaan dan kerahasiaannya.

**Penyulit dan kompensasi :**

Semua biaya pemeriksaan radiologi dan laboratorium yang terkait dengan penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti. Apabila terjadi penyulit atau komplikasi yang berhubungan dengan penelitian ini, maka Bapak / Ibu / Saudara/i akan diberi pertolongan dengan prosedur yang telah baku dan biayanya akan ditanggung oleh penelitian ini.

Lampiran 4. Lembar Persetujuan Kesediaan Dalam Penelitian

**SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN  
UNTUK IKUT SERTA DALAM PENELITIAN  
(INFORMED CONSENT)**

Yang bertanda-tangan di bawah ini:

Nama :  
Usia :  
Alamat :  
Pekerjaan :  
No. KTP/lainnya :

Dengan sesungguhnya menyatakan bahwa:

1. Saya telah mengerti apa yang tercantum dalam lembar persetujuan dan telah dijelaskan oleh peneliti.
2. Dengan ini saya menyatakan bahwa secara sukarela bersedia untuk ikut serta menjadi salah satu subyek penelitian yang berjudul "Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6 CFP10 *Mycobacterium tuberculosis*"

		Malang, 2018
Peneliti,	Saksi,	Yang Membuat Pernyataan,
.....	.....	.....



## Lampiran 5. Profil Data Subyek Penelitian

Profil Data Penelitian (Pasien Tuberculosis)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (m)	TB <sup>2</sup>	BB (kg)	IMT (kg/m <sup>2</sup> )	BCG Scar	Mantoux tes (mm)	Hb (gridl)	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HIV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi
p14	11337291	Tn Zakaria	49 th	Laki-laki	Jawa	Sekarpuo Pakis Malang	Batuk, demam, keringat malam	Petani	2	Mtb Detected Medium	Lung Tb far moderate lession	1,55	2,4025	44	18,31425598	tdk ada	17	14,1	7700	Normal	36	29	20	0,89	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p13	1704180259	Nn Rasyida	20 th	Perempuan	Jawa	Projen Pasuruan	Batuk, demam, keringat malam	Mahasiswa	1	Mtb Detected Low	Lung Tb moderate lession	1,5	2,25	40	17,77777778	ada	12	13,8	6000	Normal	22	38	16,9	0,61	non reaktif	SMU	tidak	tdk ada
p10	1704110546	Tn Hari kriswan	36 th	Laki-laki	Jawa	Merangan kramat Malang	Batuk, sesak, demam	Buruh bangunan	3	Mtb Detected High	Lung Tb far advanced lession	1,57	2,4649	42	17,0392308	ada	16	11,8	6980	Normal	22	14	12,1	0,83	non reaktif	SMP	merokok	tdk ada
p11	1704110661	Tn Rahmat	23 th	Laki-laki	Jawa	Lapas lowokwaru malang	Batuk, demam, keringat malam	Napi Narkoba	1	Mtb Detected low	Lung Tb moderate lession	1,7	2,89	80	27,6816609	ada	17	14,8	10.160	Normal	25	36	14,4	0,87	non reaktif	SMU	merokok	tdk ada
p15	1704180316	Ny Lova	27 th	Perempuan	Jawa	Sawojajar Malang	Batuk, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Ibu Rumah tangga	1	Mtb Detected Low	lung Tb minimal lession	1,55	2,4025	41	17,06556671	ada	18	11,1	4550	Normal	17	17	24,4	0,64	non reaktif	SMU	tidak	tdk ada
p12	1704110224	Tn Gatot S.	49 th	Laki-laki	Jawa	Kedung klintar Surabaya	Batuk, keringat malam	Swasta	2	Mtb Detected Medium	Lung Tb far advanced lession	1,61	2,5921	50	19,28937927	ada	15	14,7	9.870	Normal	13	7	15,6	0,67	non reaktif	SMU	merokok	tdk ada
p9	1704110221	Tn Sawal	46 th	Laki-laki	Madura	Jl Halmahera Pasuruan	Batuk darah, batuk, nyeri dada, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Pedagang	3	Mtb Detected High	Lung Tb far advanced lession	1,55	2,4025	38	15,81685744	tdk ada	16	12,5	7770	Normal	14	18	26	0,91	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p5	1701160115	Tn Aan Sugianto	47 th	Laki-laki	Jawa	Jl lang-lang Singosari	Batuk darah, batuk, demam	Montir Karoseri	3	Mtb Detected High	Lung Tb far advanced lession	1,6	2,56	52	20,3125	ada	15	11,7	10.190	Normal	11	16	17,1	0,69	non reaktif	STM	merokok	tdk ada
p1	1705220400	Tn Joshua	19 th	Laki-laki	Tapanuli	Tapanuli Utara	Sesak nafas, batuk, nyeri dada, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Mahasiswa	2	Mtb Detected Medium	Lung Tb far advanced lession	1,65	2,7225	45	16,52892562	ada	13	14,4	7840	Normal	25	13	55	0,52	non reaktif	SMU	tidak	pneumothorax
10	11319806	Ny Ni Made ayu	28 th	Perempuan	Bali	Jl Pandjaitan Malang	Batuk, penurunan bb, penurunan nafsu makan	Ibu Rumah tangga	1	Mtb Detected Low	Lung Tb moderate lession	1,55	2,4025	40	16,64932362	ada	13	11,2	8.150	Normal	20	13	14,8	0,56	non reaktif	SMU	tidak	tdk ada
p8	1704110222	Tn Irfan Sutanto	20 th	Laki-laki	Jawa	Jl Juanda Belimbing malang	Batuk darah, penurunan nafsu makan, penurunan bb	Buruh Bangunan	2	Mtb Detected Medium	Lung Tb far advanced lession	1,6	2,56	42	16,40625	tdk ada	14	13,2	10600	Normal	20	32	35	0,8	non reaktif	SD	merokok	tdk ada
p7	1704110229	Tn Dzul Qorman	25 th	Laki-laki	Jawa	Kedung Kandang Malang	Batuk Darah, batuk, penurunan nafsu maan, penurunan bb	Karyawan pabrik	2	Mtb Detected Low	Lung Tb moderate lession	1,63	2,6569	47	17,68978885	ada	13	14,5	5.990	Normal	28	19	25	0,35	non reaktif	SMU	merokok	tdk ada
p6	1704110301	Tn Mahmudi	32 th	Laki-laki	Jawa	Dampit Malang	Batuk, demam, keringat malam	Pedagang	3	Mtb Detected Medium	Lung Tb far advanced lession	1,67	2,7889	53	19,00308035	ada	12	12,6	9420	Normal	18	26	30	0,49	non reaktif	SMU	merokok	tdk ada
p4	11322895	Tn Edi Santoso	39 th	Laki-laki	Jawa	Jabung Malang	Batuk, Batuk darah, demam	Karyawan pabrik	3	Mtb Detected High	Lung Tb far advanced lession	1,68	2,8224	52	18,42403628	ada	14	13	7860	Normal	24	34	44	0,74	non reaktif	SMU	merokok	tdk ada
15	11325897	Ny Wahyuni	40 th	Perempuan	Jawa	Dampit Malang	Batuk, demam	Ibu Rumah tangga	1	Mtb Detected low	Lung Tb moderate lession	1,59	2,5281	54	21,35991456	tdk ada	15	14,3	9.100	Normal	16	12	22,6	0,81	non reaktif	SMP	tidak	tdk ada

Profil Data Penelitian (Kontak Tuberculosis)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (m)	TB <sup>2</sup>	BB (kg)	IMT (kg/m <sup>2</sup> )	BCG Scar	toux tes (Hb (gridl))	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HIV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi	
1	1612190283	Dwi Rossa	31 th	Perempuan	Betawi	Taman Nusa Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,5	2,25	41	18,22022222	ada	13	12,8	6600	Normal	15	12	22	0,66	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k10	1705220236	Wayan Wahyu Semara	32 th	Laki-laki	Bali	Sulfat Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	75	25,95155709	ada	14	13	5800	Normal	22	40	32,9	1,03	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k9	1705220271	Aria Purnama	38 th	Laki-laki	Sunda	Sulfat Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	85	29,41176471	ada	11	17	8090	Normal	17	22	17,4	1	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k2	1612270312	Iis Cholifah	29 th	Perempuan	Jawa	Sukun Malang	tdk ada	Perawat RHCU	negatif	negatif	Normal	1,6	2,56	65	25,390625	ada	13	13,2	7870	Normal	16	14	18,2	0,84	non reaktif	Diploma	tidak	tidak ada
k1	1612270176	Ratih Renata	37 th	Perempuan	Sunda	Griya Shanta Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,57	2,4649	63	25,588462	ada	12	12,8	5740	Normal	20	21	26,9	1	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k8	1704110544	Adrienne Marissa Tauran	30 th	Perempuan	Makassar	Jl Letjen Sutuyo Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,57	2,4649	54	21,90758246	ada	17	13,1	7170	Normal	13	14	15,2	0,76	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k4	1701170392	Ryanto	46 th	Laki-laki	Jawa	Blimbing Malang	tdk ada	Ka Ru RHCU	negatif	negatif	Normal	1,7	2,89	65	22,49134948	ada	14	13,8	6780	Normal	16	8	23,3	1,07	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k6	1704110229	Tommy	28 th	Laki-laki	Cina	Klojen Malang	tdk ada	PPDS EM	negatif	negatif	Normal	1,81	3,2761	100	30,5209878	ada	17	16	5940	Normal	33	13	18,5	0,57	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k5		Irfan	37 th	Laki-laki	Jawa	Tanggulangin Sidoarjo	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,71	2,9241	71	24,28097534	ada	12								non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k7		Andreas	eksklusi								Normal	1,74	3,0276	77	25,43286596	ada	12								non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
k11	1705220273	Andy Lumban	31 th	Laki-laki	Batak	Tidar Malang	Tidak ada	PPDS	Negatif	Negatif	Normal	1,69	2,8561	90	31,5115017	ada	13	15	7490	Normal	13	31	17,8	1,05	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
k3	1612270298	Neny	30 th	Perempuan	Jawa	Kademangan Blitar	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,6	2,56	48	18,75	ada	16	12,1	6340	Normal	20	14	20,3	0,65	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada

Profil Data Penelitian (Sehat)

No	RM	Nama	Usia	Sex	Suku	Alamat	Keluhan	Pekerjaan	BTA (+)	TCM	CXR (Luas Lesi)	TB (m)	TB <sup>2</sup>	BB (kg)	IMT (kg/m <sup>2</sup> )	BCG Scar	toux tes (Hb (gridl))	Leukosit	UL	SGPT	SGPT	Ur	Cr	HIV	Pendidikan	Merokok	Komplikasi	
1	1612190292	Khairil Anwar	25 th	Laki-laki	Jawa	Pakis Aji Malang	Tidak ada	Pustakawan UB	Negatif	Negatif	Normal	1,65	2,7225	55	20,2020202	ada	negatif	16,2	7.320	Normal	20	31	21,7	0,91	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
s8	1705220301	Lilita	37 th	Perempuan	Jawa	Lowok waru Malang	Tidak ada	Ibu Rumah Tangga	Negatif	Negatif	Normal	1,56	2,4336	50	20,54569362	ada	negatif	14	5640	Normal	17	14	16,4	1,03	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
s7	1704180195	Dessy	30 th	Perempuan	Jawa	Karang Gayam Wetan Sby	Tidak ada	Fisioterapis	Negatif	Negatif	Normal	1,55	2,4025	50	20,81165453	ada	negatif	13,5	6090	Normal	23	31	19,1	0,75	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
4	1612190289	Marianne Lukita	31 th	Perempuan	Jawa	JL Selat sunda Malang	Tidak ada	PPDS PK	Negatif	Negatif	Normal	1,48	2,1904	47	21,45726808	ada	negatif	13	8240	Normal	12	12	24,2	0,63	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
s5	1704180258	Elwin Risella Mawanto	28 th	Perempuan	Cina	Songgolangit Malang	Tidak ada	PPDS PK	Negatif	Negatif	Normal	1,62	2,6244	52	19,81405274	ada	negatif	16	6290	Normal	31	14	29	0,67	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
s6	1704180254	Irman	32 th	Laki-laki	Sunda	Klojen malang	Tidak ada	Wiraswasta	Negatif	Negatif	Normal	1,65	2,7225	60	22,03856749	ada	negatif	15,8	6640	Normal	21	21	26	0,96	non reaktif	SMU	Tidak	tdk ada
s4	1704180260	Rima Aurelia	30 th	Perempuan	Jawa	Hasanudin Jun Rejo Malang	Tidak ada	Mahasiswa S2	Negatif	Negatif	Normal	1,61	2,5921	75	28,9340689	ada	negatif	15,5	7940	Normal	22	23	45	0,5	non reaktif	Sarjana	Tidak	tdk ada
s9	1612191029	Zuraima	33 th	Perempuan	Madura	Ksatrian Blimbing	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,61	2,5921	63	24,30461788	ada	negatif	14,1	8510	Normal	13	21	21,5	0,69	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
s2	1612270181	Julia Rukmana	28 th	Perempuan	Jawa	Karang Lo Malang	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,59	2,5281	60	23,7332384	ada	negatif	12,7	6010	Normal	14	24	26,9	0,74	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
11	1612190266	Yunaryah	29 th	Perempuan	Jawa	Ponggok Blitar	Tidak ada	Perawat	Negatif	Negatif	Normal	1,48	2,1904	43	19,8311176	ada	negatif	13	7070	Normal	15	12	27,1	0,78	non reaktif	Diploma	Tidak	tdk ada
s3	1612270173	Andri	33 th	Laki-laki	Cina	Suropati Malang	tdk ada	PPDS Paru	negatif	negatif	Normal	1,82	3,3124	80	24,1516725	ada	negatif	16,5	5690	Normal	21	37	16	0,96	non reaktif	Sarjana	tidak	tidak ada
s1		sylvia	eksklusi																									

**Lampiran 6. Analisis Data**

**Persentase IL2 yang dipresentasikan sel T CD8**

**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Tanpa Antigen	Sehat	8	,5575	,21151	,07478	,3807	,7343	,31	,88
	Kontak	8	,6950	,29698	,10500	,4467	,9433	,30	1,06
	Pasien	8	,9463	,28590	,10108	,7072	1,1853	,60	1,51
	Total	24	,7329	,30392	,06204	,6046	,8613	,30	1,51
PPD	Sehat	8	,7388	,33327	,11783	,4601	1,0174	,45	1,38
	Kontak	8	1,0075	,57750	,20418	,5247	1,4903	,33	2,22
	Pasien	8	1,0250	,43925	,15530	,6578	1,3922	,51	1,79
	Total	24	,9238	,46037	,09397	,7294	1,1181	,33	2,22
Fusi	Sehat	8	,5763	,19063	,06740	,4169	,7356	,33	,87
	Kontak	8	1,0225	,50596	,17888	,5995	1,4455	,33	1,85
	Pasien	8	1,2175	,49853	,17626	,8007	1,6343	,60	2,08
	Total	24	,9388	,48968	,09996	,7320	1,1455	,33	2,08





### Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			(I-J)			Lower Bound	Upper Bound
Tanpa_Antigen	Sehat	Kontak	-,13750	,13375	,568	-,4746	,1996
		Pasien	-,38875*	,13375	,022	-,7259	-,0516
	Kontak	Sehat	,13750	,13375	,568	-,1996	,4746
		Pasien	-,25125	,13375	,170	-,5884	,0859
	Pasien	Sehat	,38875*	,13375	,022	,0516	,7259
		Kontak	,25125	,13375	,170	-,0859	,5884
PPD	Sehat	Kontak	-,26875	,23049	,486	-,8497	,3122
		Pasien	-,28625	,23049	,443	-,8672	,2947
	Kontak	Sehat	,26875	,23049	,486	-,3122	,8497
		Pasien	-,01750	,23049	,997	-,5985	,5635
	Pasien	Sehat	,28625	,23049	,443	-,2947	,8672
		Kontak	,01750	,23049	,997	-,5635	,5985
Fusi	Sehat	Kontak	-,44625	,21230	,114	-,9814	,0889
		Pasien	-,64125*	,21230	,017	-1,1764	-,1061
	Kontak	Sehat	,44625	,21230	,114	-,0889	,9814
		Pasien	-,19500	,21230	,635	-,7301	,3401
	Pasien	Sehat	,64125*	,21230	,017	,1061	1,1764
		Kontak	,19500	,21230	,635	-,3401	,7301

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Persentase IL10 yang dipresentasikan selT CD8**

**Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Tanpa_Antigen	Sehat	8	,6138	,22847	,08078	,4227	,8048	,29	,98
	Kontak	8	,7213	,23326	,08247	,5262	,9163	,22	,97
	Pasien	8	,7550	,39746	,14052	,4227	1,0873	,31	1,56
	Total	24	,6967	,29036	,05927	,5741	,8193	,22	1,56
PPD	Sehat	8	,6650	,23785	,08409	,4662	,8638	,34	1,06
	Kontak	8	,8175	,28962	,10240	,5754	1,0596	,43	1,28
	Pasien	8	,9013	,41474	,14663	,5545	1,2480	,55	1,57
	Total	24	,7946	,32416	,06617	,6577	,9315	,34	1,57
Fusi	Sehat	8	,6175	,30649	,10836	,3613	,8737	,31	1,31
	Kontak	8	1,0475	,68957	,24380	,4710	1,6240	,46	2,63
	Pasien	8	,8575	,44490	,15730	,4856	1,2294	,38	1,39
	Total	24	,8408	,51561	,10525	,6231	1,0586	,31	2,63



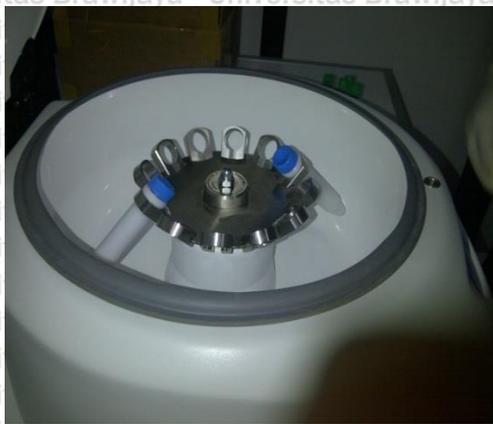


### Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference			95% Confidence Interval	
			(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
Tanpa_Antigen	Sehat	Kontak	-,10750	,14849	,752	-,4818	,2668
		Pasien	-,14125	,14849	,615	-,5155	,2330
	Kontak	Sehat	,10750	,14849	,752	-,2668	,4818
		Pasien	-,03375	,14849	,972	-,4080	,3405
	Pasien	Sehat	,14125	,14849	,615	-,2330	,5155
		Kontak	,03375	,14849	,972	-,3405	,4080
PPD	Sehat	Kontak	-,15250	,16136	,619	-,5592	,2542
		Pasien	-,23625	,16136	,328	-,6430	,1705
	Kontak	Sehat	,15250	,16136	,619	-,2542	,5592
		Pasien	-,08375	,16136	,863	-,4905	,3230
	Pasien	Sehat	,23625	,16136	,328	-,1705	,6430
		Kontak	,08375	,16136	,863	-,3230	,4905
Fusi	Sehat	Kontak	-,43000	,25288	,228	-1,0674	,2074
		Pasien	-,24000	,25288	,616	-,8774	,3974
	Kontak	Sehat	,43000	,25288	,228	-,2074	1,0674
		Pasien	,19000	,25288	,736	-,4474	,8274
	Pasien	Sehat	,24000	,25288	,616	-,3974	,8774
		Kontak	-,19000	,25288	,736	-,8274	,4474

### Lampiran 7. Foto-Foto Penelitian



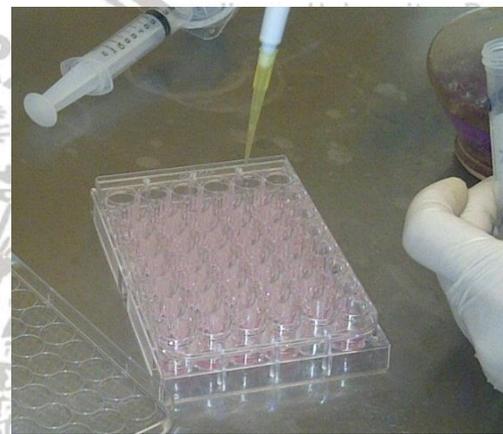
Proses sentrifus



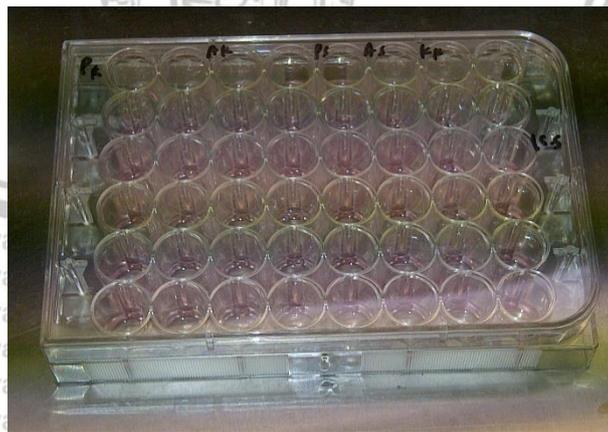
Cincin PBMC



Pelet PBMC (Pada dasar tabung)



Induksi Antigen



Pot sampel kultur PBMC