

INDONESIAN JOURNAL OF
**Clinical Pathology and
Medical Laboratory**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medis

Volume 21 No. 2 Maret 2018	Volume 21 No. 1 Desember 2017	Volume 20 No. 4 Agustus 2017	Volume 20 No. 3 Juni 2017	Volume 20 No. 2 April 2017	Volume 20 No. 1 Februari 2017
----------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------	---------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------

Disubstitusikan oleh Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

Published by Indonesian Association of Clinical Pathologists

Terbitan ini merupakan bagian dari *Journal of Infection and Immunity*

INDONESIAN JOURNAL OF
**CLINICAL PATHOLOGY AND
 MEDICAL LABORATORY**

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

DAFTAR ISI

PENELITIAN

<i>Pneumatic Tube terhadap Darah Rutin dan Laktat Dehidrogenase (Pneumatic Tube on Routine Blood Test and Lactate Dehydrogenase)</i> Liong Boy Kurniawan, Asvin Nurulita, Uleng Bahrn	111-114
Biakan Metode <i>Tetrazolium Microplate Assay</i> Terkait Dahak Pasien Terduga Tuberkulosis Paru (<i>Detection in Tetrazolium Microplate Assay Culture Methods from Pulmonary Tuberculosis Suspected Sputum</i>) Rita Rachmayanti, Ida Parwati, Tiene Rostini, Sylvia Rachmayati	115-119
Adiponektin <i>High Molecular Weight</i> dan Kekakuan Vaskular di Penyakit Diabetes Melitus Tipe-2 Terkait Gabungan <i>Glimepiride Metformin</i> Dosis Tetap (<i>High Molecular Weight Adiponectin and Vasculer Thickness in Diabetes Type 2 related to Fixed Dose Combination of Glimepiride and Metformin</i>) Ari Sutjahjo	120-124
Angka Banding Neutrofil/Limfosit di Karsinoma Payudara (<i>Neutrofil/Lymphocyte Ratio in Carcinoma Mammae</i>) Yuly Eko Prasetyo, Uleng Bahrn, Ruland DN. Pakasi	125-129
Agregasi Trombosit dan <i>Mean Platelet Volume</i> dengan Sindrom Metabolik Terkait Kegemukan (<i>Platelet Aggregation and Mean Volume With Metabolic Syndrome in Obesity</i>) Nindia Sugih Arto, Adi Koesoema Aman, Dharma Lindarto	130-134
Diagnosis Tuberkulosis Paru Menurut Kecepatan Pemeriksaan Dahak (<i>Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis Based on Frequency of Sputum Examination</i>) Larissa, Ida Parwati, A K Sugianli	135-137
Ragaman Genetik Gen Polimerase Virus Hepatitis B pada Pasien Hepatitis B Kronik dengan Pengobatan <i>Telbivudin</i> (<i>Genetic variation of Hepatitis B Virus Polymerase gene from chronic hepatitis B infected patient with telbivudine therapy</i>) Gondo Mastutik, Juniastuti, Ali Rohman, Mochamad Amin, Poernomo Boedi Setiawan	138-144
Protein Adhesin 38-kDa Mikobakterium Tuberkulosis dan Sel Makrofag Paru (<i>The 38 kDa Adhesin Protein of Mycobacterium tuberculosis and Macrophage of the Lung</i>) Maimun Zulhaidah A, Rahmawati, Bethasiwi Purbasari, Sumarno	145-152
Pola Bakteri dan Usia Pasien terhadap Prokalsitonin di Pneumonia Komunitas dan Nosokomial (<i>Bacterial Pattern and Patient's Age on Procalcitonin in Community and Hospital Acquired Pneumonia</i>) Coriejati, Mohammad Iqbal, Emmy Hermyanti Pranggono	153-157
<i>Aspergillus Glaucus Group</i> dan <i>Penicillium sp</i> di Ruang Operasi bedah Saraf (<i>Aspergillus Glaucus Group and Penicillium Sp in Neurosurgery Operating Theater</i>) Nurul Hasanah, Nurhayana Sennang, Benny Rusli	158-161

Nilai Diagnostik IgA AntiVCA Antibodi <i>Epstein-barr</i> di Karsinoma Nasofaring (<i>Diagnostic Value of IgA antiVCA Epstein-Barr Antibody in Nasopharyngeal Carcinoma</i>) Betty Agustina Tambunan, Aryati, Windu Nafika	162–169
Uji Glukosa Darah antara Metode Heksokinase dengan Glukosa Oksidase dan Glukosa Dehidrogenase di Diabetes Melitus (<i>Blood Glucose Test Between Hexokinase With Glucose Oxidase and Glucose Dehydrogenase Methods in Diabetes mellitus</i>) Baharuddin, Asvin Nurulita, Mansyur Arif	170–173
B-thalassemia Trait Menggunakan Elektroforesis Mikrokapiler (<i>β-Thalassemia Trait Using Capillary Electrophoresis</i>) Nuryanti, Ratna Akbari Ganie, Adi Koesoema Aman	174–178
Lipoprotein(a) dan Kebahayaan Sindrom Koroner Akut {(<i>Lipoprotein(a) in Acute Coronary Syndrome</i>)} Ira Puspitawati, Setyawati, Dyah Wulan Anggrahini, Diah Saraswati, Aisyah Ratna Yuniarti	179–182
Kadar D-Dimer Plasma di Strok Iskemik Akut (<i>D-Dimer Plasma Levels in Ischemic Stroke</i>) Yessi Mayke, Adi Koesoema Aman, Y. Anwar	183–186
Adrenomedulin di Karsinoma Payudara dengan Metastasis (<i>Adrenomedullin's in Breast Cancer With Metastatic State</i>) Stefanus Lembar	187–190
Suhu Penyimpanan Kreatinin dan Asam Urat dalam Air Kemih Selama 24 Jam (<i>Storage Temperature For 24 Hours of Uric Acid in Urine</i>) AAN. Subawa, Sianny Herawati, I Nyoman Wandu, I Wayan Putu Sutirta Yasa, Tjokorda Gede Oka	191–195
TELAAH PUSTAKA	
Penyakit Virus Ebola (<i>Ebola Virus Disease</i>) Henny Elfira Yanti, Aryati	195–201
LAPORAN KASUS	
Malaria Kongenital (<i>Congenital Malaria</i>) Sri Wahyunie S, Nurhayana Sennang, D. Daud, Mansyur Arif	202–207
INFORMASI LABORATORIUM MEDIK TERBARU	208–209

Ucapan terima kasih kepada penyunting Vol. 21 No. 2 Maret 2015

Sidarti Soehita, Jusak Nugraha, J.B. Soeparyatmo, Maimun Z. Arthamin,
Kusworini Handono, Rahayuningsih Dharma, July Kumalawati, Tahono, Rismawati Yaswir, Mansyur Arif

PROTEIN ADHESIN 38-KDA MIKOBAKTERIUM TUBERKULOSIS DAN SEL MAKROFAG PARU

(The 38 kDa Adhesin Protein of *Mycobacterium tuberculosis* and Macrophage of the Lung)

Maimun Zulhaidah A¹, Rahmawati¹, Bethasiwi Purbasari², Sumarno³

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) in Indonesia is at the third level in the world. The effectiveness of TB vaccine in lung TB. prevention varies, thus, this has motivated the researcher to explore based material of vaccine with a higher effectivity. One of the alternate vaccines that has developed, is the sub unit one made from adhesin protein. The aim of this study was to know the kind of oral administration of 38 kDa adhesin protein of *M. tuberculosis* in determining so that it can increase the level of macrophage in lungs of BALB/c mice. This study was an experimental work using BALB/c male mice that were immunized with 38 kDa adhesin protein of *Mycobacterium tuberculosis* orally. The samples were chosen at random and divided into six (6) groups that consisted of: "100 µg protein +adjuvant Immunostimulating Complex (ISCOM)" group (n=5), "50 µg + adjuvant ISCOM" group (n=5), "100 µg" group (n=5), "50 µg" group (n=5), "ISCOM" group (n=5) and "negative control" group (n=5). The measurement of the variable in this study was the number of macrophages . The results showed that the increasing number of macrophage had significant differences between each group. ANOVA test showed a significant level at $p < 0.05$. The conclusion of this study was that 38 kDa adhesin protein of *M. tuberculosis* peroral could increase the level of macrophage in the lung of BALB/c mice. The highest level of macrophages was the group induced by 100 µg 38 kDa adhesin protein of *M. tuberculosis* and adjuvant ISCOM. orally

Key words: 38-kDa adhesin protein, *M. tuberculosis*, lung, macrophage

ABSTRAK

Saat ini jumlah kasus tuberkulosis (TB) di Indonesia berada di peringkat ketiga terbanyak di dunia. Ketepatan penggunaan vaksin BCG yang beragam terhadap TB paru mendorong peneliti untuk dapat mengetahui bahan dasar vaksin dengan ketepatan yang lebih tinggi, yaitu mencarinya lewat penelitian. Salah satu pilihan yang dikembangkan adalah vaksin subunit yang menggunakan protein adhesin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat pemberian protein adhesin 38 kDa *M. tuberculosis* lewat mulut dengan menentukannya lewat pengkajian. Karena kajian tersebut dapat meningkatkan jumlah sel makrofag di paru mencit BALB/C. Penelitian ini merupakan penelitian percobaan yang menggunakan mencit galur BALB/c jantan yang divaksin dengan protein adhesin 38 kDa lewat mulut. Sampel dipilih dengan cara acak yang dibagi dalam enam (6) kelompok, yaitu: kelompok "protein 100 µg+ Immunostimulating Complex (ISCOM)" (n=5), 50 µg+ Immunostimulating Complex (ISCOM)" (n=5), 100 µg" (n=5), 50 µg" (n=5), kelompok "ISCOM" (n=5) dan "pembanding negatif" (n=5). Variabel yang diukur pada penelitian ini adalah jumlah sel makrofag. Hasil meneliti ini menunjukkan peningkatan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna antar kelompok. Dalam uji ANOVA, didapatkan nilai kemaknaan $p < 0,05$. Berdasarkan telitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian imunisasi lewat mulut protein adhesin 38 kDa *M. tuberculosis* dapat meningkatkan jumlah sel makrofag di dalam paru mencit BALB/c. Peningkatan jumlah sel makrofag yang paling tinggi didapatkan pada pemberian imunisasi lewat mulut protein adhesin 38 kDa *M. tuberculosis* 100 µg dengan bahan penambah Immunostimulating Complex (ISCOM).

Kata kunci: Protein adhesin 38 kDa, *M. tuberculosis*, paru, makrofag

PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan masyarakat di dunia. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, dan *M. africanum*. *Mycobacterium tuberculosis* yang telah menginfeksi sepertiga penduduk dunia,

menurut *World Health Organization* (WHO) sekitar delapan (8) juta penduduk dunia diserang TB dengan kematian tiga (3) juta orang per tahun.¹ Angka kejadian TB di Indonesia merupakan jumlah kasus TB terbesar ke tiga di dunia setelah India dan Cina. Di Indonesia, diperkirakan terdapat 450.000 kasus baru TB setiap tahun, sedangkan kematian karena

¹ Bagian Patologi Klinik FK Unibraw - RSUD dr. Saiful Anwar Malang. E-mail: maimun70@yahoo.com

² Program Studi Pendidikan Dokter FK Unibraw

³ Laboratorium Mikrobiologi FK Unibraw

TB diperkirakan sebanyak 175.000 per tahun. Di Indonesia, TB merupakan penyebab kematian utama setelah penyakit jantung dan saluran pernapasan.²

Kasus TB dan kematian akibat TB semakin bertambah dan berdampak jumlah penelitian dalam mengembangkan vaksin meningkat, diagnostik dan pengobatan dan teknik menjadi lebih sempurna. Pencegahan terhadap penyakit tuberkulosis telah dilakukan dengan keberadaan vaksin TB, yang dikenal dengan nama *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) yang terbuat dari bakteri *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan.³ Tingkat ketepatan penggunaan vaksin BCG berkisar antara 0–90%.^{4,5} Vaksin BCG memberikan perlindungan yang kuat terhadap anak usia sekolah dari infeksi penyakit TB, akan tetapi vaksin BCG di beberapa negara endemis kurang menghasilkan kekebalan pada usia dewasa. Sebagai contoh, adalah kemunculan infeksi sekunder akibat resistensi bakteri TB dan kejadian reaktivasi TB.⁶

Penelitian vaksin TB yang tepat guna banyak mengalami kegagalan sampai beberapa tahun. Sepuluh tahun terakhir ini, beberapa kandidat vaksin baru telah dikembangkan, di antaranya *DNA-subunit vaccines*, *modified BCG* dan *attenuated Mycobacterium tuberculosis*.⁶ Di samping itu, pembuatan vaksin baru dari protein *M. tuberculosis* juga sedang dikembangkan.⁷

Penggunaan bahan penambah sangat penting untuk menguatkan manfaat vaksin dalam mengimbas respons imun. Salah satu *Immunostimulating Complexes* (ISCOMs) adalah yang mengandung kolesterol, lipid, imunogen (protein) dan saponin. Bahan penambah ISCOMs dapat mengimbas respons antibodi dan yang terkait sel *T helper* terutama sel *T cytotoxic* pada berbagai macam penelitian percobaan menggunakan hewan coba.⁸

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap TB berupa respons *Cell Mediated Immunity* (CMI) yang merupakan hal penting dalam melindungi awal infeksi *M. Tuberculosis*. Setelah tahap permulaan infeksi *M.tb*, aktivasi makrofag oleh limfosit T memungkinkannya untuk menghancurkan basil *M.tb* di dalam tuberkel melalui pengeluaran bahan aktif seperti: oksigen reaktif dan nitrogen *intermediate*. Aktivasi makrofag merupakan langkah pemusatan yang utama dalam menerima imunitas terhadap *M.tb*, sehingga dapat dikatakan bahwa perkembangan infeksi dari *M.tb* berhubungan dengan kemampuan makrofag sekitar jejas mengendalikan proliferasi dan penyebaran kuman TB.⁹

Penelitian ini merupakan kelanjutan kajian sebelumnya oleh Tandy¹⁰, bahwa protein *adhesin* 38-kDa yang diberikan lewat mulut kepada mencit BALB/c dapat mengimbas sIgA (*secretory-Immunoglobulin A*) khas untuk mukosa usus dan bronkiolus.¹⁰ Imunisasi

lewat mulut dapat menghasilkan respons imun yang bersifat perlindungan paru.¹¹

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bahwa pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* lewat mulut dapat meningkatkan jumlah sel makrofag di paru mencit BALB/c lewat pembuktian.

Adapun manfaat penelitian ini antara lain: protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* diharapkan dapat menjadi bahan dasar vaksin TB, protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* diharapkan dapat menjadi bahan untuk diagnostik laboratoris TB. Penelitian yang baru tentang kandidat vaksin TB diharapkan mampu membantu memecahkan masalah dengan pencegahan infeksi TB, serta dapat mengurangi angka kematian TB.

METODE

Penelitian ini merupakan kajian percobaan di hewan coba mencit. Pada penelitian ini digunakan mencit jantan jenis BALB/c sebanyak 30 ekor dengan umur antara 6–8 minggu. Jumlah sampel untuk setiap perlakuan adalah lima (5) ekor mencit. Pada penelitian ini, mencit jantan BALB/c dibagi menjadi enam (6) kelompok yaitu: Kelompok pertama (1) adalah mencit yang diimunisasi dengan protein *adhesin* 38kDa *M. tuberculosis* 100 µg dan ISCOMs 12 µg. Kelompok kedua (2) yaitu mencit yang diimunisasi dengan protein *adhesin* 38kDa *M. tuberculosis* 100 µg. Kelompok ketiga (3) yaitu mencit yang diimunisasi dengan protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* 50 µg dan ISCOMs 12 µg. Kelompok keempat (4) yaitu mencit yang diimunisasi dengan protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* 50 µg. Kelompok kelima (5) yaitu mencit yang diimunisasi dengan ISCOMs 12 µg. Kelompok keenam (6) yaitu mencit yang tidak diimunisasi sebagai pembanding.

Persiapan hewan coba; Pemilihan hewan coba dilakukan berdasarkan ketentuan sampel, yaitu mencit jantan BALB/c, berusia antara 6–8 minggu, berat badan antara 100–150 gram dan pada pemeriksaan binatang tersebut sehat fisik, yang ditandai dengan: mata jernih, bulu mengkilap, gerakan aktif dan lincah dan tinja tidak lembek.

Penyesuaian iklim lingkungan hewan coba; Mencit dipelihara dan diadaptasikan dalam laboratorium selama enam (6) hari pada suhu ruangan yang menetap (20–25°C). Tempat pemeliharaan digunakan kotak plastik berukuran 42 × 30 × 15 cm, masing-masing berisi empat (4) ekor mencit, ditutup dengan kawat kasa dan diberi alas sekam. Pengacakan menjadi enam (6) kelompok perlakuan; Pada penelitian ini, mencit jantan BALB/c dibagi menjadi enam (6) kelompok

dengan perlakuan seperti yang telah dikemukakan di atas. Pemberian protein *adhesin* 38kDa *M. tuberculosis* dan ISCOMs; Pada kelompok pertama (I) dan ketiga (III), diberikan protein *adhesin* 38-kDa dengan dua macam dosis (50 μg dan 100 μg) dicampur dengan ISCOMs 12 μg dan PBS dalam tabung *Eppendorf* dengan volume 150 mL, kemudian dicampur selama beberapa menit dan diberikan lewat mulut (dengan sonde). Di kelompok kedua (II), keempat (IV) dan kelima (V); protein *adhesin* 38-kDa dengan berbagai dosis (50 μg dan 100 μg) saja atau ISCOMs 12 μg saja dicampur dengan PBS dalam tabung *Eppendorf* dengan volume 150 mL, kemudian dicampur selama beberapa menit dan diberikan lewat mulut (menggunakan sonde). Setelah empat (4) minggu dilakukan *booster* (vaksin ulangan) yang pertama, kemudian setelah empat (4) minggu berikutnya diberikan *booster* yang kedua kalinya. *Booster* dilakukan seperti perlakuan pertama.

Pembedahan, pengambilan organ paru mencit; Waktu pembedahan (waktu antara *booster* ketiga dengan pembedahan) pada penelitian ini adalah tiga (3) hari, dengan tujuan mendapatkan respons imun terkait sel berupa sel makrofag mencapai kadar terbanyak. Pembuatan preparat histologis paru dengan cara blok parafin. Pengecatan preparat paru mencit dengan *haematoxylin-eosin* (HE). Pemeriksaan preparat histologis paru dilakukan menggunakan mikroskop binokuler. Sel makrofag dihitung dengan pembesaran 1000 \times di lima lapang pandang dengan tiga kali pengulangan dan *double blind*.

One-way ANOVA digunakan untuk uji respons imun sel makrofag terhadap protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. *Post Hoc Test* (Tukey Test) digunakan untuk melihat perbedaan jumlah sel makrofag di setiap kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini dibedakan atas enam (6) perlakuan yang dilakukan selama ± 10 minggu, kemudian dilakukan pembedahan untuk mengambil organ paru dan selanjutnya dihitung jumlah makrofag di paru mencit tersebut. Hasil meneliti tercantumkan di Tabel 1.

Penelitian ini menggunakan variabel bilangan dengan satu faktor yang diamati yaitu perbedaan jumlah makrofag di paru mencit BALB/c pada setiap perlakuan pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. Tuberculosis* lewat mulut. Di samping itu, juga terdapat dua ragam dosis protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* yaitu 50 μg dan 100 μg .

Lebih lanjut untuk mengetahui keberadaan perbedaan pengaruh ragam dosis pemberian protein

Tabel 1. Rerata jumlah makrofag di setiap kelompok perlakuan

Perlakuan	Jumlah makrofag di paru mencit BALB/c per 10 lapang pandang [rerata (SB)]
Protein <i>adhesin</i> 38 kDa <i>M.tuberculosis</i> 100 μg dan ISCOMs 12 μg (P1)	12,18 (0,979)
Protein <i>adhesin</i> 38 kDa <i>M.tuberculosis</i> 100 μg (P2)	7,67 (0,702)
Protein <i>adhesin</i> 38 kDa <i>M.tuberculosis</i> 50 μg dan ISCOMs 12 μg (P3)	5,56 (0,634)
Protein <i>adhesin</i> 38 kDa <i>M.tuberculosis</i> 50 μg (P4)	3,11 (0,205)
ISCOMs 12 μg (P5)	3,05 (0,438)
Pembandingan (P6)	1,49 (0,276)

adhesin 38-kDa *M. tuberculosis* lewat mulut terhadap jumlah makrofag di paru mencit BALB/c dilakukan uji analisis oneway ANOVA (*Analysis of Variance*). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa di setiap perlakuan yang diberikan menunjukkan nilai kemaknaan sebesar 0,000 ($p < 0,05$) dan dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* lewat mulut yang sangat bermakna antara setiap perlakuan terhadap jumlah sel makrofag di paru mencit BALB/c. Lebih lanjut untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dilakukan analisis dengan metode *post hoc test* menggunakan uji perbandingan berganda (*Tukey's Test*).

Langkah selanjutnya adalah mengolah data yang ada dengan menggunakan metode *post hoc test* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*) dengan uji *Tukey* (*Tukey's Test*). Sehingga untuk mengetahui keberadaan perbedaan pengaruh pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* lewat mulut terhadap jumlah sel makrofag di paru mencit BALB/c antara setiap perlakuan, sehingga dapat dilihat hasil uji *Tukey* di Tabel 2 sebagai berikut.

Dari hasil uji perbandingan berganda menggunakan uji *Tukey* di Tabel 2 dapat dijelaskan bahwa jumlah sel makrofag di kelompok 1 (P1) berbeda secara bermakna dengan P2, P3, P4, P5 dan P6 bertingkat $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Di kelompok kedua (2) (P2) didapatkan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna dengan P1, P3 P4, P5 dan P6 bertingkat $p = 0,000$. Di kelompok ketiga (3) (P3) didapatkan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna dengan P1, P2, P4, P5 dan P6 bertingkat $p = 0,000$. Di kelompok keempat (4) (P4) dan kelompok kelima (5) (P5) yang diimunisasi dengan ISCOMs 12 μg

Tabel 2. Hasil uji statistik Tukey's Test

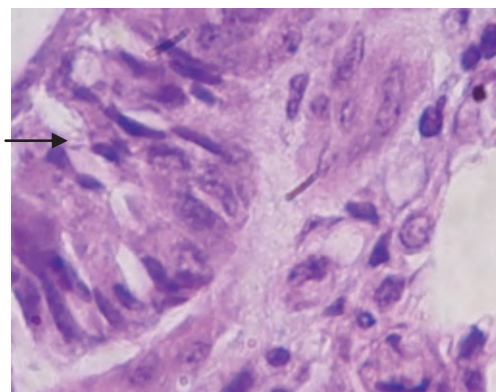
		Multiple Comparisons			
<i>Dependent Variable: makrof ag</i>					
	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
<i>LSD</i>	adhesin 100 + iscom	adhesin 100	4.50000*	.37994	.000
		adhesin 50 + iscom	6.61400*	.37994	.000
		adhesin 50	9.06800*	.37994	.000
		iscom	9.12200*	.37994	.000
		pembanding	10.68400*	.37994	.000
	adhesin 100	adhesin 100 + iscom	-4.50000*	.37994	.000
		adhesin 50 + iscom	2.11400*	.37994	.000
		adhesin 50	4.56800*	.37994	.000
		iscom	4.62200*	.37994	.000
		pembanding	6.18400*	.37994	.000
	adhesin 50 + iscom	adhesin 100 + iscom	-6.61400*	.37994	.000
		adhesin 100	-2.11400*	.37994	.000
		adhesin 50	2.45400*	.37994	.000
		iscom	2.50800*	.37994	.000
		pembanding	4.07000*	.37994	.000
	adhesin 50	adhesin 100 + iscom	-9.06800*	.37994	.000
		adhesin 100	-4.56800*	.37994	.000
		adhesin 50 + iscom	-2.45400*	.37994	.000
		iscom	.05400	.37994	.888
		pembanding	1.61600*	.37994	.000
iscom	adhesin 100 + iscom	-9.12200*	.37994	.000	
	adhesin 100	-4.62200*	.37994	.000	
	adhesin 50 + iscom	-2.50800*	.37994	.000	
	adhesin 50	-.05400	.37994	.888	
	pembanding	1.56200*	.37994	.000	
pembanding	adhesin 100 + iscom	-10.68400*	.37994	.000	
	adhesin 100	-6.18400*	.37994	.000	
	adhesin 50 + iscom	-4.07000*	.37994	.000	
	adhesin 50	-1.61600*	.37994	.000	
	iscom	-1.56200*	.37994	.000	

* The mean difference is significant at the .05 level.

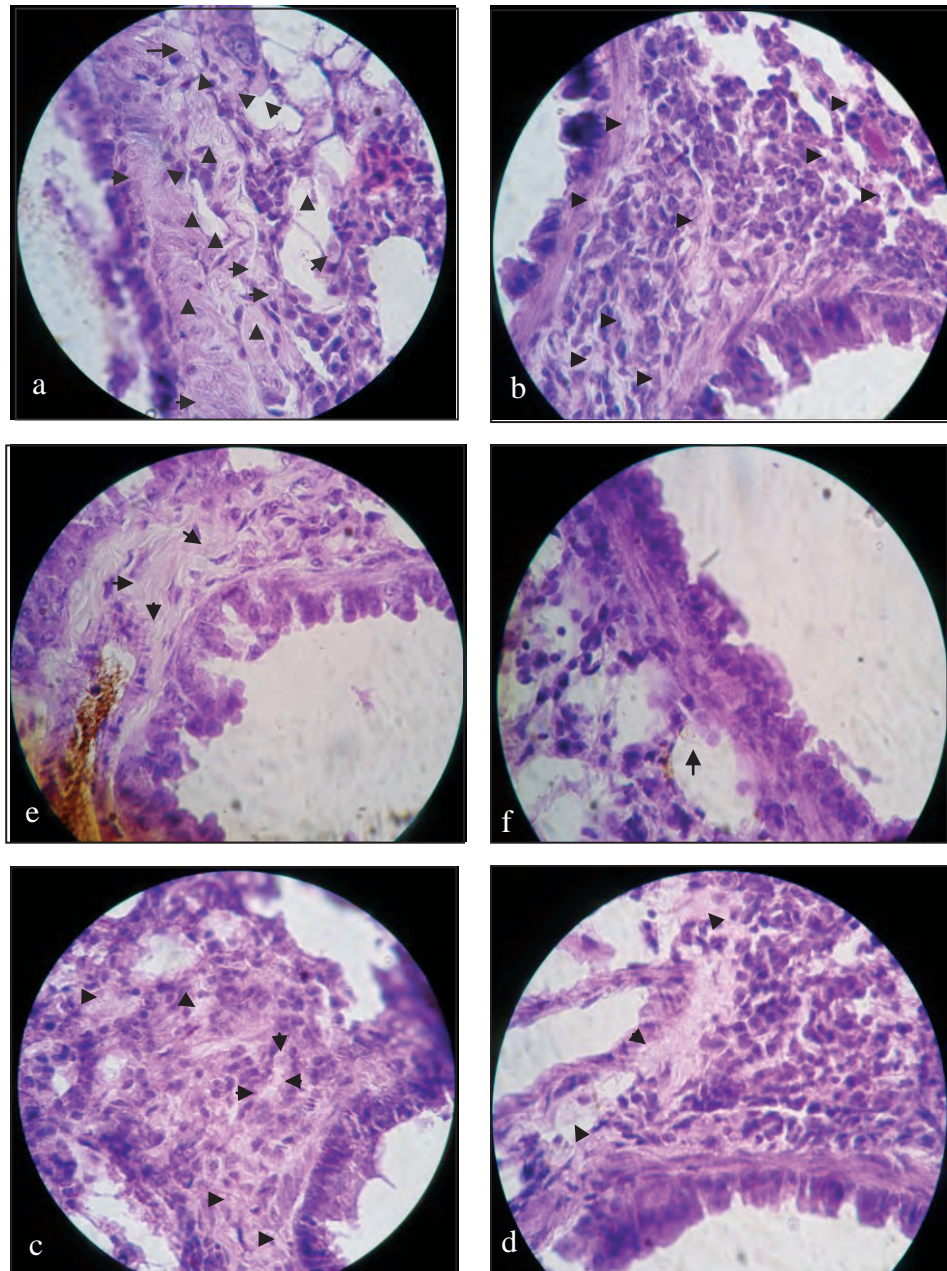
didapatkan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna dengan P1, P2, P3 dan P6 bertingkat $p=0,000$. Akan tetapi jumlah sel makrofag antara P4 dan P5 tidak berbeda secara bermakna dengan nilai $p=0,888$ ($p>0,05$). Di kelompok keenam (6) (P6) didapatkan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna dengan P1, P2, P3, P4 dan P5 bertingkat $p=0,000$

Pada penelitian ini, dilakukan pengecatan preparat menggunakan *haematoxylin eosin*, sehingga sel makrofag tampak vesikuler, pucat berinti sel besar serta memiliki granul di sitoplasma. Seperti tampak di Gambar 1.

Adapun gambar preparat paru mencit di setiap perlakuan tampak di Gambar 2.



Gambar 1. Sel makrofag pada pewarnaan HE. Sel makrofag tampak vesikuler, pucat dengan inti sel yang besar serta bergranul sitoplasmanya. Tanda panah menunjukkan bentukan sel makrofag (perbesaran 1000 \times).



Gambar 2. Gambar paru dengan pewarnaan Haematoxylin Eosin. (a) kelompok pertama (I). (b) kelompok kedua (II). (c) kelompok ketiga (III). (d) kelompok keempat (IV). (e) kelompok kelima (V) dan (f) kelompok keenam (VI). Tanda panah menunjukkan bentukan sel makrofag yang vesikuler, pucat dengan inti sel yang besar serta memiliki granula sitoplasma (perbesaran 1000 \times).

Pada penelitian ini, protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* diberikan lewat mulut karena bermanfaat yang jelas, baik dari segi fisik maupun imunologis. Secara fisik vaksinasi lewat mulut mempunyai kelebihan dibandingkan dengan yang BCG secara intrakutan. Imunisasi lewat mulut pemberiannya mudah karena tidak menyakitkan, sehingga bisa dilakukan oleh orang yang terlatih tanpa memerlukan bantuan tenaga kedokteran, serta dapat mengurangi bahaya penularan infeksi melalui darah.¹² Pemberian vaksin subkutan atau intradermal memiliki

kebahayaan penularan infeksi sistemik terjadi, yang memerlukan keterampilan yang baku untuk melakukannya dan kemungkinan timbul respons tubuh yang negatif terhadap suntikan.¹¹

Ditinjau dari segi imunologik, pertahanan terbaik terhadap patogen mukosal adalah vaksin yang mampu mengimbas baik imunitas sistemik maupun yang terkait mukosal. Pemberian vaksin secara langsung di berbagai tempat mukosa merupakan perangsangan yang baik terhadap sistem imun mukosal. Perangsangan ini penting untuk perlindungan yang

tepat guna pada permukaan terkait mukosal terhadap pengelompokan dan penyerbuan bahan bersifat infeksius.¹⁰ Mukosa merupakan tempat masuk *M. tuberculosis* dan yang terkait paru dilindungi oleh sistem limfoid khusus, yaitu the *Bronchus-Associated Lymphoid Tissue* (BALT). Imunisasi melalui satu jenis permukaan mukosa akan mengimbas sistem imun di permukaan yang lain. Jaringan limfoid di BALT mirip dengan GALT dan ditemukan di percabangan saluran napas.¹³

Santosuosso¹⁴ meneliti vaksinasi mukosa dalam hidung menggunakan antigen imunogenik *M. tuberculosis* Ag85A (AdAg85A). Berdasarkan penelitian ini, didapatkan bahwa vaksin tersebut dapat mengimbas sel T CD4+ dan sel T CD8+, hasil IFN γ dan aktivasi CTL di mukosa saluran napas, sedangkan vaksinasi sistemik tidak memiliki kemampuan untuk mengimbas sel tersebut di tempat tersebut.¹⁴ Bender¹⁵ meneliti vaksinasi mukosal dalam lambung di tikus menggunakan protein haemagglutinin dan gen nukleoprotein H1N1 influenza di tikus. Dari penelitian tersebut, didapatkan bahwa vaksin tersebut dapat mengimbas peningkatan respons imun terkait sel mukosal di paru dan sistemik di limpa.¹⁵

Vaksin mukosal dalam hidung juga memiliki kekurangan, sehingga pada penelitian ini vaksinasi diberikan lewat mulut. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Chen¹⁶ vaksinasi mukosal BCG dalam hidung hanya memberikan perlindungan lokal di paru, tetapi tidak bersifat sistemik di limpa. Di samping itu, juga diperlukan dosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan vaksinasi subkutan untuk mengimbas respons imun yang terbaik di paru.¹⁶

Protein yang terdapat di dinding *M. tuberculosis* dan di komponen yang lain dapat mengimbas respons imun. Protein tersebut diidentifikasi dan berat molekul yang diukur dalam satuan kDa.¹⁷ Dalam penelitian oleh Shin¹⁸ ditemukan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* HBHA (heparin-binding hemagglutinin) berikatan kuat dengan IgM (immunoglobulin M) di pasien TB.¹⁸ Dalam penelitian yang dilakukan oleh Rao¹⁹ vaksinasi menggunakan penggabungan ulang BCG galur yang menunjukkan, bahwa antigen 19-kDa dapat mengimbas sekresi sitokin IFN- γ dengan kadar yang tinggi dan IL-10 yang berkadar rendah.¹⁹

Protein *adhesin M. tuberculosis* belum banyak diteliti. Namun, berpeluang kuat imunogenik dalam membentuk antibodi yang khas dan dapat menghambat adesi dan kolonisasi. Penelitian ini mengarah kepada vaksin untuk mukosal. Antigen 38-kDa merupakan *non-secretory lipoprotein*. Protein ini bersifat khas, terdapat di *M. tuberculosis* dan tidak terdapat di *M. bovis*. Protein ini dapat mengimbas respons antibodi dan sel T yang kuat untuk mencegah infeksi *M. tuberculosis* di mencit.³ Penelitian yang dilakukan oleh

Tandya¹⁰ bahwa protein 38-kDa memiliki kemampuan penggumpalan darah, sehingga dapat disimpulkan bahwa protein ini merupakan *adhesin*. Protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* yang didapatkan dari hasil isolasi membran sel *M. tuberculosis*. Di samping itu, Tandya¹⁰ juga telah membuktikan bahwa protein *adhesin* 38-kDa yang diberikan lewat mulut di mencit BALB/c dapat mengimbas sekresi sIgA spesifik di mukosa usus dan bronkiolus.¹⁰

Respons imun terhadap mikobakteri lebih banyak diperankan oleh imunitas terkait sel daripada hasil antibodi. Keberadaan antigen dari mikobakteri akan merangsang sel makrofag untuk menghasilkan interleukin 2 (IL-2) yang berperan dalam pembentukan sel Th1. Interleukin 12 akan bekerja sama dengan interleukin 1 (IL-1) dan TNF- α untuk merangsang sel T dan *Natural Killer cell* (sel NK) supaya menghasilkan IFN- γ . Interferon γ yang dihasilkan selain berperan dalam pembentukan Th1 juga akan memberikan umpan balik positif terhadap hasil IL-12 oleh sel makrofag. Kandidat vaksin tuberkulosis yang ideal dan tepat guna adalah vaksin yang dapat mengimbas respons perlindungan yang kuat.²⁰ Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respons imun terkait sel yang terjadi terhadap pemberian protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* lewat mulut yang meliputi peningkatan sel makrofag di paru mencit BALB/c. Hasil penelitian ini diuji secara kuantitatif. Uji kuantitatif dilakukan dengan melihat perbedaan jumlah sel makrofag di paru mencit. Perubahan jumlah sel makrofag di paru mencit berbeda pada setiap kelompok perlakuan. Untuk menentukan sel makrofag maka dilakukan pewarnaan *haematoxylin eosin*. Sel makrofag digambarkan sebagai sel dengan ciri vesikuler, pada pengecatan HE tercatat pucat, inti sel yang besar serta sitoplasma bergranul.

Di kelompok pertama (1) (imunisasi lewat mulut dengan protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* 100 μg dan ISCOMs 12 μg) didapatkan peningkatan jumlah sel makrofag yang bermakna dibandingkan dengan kelompok pembanding bertingkat kemaknaan $p=0,00$ ($p<0,05$) yang pada pewarnaan *haematoxylin-eosin* sitoplasma tampak berwarna pucat dan vesikuler dan bergranul. Hal tersebut menunjukkan bahwa protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* dapat mengimbas respons imun terkait sel berupa peningkatan jumlah sel makrofag.

Penggunaan protein *adhesin* 38-kDa dengan dosis 100 μg berdasarkan penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Tandya.¹⁰ Dari hasil menelusur penelitian Tandya¹⁰, didapatkan hasil bahwa kepekatan protein *adhesin* 38-kDa yang terbaik adalah 100 μg yang di kepekatan ini mencit masih tetap dalam keadaan hidup. Kepekatan di atas 100 μg menyebabkan jejas di usus mencit dan kematiannya.

Protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* dianggap benda asing oleh tubuh yaitu antigen. Respons imun yang bersifat melindungi di sistem mukosal terdapat di bagian mikro limfoid, yang terdiri dari *peyer's patches*, *mesenteric lymph nodes*, sel limfoid di lamina propria dan epitel terkait saluran cerna.¹⁷ Pertahanan terkait mukosal terdiri dari barrier alamiah seperti mukus, epitel dan respons imun alamiah dan yang adaptif terutama sel T CD4+, T CD8+ atau *cytotoxic T-lymphocyte* (CTL) dan s-IgA.²¹ Antigen yang masuk ke dalam tubuh melalui mukosa akan ditangkap oleh sel M yang berada di *Follicle Associated Epithelium* (FAE) yang merupakan bagian dari *Peyer's patches* usus, kemudian antigen tersebut akan diproses oleh sel makrofag di *Sub-Epithelial Dome* (SED); yang merupakan tempat APC; untuk diberikan kepada sel T di zona parafolikular di folikel limfoid.²² Apabila APC tertentu seperti sel makrofag menyajikan epitop antigen yang sudah diproses pada permukaannya, maka epitop tersebut akan dikaitkan ke antigen MHC kelas II, mengaktifkan sel T CD4+.¹³ Sel T tersebut akan berdiferensiasi menjadi sel T efektor (sel T CD4+) yaitu Th1 dan Th2.¹⁷

Pada penelitian ini juga digunakan bahan penambah untuk vaksin. Bahan penambah yang digunakan adalah *Immuno-Stimulatory Complexes* (ISCOM). *Immunostimulatory complexes* merupakan salah satu jenis terkait yang terbuat dari: saponin, kolesterol, fosfolipid dan imunogen (protein). Hal yang terpenting dari bahan penambah yaitu kemampuannya mengaktifkan APC.⁸ Bahan penambah digabungkan dengan vaksin antigen untuk mengimbas respons imun yang kuat.²³

Immunostimulatory complexes dapat membangkitkan respons imun terkait sel melalui dua jalur pembuatan dan pemberian antigen, yaitu jalur dari luar dan dari dalam. Untuk pemberian sel T CD4+, antigen ditangkap melalui endosom dari APC melalui jalur dari luar, kemudian didegradasi menjadi peptida yang kelak diikat oleh MHC kelas II untuk diberikan ke permukaan APC.²⁴ Antigen Presenting Cell melalui jalur MHC II akan menyajikan peptida kepada sel T CD4+, kemudian mengaktifkannya.¹⁰ Salah satu fungsi penting bahan penambah adalah meningkatkan kemampuan antigen untuk berinteraksi dengan APC. Kemampuan tersebut terdiri dari pengambilan dan pemberian antigen, menunjukkan molekul kostimulator dan membuat sitokin. *Immunostimulatory complexes* (ISCOM) terbukti dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas II pada permukaan APC, sehingga terjadi peningkatan pada pemberian antigen.⁸ Antigen yang telah diberikan tersebut akan disajikan kepada sel T CD4+, sehingga sel T CD4+ dapat teraktivasi yang kemudian akan mengaktifkan sel efektor respon imun terkait sel, antara lain sel makrofag. Maka berdasarkan

mekanisme tersebut, ISCOM dapat meningkatkan aktivasi sel makrofag.⁸

Pada kelompok kedua (2) (imunisasi lewat mulut dengan protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* 100 μg) didapatkan perbedaan jumlah sel makrofag yang bermakna dibandingkan dengan kelompok pembanding ($p=0,00$ yaitu $p < 0,05$) dan kelompok pertama (1) ($p=0,000$ yaitu $p < 0,05$). Jumlah sel makrofag berkurang 37% dari kelompok pertama (1). Hal ini diduga terjadi karena pengaruh bahan penambah ISCOM yang diberikan bersama-sama dengan 100 μg protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* di kelompok perlakuan pertama (1). Bahan penambah ISCOM yang diberikan dapat meningkatkan respons imun yang terjadi terhadap protein *adhesin*.⁸

Di Kelompok ketiga (3) (imunisasi lewat mulut dengan protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* 50 μg dan ISCOMs 12 μg) didapatkan perbedaan jumlah sel makrofag yang bermakna dibandingkan dengan kelompok pembanding ($p=0,000$ yaitu $p < 0,05$). Dosis pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* di kelompok ketiga (3) setengah dari yang diberikan kepada kelompok pertama (1). Jika di kelompok pertama (1) peningkatan sel makrofag di paru mencit adalah tujuh kali lipat dari kelompok pembanding, maka di kelompok ketiga (3) peningkatan sel makrofag yaitu hampir tiga kali lipat (275%) dari kelompok pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* dosis 100 μg dapat mengimbas peningkatan jumlah sel makrofag yang lebih tinggi dibandingkan dengan protein *adhesin* 38 kDa *M. tuberculosis* dosis 50 μg .

Di kelompok keempat (4) (P4) yang diimunisasi dengan protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* 50 μg dan kelompok kelima (5) (P5) yang diimunisasi dengan ISCOMs 12 μg didapatkan jumlah sel makrofag yang berbeda secara bermakna dengan pembanding dengan tingkat kemaknaan $p=0,000$. Akan tetapi, di kelompok P4 dan P5, peningkatan jumlah sel makrofag terhadap pembanding di antara kedua kelompok ini tidak terlalu berbeda yaitu sebesar 108% di P4 dan 104% di P5. Hal ini dibuktikan melalui uji kemaknaan yang terbukti jumlah sel makrofag antara P4 dan P5 tidak berbeda secara bermakna dengan nilai $p=0,888$ ($p > 0,05$). Di kelompok perlakuan kelima (5), juga terdapat peningkatan jumlah sel makrofag walaupun tidak diberikan protein *adhesin*. Hal ini disebabkan karena ISCOM itu sendiri berinteraksi dengan APC dan dapat diberikan olehnya, sehingga dapat menimbulkan respons imun.⁸

Di kelompok keenam (6) (pembanding, tidak diimunisasi) didapatkan sel makrofag dalam jumlah sangat sedikit, dengan rerata 1,49 per lapang pandang. Pada saat tarikan napas, udara yang masuk tidak hanya mengandung oksigen, tetapi juga

mengandung beberapa partikel asing, gas beracun dan mikroorganisme. Untuk fungsi pertukaran gas di paru, maka benda asing tersebut harus dihilangkan atau dibuang dengan sistem pertahanan tubuh tertentu mulai dari hidung sampai alveoli agar tidak timbul inflamasi tertentu. Di saluran napas bawah termasuk alveoli, pertahanan tubuh berupa membran permukaan di mukosa, sel dendritik yang dapat menangkap organisme atau partikel yang masuk ke dalam paru dan membawanya ke limfaden di sekitar saluran napas atau di hilus. Di bronkiolus, partikel atau organisme yang masuk ditangkap oleh sel makrofag. Sel makrofag di kelompok peribronkiolus merupakan hal tertentu yang normal yang terjadi di hewan dan manusia yang sehat.

SIMPULAN

Pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* lewat mulut terbukti dapat meningkatkan jumlah sel makrofag di paru mencit BALB/c. Pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* dosis 100 µg lewat mulut terbukti meningkatkan jumlah sel makrofag lebih banyak dibandingkan dengan pemberian protein *adhesin* 38-kDa *M. tuberculosis* sebanyak 50 µg.

DAFTAR PUSTAKA

- Sarhan MAA. Progress in Tuberculosis Vaccines Development. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2007; 2 (2): 35–41.
- Clark S, Cross ML, Nadian A, Vipond J, Court P, Williams A, Hewinson RG, Aldwell FE, Chambers MA. Oral Vaccination of Guinea Pigs with a Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Vaccine in a Lipid Matrix Protects against Aerosol Infection with Virulent *M. bovis*. *Infection and Immunity*, 2008; 76 (8): 3771–3776
- Martin C. The Dream of a Vaccine Against Tuberculosis; New Vaccine Improving or Replacing BCG?. *European Respiratory Journal*, 2005; 26 (1): 162–166.
- Gafdonga. *Immunology of Tuberculosis*. Annual Review of Immunology, 2004; 19 : 93–129.
- Salyers A and D. Witt. Virulence factor that damage the host. *Bacterial Pathogenesis: a molecular approach*. Washington DC, ASM Press, 1994; 133–141
- Martín C, Bigi F and Gicquel B. New Vaccines against Tuberculosis, Palomino JC *et al.* (Eds). Bernd Sebastian Kamps and Patricia Bourcillier, 2007; 341–360.
- Barclay L. A Review of BCG Complications Since The Introduction of a Different BCG Vaccine. <http://www.nt.gov.au/nths/public/cdc/vol5/bcg.htm>. Diakses tanggal 02 Februari 2009. *Jam* 15.20.
- Sjolander A, Cox JC and Barr IG. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998; 64: 713–723.
- Al-Buhairan, Al-Ashban and Al-Omar. Hematological abnormalities in Saudis Suffering from Pulmonary Tuberculosis and Their Response to The Treatment. *Research Journal of Pharmacology*. 2000; 3: 78–85.
- Tandya S. Peran Protein Adhesin Mycobacterium tuberculosis dalam Menginduksi Secretory Immunoglobulin A Mukosa Usus dan Bronkiolus Mencit Balb/c (Upaya Memperoleh Bahan Dasar Vaksin Oral Tuberkulosis). Tidak diterbitkan, Malang, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. 2006.
- Doherty TM, Olsen AW, van Pinxteren L, Andersen P. Oral Vaccination with Subunit Vaccines Protects Animals against Aerosol Infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2002; 70 (6): 3111–3121.
- Anderson AO. Peripheral and Mucosal Immunity: Critical Issues for Oral Vaccine Design. 1997; <http://www.geocities.com/artscience/peripheral-it.html>. Diakses Tanggal 06 September 2008. *Jam* 15.00.
- Price SA, Wilson LM. *PATOFISIOLOGI : Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ed 6., Jakarta, EGC, 2006; 1: 86–99.
- Santoso, M Zhang, X McCormick, S Wang, J Hitt M and Xing Z. Mechanisms of Mucosal and Parenteral Tuberculosis Vaccinations: Adenoviral-Based Mucosal Immunization Preferentially Elicits Sustained Accumulation of Immune Protective CD4 and CD8 T Cells within the Airway Lumen. *The Journal of Immunology*, 2005; 174: 7986–7994.
- Bender BS, Rowe CA, Taylor SF, Wyatt LS, Moss B and Small PA, Jr. Oral Immunization with a Replication deficient Recombinant Vaccinia Virus Protects Mice Against Influenza. *Journal Virology*; 1996; 70: 6418–6424.
- Chen L, Wang J, Zganiacz A, Xing Z. Single Intranasal Mucosal Mycobacterium bovis BCG Vaccination Confers Improved Protection Compared to Subcutaneous Vaccination against Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*, 2004; 238–246.
- Hitchick NC. Tuberculosis: Prospects for an Oral Vaccine Using Novel Antigens and Adjuvants. 2006; <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v100n5/v100n5a02.pdf>. Diakses tanggal 02 Februari 2008. *Jam* 15.51.
- Shin AR, Lee KS, Lee JS, KIM SY, Song CH, Jung SB, Yang CS, Jo EK, Park JK, Paik TH, Kim HJ. Mycobacterium tuberculosis HBHA Protein Reacts Strongly with the Serum Immunoglobulin M of Tuberculosis Patients. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008; 13 (8): 869–875.
- Rao V, Dhar N, Shakila H, Singh R, Khera A, Jain R, Naseema M, Paramasivan CN, Narayanan PR, Ramanathan VD, Tyagi AK. Increased Expression of Mycobacterium tuberculosis 19 kDa Lipoprotein Obliterates the Protective Efficacy of BCG by Polarizing Host Immune Responses to the Th2 Subtype. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005; 61: 410–417.
- Kaplan, Gilla. Rational Vaccine Development — A New Trend in Tuberculosis Control. *The New England Journal of Medicine*, 2005; 353: 1624–1625, October 13, 2005, Number 15. (Online) (<http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/15/1624>, diakses 16 Mei 2009).
- Ogra PL, Faden H, Welliver RC. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001; 14 (2): 432–441.
- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. Intestinal M cells: The fallible sentinels. *World Journal Gastroenterology*, 2007; 13 (10): 1477–1486.
- West E. A Glimpse into the Scary World of Vaccine Adjuvants. 2005; <http://www.vaclib.org/basic/adjuvants.htm>. Diakses tanggal 15 Mei 2009. *Jam* 12.02
- Mowat AMI, Donachie, AM, Sara, J, Auml G, Schon K, Lowenadler B, Dalsgaard K, Kastrup P and Lycke N. CTA1-DD-Immune Stimulating Complexes: A Novel, Rationally Designed Combined Mucosal Vaccine Adjuvant Effective with Nanogram Doses of Antigen. *The Journal of Immunology*, 1991; 167 (6): 3398–3408.