Ekspresi IFN- γ dan IL-4 CD4⁺T Limfosit pada Tuberkulosis Kontak terhadap Antigen 38 Kda *Mycobacterium tuberculosis*

Expression of IFN- γ and IL-4 CD4⁺T lymphocytes in Tuberculosis Contacts Against the 38 Kda Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*

Iin Trilistiyanti N¹, HMS Chandra Kusuma¹, Tri Yudani MR², Maimun Zulhaidah A³, Triwahju Astuti⁴, Francisca Tanoerhardjo⁵

¹Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang

²Laboratorium Biomedik & Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang

⁴Laboratorium Paru Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang

⁵Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Indonesia

ABSTRAK

Mengendalikan epidemi tuberkulosis pada anak adalah prioritas kesehatan global. Efikasi vaksin *Bacillus of Calmette and Guerin* (BCG) sangat bervariasi sehingga memerlukan pengembangan vaksin baru. Antigen rekombinan 38 Kda *Mycobacterium tuberculosis* sebagai kandidat vaksin harus melalui uji imunogenitas. Tujuan studi ini untuk mengidentifikasi apakah antigen 38 Kda dapat menstimuli ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit TCD4⁺ pada kultur PBMC anak dengan kontak TB. Studi ini dilakukan pada kultur PBMC dari 8 kontak TB dan 8 anak sehat yang diinduksi oleh antigen 38 Kda (kelompok 1), PPD (kelompok 2) dan tanpa perlakuan (kelompok 3). Ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit TCD4⁺ diukur dengan *flowcytometry*. Rerata kadar IFN- γ untuk kontak TB tertinggi pada kelompok 3 ($p=0,76$), sedangkan rerata IL-4 tertinggi pada kelompok 2 ($p=0,68$). Rerata IFN- γ untuk kelompok sehat tertinggi pada kelompok 3 ($p=0,78$) sedangkan rerata IL-4 tertinggi pada kelompok 2 ($p=0,32$). Rerata ekspresi IFN- γ dan IL-4 yang diinduksi oleh antigen 38 Kda, masing-masing lebih tinggi pada kontak TB daripada subjek sehat ($p=0,62$ dan $0,39$). Pengaruh respon imun yang protektif ditunjukkan oleh rasio ekspresi IFN- γ dan IL-4 yang lebih dari 1, baik pada kontak TB dan sehat (1,22 dan 1,28). Tidak ada perbedaan signifikan antara perlakuan pemberian antigen 38 kDa, PPD dan tanpa perlakuan. Dapat disimpulkan bahwa antigen 38 Kda dapat menstimuli ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit TCD4⁺ pada kultur PBMC kontak TB.

Kata Kunci: Antigen rekombinan 38 Kda, *Mycobacterium tuberculosis*, IFN- γ , IL-4, limfosit TCD4⁺

ABSTRACT

Controlling the epidemic of tuberculosis in children is a global health priority. Efficacy of BCG is varies widely so the development of new vaccine is needed. The 38 kDa recombinant antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a vaccine candidate must pass immunogenity test. The purpose was to determine that 38 kDa antigen can stimulate expression of IFN- γ and IL-4 lymphocyte TCD4⁺ in PBMC cultures from contact TB children. This was a study on PBMC culture from 8 contact TB and 8 healthy children induced by 38 kDa antigen (group 1), PPD (group 2) and without challenge (group 3). The expression of IFN- γ and IL-4 lymphocyte TCD4⁺ were measured by *flowcytometry*. The highest mean of IFN- γ level for contact TB was in group 3 ($p=0,76$), while the highest expression of IL-4 was in group 2 ($p=0,68$). The highest mean of IFN- γ level for healthy subject was in group 3 ($p=0,78$), while the highest expression of IL-4 was in group 2 ($p=0,32$). Mean of IFN- γ and IL-4 induced by 38 kDa antigen in contact TB were higher than healthy group ($p=0,62$ and $p=0,39$). Protective effect of immune respon was showed by ratio of exspression for IFN- γ and IL-4 more than 1, both in contact TB and health group (1,22 and 1,28). There was no significantly difference between challenge with 38 kDa antigen, PPD and no challenge. The 38 kDa antigen could stimulate the expression of IFN- γ and IL-4 lymphocyte TCD4⁺ in PBMC cultures eventhough.

Keywords: 38 kDa recombinant antigen, IFN- γ , IL-4, lymphocytes TCD4⁺, *Mycobacterium tuberculosis*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 28, No. 4, Agustus 2015; Korespondensi: Iin Trilistiyanti N. Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang, Jl. Jaksa Agung Suprpto 2 Malang, Telp. (0341)366242 Email: iin_junianto@yahoo.com

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Prevalensi penderita TB di Indonesia cukup tinggi yaitu 297 per 100.000 jiwa, dengan tingkat mortalitas 69.000 jiwa/tahun (1,2). Proporsi penderita TB anak diantara seluruh kasus TB pada tahun 2008-2010 berkisar antara 9,4-11,2%. Tuberkulosis pada anak merupakan masalah penting di negara-negara berkembang karena jumlah anak berusia kurang 15 tahun adalah 40-50% dari jumlah seluruh populasi (3-5). Salah satu penyebab banyaknya penderita TB anak dapat disebabkan vaksin yang kurang efektif. Vaksin TB yang paling banyak digunakan sampai saat ini adalah vaksin *Bacillus of Calmette and Guérin* (BCG). Penelitian metaanalisis terhadap 26 penelitian efikasi vaksin BCG didapatkan BCG hanya dapat mengurangi risiko TB sebesar 50% dan daya efikasinya dipengaruhi etnis dan letak geografis (6). Perbedaan genetik pada strain Mtb yang berbeda dapat menimbulkan respons imun yang berbeda pula yang nantinya akan mempengaruhi tingkat keparahan infeksi Mtb (7).

Vaksin BCG saat ini adalah satu-satunya vaksin yang berlisensi untuk mencegah TB dari strain *M. bovis* hidup yang dilemahkan. Vaksin ini bekerja dengan menghasilkan infeksi mikobakteri ringan sampai sistemik yang berlangsung beberapa minggu namun memiliki kekurangan sehingga saat ini dikembangkan vaksin TB baru. Vaksin yang efektif adalah vaksin yang mampu menstimulasi dengan baik sel T limfosit dan sitokin-sitokin yang diperlukan untuk mekanisme proteksi dengan meningkatkan fungsi sel T dan aktivasi makrofag serta memiliki potensi sebagai immuno-therapeutic agents. Vaksin yang ideal harus dapat meningkatkan imunitas protektif (respons sel Th1) tanpa meningkatkan respons inflamasi (8). Beberapa vaksin subunit rekombinan yang sudah diteliti yaitu antigen (Ag) 85, ESAT6, dan antigen 38 kDa. Antigen 38 kDa mengandung 2 epitop sel B spesifik Mtb dan disinyalir merupakan imunogen paling poten karena memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi (9). Antigen 38 kDa yang dikombinasikan dengan CFP-10 menunjukkan peningkatan respons IFN- γ pada penderita TB (10,11). Interleukin 4 merupakan sitokin dari tipe Th2 yang secara umum meningkat pada stadium lanjut TB dan melakukan *downregulate* respon protektif Th2. Pada penyakit yang progresif, IL-4 menyebabkan peningkatan imunopatologi (12).

Penelitian di laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya telah berhasil mengembangkan Ag 38 rekombinan. Antigen 38 kDa rekombinan Mtb dihasilkan dengan cara mengklon dan mengekspresikan gen pab dari Mtb strain lokal pada bakteri *E. coli* BL21-DE3 antigen 38 (13). Pada studi sebelumnya, antigen 38 rekombinan ini dapat menstimulasi IFN- γ , IL-2 pada *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) penderita TB paru BTA positif dewasa (14). Pada penelitian ini, ingin diperluas subjek penelitian pada anak karena belum ada penelitian sebelumnya yang meneliti pada anak. Antigen 38 rekombinan akan dipaparkan pada PBMC anak dengan kontak TB dan anak sehat. Kemudian ekspresi IFN- γ dan IL-4 pada limfosit T CD4⁺ diukur dengan *flow cytometry*. Berdasarkan hasil penelitian pada subjek dewasa bahwa antigen 38 rekombinan dapat menstimulasi sitokin dalam respon imun terhadap TB maka penelitian ini ingin membuktikan hipotesis adalah bahwa Ag 38 rekombinan Mtb dapat menginduksi respons imun seluler baik pada

IFN- γ dan IL-4 pada limfosit T CD4⁺ kultur PBMC anak dengan kontak TB.

METODE

Populasi penelitian ini adalah anak dengan kontak TB yang datang ke Laboratorium/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Saiful Anwar Malang dan memenuhi kriteria inklusi. Kriteria diagnosis TB mengacu pada Pedoman Nasional Tuberkulosis Anak dari UKK Respirologi PP Ikatan Dokter Anak Indonesia. Persetujuan (*informed consent*) didapatkan dari orang tua. Anak dengan kontak TB adalah berusia ≤ 14 tahun, pasien anak dengan gejala/keluhan sesuai sistem skoring TB tetapi dengan nilai tidak mencapai 6 dimana salah satu keluhan harus ada kontak dengan penderita TB dewasa yang kemudian dikonfirmasi dengan tes tuberkulin. Karena bila skoring ≥ 6 , diagnosis mengarah menjadi penderita TB. Ekskusi diberlakukan pada sampel yang memiliki riwayat menderita TB paru/ekstra paru, memiliki penyakit lain yang juga dengan gejala/tanda yang sesuai dengan parameter skoring TB, mendapat terapi steroid, atau menderita penyakit infeksi lain (15). Anak sehat adalah yang berusia ≤ 14 tahun dan tidak memiliki gejala sesuai parameter skoring TB. Kami mengekskusi anak sehat yang memiliki kontak erat dengan penderita TB dewasa dengan BTA (+), menderita gejala/keluhan sesuai dengan parameter skoring TB, atau memiliki riwayat sakit TB. Jumlah sampel masing-masing kelompok 8 pasien. Sampel diperoleh dari Poli Anak dan Ruang Rawat Inap RSUD Dr. Saiful Anwar Malang pada bulan Mei-Juli 2014. Surat keterangan laik etik didapatkan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Antigen 38 rekombinan berasal dari galur lokal. Gen pab diisolasi dari penderita TB paru di Malang, diklon ke plasmid pGEM-Teasy menjadi pMB38. Klon *E. coli* BL21-DE3 yang membawa pMB38 diseleksi di medium yang ditambah dengan X-Gal. Ekspresi pab dilakukan menggunakan pMBhis yang berasal dari pPRoExHTc dibawah kontrol promoter Trc dengan inang *E. coli* BL21-DE3.

Dilakukan isolasi PBMC dan jumlah PBMC dihitung dengan *haemocytometer* dan kemudian dilakukan kultur PBMC. Sebanyak 10^6 PBMC masing-masing dibagi 3 kelompok yaitu kelompok (1) PBMC dikultur dengan antigen rekombinan 38 kDa Mtb $2\mu\text{g/ml}$; (2) kontrol positif, PBMC dikultur dengan PPD $2\mu\text{g/ml}$ dan kelompok (3) kontrol negatif, PBMC dikultur tanpa antigen rekombinan 38 kDa Mtb, maupun PPD. PBMC dikultur dalam inkubator 37°C 5% CO₂ selama 72 jam. Enam jam sebelum dipanen diberikan Brefeldin A dan setelah 72 jam PBMC dipanen. Pellet siap untuk distaining dengan *antibodi cell surface marker* CD4⁺, *staining dengan Intracellular (Cytoplasmic) Marker/Antibodi Sitokin*. Setelah inkubasi ditambahkan *cell staining buffer* sesuai dengan kebutuhan, dihomogenkan, kemudian dipindahkan ke kuvet baca dan siap untuk dibaca dengan *flow cytometry*. Hasil penelitian ditampilkan untuk masing-masing kelompok perlakuan dari masing-masing variabel tergantung (IFN- γ dan IL-4) dengan uji beda, di mana taraf kebermaknaan sebesar $p < 0,05$.

HASIL

Tabel 1 menyajikan karakteristik penderita berdasarkan jenis kelamin, umur, dan gejala klinis. Subjek kontak TB yang berpartisipasi pada penelitian ini sebagian besar memiliki status gizi baik (7 orang) dan 1 orang dengan

status gizi kurang. Malnutrisi pada anak diukur dengan menggunakan persentil berat badan per tinggi badan. Malnutrisi atau gizi kurang merupakan faktor risiko penting berkembangnya TB karena mempengaruhi respon imun terhadap TB. Pada penyakit TB aktif dapat menyebabkan keadaan gizi kurang karena pada TB terjadi penurunan nafsu makan dan peningkatan metabolisme tubuh (16). Batuk yang berlangsung lebih dari 3 minggu merupakan salah satu gejala umum TB anak. Hal yang perlu diperhatikan adalah batuk kronik juga merupakan gejala utama asma yang biasanya bersifat berulang selain adanya kronisitas. Pada subjek kontak, didapatkan 1 orang yang mengalami batuk lama, namun pada sistem penilaian skoring didapatkan skor kurang dari 5. Pada penelitian ini didapatkan kontak dengan tes *mantoux* yang semuanya negatif. Anak dengan kontak TB didefinisikan sebagai anak sehat yang memiliki kontak dengan pasien TB dewasa dengan BTA sputum positif tetapi pada evaluasi sistem skoring didapatkan skor <5 (15). Uji tuberkulin atau tes *mantoux* merupakan alat diagnosis TB yang sudah sangat lama dikenal, tetapi hingga saat ini masih mempunyai nilai diagnostik yang tinggi terutama pada anak dengan sensitivitas dan spesifisitas lebih dari 90% (17).

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik subjek	Kontak TB	Sehat
Jenis kelamin:		
Laki-laki	6/8	6/8
Perempuan	2/8	2/8
Usia (th):		
≤ 5 th	1/8	0/8
> 5 th	7/8	8/8
Uji tuberculin:		
Positif	0/8	0/8
Negatif	8/8	8/8
Demam tanpa sebab jelas:		
Demam	0/8	0/8
Tidak demam	8/8	8/8
Batuk lama:		
Batuk	1/8	0/8
Tidak batuk	7/8	8/8
Pembesaran kelenjar getah bening:		
Ada	0/8	0/8
Tidak ada	8/8	8/8
Foto rontgen sugestif TB:		
Ada	0/8	-
Tidak ada	8/8	-
Pembengkakan tulang/sendi:		
Ada	0/8	0/8
Tidak ada	8/8	0/8
Status gizi:		
Kurang	1/8	0/8
Baik	7/8	8/8

Setelah kultur PBMC ketiga kelompok perlakuan selama 72 jam, dilakukan panen, kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ dengan *flow cytometry*. Beberapa hasil *flow cytometry* seperti tampak pada Gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa baik pada subjek sehat dan kontak, dapat menginduksi

ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺.

Gambar 1. Hasil *flow cytometry* ekspresi IFN- γ limfosit T CD4⁺ pada pemberian antigen rekombinan 38 kDa (A. kontak; B. sehat)

Gambar 2. Hasil *flow cytometry* ekspresi IL-4 limfosit T CD4⁺ pada pemberian antigen rekombinan 38 kDa (A. kontak; B. sehat)

Hasil pemeriksaan ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ dengan *flow cytometry* pada kontak TB dan sehat disajikan pada Tabel 2. Pada kelompok kontak dan sehat, ekspresi IFN- γ tertinggi pada perlakuan tanpa antigen sedangkan ekspresi IL-4 tertinggi pada perlakuan dengan PPD.

Tabel 2. Ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺

Parameter	Perlakuan	Kontak		Sehat	
		Rerata (SD)	p	Rerata (SD)	p
IFN- γ	(-) Ag	16,72 (9,30)	0,76	12,62 (4,96)	0,78
	(+) PPD	14,16 (10,99)		11,65 (6,32)	
	(+) Ag 38 kDa	12,84 (11,05)		10,69 (4,78)	
IL-4	(-) Ag	8,90 (7,98)	0,68	9,14 (3,85)	0,32
	(+) PPD	14,46 (15,43)		12,74 (8,29)	
	(+) Ag 38 kDa	13,81 (15,93)		8,57 (4,32)	

Ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ pada perlakuan pemberian Ag Rekombinan 38 kDa lebih tinggi pada kelompok kontak daripada kelompok sehat (Tabel 3). Rasio ekspresi IFN- γ dengan IL-4 limfosit T CD4⁺ baik pada kelompok kontak dan sehat adalah lebih dari 1.

Tabel 3. Rata-rata prosentase ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ pada Pemberian Ag Rekombinan 38 kDa

Parameter	Rata-rata (SD)		p
	Sehat	Kontak	
IFN- γ	10,69 (4,78)	12,84 (11,06)	0,62
IL-4	8,57 (8,58)	13,81 (15,93)	0,39
IFN- γ % IL-4	1,28	1,22	

DISKUSI

Subjek kontak TB yang berpartisipasi pada penelitian ini sebagian besar memiliki status gizi baik (7 orang) dan 1 orang dengan status gizi kurang. Malnutrisi pada anak diukur dengan menggunakan persentil berat badan per tinggi badan. Malnutrisi atau gizi kurang merupakan faktor risiko penting berkembangnya TB karena mempengaruhi respon imun terhadap TB. Pada penyakit TB aktif dapat menyebabkan keadaan gizi kurang karena pada TB terjadi penurunan nafsu makan dan peningkatan metabolisme tubuh (16).

Batuk yang berlangsung lebih dari 3 minggu merupakan salah satu gejala umum TB anak. Hal yang perlu diperhatikan adalah batuk kronik juga merupakan gejala utama asma yang biasanya bersifat berulang selain adanya kronisitas (15). Pada subjek kontak, didapatkan 1 orang yang mengalami batuk lama, namun pada sistem penilaian skoring didapatkan skor kurang dari 6. Pada penelitian ini didapatkan kontak dengan tes *mantoux* yang semuanya negatif. Anak dengan kontak TB didefinisikan sebagai anak sehat yang memiliki kontak dengan pasien TB dewasa dengan BTA sputum positif tetapi pada evaluasi sistem skoring didapatkan skor <6. Uji tuberkulin atau tes *mantoux* merupakan alat diagnosis TB yang sudah sangat lama dikenal, tetapi hingga saat ini masih mempunyai nilai diagnostik yang tinggi terutama pada anak dengan sensitivitas dan spesifisitas lebih dari 90% (17).

Dalam respon imun adaptif terhadap Mtb, setelah makrofag dan sel dendritik mempresentasikan antigen dan membawanya ke permukaan, patogen ini akan dikenali oleh sel limfosit T melalui berbagai molekul yang terdapat di permukaan makrofag dan sel dendritik. Bila makrofag dipresentasikan oleh MHC kelas II akan mengaktifkan limfosit T CD4⁺. Dalam respon imun adaptif, limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ merupakan subpopulasi yang sangat penting dalam mengendalikan infeksi Mtb (18). Pada penelitian ini kami mendapatkan bahwa pada ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ pada kelompok kontak, tidak terdapat perbedaan yang bermakna, baik pada pemberian antigen antigen 38 kDa rekombinan, PPD, maupun tanpa pemberian antigen. Pada ekspresi IFN- γ limfosit T CD4⁺, ekspresi tertinggi didapatkan pada perlakuan tanpa antigen, diikuti tanpa antigen, kemudian antigen rekombinan 38 kDa. Sedangkan ekspresi tertinggi IL-4 limfosit T CD4⁺ pada perlakuan PPD, diikuti antigen rekombinan 38 kDa kemudian tanpa antigen. Antigen rekombinan antigen 38 kDa maupun PPD mempunyai pengaruh terhadap sistem imunitas yaitu mampu menginduksi limfosit T CD4⁺ dalam mengekspresikan IFN- γ dan IL-4 pada kelompok kontak. Dalam respon imun adaptif, CD4⁺ dan CD8⁺ sangat penting untuk mengendalikan infeksi Mtb (19). Namun disini juga terdapat hasil ekspresi IFN- γ limfosit T CD4⁺ yang lebih tinggi pada perlakuan tanpa antigen dibandingkan perlakuan pemberian antigen antigen 38 kDa rekombinan maupun PPD walaupun secara statistik tidak signifikan. Kemungkinan hal ini bisa disebabkan karena sel PBMC yang tanpa perlakuan antigen sebelumnya sudah terpapar dengan PPD (tes *mantoux*).

Hasil penelitian ini menunjukkan pada subjek sehat terdapat ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ yang tidak berbeda bermakna, baik pada pemberian antigen 38 kDa, PPD, maupun tanpa pemberian antigen. Ekspresi tertinggi IFN- γ limfosit T CD4⁺ pada perlakuan tanpa antigen, diikuti PPD, kemudian antigen 38 kDa. Ekspresi tertinggi IL-4 limfosit T CD4⁺ pada perlakuan PPD diikuti tanpa antigen kemudian antigen antigen 38 kDa. Antigen 38 kDa maupun PPD mempunyai pengaruh terhadap sistem imunitas yaitu mampu menginduksi limfosit T CD4⁺ dalam mengekspresikan IFN- γ dan IL-4 pada kelompok sehat. Adanya ekspresi IFN- γ dan IL-4 Limfosit T CD4⁺ pada kelompok sehat pada penelitian ini, kemungkinan juga menunjukkan bahwa kelompok sehat yang dipakai pada penelitian ini, sistem imunnya telah mengenali kuman TB sebelumnya artinya telah terpapar dengan kuman TB sebelumnya. Dari anamnesis, seluruh sampel sehat pada penelitian ini telah mendapatkan imunisasi BCG dengan hasil tes *mantoux* negatif. Walaupun kelompok sehat yang dimaksud dalam penelitian ini adalah orang sehat yang tidak pernah kontak dengan penderita TB, tetapi pada daerah dengan prevalensi yang tinggi, seseorang sangat mungkin telah terpapar dengan kuman TB meskipun dalam anamnesanya tidak didapatkan adanya kontak dengan penderita TB sebelumnya (4).

Subjek sehat dan kontak TB merupakan populasi yang memiliki respon imun yang baik terhadap paparan antigen 38 kDa Mtb yang bersifat antigenik. Respon imun yang baik terhadap paparan antigen 38 kDa Mtb ini tampak dengan adanya rasio ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ yang lebih dari 1 baik pada subjek sehat dan kontak TB. Hal ini menunjukkan bahwa dalam hubungannya dengan cross regulasi antara Th1 dan Th2, keseimbangan lebih

didominasi oleh ekspresi Th1 yang dalam hal ini diwakili oleh ekspresi IFN- γ . Pengembangan Th1 dianggap berkontribusi sebagai pelindung terhadap TB (20). Pengaruh pemberian antigen 38 kDa Mtb terhadap ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺ mendukung teori bahwa terdapat ligand spesifik untuk sel T pada antigen 38 kDa Mtb yang dapat mengaktivasi sel T CD4⁺ pada subjek sehat dan kontak TB. Walaupun demikian, hal ini perlu dibuktikan lebih lanjut pada masing-masing subset sel T (19).

Tavares et al, meneliti respon imun sel T dari kombinasi 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/PT-64 dan ESAT-6/CFP-10 (masing-masing terkait dengan antigen tunggal Mtb) pada individu di daerah TB endemik. ELISA digunakan untuk mendeteksi produksi IFN- γ pada PBMC dengan antigen tunggal dan kombinasi dalam panel 105 orang: 38 pasien tuberkulosis (6 tidak diobati dan 32 diobati) dan 67 kontrol sehat dengan tes kulit tuberkulin positif atau negatif (TST). Pasien TB Brasil sangat mengenali ESAT-6 (66%), namun respon kombinasi meningkat dengan urutan sebagai berikut: ESAT-6/MPT-64 (89%) > ESAT-6/CFP-10 (73%) > 38 kDa/CFP-10 (70%), kombinasi terakhir menunjukkan spesifisitas tertinggi (TST⁺=42% dan TST⁺=83%). Rata-rata produksi IFN- γ pada pasien TB secara signifikan lebih tinggi untuk 38 kDa/CFP-10 ($p=0.012$) dan 38 kDa/MPT-64 ($P<0,035$), bila dibandingkan dengan antigen tunggal. Tidak satu pun dari kombinasi mampu membedakan pasien TB dari kontrol TST⁺; tapi 38 kDa/CFP-10 menunjukkan signifikansi borderline ($p=0,053$). Serupa dengan kombinasi ESAT-6/CFP-10, respon IFN- γ terhadap 38 kDa/CFP-10 menunjukkan peningkatan kecenderungan pada pasien yang diobati, meskipun tidak signifikan ($p=0,16$). Penelitian ini menunjukkan untuk pertama kalinya bahwa 38 kDa/CFP-10 memiliki sensitivitas prediksi untuk TB pasien yang mirip dengan kombinasi ESAT-6/CFP-10 dan juga respon perbaikan yang signifikan yang berkaitan dengan antigen tunggal dengan reaktivitas lebih selektif diantara individu dengan TST positif. Hasil penelitian ini dapat berpotensi sebagai alat diagnostik untuk infeksi TBC (21).

Penelitian yang dilakukan Shams et al menggunakan PBMC yang berasal dari subjek sehat yang distimulasi oleh heat killed Mtb mendapatkan hasil yang sama dengan masa kultur PBMC 72 jam dimana respon sel T CD4⁺ dalam mensintesis IFN- γ dilihat dengan metode Elispot (22). Heuer et al melakukan penelitian dengan menguji kapasitas stimulasi selektif antigen Mtb pada monosit khususnya sel dendritik maturasi dan produksi sitokin. Penanda maturasi sel dendrit yaitu CD80, CD86 dan CD83 diregulasi oleh dan antigen terkait H37Ra dan, antigen 30-kDa (dari kompleks Ag85 B) dan antigen 38-kDa Mtb hanya sebagian diinduksi oleh penanda tersebut. Antigen 30-kDa dan 38-kDa juga menstimulasi sekresi IL-4 pada limfosit sel T CD4⁺ setelah stimulasi sekunder dibandingkan dengan H37Ra dan H37Rv. Penelitian ini menyimpulkan bahwa antigen 30-kDa dan 38-kDa Mtb hanya menginduksi maturasi sel dendrit secara parsial yang menunjukkan pergeseran respon imun ke arah Th2 (23).

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi IFN- γ limfosit T CD4⁺ pada subjek kontak setelah inkubasi dengan pemberian antigen rekombinan 38 kDa Mtb lebih tinggi daripada kelompok sehat walaupun tidak signifikan. Hal

ini menunjukkan bahwa ekspresi IFN- γ limfosit T CD4⁺ pada pasien sehat kurang berespon terhadap pemberian antigen rekombinan 38 kDa Mtb jika dibandingkan dengan subjek kontak. Hasil penelitian Mc Dyer et al menunjukkan bahwa PBMC dari subjek penderita TB menunjukkan sintesis IFN- γ yang lebih rendah dari subjek sehat (24).

Ekspresi IL-4 limfosit T CD4⁺ pada subjek kontak setelah inkubasi dengan pemberian antigen 38 kDa rekombinan Mtb juga lebih tinggi daripada kelompok sehat walaupun tidak signifikan. Hal ini berarti bahwa ekspresi IL-4 limfosit T CD4⁺ pada pasien sehat kurang berespon terhadap pemberian antigen 38 kDa rekombinan Mtb jika dibandingkan dengan subjek kontak. Hasil analisis statistik yang tidak bermakna dapat disebabkan jumlah sampel yang terbatas. Pada penelitian ini, tidak dapat dilakukan duplikasi pada saat kultur sel karena pada sampel anak hanya dapat diambil 3 ml darah sehingga jumlah sel yang didapatkan sekitar 500.000 sel. Kemungkinan ini menyebabkan standar deviasi yang besar sehingga diperlukan perbanyakan sampel untuk menurunkan standar deviasi. Selain itu dapat juga disebabkan dosis antigen yang sedikit, atau waktu paparan yang kurang tepat. Pada penelitian ini juga didapatkan ekspresi CD4⁺ yang cukup besar sehingga kemungkinan juga dapat menjadi faktor perancu hasil ekspresi IFN- γ dan IL-4.

Interferon-gamma merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang memainkan peran protektif pada infeksi intraseluler. Interleukin 4 merupakan salah satu sitokin anti inflamasi atau imunosupresi sehingga pergeseran respon ke arah Th2 yang ditunjukkan oleh peningkatan IL-4 akan memberikan pengaruh negatif pada respon kekebalan tubuh. Efek merugikan IL-4 pada infeksi intraseluler dianggap berasal dari penghambatan produksi sitokin IFN- γ dan aktivasi makrofag (20,25).

Bila sel CD4⁺ diaktifkan oleh suatu antigen yang merupakan trigger *T cell receptor* maka sel tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi efektor CD4⁺ Th1 maupun CD4⁺ Th2. Dominasi proliferasi dan diferensiasi menjadi efektor CD4⁺ Th1 maupun CD4⁺ Th2 tergantung pada lingkungan sitokin yang berperan (20,26). Pengembangan Th1 dianggap berkontribusi sebagai pelindung terhadap TB yang dalam hal ini bisa dilihat dari rasio Th1 dengan Th2 (20,27,28). Untuk mengetahui apakah antigen 38 kDa ini bisa memberikan perlindungan terhadap infeksi Mtb sehingga bisa menjadi kandidat vaksin yang baik, salah satunya diperlukan penghitungan rasio antara Th1 dengan Th2 dalam hal ini rasio ekspresi IFN- γ dengan IL-4 limfosit T CD4⁺ baik subjek sehat maupun sakit pada perlakuan pemberian antigen 38 kDa. Pada penelitian ini menunjukkan hasil lebih dari 1. Dalam hubungannya dengan cross regulasi antara Th1 dan Th2 keseimbangan lebih didominasi oleh ekspresi Th1 yang dalam hal ini diwakili oleh ekspresi IFN- γ .

Penelitian ini hanya melihat ekspresi IFN- γ dan IL-4 limfosit T CD4⁺, sedangkan dalam respon imun terhadap TB melibatkan banyak sitokin antara lain IL-2, IL-12, TNF- α dan lain-lain sehingga belum bisa menggambarkan pengaruh Ag 38 kDa secara keseluruhan pada respon imun TB. Jumlah sampel yang terbatas pada penelitian ini menyebabkan *standard deviation* tinggi. Disamping itu waktu antara pengambilan sampel darah untuk kultur PBMC dengan pemeriksaan tes *mantoux* tidak sama pada masing-masing sampel kelompok kontak, sehingga dimungkinkan dapat mempunyai pengaruh pada respon

imun terhadap TB.

Sebagai kesimpulan, antigen Ag38 kDa rekombinan Mtb dapat menginduksi respon imun seluler dalam hal ini ekspresi IFN- γ dan IL-4 pada limfosit T CD4+ kultur PBMC anak dengan kontak TB dan anak sehat. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi IFN- γ dan IL-4 pada

limfosit T CD4+ kultur PBMC antara anak dengan kontak TB dengan anak sehat yang dipaparkan dengan antigen 38 kDa rekombinan Mtb. Penelitian ini juga tidak menemukan perbedaan bermakna antara perlakuan paparan Ag38 kDa rekombinan Mtb, PPD, dan tanpa paparan Ag, baik pada kelompok kontak maupun sehat.

DAFTAR PUSTAKA

- Brooks G, Carroll KC, Butel J, and Morse S. *Jawets, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. USA: McGraw-Hill Medical; 2007: p. 257-289.
- World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2013*. Geneva: WHO Press; 2013.
- Kartasasmita CB dan Basir D. *Tuberkulosis*. Di dalam: Rahajoe NN, Supriyatno B, dan Setyanto DB (Eds). Buku Ajar Respirologi Anak edisi 1. Jakarta: Sagung Seto; 2010: hal. 162-168.
- Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Laporan Situasi Terkini Perkembangan Tuberculosis di Indonesia Januari-Juni 2011*. (Online) 2011. <http://www.tbindonesia.or.id/opendir/Dokumen/2011/IndonesiaReport2011.pdf> [diakses tanggal 5 Maret 2014].
- Horsburgh CR. *Epidemiology of Tuberculosis*. (Online) 2013. <http://www.uptodate.com>. [diakses tanggal 6 Maret 2014].
- Zhang W, Zhang Y, Zheng H, et al. *Genome Sequencing and Analysis of BCG Vaccine Strains*. PLoS One. 2013; 8(8): e71243-71243.
- Nagata T and Koide Y. *Immune Responses Against Mycobacterium Tuberculosis and the Vaccine Strategies*. In: Cardona PJ (Ed). *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. Kroasia: InTech; 2012: 391-494.
- Sharma S and Bose M. *Role of Cytokines in Immune Response to Pulmonary Tuberculosis*. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2001; 19(3): 213-219.
- Wilkinson RJ, Hasløv K, and Rappuoli R. *Evaluation of the Recombinant 38-Kilodalton Antigen of Mycobacterium tuberculosis as a Potential Immunodiagnostic Reagent*. Journal of Clinical Microbiology. 1997; 35(3): 553-557.
- Olsen AW, Hansen PR, Holm A, and Andersen P. *Efficient Protection Against Mycobacterium Tuberculosis by Vaccination with a Single Subdominant Epitope from the ESAT-6 Antigen*. European Journal of Immunology. 2000; 30(6): 1724-1732.
- McShane H, Brookes R, Gilbert SC, and Hill AV. *Enhanced Immunogenicity of CD4(+) T-Cell Responses and Protective Efficacy of a DNA-Modified Vaccinia Virus Ankara Prime-Boost Vaccination Regimen for Murine Tuberculosis*. Infection and Immunity. 2001; 69(2): 681-686.
- Vidyanari M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, and Narayanan PR. *Interferon Gamma (IFN- γ) & Interleukin-4 (IL-4) Gene Variants & Cytokine Levels in Pulmonary Tuberculosis*. Indian Journal of Median Research. 2006; 124(4): 403-410.
- Raras TYM and Lyrawati D. *Cloning and Expression of Pab Gene of M.tuberculosis Isolated from Pulmonary TB Patient in E.coli DH5*. Medical Journal of Indonesia. 2011; 20: 247-254.
- Maimun A RT dan Astuti TW. *Uji Immunogenitas Tiga Antigen Rekombinan Kandidat Vaksin Mycobacterium Tuberculosis terhadap Sekresi Interferon Gamma (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Peripheral Blood Mononuclear Cells dan Immunoglobulin Serum pada Penderita Tuberculosis Paru*. Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory. [In press]. 2013.
- Rahajoe NN, Basir D, Makmuri MS, dan Kartasasmita CB. *Pedoman Nasional Tuberculosis Anak*. Edisi 2. Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2008; hal. 3-115.
- Sitienei KH, Kipruto H, Borus P, Nyambati V, et al. *Predictors of Low Body Mass Index among Patients with Smear Positive Pulmonary Tuberculosis in Kenya*. International Journal of Tropical Disease & Health. 2014; 4(4): 427-436.
- Kusuma HMSC dan Setiawati L. *Imunologi Infeksi Mycobacterium tuberculosis*. Di dalam: Rahajoe NN, Supriyatno B, Setyanto DB, (ed). Buku Ajar Respirologi Anak edisi 1. Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2010: hal. 178-193.
- Hanekom WA, Abel B, and Scriba TJ. *Immunological Protection against Tuberculosis*. South African Medical Journal. 2007; 97(10pt2): 973-977.
- Skold M and Behar SM. *Role of CD1d Restricted NKT Cells in Microbial Immunity*. Infection and Immunity. 2003; 71(10): 5447-5455.
- Raja A. *Immunology of Tuberculosis*. Indian Journal of Medical Research. 2004; 120(4): 213-232.
- Tavares RC, Salgado J, Moerira VB, et al. *Interferon Gamma Response to Combinations 38 Kda/CFP-10, 38 Kda/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP 10, Each Related to a Single Recombinant Antigen of Mycobacterium Tuberculosis in Individuals from Tuberculosis Endemic Areas*. Microbiology Immunology. 2007; 51(3): 289-296.
- Shams H, Wize B, Weis SE, Samten B, and Barnes PF. *Contribution of CD8+ T Cells to Gamma Interferon Production in Human Tuberculosis, Infection and Immunity*. Infection and Immunity. 2001; 69(5): 3497-3501.
- Heuer M, Behlich AS, Lee JS, Ribechini E, Jo EK, and Lutz MB. *The 30-Kda And 38-Kda Antigens from Mycobacterium Tuberculosis Induce Partial Maturation of Human Dendritic Cells Shifting CD4+ T Cell Responses Towards IL-4 Production*. BioMed Central Immunology. 2013; 14: 48.

24. McDyer JF, Hackley HM, Walsh TE, Cook JL, and Seder RA. *Patients with Multidrug Resistant Tuberculosis with Low CD4+ T Cell Counts have Impaired Th1 Responses*. Journal of Immunology. 1997; 158(1): 492-500.
25. Nolan A, Fajardo E, Huie ML, et al. *Increased Production of IL-4 and IL-12 from Bronchoalveolar Lavage Cells are Biomarkers of Mycobacterium Tuberculosis in the Sputum*. PloS One. 2013; 8(3): e59461.
26. Zhu J, Yamane H, and Paul WE. *Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations*. The Annual Review of Immunology. 2010; 28: 445-489.
27. Kaufmann SH. *How can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis?* Nature Reviews Immunology. 2001; 1(1): 20-30.
28. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, and Torres M. *Human Immunity to M Tuberculosis: T Cell Subsets and Antigen Processing*. Tuberculosis. 2003; 83(1-3): 98-106.