

JURNAL RESPIROLOGI INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology



Kadar Kotinin Urin dan CO Ekspirasi pada Perempuan Dewasa yang Terpajan Asap Rokok di Lingkungan Rumah

Hubungan Lesi Tuberkulosis Paru Dengan Diabetes Melitus Terhadap Kadar HbA1c

Uji Immunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Galur Indonesia): Ekspresi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4⁺ Pada Kultur PBMC

Pengaruh *Allopurinol* Terhadap Kadar *Glutathione Sulfhydryl* (GSH), *Six Minute Walking Test*, dan Skor CAT Pasien PPOK Stabil

Prevalensi Ototoksik pada Pasien Tuberkulosis Resistan Obat dan Faktor-Faktor yang Berhubungan di Rumah Sakit Umum Pusat Persahabatan

Digital Index Jari Tangan dengan Diagnosis Jari Tabuh: Cara Pengukuran untuk Menentukan Diagnosis Jari Tabuh

Hubungan Pola Kuman dengan Derajat Obstruksi (VEP₁) pada Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK) Eksaserbasi Akut

Infeksi Jamur Paru di Indonesia: Situasi Saat Ini dan Tantangan di Masa Depan

JURNAL RESPIROLOGI INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology

SUSUNAN REDAKSI

Penasehat

M. Arifin Nawas
Faisal Yunus

Penanggung Jawab / Pemimpin Redaksi

Feni Fitriani

Wakil Pemimpin Redaksi

Winariani

Anggota Redaksi

Amira Permatasari Tarigan
Jamal Zaini
Farih Raharjo
Mia Elhidsi
Ginangjar Arum Desianti
Irandi Putra Pratomo

Sekretariat

Yolanda Handayani
Suwondo
SST : Surat Keputusan Menteri Penerangan RI
No.715/SK/DitjenPPG/SST/1980 Tanggal 9 Mei 1980

Alamat Redaksi

PDPI Jl. Cipinang Bunder, No. 19, Cipinang Pulo Gadung
Jakarta Timur 13240 Telp: 02122474845
Email : editor@jurnalrespirologi.org
Website : <http://www.jurnalrespirologi.org>

Diterbitkan Oleh

Perhimpunan Dokter Paru Indonesia (PDPI)
Terbit setiap 3 bulan (Januari, April, Juli & Oktober)

Jurnal Respirologi Indonesia

Akreditasi A
Sesuai SK Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia
Nomor: 2/E/KPT/2015 Tanggal 1 Desember 2015
Masa berlaku 15 Desember 2015 - 15 Desember 2020

JURNAL RESPIROLOGI INDONESIA

Majalah Resmi Perhimpunan Dokter Paru Indonesia
Official Journal of The Indonesian Society of Respiriology

VOLUME 39, NOMOR 3, Juli 2019

DAFTAR ISI

Artikel Penelitian

- Kadar Kotinin Urin dan CO Ekspirasi pada Perempuan Dewasa yang Terpajan Asap Rokok di Lingkungan Rumah 140
Herman Suryatama, Feni Fitriani, Sita Andarini, Agus Dwi Susanto, Achmad Hudoyo
- Hubungan Lesi Tuberkulosis Paru Dengan Diabetes Melitus Terhadap Kadar HbA1c 154
Dana Jauhara Layali, Bintang YM Sinaga, Parluhutan Siagian, Putri C. Eyanoer
- Uji Imunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Galur Indonesia): Ekspresi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4+ Pada Kultur PBMC 160
Eko Prasetyo, Triwahju Astuti, Nunuk Sri Muktiati, Maimun Z Arthamin
- Pengaruh *Allopurinol* Terhadap Kadar *Glutathione Sulfhydryl* (GSH), *Six Minute Walking Test*, dan Skor CAT Pasien PPOK Stabil 169
Samuel, Suradi, Yusup Subagio Sutanto
- Prevalensi Ototoksik pada Pasien Tuberkulosis Resistan Obat dan Faktor-Faktor yang Berhubungan di Rumah Sakit Umum Pusat Persahabatan 180
Ismulat Rahmawati, Fathiyah Isbaniah, Heidy Agustin, Raden Ena Sarikencana
- Digital Index* Jari Tangan dengan Diagnosis Jari Tabuh: Cara Pengukuran untuk Menentukan Diagnosis Jari Tabuh 196
Rahardjo Darmanto Djojodibroto, Asri Said, Nurul Shahirah Abdul Shukor, Sim Chun Yang
- Hubungan Pola Kuman dengan Derajat Obstruksi (VEP₁) pada Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK) Eksaserbasi Akut 204
Rianti Tarigan, Amira P. Tarigan, Dian Dwi Wahyuni, Putri C. Eyanoer
- ### Tinjauan Pustaka
- Infeksi Jamur Paru di Indonesia: Situasi Saat Ini dan Tantangan di Masa Depan 210
Anna Rozaliyani, Anwar Jusuf, Priyanti ZS, Erlina Burhan, Diah Handayani, Henie Widowati, Satria Pratama, Findra Setianingrum

Uji Immunogenitas Protein Rekombinan Fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Galur Indonesia): Ekspresi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4⁺ Pada Kultur PBMC

Eko Prasetyo¹, Triwahju Astuti¹, Nunuk Sri Muktiati¹, Maimun Z Arthamin²

¹Departemen Pulmonologi dan Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang

²Department Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Rumah Sakit Saiful Anwar, Malang

Abstrak

Latar Belakang: Vaksinasi *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) belum dapat memberikan perlindungan terhadap infeksi tuberculosis (TB) pada orang dewasa. Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) sebagai kandidat vaksin dapat merangsang respon imun tubuh. Interleukin-17 (IL-17), tumor necrosis factor- α (TNF- α) dan cluster of differentiation 4⁺ (CD4⁺) berperan melawan TB. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb mampu merangsang ekspresi TNF- α , IL-17 dan sel T CD4⁺ pada kultur peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Metode: Desain penelitian ini adalah studi eksperimental dengan jumlah sampel penelitian tiap kelompok sebanyak 8 subjek. Masing subjek adalah sehat, kontak TB dan pasien TB diambil sampel darah tepi dan diberikan rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb. Kadar TNF- α sel T CD4⁺ diukur dengan metode enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Flow cytometry digunakan untuk mengukur konsentrasi IL-17 dan sel T CD4⁺. Masing-masing subjek juga diberi perlakuan tanpa antigen dan dengan antigen purified protein derivative (PPD).

Hasil: Tidak didapatkan peningkatan bermakna pada pemberian protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb dibandingkan tanpa antigen pada ekspresi TNF- α CD4⁺ ($P=0,202$), ekspresi IL-17 CD4⁺ ($P=0,994$) dan presentase sel T CD4⁺ ($P=0,183$). Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb mampu merangsang ekspresi TNF- α CD4⁺ pada kelompok subjek sehat ($29,91 \pm 1,23$ pg/ml), kontak TB ($32,21 \pm 4,02$ pg/ml) dan pasien TB ($33,35 \pm 8,41$ pg/ml). Ekspresi IL-17 CD4⁺ pada subjek sehat $33,24 \pm 39,01\%$, kontak TB $23,88 \pm 21\%$ dan pasien TB $51,93 \pm 36\%$. Ekspresi sel T CD4⁺ pada subjek sehat sebesar $30,64 \pm 7,63\%$, kontak TB $24,58 \pm 5,24\%$ dan pasien TB $40,73 \pm 2,63\%$.

Kesimpulan: Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb dapat merangsang produksi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4⁺ pada semua subjek. Ekspresi TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4⁺ pada subjek sehat, menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 berpotensi sebagai kandidat vaksin TB. (*J Respir Indo*. 2019; 39(3): 160-8)

Kata kunci: Fusi ESAT-6/CFP-10, IL-17, sel T CD4⁺, TNF- α , *Mycobacterium tuberculosis*

Immunogenicity Test of ESAT-6/CFP-10 *Mycobacterium tuberculosis* (Indonesian Strain) Recombinant Protein Fusion: TNF- α , IL-17 and CD4⁺ T Cells Expression in PBMC Culture

Abstract

Background: *Bacillus Calmette Guérin* vaccination has not provided protection against TB in adults. ESAT-6/CFP-10 Mtb recombinant protein fusion as a vaccine candidate can stimulate the body's immune response. Interleukin-17, TNF- α and CD4⁺ play a major role against TB. This study aims to determine that the recombinant protein fusion ESAT-6/CFP-10 Mtb can stimulate TNF- α , IL-17 and CD4⁺ T cells expression in PBMC culture.

Methods: Design of this study is experimental study. Number of research sample per group of 8 subjects. The subjects were healthy, TB contact and TB patients taken their peripheral blood sample and treated with ESAT-6/CFP-10 Mtb recombinant protein fusion. TNF- α CD4⁺ T cells were measured by ELISA. Flow cytometry is used to measure IL-17 and CD4⁺ T cells. As standard protocol research on tuberculosis vaccine, each subject also treated without antigen and with PPD.

Results: There was no significant increase in the administration of ESAT-6/CFP-10 Mtb fusion compared without antigen on TNF- α expression of CD4⁺ ($P=0.202$), expression of IL-17 CD4⁺ ($P=0.994$) and percentage of CD4⁺ T cells ($P=0.183$). ESAT-6/CFP-10 Mtb Fusion was able to stimulate expression of TNF- α CD4⁺ in healthy subjects (29.91 ± 1.23 pg/ml), TB contact (32.21 ± 4.02 pg/ml) and TB patients (33.35 ± 8.41 pg/ml). Expression IL-17 CD4⁺ in healthy subjects ($33.24 \pm 39.01\%$), TB contact ($23.88 \pm 21\%$) and TB patients ($51.93 \pm 36\%$). CD4⁺ T cell expression in healthy subjects $30.64 \pm 7.63\%$, TB contact $24.58 \pm 5.24\%$ and TB patients ($40.73 \pm 2.63\%$).

Conclusions: ESAT-6/CFP-10 Mtb recombinant proteins fusion may stimulate the production of TNF- α , IL-17 CD4⁺ and CD4⁺ T cells in all subject. Expression of TNF- α , IL-17 CD4⁺ and CD4⁺ T cells in the healthy group, indicated that the ESAT-6/CFP-10 recombinant protein fusion has the potential as vaccine candidate. (*J Respir Indo*. 2019; 39(3): 160-8)

Key word: ESAT-6/CFP-10 Fusion, IL-17, CD4⁺ T cells, TNF- α , *Mycobacterium tuberculosis*

Korespondensi: Eko Prasetyo

Email: dr.eko.pn@gmail.com; No. HP: 087772291376

PENDAHULUAN

Pada tahun 2015 tuberkulosis (TB) menjadi penyebab global utama kematian yang diakibatkan penyakit menular. Terdapat 9,6 juta kasus TB baru dan 1,5 juta kematian akibat TB diperkirakan yang terjadi di seluruh dunia. Berdasarkan *global tuberculosis report* oleh *World Health Organization* (WHO) didapatkan bahwa peringkat Indonesia naik ke peringkat ke-2 setelah India yang sebelumnya peringkat ke-4 dunia dengan 1 juta kasus TB baru pada tahun 2015. Intervensi baru termasuk pengobatan yang lebih singkat dan tidak memiliki efek samping, diagnosis yang lebih baik serta vaksin yang lebih efektif diperlukan untuk mencapai target global mengenai pengurangan 90% insiden TB pada tahun 2035.¹

Vaksinasi adalah intervensi yang paling efektif untuk mengendalikan penyakit menular. Keberhasilan eradikasi cacar, pest dan polio dimungkinkan karena tersedianya vaksin yang sangat efektif. Vaksin *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) yang pertama kali diperkenalkan pada tahun 1921, menunjukkan efektivitas yang terbatas dalam mencegah TB paru dan penularan *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) orang dewasa. Target eradikasi TB tahun 2035 akan berhasil jika vaksin yang lebih efektif tersedia pada tahun 2025.²

Komponen antigen yang tidak didapatkan pada vaksin BCG menjadi perhatian terhadap penelitian vaksin TB. Vaksin BCG adalah galur *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan. Mahairas dkk pada tahun 1996 berhasil mengidentifikasi *genomic region* yang membedakan Mtb dan BCG serta melaporkan hilangnya *genome region of difference 1* (RD) 1 dan RD3 pada BCG.³

RD1 mengekspresikan sistem Esx-1 dan mengkodekan 2 protein, yaitu *culture filtrate protein of 10 kDa* (CFP-10) dari gen Esx-B dan *early secreted antigenic target protein 6* (ESAT-6) dari gen Esx-A yang merupakan *immunogenic protein*. Protein ESAT-6 dan CFP-10 pada Mtb diidentifikasi pada tahun 1991. Maue dkk tahun 2007 dengan dasar tersebut telah menggunakan kombinasi (fusi) protein keduanya dalam penelitian uji hewan dan telah

membuktikan bahwa kombinasi kedua protein tersebut akan saling menguatkan dalam menghindari proses eliminasi awal oleh sistem imun tubuh dan hasil akhirnya akan merangsang respon imun terutama respons imun seluler.^{3,4}

Respons imun terhadap Mtb lebih banyak diperankan oleh sel T dibandingkan dengan sel B. Pada manusia, peran sel T *cluster of differentiation 4* (CD4⁺) menjadi perhatian pada pasien HIV karena terdapat penurunan jumlah sel T CD4⁺ namun risiko infeksi Mtb meningkatkan. Fungsi utama sel T CD4⁺ adalah menghasilkan sitokin tipe 1.⁵

Sel T *helper* tipe 1 (Th1) polifungsional yang secara simultan menghasilkan interferon gamma (IFN- γ), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan interleukin-2 (IL-2) bermanfaat dalam mengendalikan infeksi Mtb. Sel CD4⁺ Th1 mengaktifkan fungsi efektor pada makrofag yang mengendalikan Mtb intraselular sebagai perlindungan terhadap Mtb. Sitokin TNF- α memiliki peran awal dalam proses pengendalian infeksi TB yang bekerja pada berbagai sel. Sitokin ini bekerja bersinergi dengan IFN- γ yang merangsang produksi *reactive nitrogen intermediates* (RNI) yang memediasi fungsi tuberkulostatik dari makrofag. Sitokin TNF- α juga merangsang migrasi sel imun ke tempat infeksi dan berkontribusi terhadap pembentukan granuloma, yang mampu mengendalikan perkembangan penyakit.⁶

Beberapa penelitian melaporkan peranan sel T *helper 17* (Th17) pada respon imun terhadap infeksi Mtb. Sel Th17 yang mampu menghasilkan interleukin-17 (IL-17), terlibat dalam perlindungan kekebalan terhadap Mtb terutama karena efek sitokin ini dalam menarik dan mengaktifkan neutrofil.⁵ Sel Th17 telah terlibat dalam perlindungan terhadap TB pada tahap awal karena kapasitas mereka untuk merekrut limfosit, monosit dan Th1 ke lokasi pembentukan granuloma.⁶

Penelitian sebelumnya oleh Setyobudi dkk tahun 2014 dengan antigen protein 38 kd Mtb galur Indonesia sebagai kandidat vaksin menunjukkan hasil peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi IL-2 dan penurunan anti inflamasi IL-4. Sebagai kelanjutan untuk membandingkan dengan protein Ag Mtb yang

sudah ada kami menguji protein rekombinan fusi ESAT6/CFP10 Mtb yang dihasilkan oleh Pusat Biomedis Litbangkes Kemenkes RI dalam menginduksi respons imun seluler berdasarkan produksi sitokin TNF- α dan IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺. Penelitian ini juga akan menjadi dasar uji vaksin tahap berikutnya berupa uji klinis dengan hewan coba.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain *true experimental laboratory* yang akan menguji protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb galur Indonesia pada kultur *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) pasien TB, kontak TB, dan sehat untuk kemudian diukur ekspresi TNF- α , IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺. Pengukuran TNF- α dilakukan dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sedangkan pengukuran IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺ dilakukan dengan *flow cytometry*.

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit (RS) Syaiful Anwar Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, mulai 1 Juli – 31 Agustus 2017. Subjek penelitian dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu orang sehat, pasien TB dan kontak TB (keluarga pasien TB serta dokter dan paramedis) di lingkungan RS Syaiful Anwar Malang yang memenuhi kriteria inklusi.

Jumlah subjek penelitian untuk setiap kelompok sebesar 8 subjek. Masing-masing kelompok diberi 3 perlakuan, yaitu pemberian antigen protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 Mtb 2 μ g/ml, antigen *purified protein derivative* (PPD) 2 μ g/ml dan tanpa pemberian antigen sebagai prosedur pada penelitian vaksin TB. Kultur PBMC diinkubasi selama 2 hari setelah diberi perlakuan dan kemudian diukur konsentrasi TNF- α CD4⁺, presentase IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺. Hasilnya akan dianalisis dengan *one-way analysis of variance* (ANOVA).

HASIL

Karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada tabel 1 pada penelitian ini didapatkan jumlah

laki-laki lebih banyak pada kelompok pasien TB dengan jumlah laki-laki 6 subjek dan perempuan 2 subjek. Jumlah subjek laki-laki pada kelompok kontak TB sama dengan perempuan sedangkan jenis kelamin perempuan lebih banyak daripada laki-laki pada kelompok pasien sehat dengan jumlah laki-laki 2 subjek dan perempuan 6 subjek. Berdasarkan usia didapatkan subjek penelitian pada usia 21–50 tahun baik pada semua kelompok subjek.

Indek masa tubuh (IMT) paling banyak pada subjek kelompok pasien TB adalah IMT <18,5 yaitu 5 subjek sedangkan 2 subjek lainnya memiliki IMT antara 18,5-23. Pada kelompok kontak TB dan kelompok sehat hampir semua subjek memiliki IMT >18,5. Sebagian besar subjek penelitian memiliki skar BCG kecuali pada 2 subjek penelitian pada kelompok pasien TB tidak memiliki skar BCG. Pemeriksaan Mantoux didapatkan pada seluruh subjek kelompok pasien TB dan kontak TB.

Tabel 1 Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik		Pasien TB (n=8)	Kontak TB (n=8)	Sehat (n=8)
Usia (tahun)	< 20	1	0	0
	21 - 30	2	3	4
	31 - 40	1	4	4
	41 - 50	4	1	0
IMT (kg/m ²)	< 18.5	5	1	0
	18.5 - 23	2	2	6
	> 23	1	5	2
Riwayat merokok	Merokok	6	0	0
	Tidak	2	8	8
Jenis kelamin	Laki-laki	6	4	2
	Perempuan	2	4	6
Skar BCG (+)		6	8	8
Mantoux		8	8	0
Gejala klinis	Batuk	8	-	-
	Batuk darah	2	-	-
	Sesak	1	-	-
	Nyeri Dada	1	-	-
	Demam	7	-	-
	Keringat Malam	6	-	-
	Penurunan BB	5	-	-
Foto toraks	Minimal	0	N	N
	Moderate	2		
	Far advanced	6		
BTA	+1	3	(-)	(-)
	+2	3		
	+3	2		
TCM	Detected Low	3	-	-
	Detected Med	3		
	Detected High	2		

Ket: IMT=indeks massa tubuh; BCG=*Bacillus Calmette–Guérin*; BB=berat badan; BTA=basil tahan asam; TCM=tes cepat molekuler.

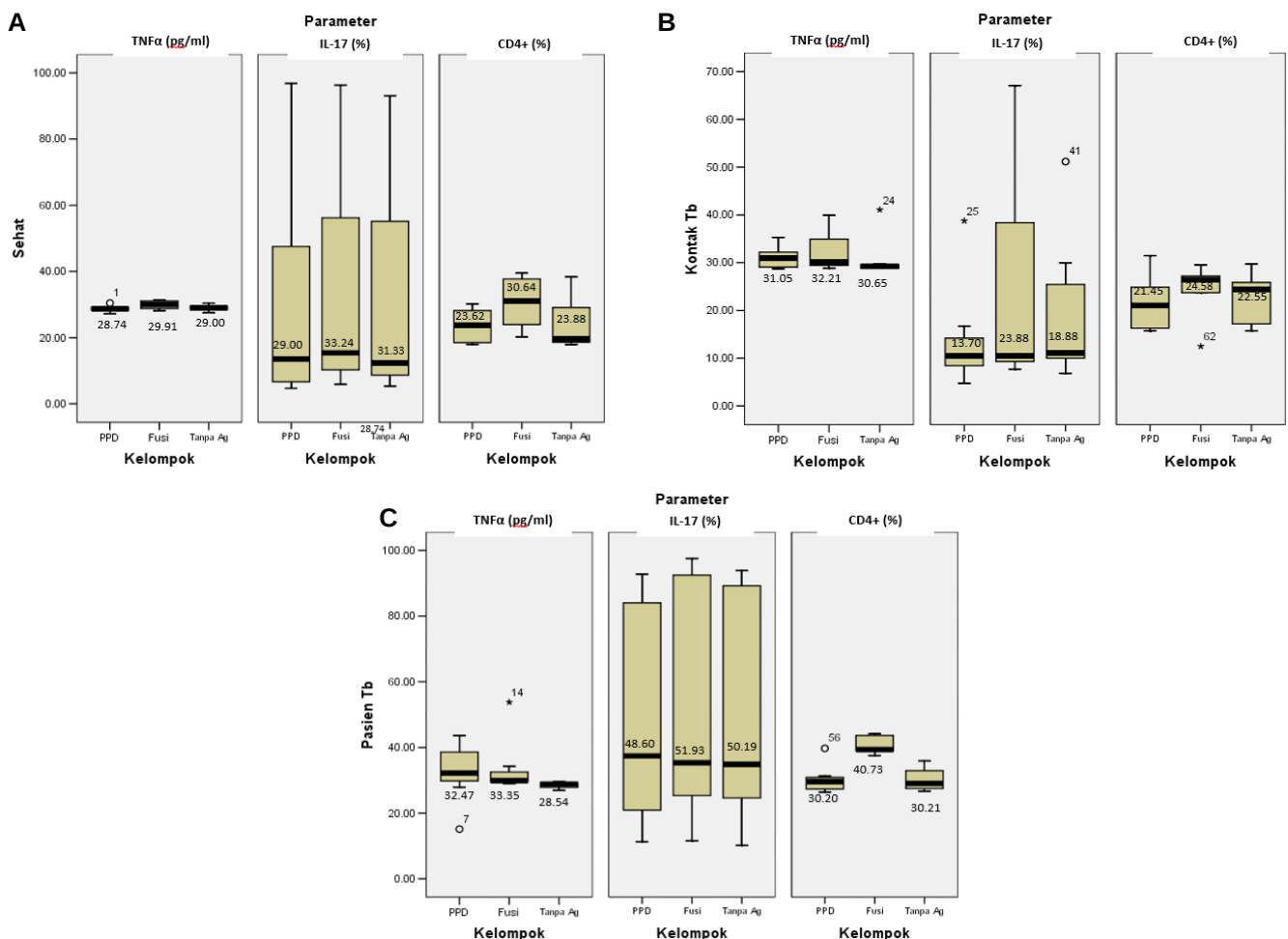
Gejala klinis hanya didapatkan pada kelompok pasien TB yang merupakan gejala pernapasan dan sistemik yang sering terjadi pada penderita TB. Batuk merupakan gejala yang paling banyak menyertai penyakit TB dan pada penelitian ini didapatkan pada seluruh subjek kelompok pasien TB. Keluhan demam terdapat pada 7 subjek, keringat malam 6 subjek dan penurunan berat badan 5 subjek. Beberapa pasien juga mengeluhkan batuk darah yaitu sebanyak 2 subjek, sesak napas dan nyeri dada masing-masing 1 subjek.

Pada gambaran foto toraks paling banyak didapatkan gambaran paru far advanced lesion yaitu sebanyak 6 dari 8 subjek pasien TB dan tidak didapatkan minimal lesion pada subjek pasien TB. Hasil pemeriksaan sputum basil tahan asam (BTA) pada seluruh subjek kelompok pasien TB didapatkan hasil positif (+) sesuai dengan syarat dalam kelompok pasien TB. BTA +1 dan +2 didapatkan pada masing

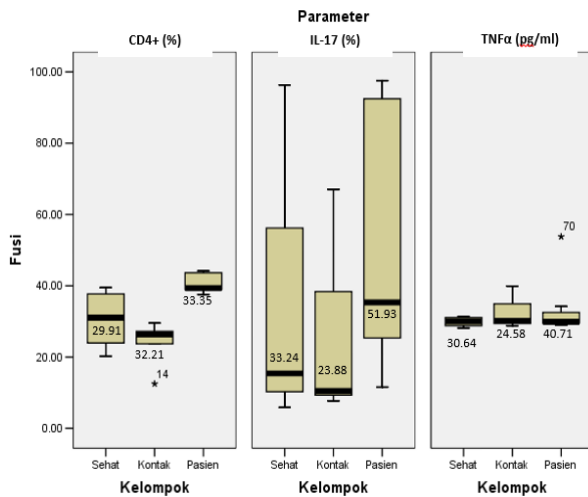
masing 3 subjek, BTA +3 didapatkan pada 2 orang pasien.

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa parameter TNF- α , IL-17 dan Sel T CD4 $^{+}$ kelompok fusi ESAT6/CFP10 yang diberikan kepada kelompok sehat, kontak TB maupun pasien TB memiliki hasil yang lebih besar dibandingkan tanpa pemberian antigen atau dengan pemberian PPD.

Pada Gambar 2 menunjukkan hasil pemeriksaan ekspresi TNF- α , IL-17 dan sel T CD4 $^{+}$ akibat respons terhadap antigen rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10. Protein rekombinan fusi ESAT6/CFP10 dapat memberikan ekspresi sel T CD4 $^{+}$ pada kelompok sehat, kontak TB dan pasien TB. Nilai ekspresi tertinggi pada kelompok pasien TB yaitu 40,73. Selain ekspresi terhadap sel T CD4 $^{+}$, pemberian protein rekombinan fusi ESAT6/CFP10 juga menghasilkan ekspresi sitokin TNF- α dan IL-17 CD4 $^{+}$.



Gambar 1. Perbandingan hasil ekspresi TNF- α , IL-17 dan sel T CD4 $^{+}$ dengan perlakuan tanpa antigen, dengan pemberian antigen PPD dan antigen fusi ESAT6/CFP10 pada kelompok sehat (A), pada kelompok kontak TB (B), pada kelompok pasien TB (C).



Gambar 2. Hasil ekspresi TNF- α , IL-17 CD4⁺ dan sel T CD4⁺ pada pemberian antigen protein rekombinan fusi ESAT6/ CFP10.

PEMBAHASAN

Karakteristik jenis kelamin laki-laki (n=6) lebih banyak daripada perempuan (n=2) pada kelompok pasien TB. Hal ini sesuai dengan data terbaru dari *global tuberculosis report 2016* WHO dan Data Profil Kesehatan Indonesia tahun 2016^{1,7}. Data tersebut menunjukkan laki-laki lebih rentan menderita TB dibandingkan dengan wanita terutama pada saat dewasa. Salah satu faktor risikonya adalah kebiasaan merokok dan minum alkohol pada laki-laki mengakibatkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi TB. Peranan hormon testosteron pada laki-laki dan estrogen pada wanita yang mempengaruhi respons imun seluler antara lain sel B, sel T, neutrofil, sel dendrit dan makrofag terhadap antigen.⁸

Sebanyak 6 subjek pada kelompok pasien TB memiliki IMT <18 rendah sedangkan pada kelompok sehat dan kontak TB tidak ada yang memiliki IMT <18. Keadaan IMT rendah menunjukkan prognosis yang buruk dan dapat meningkat risiko kematian. Hilangnya massa tubuh merupakan indikasi malnutrisi yang dapat memperberat tingkat keparahan penyakit TB dan mempengaruhi proses respons imun terhadap TB.⁹

Skar BCG pada pasien TB menunjukkan pasien sudah pernah diimunisasi BCG. Pada kelompok pasien TB yang memiliki skar BCG sebanyak 6 subjek. Hal ini menunjukkan vaksinasi

BCG tidak menyebabkan kekebalan terhadap infeksi TB. Beberapa literatur menyebutkan beberapa penyebab kegagalan BCG dalam memberikan perlindungan pada dewasa terhadap paparan kuman Mtb terutama pada daerah endemis, antara lain karena hilangnya lokus Esx-1 pada genome RD1 yang bersifat imunodominan, paparan *ultraviolet*, infeksi cacing, reaksi silang dengan *Mycobacterium other than tuberculosis* (MOTT) dan perubahan genetik dari BCG.^{2,10,11}

Kelompok subjek sehat didapatkan hasil ekspresi yang lebih tinggi pada pemberian antigen protein fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan dengan tanpa antigen dan PPD. Hal ini menunjukkan bahwa protein fusi ESAT-6/CFP-10 mampu menginduksi sistem imun seluler pada subjek yang belum pernah terpapar antigen Mtb sebelumnya. Protein fusi ESAT-6/CFP-10 berasal dari ekspresi lokus Esx-1 (Esx-B dan Esx-A) yang ditranskripsikan sebagai *operon* tunggal berupa protein yang masing-masing membentuk kompleks heterodimerik 1:1. CFP-10/ESAT-6 disekresikan pada tahap awal infeksi Mtb dan menyebabkan respons imun seluler dan humoral yang kuat.^{12,13,14,15}

Pada kelompok subjek sehat pada penelitian kami didapatkan peningkatan ekspresi baik pada TNF- α , IL-17 CD4⁺ atau pada sel T CD4⁺ sendiri oleh rangsangan rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10. Peningkatan ini meskipun tidak bermakna menunjukkan hasil yang sama pada rangsangan oleh paparan Mtb. Pada tahap awal infeksi TB terjadi respons alamiah tubuh pada 2-3 minggu pertama terpaparan kuman Mtb.^{12,13,14,15}

Pada kontak TB berarti subjek pernah terpapar terhadap kuman Mtb dan telah memiliki memori sel T spesifik Mtb. Pada penelitian kami menunjukkan hasil ekspresi TNF- α , IL-17 CD4⁺ dan Sel T CD4⁺ yang meningkat pada paparan antigen protein fusi ESAT-6/CFP-10 dibandingkan tanpa antigen dan PPD. Adanya *cross reaction* antara sel T CD4⁺ spesifik Mtb dan antigen protein fusi ESAT-6/CFP-10 menyebabkan peningkatan ekspresi berbagai sitokin proinflamasi. Induksi sel memori seperti sel T memori yang memiliki jumlah dan durasi yang cukup dengan

pemberian vaksin terhadap patogen intraselular telah terbukti merupakan tantangan besar bagi pengembangan vaksin ajuvan subunit baru. Karena belum adanya vaksin yang disetujui untuk penggunaan pada manusia yang mampu mempromosikan respon imunitas seluler yang dimediasi Th1, pengembangan vaksin subunit modern telah menjadi tantangan yang sangat penting sampai saat ini dalam upaya pemberantasan penyakit TB.^{16,17}

Pada subjek kontak TB memiliki hasil yang sama dengan subjek sehat berupa peningkatan ekspresi TNF- α , IL-17 CD4 $^{+}$ dan sel T CD4 $^{+}$. Subjek kontak menunjukkan pajanan Mtb di masa lalu dan menunjukkan imunitas yang baik. Pemberian rekombinan fusi ESAT-6 dan CFP-10 mempertahankan jumlah dan kualitas sel T memori melalui perangsangan ulang antigen spesifik sel T.^{3,17}

Antigen Mtb dan ESAT-6 memiliki sel T spesifik yang sama. Respon imunitas yang adekuat pada imunitas bawaan dan adaptif memberikan hasil berupa infeksi TB laten akibat rangsangan awal oleh kuman Mtb. Proteksi yang baik jika dapat menginduksi memori sel T spesifik ditunjukkan melalui ekspresi multipel sitokin dalam hal ini yang bersifat proinflamasi seperti TNF- α dan IL-17.^{3,17}

Rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 selain sebagai kandidat vaksin baru baik primer dengan mengembalikan imunogenitas pada BCG (rBCG) atau sebagai vaksin subunit serta dapat *booster* pada subjek yang telah divaksinasi sebelumnya. Kandidat vaksin yang baru diharapkan dapat mempertahankan jumlah sel T memori dalam waktu yang lama dan kualitas yang baik dalam arti mampu mengekspresikan sel T multifungsional pada pajanan Mtb.^{3,17}

Peningkatan ekspresi TNF- α , IL-17 CD4 $^{+}$ dan sel T CD4 $^{+}$ juga didapatkan pada pasien TB setelah diberikan dengan antigen ESAT-6/CFP-10. Salah satu penelitian memberikan analisis rinci tentang fenotip dan frekuensi sel penghasil sitokin pada penyakit TB. Penelitian oleh Sutherland dkk

menunjukkan bahwa jumlah sel limfosit T spesifik MTb yang menghasilkan beberapa sitokin atau TNF- α saja secara signifikan lebih tinggi pada subjek dengan penyakit TB aktif, dibandingkan dengan subjek kontak TB. Profil seluler ini dikaitkan dengan sekresi respons sitokin sel Th1 yang dominan dan produksi IL-17 pada kasus TB dibandingkan dengan kontak TB. Peningkatan ini menunjukkan proses dari progresifitas dari penyakit TB yang masih berlangsung. Pada penelitian yang lain menunjukkan penurunan respon sitokin setelah pemberian obat anti TB dan perbaikan dari gejala klinis TB.¹⁸

Meskipun Vaksin TB berbasis ESAT-6 masih jauh dari implementasi dalam program vaksin, namun dalam pengembangannya ESAT-6 dan CFP-10 telah dieksplorasi secara luas perannya sebagai antigen dalam merangsang terbentuknya imunitas seluler. Salah satu imunitas yang telah terbukti adalah pelepasan sitokin IFN- γ yang telah digunakan diseluruh dunia dalam mendiagnosis infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. ESAT-6 dan protein pendampingnya CFP10 adalah antigen utama dalam terbentuknya IFN- γ (IGRA). Protein dengan berat molekul rendah ini adalah faktor virulensi penting untuk Mtb, dan antigen yang paling imunodominan sejauh ini telah diidentifikasi.¹⁹

Spesifisitas diagnostik mereka dikaitkan dengan lokalisasi mereka pada *Region of Difference* 1 (RD1) dari genom Mtb, yang pada BCG telah dihilangkan untuk menurunkan virulensi. Selain IFN- γ peran ESAT-6 dan CFP-10 sebagai kandidat vaksin perlu dibuktikan dalam pelepasan sitokin lain yang tidak kalah pentingnya dalam imunitas terhadap TB yaitu TNF- α dan IL-17.¹⁹

TNF α pada pemeriksaan ELISA penelitian kami tidak dapat dibedakan apakah dihasilkan oleh sel T CD4 $^{+}$, makrofag atau sel dendrit. Untuk sitokin IL-17 pada penelitian kami adalah yang dihasilkan oleh sel T CD4 $^{+}$ yang merupakan produsen utama IL-17 melalui Th-17.^{20,21}

Hasil ekspresi oleh rekombinan fusi ESAT-6 dan CFP-10 menunjukkan peningkatan selain berperan terhadap imunitas seluler pada respon adaptif, berperan juga sebagai penghubung antara

respon alamiah dan adaptif. TNF- α dihasilkan terutama oleh sel T CD4 $^{+}$ dan CD8 $^{+}$ berperan utama dalam aktivasi makrofag. Sebagian besar sel tubuh memiliki respon terhadap TNF- α , hal ini yang menyebabkan TNF- α merupakan mediator proinflamasi yang utama.^{20,21}

Selain dihasilkan oleh sel T, TNF- α juga dihasilkan oleh makrofag pada mekanisme respon alamiah melalui aktivasi jalur NF κ B, JNK dan p38 dan menginduksi apoptosis. Meher dkk, pemberian CFP-10 menyebabkan ekspresi B7.1 pada permukaan makrofag menyebabkan pelepasan agen antimicrobial NO dan TNF- α dan membantu membunuh mikroba yang telah difagosit.^{20,21}

Penelitian dengan menganalisa respon imun beberapa antigen *Mycobacterium tuberculosis* pada pasien aktif TB yang dilakukan oleh Kassa dkk mendukung penelitian sebelumnya oleh Mattos dkk bahwa peningkatan level sitokin IL-17 dan TNF α secara bersama sama dengan IgG merupakan penanda hayati yang berguna untuk mengidentifikasi TB aktif. Respon peningkatan ini menunjang imunogenitas dari fusi ESAT-6 dan CFP-10 yang dapat menjadi acuan sebagai kandidat vaksin baru.²²

Penelitian lainnya oleh Maue dkk, Uvanova dkk, Olsen dkk, Pym dan Gao dkk menunjukkan fusi ESAT-6 dan CFP-10 merupakan kandidat yang kuat vaksin baru karena menginduksi imunitas sel T secara kuat pada model hewan coba. Tetapi hal ini tidak kalah pentingnya bahwa ESAT-6 dan CFP-10 sebagai faktor virulensi pada proses infeksi TB. ESAT-6 diketahui dapat menghambat APC dengan mengurangi produksi IL-12 oleh makrofag dengan melisiskan sel epitelial dan makrofag dan menyebabkan ketidakstabilan fagolisom menyebabkan bakteri menghindari proses fagosom. Diketahui juga bahwa ESAT-6 produksi IL-10, IL-17 dan TNF- α oleh sel T dari hasil penelitian Samten dkk dan Peng dkk.²²

Sutherland dkk dan Cocciano dkk menunjukkan triple positif sel T CD4 $^{+}$ dalam artian menghasilkan ekspresi 3 sitokin secara bersamaan antara lain IL-2, TNF- α dan IFN- γ secara bersamaan pada pemberian fusi ESAT-6 dan CFP-10 pada

pasien aktif TB yang merupakan tanda replikasi aktif TB dibandingkan pada subjek kontak TB dan sehat. RD1 spesifik bifungsional sel T CD4 $^{+}$ yang menghasilkan TNF- α dan IFN- γ sel T CD4 $^{+}$ lebih tinggi dibandingkan pada kontak TB, hasil yang sama ditunjukkan oleh Day dkk yang jumlahnya akan menurun setelah proses terapi anti Tuberkulosis.^{23,24}

KESIMPULAN

Protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 galur Indonesia dapat menstimulasi ekspresi TNF- α , IL-17 CD4 $^{+}$ dan sel T CD4 $^{+}$ pada subjek sehat, terdapat kontak TB dan penderita TB. Ekspresi sitokin pada subjek sehat menunjukkan bahwa protein rekombinan fusi ESAT-6/CFP-10 berpotensi sebagai kandidat vaksinasi pengganti BCG.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. WHO: Global Tuberculosis Report 2016. Geneva. World Health Organization; 2016.
2. Fletcher HA, Schragerb L. TB Vaccine development and the end TB strategy: importance and current status. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016;110(4):212–8.
3. Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, et al. An ESAT-6: CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. Vaccine. 2007;25(24):4735–46.
4. Ganguly N, Giang PH, Gupta C, Basu SK, Siddiqui I, Salunke DM, Sharma P. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF- κ B transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. Immunol Cell Biol. 2008;86(1):98–106.
5. Li A, Qiao D, Li Q, Zhang X, Lao S, Wu C. Distinct polyfunctional CD4 $^{+}$ T cell responses to

- BCG, ESAT-6 and CFP-10 in tuberculous pleurisy. *Tuberculosis* (Edinb). 2012;92(1):63-71.
6. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional signatures of human CD4 and CD8 T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol*. 2014;5:1-13.
7. Kemenkes RI. Data dan informasi profil kesehatan Indonesia 2016. Jakarta. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017.
8. Nhamoyebonde S, Leslie A. Biological differences between the sexes and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014;209(3):100-6.
9. Chang SW, Pan WS, Lozano Beltran D, Oleyda Baldelomar L, Solano MA, Tuero I, et al. Gut hormones, appetite suppression and cachexia in patients with pulmonary TB. *PLoS One*. 2013;8(1):1-7.
10. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014; 58(4):470-80.
11. Gowthaman U, Rai PK, Khan N, Jackson DC, Agrewala JN. Lipidated promiscuous peptides vaccine for tuberculosis-endemic regions. *Trends Mol Med*. 2012;18(10):607-14.
12. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:1-12.
13. Wang X, Barnes PF, Huang F, Alvare, IB, Neuenschwander PF, Sherman DR, et al. Early secreted antigenic target of 6-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* primes dendritic cells to stimulate Th17 and inhibit Th1 immune responses. *J Immunol*. 2012;189(6):3092-103.
14. Meher AK, Lella R., Sharma C, Arora A. Analysis of complex formation and immune response of CFP-10 and ESAT-6 mutants. *Vaccine*. 2007;25(32): 6098-106
15. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. 2008;41(2):79-83.
16. Derrick SC, Yabe IM, Yang A, Sheldon LM. Vaccine-induced antituberculosis protective immunity in mice correlates with the magnitude and quality of multifunctional CD4 T cells. *Vaccine*. 2011;29(16):2902–9.
17. Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol*. 2009;182(12):8047–55.
18. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):723-9.
19. Gonzalez R, Prince O, Cooper A, Khader S. Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Microbiol Spectr*. 2016;4(5):1-58.
20. Romero-Adrian TB, Leal_Montiel J, Fernández G, Valecillo A. Role of cytokines and other factors involved in the *Mycobacterium tuberculosis* infection. *World J. Immunol*. 2015;5(1):16-50.
21. Abebe F, Belay M, Legesse M, Mihret A, Franken KS. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- γ , TNF- α and IL-10 with clinical tuberculosis: evidence from cohorts of pulmonary tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(2):241-9.
22. Lichtner M, Mascia C, Sauzullo I, Mengoni F, Vita S, Marocco R, et al. Multifunctional analysis of CD4 $^{+}$ T-cell response as immune-based model for tuberculosis detection. *J Immunol Res*. 2015;2015:203-5.

23. Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Sampaolesi A, Gualano G, Girardi E, et al. IFN γ /TNF- α specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. *J Infect.* 2013;66(6):475-86.