

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

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

---

**Susunan Pengelola Jurnal Ilmiah Patologi Klinik Indonesia  
(*Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*)**  
Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia Masa Bakti 2013–2016  
(surat keputusan pengurus pusat PDSPATKLIN Nomor 008/PP-PATKLIN/III/2014)

**Pelindung:**

Ketua Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Klinik Indonesia

**Ketua:**

Puspa Wardhani

**Wakil Ketua:**

Maimun Zulhaidah Arthamin

**Sekretaris:**

Dian Wahyu Utami

**Bendahara:**

Bastiana Bermawi

**Anggota:**

Osman D. Sianipar

**Penelaah Ahli:**

Riadi Wirawan, AAG. Sudewa, Rahayuningsih Dharma, Mansyur Arif

**Penelaah Pelaksana:**

Prihatini, July Kumalawati, Ida Parwati, Tahono, Krisnowati, Nurhayana Sennang Andi Nanggung, Aryati, Purwanto AP, Jusak Nugraha, Sidarti Soehita, Maimun Zulhaidah Arthamin, Endang Retnowati, Edi Widjajanto, Budi Mulyono, Adi Koesoema Aman, Uleng Bahrin, Ninik Sukartini, Kusworini Handono, M. Yolanda Probahoosodo, Rismawati Yaswir

**Berlangganan:**

3 kali terbit per tahun

Anggota dan anggota muda PDSPATKLIN mulai Tahun 2011 gratis setelah melunasi iuran

Bukan Anggota PDSPATKLIN: Rp 175.000,-/tahun

Uang dikirim ke alamat:

**Bastiana Bermawi dr, SpPK**

Bank Mandiri KCP SBY PDAM No AC: 142-00-1079020-1

**Alamat Redaksi:**

d/a Laboratorium Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Jl. Mayjend. Prof. Dr Moestopo 6–8 Surabaya.

Telp/Fax. (031) 5042113, 085-733220600 E-mail: majalah.ijcp@yahoo.com; jurnal.ijcp@gmail.com

Website: <http://www.indonesianjournalofclinicalpathology.or.id>

**Akreditasi No. 66b/DIKTI/KEP/2011**

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

Majalah Patologi Klinik Indonesia dan Laboratorium Medik

---

**DAFTAR ISI**

**PENELITIAN**

Angka Banding Netrofil/Limfosit di Populasi Dewasa Muda ( <i>Neutrophil/Lymphocyte Ratio in Young Adults</i> ) <b>Arie Yanti, Uleng Bahrun, Mansyur Arif</b> .....	105-108
Phosphatidylinositol -3kinase (PI3K) di Perbenihan Adiposit yang Dipajan Glukosa Tinggi dengan Retinol { <i>The Enzyme Phosphatidylinositol -3Kinase (PI3K) in Adipocyte Culture Exposed by High Glucose Related with Retinol</i> }	
<b>Novi Khila Firani, Bambang Prijadi</b> .....	109-113
Penilaian Uji Troponin I dengan <i>Point of Care Testing</i> ( <i>Evaluation of Troponin I Assay with Point of Care Testing</i> ) <b>Sheila Febriana, Asvin Nurulita, Uleng Bahrun</b> .....	114-118
Perbandingan Nilai Diagnostik IgE Spesifik Tungau Debu Rumah, Metode ELISA dan Immunoblot pada Rinitis Alergi ( <i>Diagnostic Value Comparison of Specific IgE House Dust Mite, ELISA and Immunoblot Methods in Allergic Rhinitis</i> ) <b>Janti Tri Habsari, Aryati, Dwi Reno Pawarti</b> .....	119-126
<i>Heart Fatty Acid Binding Protein</i> Sebagai Petanda Biologis Diagnosis Sindrom Koroner Akut ( <i>Heart Fatty Acid Binding Protein Can be a Diagnostic Marker in Acute Coronary Syndromes</i> ) <b>Ira Puspitawati, I Nyoman G Sudana, Setyawati, Usi Sukorini</b> .....	127-132
Permintaan Darah Persiapan Tindakan Bedah di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo ( <i>Blood Demand for Surgery Preparation at Dr. Wahidin Sudirohusodo General Hospital</i> ) <b>Herlinah, Rachmawati Muhiddin, Mansyur Arif</b> .....	133-136
CD4+ dan CD8+ Interferon Gamma Tuberkulosis Paru Aktif dan Tuberkulosis Laten ( <i>Interferon Gamma Expression of CD4+ and CD8+ between Active Pulmonary Tuberculosis and Latent Tuberculosis</i> ) <b>Betty Agustina Tambunan, John Wiwin, Jusak Nugraha, Soedarsono</b> .....	137-140
Interleukin-4 dan Interferon Gamma di Nefritis Lupus: Hubungan Aktivitas Penyakit Serta Kekambuhan ( <i>Interleukin-4 and Interferon Gamma in Lupus Nephritis: Correlation with Disease Activity and Flare Up</i> ) <b>Torajasa Achamar, Dany Farida, Hani Susianti, Kusworini Handono, Ati Rastini, R.I, I Putu A.S, Atma Gunawan, Handono Kalim</b> .....	141-146
RDW, Jumlah Trombosit dan RPR dengan Indeks FIB-4 di Hepatitis C ( <i>RDW, Platelets and RPR with FIB-4 Index in Hepatitis C</i> ) <b>Yenny Yulianti, Banundari Rachmawati</b> .....	147-150

Protein Rekombinan 38 KDA Mycobacterium Tuberculosis dapat Mengimbas Pembuatan Interleukin-2 dan Interferon- $\gamma$ Limfosit T di Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi ( <i>The 38 KDA Recombinant Protein of Mycobacterium Tuberculosis can Induce the Synthesis of Interleukin-2 and Interferon-<math>\gamma</math> T Lymphocytes in Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture</i> ) <b>Maimun Z Arthamin, Singgih Pujo Wahono, Antiek Primardianti, Ati Rastini, Tri Wahyu Astuti, Tri Yudani Mardining Raras, Francisca S Tanoerahardjo</b> .....	151–157
Rancangan Primer Spesifik <i>Gen Macrophage Mannose Receptor</i> (MMR) untuk <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan <i>Sekuensing Deoxyribo Nucleic Acid</i> (DNA) { <i>Macrophage Mannose Receptor Gene (MMR) Specific Primer Design for Polymerase Chain Reaction (PCR) and Deoxyribonucleic Acid (DNA) Sequencing</i> }	
<b>Yani Triyani, Nurizzatun NaFsi, Lelly Yuniarti, Nanan Sekarwana, Endang Sutedja, Dida Ahmad Gurnida, Ida Parwati, Bacht Alisjahbana</b> .....	158–162
Analisis <i>King's Score</i> di Penyakit Hati Kronis Berdasarkan Fibroscan ( <i>Analysis of King's Score in Chronic Liver Disease Based on Fibroscan</i> )	
<b>Wira, Amaliyah T. Lopa, Ibrahim Abdul Samad</b> .....	163–167
Kadar <i>Surfactant Protein-D</i> Serum pada Pasien Penyakit Paru Obstruktif Kronis Berkebahayaan Kambuhan Rendah dan Tinggi ( <i>Serum Surfactant Protein-D Level in High and Low Risk of Exacerbation Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients</i> )	
<b>Dewi Nurhayati, Ida Parwati, Tiene Rostini, Arto Yuwono</b> .....	168–175
Identifikasi Mutasi H63D <i>Gen HFE</i> pada Kelainan HBE ( <i>Identification of H63D HFE Gene Mutation in HBE Disorder</i> )	
<b>Yanuarita Tursinawati, Nyoman Suci Widyastiti, Moedrik Tamam</b> .....	176–181
Anti-HIV dan Subtipe HIV pada Pasien Hemodialisis ( <i>Anti-HIV and HIV Subtype in Hemodialysis Patients</i> )	
<b>Retno Handajani, Mochammad Thaha, Mochamad Amin, Citrawati Dyah Kencono WuNgu, Edhi Rianto, Pranawa</b> .....	182–186
Kenasaban Fosfat Serum, C-Reaktif Protein dan Fetuin A di Pasien Ginjal Tahap Akhir dengan Hemodialisis ( <i>Correlation of Serum Phosphate, CRP and Fetuin A in End Stage Renal Disease Patients on Hemodialysis</i> )	
<b>Indranila KS, Heri Winarto, Purwanto AP</b> .....	187–193
<b>TELAAH PUSTAKA</b>	
<i>Maldi-Tof dan Seldi-Tof Mass Spectrometry</i> dengan <i>Throughput</i> Tinggi untuk Analisis Proteomik Profil Protein dari Petanda Biologis ( <i>Maldi-Tof and Seldi-Tof Mass Spectrometry with High Throu Ghput for Proteomic Analysis of Protein Profiling of Biomarker</i> )	
<b>Trinovia Andayaningsih, Siti Muchayat P</b> .....	194–199
<b>LAPORAN KASUS</b>	
Ketoasidosis Diabetik di Diabetes Melitus Tipe 1 ( <i>Ketoacidosis Diabetic in Type 1 Diabetes Mellitus</i> )	
<b>Zuhrinah Ridwan, Uleng Bahrn, Ruland DN Pakasi R</b> .....	200–203

**Ucapan terimakasih kepada penyunting Vol. 22 No. 2 Maret 2016**

Riadi Wirawan, Adi Koesoema Aman, Purwanto AP, Sidarti Soehita, Ninik Sukartini, Prihartini, Kusworini Handono, Uleng Bahrn, Aryati, Budi Mulyono, AAG. Sudewa

---

PENELITIAN

---

**PROTEIN REKOMBINAN 38 KDA MYCOBAKTERIUM TUBERKULOSIS  
DAPAT MENGIMBAS PEMBUATAN INTERLEUKIN-2 DAN  
INTERFERON- $\gamma$  LIMFOSIT T DI KULTUR SEL MONONUKLEAR DARAH  
TEPI**

*(The 38 kDa Recombinant Protein of Mycobacterium Tuberculosis can Induce the Synthesis of Interleukin-2 and Interferon- $\gamma$  T Lymphocytes in Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture)*

Maimun Z Arthamin<sup>1</sup>, Singgih Pujo Wahono<sup>1</sup>, Antiek Primardianti<sup>1</sup>, Ati Rastini<sup>1</sup>,  
Tri Wahyu Astuti<sup>2</sup>, Tri Yudani Mardining Raras<sup>3</sup>, Francisca S Tanoerhardjo<sup>4</sup>

**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) and is one of the significant mortality causes WHO (2012). The primary immune response in TB pathogenesis is Cell Mediated Immunity (CMI), roled by T lymphocytes. Interleukin-2 (IL-2) is a growth factor for T lymphocytes. Gamma Interferon is the key cytokine in M.tb infection control, synthesized by T lymphocytes. An effective vaccination strategy is achieved by giving vaccine which is able to stimulate T lymphocytes in synthesizing cytokines. The 38 kDa M.tb protein is potential in the vaccine development program, because it has specific epitopes for T lymphocytes. The aim of this study was to know how to determine that the 38 kDa recombinant protein of M.tb Malang strain could induce cellular immune response by IL-2 and IFN- $\gamma$  synthesized by T lymphocytes. The study was carried out by an experimental in vitro study on PBMC from healthy endemic subjects, those having TB contact, and the TB patients themselves. PBMC from subjects was cultured with 38 kDa recombinant protein of M.tb Malang strain, with PPD and without any protein. The analysis of IL-2 and IFN- $\gamma$  used flowcytometry. The result showed that the highest percentage of IL-2 was found in the culture with 38 kDa recombinant protein of M.tb Malang strain, in healthy endemic ( $p=0.000$ ) and in those who had TB contact ( $p=0.000$ ). the highest percentage of IFN- $\gamma$  was found in the culture with 38 kDa recombinant protein of M.tb Malang strain, in healthy endemic ( $p=0.007$ ) and those who had TB contact ( $p = 0.105$ ). The 38 kDa recombinant protein of M.tb Malang strain was able to induce IL-2 and IFN- $\gamma$  synthesized by TCD3+ lymphocytes from healthy endemic subjects and those who had TB contact.

**Key words:** The 38 kDa recombinant protein of M.tb, interleukin-2, gamma interferon, T lymphocytes, PBMC culture

**ABSTRAK**

Tuberkulosis (TB) yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb), merupakan salah satu penyebab kematian utama. WHO (2012), menempatkan Indonesia sebagai penyumbang TB nomor 4 dunia. Respons imun utama dalam patogenesis TB adalah *cell mediated immunity* yang diperankan limfosit T. Interleukin-2 adalah faktor pertumbuhan limfosit T. *Interferon Gamma* adalah sitokin kunci pengendalian infeksi M.tb yang dihasilkan limfosit T. Strategi vaksinasi yang tepat guna adalah yang dapat merangsang respons limfosit T untuk menghasilkan sitokin. Protein 38 kDa M.tb sanggup bekerja untuk pengembangan vaksin TB karena memiliki epitop untuk limfosit T. Adalah untuk mengetahui bagaimana penentuan protein rekombinan 38 kDa M.tb galur Malang dapat mengimbas respons imun sel melalui pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  limfosit T. Metode meneliti dilakukan secara eksperimental di *in vitro* di kultur PBMC dari subjek sehat endemis, kontak dengan TB dan pasien TB. PBMC dari subjek dikultur masing-masing dengan tiga; perlakuan, tidak dipajan, dipajan protein rekombinan 38 kDa M.tb dan dipajan *Protein Purified Derivative* (PPD).

---

<sup>1</sup> Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya-RSUD dr Saiful Anwar Malang. Email: maimun70@yahoo.com

<sup>2</sup> Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi-Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya-RSSA, Malang.

<sup>3</sup> Laboratorium Biokimia dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

<sup>4</sup> Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementrian Kesehatan, Indonesia.

Pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  intrasel limfosit TCD3+ diperiksa menggunakan *flowcytometry*. Data dianalisis dengan uji *Anova* atau *Kruskal Wallis*. Persentase tertinggi IL-2 terdapat pada pajanan protein rekombinan 38 kDa M.tb, tatkala sehat endemis ( $p=0,000$ ) dan kontak dengan TB ( $p=0,000$ ). Prosentase tertinggi IFN- $\gamma$  terdapat pada paparan protein rekombinan 38 kDa M.tb, pada sehat endemis ( $p=0,007$ ) dan kontak dengan TB ( $p=0,105$ ). Berdasarkan penelitian ini Protein rekombinan 38 kDa M.tb galur Malang dapat mengimbas pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  limfosit TCD3+ di subjek sehat endemis dan yang kontak TB.

**Kata kunci:** Protein rekombinan 38 kDa M.tb, interleukin-2, interferon gamma, limfosit T, kultur PBMC

## PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) adalah salah satu penyakit tertua yang menyerang manusia, merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Di Indonesia, TB merupakan masalah utama kesehatan masyarakat. Laporan TB dunia oleh WHO tahun 2012, menempatkan Indonesia sebagai penyumbang TB terbesar nomor 4 di dunia setelah India, Cina dan Afrika Selatan. Kejadian TB di Indonesia mencapai antara 0,4–0,5 juta kasus pada tahun 2011.<sup>1</sup>

Sampai saat ini vaksin yang digunakan untuk pencegahan TB adalah *Bacillus Calmette Guerin* (BCG). Ketepatan-gunaan tertinggi dari BCG dilaporkan ketika vaksin tersebut diberikan kepada bayi baru lahir, tetapi akan menurun pada masa waktu antara 10–15 tahun dan pada usia dewasa, tetapi obat tersebut tidak mampu mencegah penularan TB paru.<sup>2,3</sup>

Salah satu kandidat vaksin dari protein M.tb. adalah protein 38 kDa M.tb, yang memiliki kemampuan imunogenik untuk merangsang antibodi khas terbentuk yang dapat menghambat adesi dan kolonisasi.<sup>4,5</sup> Antigen 38 kDa M.tb merupakan zat yang berkemampuan untuk pengembangan vaksin TB karena memiliki epitop khas sel TCD4+, sel T CD8+ (CTL) dan epitop untuk sel B.<sup>6-8</sup> Penelitian lain tentang protein 38 kDa M.tb menyebutkan bahwa zat ini membangkitkan respons sel T CD4+ dan T CD8+ di tikus, tetapi di manusia hanya T CD8+.<sup>9</sup> Pada penelitian oleh Kusumaningsih dkk tahun 2009 ditemukan peningkatan jumlah sel T CD4+, T CD8+ dan IFN- $\gamma$  + di jaringan paru dan usus mencit yang diberi vaksin oral dengan protein ini.<sup>5,10</sup>

Pemberian vaksin yang paling tepat guna adalah dengan memberikannya agar dapat merangsang respons CMI, terutama limfosit T, untuk menghasilkan sitokin, seperti: IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  dan TNF- $\gamma$ , yaitu meningkatkan fungsi sel T sitotoksik dan merangsang respons humoral melalui pembentukan antibodi terhadap antigen yang khas.<sup>11,12</sup>

Dalam patogenesis TB, respons imun yang berperan utama adalah *Cell mediated immunity* (CMI) dan *Delayed type hyper-sensitivity* (DTH). *Cell mediated immunity* sebagai respons imun inang yang sangat bermanfaat, yang dikenali melalui populasi sel limfosit T CD3+ yang berkembang.<sup>13</sup>

Interleukin-2 (IL-2) adalah faktor pertumbuhan pertama di klon sel limfosit T dan merupakan sitokin untuk perkembangan sel limfosit T di kultur. Interleukin-2 merupakan sitokin yang terutama dihasilkan oleh sel T CD4+, T CD8+, dendritik dan *thymic*.<sup>14</sup> Sedangkan *Interferon Gamma* (IFN- $\gamma$ ) adalah sitokin kunci dalam pengendalian infeksi M.tb yang dihasilkan oleh limfosit TCD4+, CD8+ dan sel *Natural Killer* (NK). IFN- $\gamma$  dapat meningkatkan presentasi antigen, yang menyebabkan pembinaan limfosit T CD4+ dan/atau limfosit T sitotoksik CD8+ yang berperan dalam pemusnahan kuman M.tb.<sup>15</sup>

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mengembangkan pembuatan kandidat vaksin berupa protein rekombinan 38 kDa M.tb galur Malang. Namun sampai saat ini belum banyak penelitian mengenai protein ini, khususnya mengenai imunogenitas dan kemampuan dalam mengimbas respons CMI di kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui uji imunogenitas protein rekombinan 38 kDa M.tb galur Malang melalui pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  oleh limfosit T CD3+ di kultur PBMC dari kelompok pasien TB, mereka yang kontak TB dan sehat endemis yang dipajan dengan protein tersebut.

## METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan eksperimen murni di laboratorium secara *in vitro* menggunakan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* di kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) dari ketiga kelompok subjek yang telah diimbas dengan protein rekombinan 38 kDa M.tb galur Malang. *Peripheral blood mononuclear cell* diisolasi dari ketiga kelompok subjek penelitian, yaitu sehat endemis, mereka yang kontak TB dan pasien TB. Kemudian dilakukan tiga (3) perlakuan, yaitu: perbandingan (tanpa perlakuan), dipajan dengan protein 38 kDa M.tb galur Malang dan PPD sebagai pembanding positif. Setelah dikultur selama 72 jam, dilihat buatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  oleh limfosit T CD3+ dengan *flowsitometry*.

Patokan kesertaan subjek pada penelitian ini adalah seronegatif terhadap HIV, hasil memeriksa laboratorik darah lengkap, uji fungsi hati dan

ginjal, glukosa urinalisis normal, serta tidak sedang menggunakan obat steroid dan/atau immunosupresan. Peserta perempuan yang ikut terlibat dalam penelitian ini tidak boleh sedang atau merencanakan kehamilan. Usia subjek penelitian antara 20–50 tahun. Sedangkan patokan tidak disertakan meliputi semua subjek penelitian yang berpenyakit diabetes melitus, hasil laboratorium darah lengkap, uji fungsi hati, fungsi ginjal, analisis air kemih yang kesemuanya tidak normal. Terdapat kambuhan HIV dan sedang mengalami pengobatan steroid dan/atau immunosupresan.

Jumlah subjek untuk setiap kelompok adalah tujuh (7), jadi jumlah keseluruhan 21 peserta (masing-masing tujuh (7) untuk: pasien TB, pembandingan positif dan pembandingan normal). Waktu penelitian ini dilaksanakan mulai Desember 2012 sampai November 2013 di RSUD dr Saiful Anwar dan Laboratorium Biomedik FKUB Malang. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS *Statistic version 19*. Data hasil meneliti dihitung untuk mendapatkan rerata dan kesalahan baku [*standard error of mean (SE)*]. Perbedaan antar kelompok dianalisis dengan uji *One Way Anova* atau *Kruskal Wallis* bergantung sebaran data yang diperoleh, dengan tingkat kemaknaan  $p < 0,05$ .

Isolasi PBMC diawali dengan memasukkan darah dari tempat kedap udara, kemudian heparin dimasukkan ke dalam tabung pemusing yang sudah diisi dengan *Ficoll-Hipaque*  $d=1,077$  g/mL sebanyak 15 mL. Kemudian dipusingkan dengan kecepatan putar 1000 rpm selama 30 menit. Hasilnya berupa lima (5) lapisan, yaitu: plasma, PBMC, *Ficoll-Hipaque*, granulosit dan sel darah merah. Cincin PBMC diambil secara perlahan dan dicuci dengan PBS 10 mL kemudian dipusingkan dengan kecepatan putar 1200 rpm selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan RBC lisis bufer. Pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan PBS dan dipusingkan lagi dengan kecepatan putaran 1200 rpm (1000 – 1600 rpm) selama 10 menit pada suhu ruang. Pekerjaan tersebut dilakukan dua kali, sehingga akan terbentuk pelet (sel PBMC) di dasar tabung.

Untuk kultur PBMC, menggunakan sebanyak  $10^5$ - $10^6$  PBMC yang disuspensikan dalam 500  $\mu$ L medium kultur untuk setiap PBMC sampel. Ada tiga (3) perlakuan : sebagai pembandingan negatif yaitu sel dikultur tanpa antigen protein yang rekombinan M.tb maupun PPD. Sebagai pembandingan positif sel dikultur dengan PPD 2  $\mu$ g/mL, yaitu dikultur dengan antigen protein rekombinan 38 kDa M.tb dengan dosis 2  $\mu$ g/mL. *Peripheral blood mononuclear cell* dikultur selama 72 jam dalam 48 *tissue culture well 48* di inkubator bersuhu 37°C 5% CO<sub>2</sub>. *Peripheral blood mononuclear cell* dikultur masing-masing secara rangkap, karena digunakan untuk pemeriksaan sitokin IL2 dan IFN $\gamma$ .

Pada hari ke 3 dipanen, antara 5–6 jam sebelumnya diberikan *Brefeldin A (Golgiplug)* dengan dosis 10  $\mu$ g/mL. Sel diambil dengan *micropipette* dan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL dan dipusingkan dengan kecepatan putar 2500 rpm selama tiga (3) menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan satu (1) mL PBS, dicuci antara 2–3 kali. Setelah itu siap untuk dicat pada pemeriksaan dengan *flowcytometry*.

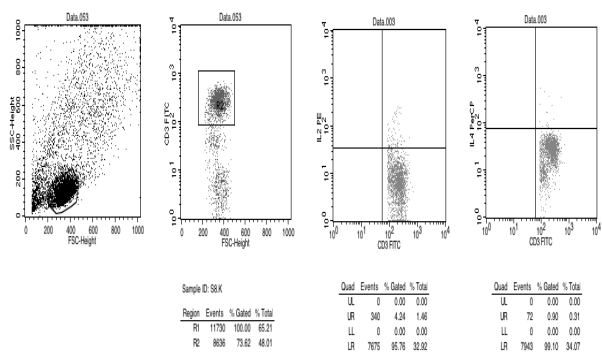
Pelet PBMC ditambahkan dengan *cell staining buffer* dan dibagi dalam beberapa *Eppendorf* sesuai dengan banyaknya perlakuan. Pelet sekarang siap untuk diwarnai dengan antibodi *cell surface marker* anti human CD3+ yang bertanda *fluorochrome FITC*. Setelah siap pelet dipindahkan ke kuvet baca untuk dibaca ekspresi IL-2 dan IFN  $\gamma$  dengan *flowcytometry*. Ekspresi IL-2 dan IFN  $\gamma$  dinyatakan dalam satuan persen (%).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa hasil *flowcytometry* pada pembuatan IL-2 untuk limfosit TCD3+ diisyaratkan di Gambar 1 dan 2.

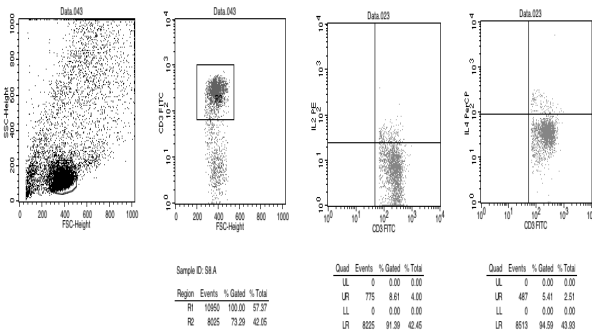
Data hasil *flowcytometry* pembuatan IL-2 limfosit TCD3+ secara lengkap disajikan di Tabel 1.

Analisis presentase sel TCD3+ yang membuat IL-2 kelompok subjek sehat endemis menggunakan uji *Anova*, diperoleh nilai  $p=0,00$ , maka paling tidak terdapat perbedaan pembuatan IL-2 yang bermakna sampel sehat di dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna di antaranya, maka dianalisis *post hoc* dengan uji LSD. Hasil menganalisis *post hoc* uji LSD diperoleh nilai  $p < 0,05$  di semua kelompok perlakuan, maka terdapat perbedaan bermakna pembuatan IL-2 limfosit TCD3+



**Gambar 1.** Hasil memeriksa *flowcytometry* pada pembuatan IL-2 di limfosit TCD3+ subjek populasi sehat endemis tanpa perlakuan

**Keterangan:** *Scattergram* kiri: R2 di dalam kotak kecil adalah gating limfosit T CD3+ (*Scattergram* kanan: kuadran kanan atas adalah gating limfosit T CD3+ IL-2 (positif rangkap)



**Gambar 2.** Hasil memeriksa *flowcytometry* pembuatan IL-2 di limfosit TCD3+ subjek populasi sehat endemis yang diberi protein 38 kDa M.tb galur Malang

**Keterangan:**

*Scattergram* kiri: R2 di dalam kotak kecil adalah *gating* lim-fosit T CD3+  
*Scattergram* kanan:kuadran kanan atas adalah *gating* limfosit T CD3+ IL-2 (positif rangkap)

sampel sehat di semua kelompok perlakuan. Jumlah pembuatan IL-2 tertinggi di sampel sehat endemis terdapat pada perlakuan dengan pajanan protein 38 kDa sebesar 8,16%.

Hasil menganalisis pembuatan IL-2 kelompok kontak dengan TB menggunakan uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $p=0,00$ , maka paling tidak terdapat perbedaan pembuatan IL-2 yang bermakna terhadap sampel yang bersangkutan di dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna di antara ketiga kelompok perlakuan, maka dilakukan analisis *post hoc* dengan uji Mann Whitney. Hasil menganalisis *post hoc* Mann Whitney menunjukkan jumlah pembuatan IL-2 tertinggi di sampel yang kontak dengan TB terdapat pada perlakuan dengan pajanan protein 38 kDa sebesar 9,49 %.

Analisis pembuatan IL-2 di sampel kelompok pasien TB menggunakan uji *Anova* diperoleh nilai  $p=0,827$ ; sehingga tidak terdapat perbedaan pembuatan IL-2 di sampel pasien di semua kelompok perlakuan. Hal ini dibuktikan dengan *post hoc* uji LSD. Hasil menganalisis *post hoc* uji LSD, diperoleh nilai  $p >0,05$  di semua kelompok perlakuan, maka tidak terdapat perbedaan

**Tabel 1.** Data hasil *flowcytometry* [rerata (SE)] (%gated) pembuatan IL-2 limfosit T CD3+ di setiap kelompok subjek dan perlakuan

Kelompok subjek	Tanpa perlakuan	Pajanan protein 38 kDa M.tb	Pajanan PPD	p
Sehat	5,19 (0,17)	8,16 (0,18)	7,29 (0,14)	0,000*
Kontak TB	3,84 (0,12)	7,10 (0,54)	6,28 (0,30)	0,000*
Pasien TB	6,18(0,60)	6,50 (0,89)	6,85 (0,82)	0,827

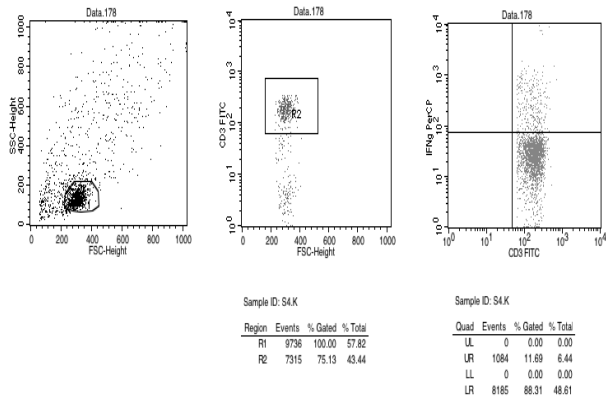
keterangan\*: berbeda bermakna,  $p < 0,05$

bermakna pembuatan IL-2 di semua perlakuan kelompok sampel pasien TB.

Hasil menganalisis pembuatan IL-2 ketiga kelompok sampel yang diimbasi protein 38 kDa M.tb dengan uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $p=0,171$ , maka secara umum tidak terdapat perbedaan bermakna pajanan protein di ketiga kelompok sampel. Hasil menganalisis *post hoc* Mann Whitney kelompok sehat endemis dan yang kontak dengan TB, diperoleh nilai  $p=0,353$ ; kelompok sehat endemis dan pasien TB, diperoleh nilai  $p=0,043$ ; kelompok yang kontak dengan TB dan pasien TB, diperoleh nilai  $p=0,684$ . Perbedaan bermakna pembuatan IL-2 karena pemberian protein 38 kDa M.tb terdapat antara kelompok sehat endemis dan pasien TB, dengan nilai  $p=0,043$ , dengan jumlah pembuatan IL-2 tertinggi karena pengaruh pemberian protein 38 kDa terdapat di kelompok sehat endemis.

**Pembuatan IFN- $\gamma$  limfosit TCD3+**

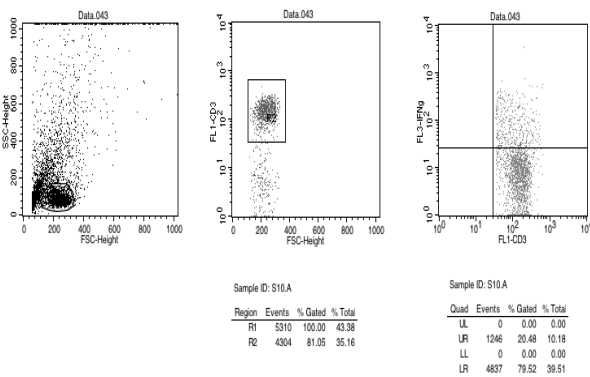
Beberapa hasil *flowcytometry* pembuatan IFN- $\gamma$  di limfosit TCD3+ diisyaratkan di Gambar 3 dan 4.



**Gambar 3.** Hasil memeriksa *flowcytometry* pembuatan IFN- $\gamma$  di limfosit TCD3+ subjek populasi sehat endemis tanpa perlakuan

**Keterangan:**

*Scatergram* kiri: R2 di dalam kotak kecil adalah *gating* limfosit T CD3+  
*Scatergram* kanan: kwadran kanan atas adalah *gating* limfosit T CD3+ IFN- $\gamma$  (positif rangkap)



**Gambar 4.** Hasil memeriksa *flowcytometry* pembuatan IFN- $\gamma$  di limfosit CD3+ subjek populasi sehat endemis yang diberi protein 38 kDa M.tb galur Malang

**Keterangan:**

Scatergram kiri: R2 di dalam kotak kecil adalah *gating* limfosit T CD3+  
 Scatergram kanan: kuadran kanan atas adalah *gating* limfosit T CD3+ IFN- $\gamma$  (positif rangkap)

Data hasil *flowcytometry* pembuatan IFN- $\gamma$  limfosit TCD3+ secara lengkap disajikan di Tabel 2

Hasil menganalisis jumlah pembuatan IFN- $\gamma$  kelompok sehat endemis dengan uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $p=0,007 (< 0,05)$ , sehingga paling tidak terdapat perbedaan pembuatan IFN- $\gamma$  di dua kelompok perlakuan sampel sehat endemis. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna di antara ketiga kelompok perlakuan, maka dianalisis *post hoc* dengan uji Mann Whitney. Hasil analisa menganalisis *post hoc* Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada pembuatan IFN- $\gamma$  di antara kelompok perlakuan pembanding dan PPD dan di antara perlakuan protein 38 kDa serta PPD. Jumlah pembuatan IFN- $\gamma$  tertinggi di sampel sehat endemis terdapat pada perlakuan dengan pajanan protein 38 kDa sebesar 13,55%.

Hasil menganalisis jumlah pembuatan IFN- $\gamma$  kelompok kontak dengan TB dengan uji Kruskal Wallis diperoleh nilai  $p=0,105$ , sehingga tidak terdapat perbedaan pembuatan IFN- $\gamma$  di kelompok perlakuan kontak dengan TB. Hasil uji *post hoc* Mann Whitney menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada

pembuatan IFN- $\gamma$  di kelompok pembanding dan perlakuan PPD di mereka yang kontak TB. Jumlah pembuatan IFN- $\gamma$  tertinggi di sampel yang kontak TB terdapat pada perlakuan dengan pajanan protein 38 kDa sebesar 9,49%.

Hasil menganalisis pembuatan IFN- $\gamma$  kelompok pasien TB di ketiga perlakuan dengan uji Kruskal Wallis, didapatkan  $p=0,628$ , sehingga tidak terdapat perbedaan bermakna pembuatan IFN- $\gamma$  kelompok pasien TB di ketiga perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* Mann Whitney, dengan hasil menunjukkan tidak terdapat perbedaan pembuatan FN- $\gamma$  di semua kelompok perlakuan pasien TB.

Hasil menganalisis pembuatan IFN- $\gamma$  ketiga kelompok sampel yang diimbas protein 38 kDa M.tb dengan uji Kruskal Wallis, diperoleh nilai  $p=0,005$ . Dengan demikian, maka paling tidak terdapat perbedaan bermakna pajanan protein terhadap pembuatan IFN- $\gamma$  di kedua kelompok. Hal ini dibuktikan dengan uji *post hoc* Mann Whitney, dengan hasil, terdapat perbedaan bermakna pembuatan IFN- $\gamma$  dengan pemberian protein 38 kDa M.tb di antara kelompok sehat endemis dan pasien, dengan jumlah tertinggi terdapat di kelompok sehat endemis, 13,55%.

Hasil meneliti menunjukkan terdapat perbedaan bermakna dalam jumlah limfosit T CD3+ yang membuat IL-2 yang berasal dari subjek sehat dan kontak dengan TB serta semua perlakuan, yang tertinggi adalah di mereka yang sehat endemis dengan perlakuan protein rekombinan 38 kDa M.tb. Hal ini menunjukkan bahwa protein 38 kDa M.tb tersebut memiliki kekuatan mengimbas pembuatan IL-2 di limfosit T CD3+ subjek yang sehat endemis dan kontak dengan TB, bahwa terdapat ligan khas untuk sel Th1 di protein 38 kDa M.tb galur Malang yang dapat mengaktifasi sel TCD3+ normal di subjek sehat endemis dan kontak dengan TB. Dengan demikian protein ini dapat menjadi kandidat yang berkemampuan sebagai vaksin TB.

Penelitian yang dilakukan oleh Mc Dyer, *et al.*, tahun 2007 mendapatkan bahwa PBMC dari subjek pasien TB menunjukkan pembuatan IL-2 yang lebih rendah dari PBMC dari terteliti yang sehat yang

**Tabel 2.** Data hasil *flowcytometry* (rerata [SE]) (%gated) pembuatan IFN- $\gamma$  limfosit T CD3+ di setiap kelompok subjek dan perlakuan

Kelompok subjek	Tanpa perlakuan	Pajanan protein 38 kDa M.tb	Pajanan PPD	p
Sehat	10,82 (0,77)	13,55 (1,43)	7,53 (0,05)	0,007*
Kontak TB	8,46 (0,18)	9,49 (1,82)	6,65 (1,89)	0,105
Pasien TB	5,62(0,92)	4,94(0,42)	6,82 (1,31)	0,628

keterangan\*: berbeda bermakna,  $p < 0,05$

SE: Standart Error



dirangsang *M.tb* dalam *in vitro*, karena respons imun yang jelek di pasien TB. Pasien TB tetap memiliki sistem CMI yang kurang baik, yaitu yang tampak melalui jumlah sitokin pengatur imun IL-2 dalam serum pasien TB yang lebih rendah daripada serum subjek sehat.<sup>16</sup>

Analisis statistik pembuatan IFN- $\gamma$  limfosit TCD3+ kultur PBMC yang berasal dari mereka yang sehat endemis menunjukkan perbedaan bermakna di semua kelompok perlakuan. Di kelompok subjek sehat endemis, data menunjukkan bahwa pembuatan IFN- $\gamma$  tertinggi terdapat pada perlakuan dengan pajanan protein rekombinan 38 kDa *M.tb* dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan dan PPD. Interferon- $\gamma$  merupakan sitokin kunci pada pengendalian infeksi *M.tb*, yang dibuat oleh sel TCD4+ maupun TCD8+ dan sel NK. Respons sel T terhadap infeksi *M.tb* berupa pembuatan IFN- $\gamma$  yang memerlukan perangsangan epitop antigen khas dari protein *M.tb* yang dapat dikenali oleh sel T. Imbasan limfosit T CD4+ maupun CD8+ dalam membuat IFN- $\gamma$  bergantung ligan khas yang terdapat di antigen yang sesuai dengan reseptor yang terdapat di sel T CD4+ maupun CD8+. Penelitian ini menunjukkan ada peningkatan pembuatan IFN- $\gamma$  setelah pengimbasan protein rekombinan 38 kDa dari galur Malang bila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan di subjek sehat endemis. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ligan yang khas di protein ini yang sesuai dengan reseptor di sel TCD3+ yang berperan pada pembuatan IFN- $\gamma$ .

Kelompok sehat endemis merupakan subjek dengan respons CMI yang bagus, sehingga dengan pajanan protein rekombinan 38 kDa menunjukkan peningkatan pembuatan IFN- $\gamma$  bila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan dan bila dibandingkan dengan perlakuan dengan PPD. Penelitian yang dilakukan oleh Shams, *et al* pada tahun 2001 di PBMC dari subjek sehat yang dirangsang oleh *heat-killed M.tb* mendapatkan hasil yang sama dengan masa kultur PBMC 72 jam yang respons sel T CD4+ dalam membuat IFN- $\gamma$  dilihat dengan metode *Elispot*.<sup>9</sup> Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang cukup berkesanggupan mengimbas pembuatan IFN- $\gamma$  oleh limfosit T CD3+ di kultur PBMC yang berasal dari sehat endemis.

Pembuatan IFN- $\gamma$  sel T CD3+ di kultur PBMC yang berasal dari mereka yang kontak TB menunjukkan yang tertinggi terdapat pada perlakuan pengimbasan dengan protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang bila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan dan dengan PPD, walaupun secara statistik tidak bermakna. Subjek yang kontak TB merupakan

populasi dengan respons imun yang baik yang telah mendapatkan pemekaan antigen *M.tb* sebelumnya, yang dibuktikan dengan hasil uji *Mantoux* positif. Sel efektor memori di kelompok yang kontak TB telah berkembang dengan baik atas responsnya terhadap antigen *M.tb* sebelumnya. Namun, tidak menimbulkan gejala klinis TB, sehingga dengan pajanan antigen protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang, tetap menunjukkan peningkatan dibandingkan dengan yang tanpa perlakuan.

Pada penelitian ini ditemukan pembuatan IFN- $\gamma$  tertinggi karena pajanan protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang terdapat di kultur PBMC yang berasal dari mereka yang sehat endemis bila dibandingkan dengan yang berasal dari kontak TB dan pasien TB. Hal yang sama dikemukakan pula oleh Mc Dyer, *et al.*,<sup>16</sup> tahun 2007 bahwa PBMC dari subjek pasien TB menunjukkan pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  yang lebih rendah dari yang sehat.<sup>16</sup> Hal ini mendukung teori bahwa hasil IFN- $\gamma$  sangat turun di pasien dengan TB paru lanjut sedang dan lanjut jauh yang menunjukkan bahwa respons imun awal terhadap *M.tb* di populasi ini berkaitan dengan hasil IFN- $\gamma$  yang berkurang.<sup>15</sup>

Pada penelitian ini belum diperiksa respons imun sel yang lebih khas terhadap peran sel T CD4+ dan sel T CD8+. Yaitu hal untuk mengetahui kemampuan imunogenik protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang dalam mengimbas pembuatan sitokin yang penting dan bersifat melindungi terhadap *M.tb*.

## SIMPULAN DAN SARAN

Didasari hasil meneliti ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada pembuatan IL-2 dan IFN- $\gamma$  pada kultur PBMC setelah pemberian protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang di kelompok subjek yang sehat endemis. Protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang dapat mengimbas pembuatan IL-2 di limfosit TCD3+ kultur PBMC yang berasal dari subjek yang sehat endemis dan kontak TB. Protein rekombinan 38 kDa *M.tb* galur Malang dapat mengimbas pembuatan IFN- $\gamma$  di limfosit TCD3+ kultur PBMC yang berasal dari subjek yang sehat endemis dan kontak TB. Untuk penilaian respons limfosit T lebih lanjut terhadap pemberian protein 38 kDa *M.tb* galur Malang untuk mengetahui kemampuan imunogenitasnya lebih baik dilanjutkan dengan penelitian yang lebih khas tentang respons limfosit T CD4+ maupun sel T CD8+ dalam membuat

sitokin yang penting dan bersifat melindungi terhadap M.tb.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Global TB Report, World Health Organization, 2012; 17.
2. Brandt L, Cunha J.F, Olsen A.W, Chilima B, Hirsch F, Appelberg R, et al, Failure of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis, *Infection And Immunity, American Society*, 2002; X(26): p. 56-65
3. Raekiansyah, M. Meracik Ulang Vaksin BCG. 2005. (Online) (<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0505/04/ilpeng/1726488.htm>, diakses 1 Desember 2012).
4. ChangZ, ChoudharyA, LathigraR, Quioco F.A, The Immunodominant 38-kDa Lipoprotein Antigen of Mycobacterium tuberculosis Is a Phosphate-binding Protein, *The Journal of Biological Chemistry, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc*, 1994; 269(3): 1956-1968.
5. Tandy, 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.
6. Da Fonseca DPAJ, Joosten D, Van Der Zee R, Jue D.L, Singh M, Vordermeier H.M, Snippe H, Verheul AFM, Identification of New Cytotoxic T-Cell Epitopes On The 38-Kilodalton Lipoglycoprotein of Mycobacterium Tuberculosis By Using Lipopeptides, *Infection And Immunity, American Society For Microbiology*, 1998; 66(7): 3190-3197.
7. Raras TYM, Lyrawati D, Cloning and expression of pab gene of M. tuberculosis isolated from pulmonary TB patient in E.coli DH5 $\alpha$ , *Med J Indonesia*, 2011; 20(4): 247-54.
8. Chen F, Gao Y, Qi Y. Identification of CD8+ T Cell Epitopes Against Mycobacterium tuberculosis, *Understanding Tuberculosis – Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*, 2012; 19: p. 35-46
9. Shams H, Wizel B, Weis S.E, Samten B, Barnes PF, Contribution of CD8+ T Cells To Gamma Interferon Production In Human Tuberculosis, *Infection And Immunity, American Society For Microbiology*, 2001; 69(5): 3497-3501.
10. Kusumadewi W, Arthamin M.Z, Winarsih S, Protein adhesin 38 kda Mycobacterium tuberculosis per oral meningkatkan jumlah sel T CD4+ pada paru mencit balb/c. Tugas akhir. 2009; 47-55.
11. Ginsberg AM, A Proposed National Strategy for Tuberculosis Vaccine Development, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 30 (Suppl 3): p. 123-127
12. Martin C, Tuberculosis vaccines: past, present and future, *Curr Opin Pulm Med United States of America, Lippincott Williams & Wilkins*, 2006; p. 221-232
13. Manabe YC, Dannenberg AM, *Pathophysiology: Basic Aspects, Tuberculosis & Non Tuberculous Mycobacterial infections*, 5<sup>th</sup> Ed., United States of America, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2006; part 1-2: p. 340-358
14. Nelson BH, IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *The Journal of Immunology*, 2004; 172(45): 3983-3988.
15. Raja A, Immunology of tuberculosis, *Indian Journal of Medical Respirology* 2004; 65(120): 213-232.
16. McDyer JF, Hackley MN, Walsh TE, Cook JL, Seder RA, Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses, abstract, *J Immunol*, 1997; 158(89): 492-500.