TESIS

SEKRESI INTERLEUKIN 12 PADA KULTUR MAKROFAG DARI PENDERITA TUBERKULOSIS PARU DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO TUBERKULOSIS PARU, YANG MASING-MASING DIINFEKSI *Mycobacterium tuberculosis*

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK

NI MADE LINAWATI
NIM. 090415423M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

SEKRESI INTERLEUKIN 12 PADA KULTUR MAKROFAG DARI PENDERITA TUBERKULOSIS PARU DAN INDIVIDU SEHAT BERISIKO TUBERKULOSIS PARU, YANG MASING-MASING DIINFEKSI *Mycobacterium tuberculosis*

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Imunologi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

oleh :

NI MADE LINAWATI
NIM. 090415423M

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 22 Mei 2006

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL, 22 Mei 2006

Oleh

Pembimbing Ketua

Dr. Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK

NIP. 131 406 054

Pembimbing

Dr.Sri Hidajati Bayu S,dr,DTM, MS,SpParK

NIP. 130 680 855

Mengetahui

KPS S2 IMUNOLOGI

Dr.Sri Hidajati Bayu S,dr,DTM, MS,SpParK

Telah diuji pada

Tanggal 22 Mei 2006

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. J.F. Palilingan, dr., SpP(K)

Anggota : 1. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK

2. Dr. Sri Hidajati Bayu S, dr., DTM., MS., SpParK

3. Dr. Fedik Abdulrantam, drh

4. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas rakhmat dan karuniaNya tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Ibu Dr. Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK, selaku pembimbing ketua sekaligus dosen selama kuliah yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran mulai dari penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Ibu Dr. Sri Hidajati Bayu S, dr, DTM, MS, SpParK, selaku pembimbing sekaligus Ketua Program Studi Imunologi yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran mulai dari penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih yang setulusnya saya ucapkan kepada Dr. J.F. Palilingan, dr., SpP(K), selaku ketua penguji dan dosen kuliah yang dengan sabar memberi arahan dan bimbingan selama penulisan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Dr. Fedik Abdulrantam, drh, selaku dosen kuliah dan juga penguji yang dengan sabar telah memberikan dorongan dan bimbingan selama penelitian hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Dr H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK, selaku dosen kuliah dan penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan masukan dan arahan dalam penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang tulus saya sampaikan kepada Mbak Fitri, Mbak Primenila Destiany, Bu Ismulati, Mbak Helen, Mbak Titi, Pak Sugeng, Pak Erik serta para bapak satpam di TDC yang bersedia membantu dan memperlancar proses penelitian saya.

Saya ucapkan terima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian hingga selesainya penyusunan tesis ini, terutama kepada :

1. Rektor Unair Prof. Dr. Med. Puruhito, dr, SpB., TKV, atas kesempatan yang diberikan dan fasilitas yang disediakan untuk mengikuti Program Pasca Sarjana di Unair.
2. Direktur Program Pasca Sarjana Unair, Prof. Dr. H. Muhamad Amin, dr., SpP dan yang telah memberikan kesempatan saya menyelesaikan pendidikan Program Magister pada Program Studi Imunologi Pasca Sarjana Unair.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Prof. Dr. H. M. S. Wiyadi, dr., SpTHT yang mengijinkan saya menuntut ilmu dibidang kedokteran selama saya menjadi mahasiswa Pasca Sarjana Unair.
4. Seluruh dosen pengajar pada Program Studi Imunologi Pasca Sarjana Unair.
5. Kepala SMF Paru RSUD, Prof. Dr. S. Hood Alsagaff, SpP(K) yang mengijinkan untuk mengambil sampel penderita tuberkulosis di poliklinik RSUD Dr. Soetomo.
6. Kepala Poliklinik paru RSUD Dr. Soetomo serta Ibu Lis dan Pak Yono yang telah membantu mendapatkan sampel penderita tuberkulosis
7. Kepada *Due Like Batch*-III FK Udayana atas bantuan yang diberikan sehingga saya berkesempatan menuntut ilmu di Program Pasca Sarjana Unair.
8. Kepada seluruh senior di Bagian Histologi FK Unud yang memberikan dorongan dan bimbingan selama saya menempuh pendidikan Program Pasca Sarjana Unair.
9. Kepada sahabat seperjuangan saya di PS Imunologi angkatan 2004; saudari Arlita LA serta kakak-kakak di PS Imunologi 2003.
10. Khusus untuk suami tercinta Nyoman Wande,dr, yang penuh kesabaran, kasih sayang, dan perhatian selalu memberi semangat, dorongan materiil/moril, bantuan serta sumbangan pikiran selama saya mengikuti pendidikan.
11. Khusus untuk kedua orangtua saya Bapak dan Ibu Sukarata serta kedua mertua Bapak dan Ibu Jaman yang selalu memberi doa restu, semangat dan dorongan selama saya menjalani pendidikan.
12. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu, yang telah membantu saya baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga penulisan tesis ini selesai.

Demikianlah semoga Tuhan Yang Maha Esa memberi balasan atas segala amal dan bantuan serta senantiasa melindungi kita semua.

Surabaya, 13 Mei 2006

Penulis

RINGKASAN

Sekresi Interleukin 12 pada Kultur Makrofag dari Penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru, yang masing-masing diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Ni Made Linawati

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi kronis disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang terutama menyerang jaringan paru. Sejak 1985 sampai saat ini tuberkulosis telah menjadi masalah kesehatan dunia. Patogenesis tuberkulosis ditentukan interaksi antara imunitas hospes dengan *Mycobacterium tuberculosis*, *activated* makrofag berusaha mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* namun *Mycobacterium tuberculosis* memiliki mekanisme *evasion* sehingga mampu bertahan dan bermultiplikasi.

Interleukin 12 merupakan salah satu kunci pertahanan imunitas melawan *Mycobacterium tuberculosis*, disekresikan *activated* makrofag, berfungsi menginduksi sekresi IFN-γ oleh sel NK dan sel T, serta merangsang differensiasi Th0 menjadi Th1. IFN-γ meningkatkan kemampuan mikrobisidal makrofag sehingga mampu membunuh *Mycobacterium tuberculosis*.

Tujuan penelitian adalah mengetahui sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan inkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Penelitian ini dilakukan dengan isolasi Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) dari *buffy coat* darah vena cubiti individu sehat berisiko tuberkulosis paru dan penderita tuberkulosis paru. Sel-sel diletakkan diatas coverslip dalam sumuran 24-well, dengan konsentrasi $2x10^5$ sel per sumuran. Sel PBMC tersebut kemudian dikultur dalam inkubator CO2 pada 37^0C, 5% CO2 dengan suplementasi RPMI, 10% *pooled human serum* dan 100 iu/ml penicillin. Pada hari ke 2 dilakukan pencucian dengan RPMI 5 kali untuk membuang sel-sel limfosit. Kultur dilanjutkan dan setiap hari dilakukan penggantian medium, kemudian hari ke 4 setelah sel-sel monosit berdiferensiasi menjadi makrofag lalu di infeksikan dengan *Mycobacterium tuberculosis* 1,5 x 10^5 sel/sumuran, setelah diinfeksi diperiksa sekresi interleukin 12 pada supernatan kultur makrofag pada inkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) yang digunakan untuk membandingkan hasil-hasil yang diperoleh pada kelompok perlakuan yang berbeda, dan hasil yang bermakna dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Square Difference*).

Hasil penelitian menunjukkan sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (3,156 ng/ml) lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru (1,593 ng/ml) dan sekresi IL-12 pada kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (3,446 ng/ml) lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru (1,8 ng/ml). Hasil analisis ANOVA pada waktu inkubasi 24 jam dam 48 jam setelah infeksi menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna p=0,000.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sekresi Interleukin 12 kelompok kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 24 jam dan 48 jam lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru.

Perlu dilakukan studi *invitro* untuk mengetahui efek Interleukin 12 pada komponen sistem imun lainnya seperti pada kultur limfosit untuk mengetahui efek Interleukin 12 terhadap sekresi IFN-γ, perlu dilakukan penelitian *invivo* untuk mengetahui apakah Interleukin 12 bisa berperan sebagai imunomodulator yang nantinya bisa digunakan untuk imunoterapi terutama dalam pengobatan tuberkulosis dan perlu penelitian lebih lanjut mengenai adanya defek gen penyandi interleukin 12 pada penderita tuberkulosis paru.

SUMMARY

Interleukin 12 Secretion in The Culture of Macrophage from Pulmonary Tuberculosis Patients and Healthy Individuals with Pulmonary Tuberculosis Risk, that infected with *Mycobacterium tuberculosis*

Ni Made Linawati

Tuberculosis is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* which mostly attacks pulmonary tissue. Since 1985 until now, tuberculosis have been a global health problem.

Pathogenesis of tuberculosis is mainly determined by interaction between host immunity and *Mycobacterium tuberculosis*. Activated macrophages try to eliminate *Mycobacterium tuberculosis,* but on the other hand, *Mycobacterium tuberculosis* has evasion mechanism from host immunity, so that it can survive and multiplicate.

Interleukin 12 is a crucial cytokine which acts as one of key defence immunity from tuberculosis infection and has the following main functions : induces IFN-γ production by T cells and Natural killer (NK) cells, induces differentiation from Th0 becomes Th1. IFN-γ would influence macrophage to be more active so that it can increase microbicidal activity to kill *Mycobacterium tuberculosis*.

The purpose of this study was to find whether there was any difference in interleukin 12 secretion capacity between macrophages culture from pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk after being infected with *Mycobacterium tuberculosis* at incubation period of 24 hours and 48 hours.

The experiment was performed by isolation of *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) from buffy coat of pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk. The cells were plated on coverslip glass in 24-well tissue culture plates with concentration of $2x10^5$ cells/well and cultured at CO2 incubator in RPMI supplemented with 10% pooled human serum and 100 iu/ml penicillin at 37^0C; 5% CO2. On day II, wells were washed 5 times with RPMI to eliminate lymphocytes and then after feeding, the culture were continued. On day IV, culture were infected with 1,5 x 10^5 *Mycobacterium tuberculosis* for each well. After

infection, Interleukin 12 secretion was measured at incubation period of 24 hours and 48 hours with ELISA (Accucyte human IL-12) procedure.

Analysis of Variance (ANOVA) was used to compare the result obtained with different treatment and Least Square Difference (LSD) was used to continue analysis for significant result.

Result showed Interleukin 12 secretion at macrophage culture of healthy individual with pulmonary tuberculosis risk at incubation period of 24 hours (3,156 mg/ml) were more higher than pulmonary tuberculosis patients (1,543 ng/ml) and Interleukin 12 secretion at macrophage culture of healthy individual with pulmonary tuberculosis risk at incubation period of 48 hours (3,446 mg/ml) were more higher than pulmonary tuberculosis patients (1,543 ng/ml). ANOVA showed significant difference (p=0,000) in interleukin 12 secretion between macrophage culture of pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk after *Mycobacterium tuberculosis* infection at incubation period of 24 hours and 48 hours.

In conclusion, there was a difference in the secretion of interleukin 12 between that in the macrophage of pulmonary tuberculosis patients and that in the macrophage of healty individual with pulmonary tuberculosis risk, that infected with *Mycobacterium tuberculosis* at incubation period of 24 hours and 48 hours.

An invitro study is needed to find the effect of interleukin 12 on other immune system components for example, in lymphocyte culture the study should be aimed to find the effect on IFN-γ secretion, In vivo study is also needed to determine whether interleukin 12 may act as immune modulator that can be applied for immuno therapy particularly in tuberculosis treatment and study to determine Interleukin 12 gen defect at pulmonary tuberculosis patients.

ABSTRACT

Interleukin 12 in The Culture of Macrophage from Pulmonary Tuberculosis Patients and Healthy Individuals with Pulmonary Tuberculosis Risk, that Infected with *Mycobacterium tuberculosis*

Ni Made Linawati

This study was to evaluate Interleukin 12 secretion at macrophage culture of pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk who was infected with *Mycobacterim tuberculosis*.

Activated macrophage is the major phagocytic cells involved in protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. Interleukin 12 is secreted by activated macrophage.It plays an important role in IFN-γ production by T cells and NK cells and also influences the differentiation of Th0 to become Th1. IFN-γ induced bacterisidal mechanism in activated macrophage, so that it can kill *Mycobacterium tuberculosis*.

PBMC was isolated from pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk. PBMC were cultured for 24 hours and then washed with RPMI 5 times to clear the culture from lymphocytes. The culture was maintained at CO2 incubator; at 37^0C; 5% CO2 and every day the feeding is carried out until day IV when the cells were infected with *Mycobacterium tuberculosis*. After infection, interleukin 12 secretion was measured by ELISA at incubation period of 24 hours and 48 hours.

Result showed Interleukin 12 secretion at macrophage culture of healthy individual with pulmonary tuberculosis risk at incubation period of 24 hours and 48 hours were more higher than pulmonary tuberculosis patients. ANOVA showed significant difference (p=0,000) in interleukin 12 secretion between macrophage culture of pulmonary tuberculosis patients and healthy individuals with pulmonary tuberculosis risk after *Mycobacterium tuberculosis* infection at incubation period of 24 hours and 48 hours.

Key word: *Mycobacterium tuberculosis*, activated macrophage, Interleukin 12.

DAFTAR ISI

		Halaman
Sampul Dalam		i
Prasyarat Gelar		ii
Persetujuan		iii
Penetapan panitia Penguji		iv
Ucapan terima kasih		v
Ringkasan		vii
Summary		ix
Abstract		xi
Daftar Isi		xii
Daftar Tabel		xviii
Daftar Gambar		xx
Daftar Ringkasan		xxi
BAB 1	**PENDAHULUAN**	
1.1	Latar Belakang Masalah	1
1.2	Rumusan Masalah	6
1.3	Tujuan Penelitian	6
1.3.1	Tujuan Umum	6
1.3.2	Tujuan khusus	6
1.4	Manfaat Penelitian	7
1.4.1	Manfaat Keilmuwan	7
1.4.2	Manfaat Praktis	7
BAB 2	**TINJAUAN PUSTAKA**	
2.1	Tuberkulosis	8
2.1.1	Epidemiologi	8
2.1.2	Perjalanan Alamiah Penyakit	10
2.1.3	Gejala Klinis	11
2.1.4	*Mycobacterium tuberculosis*	11
2.1.5	Patogenesis Tuberkulosis	13
2.2	Makrofag	15

	2.2.1	Proliferasi dan Diferensiasi Sistem Fagosit Mononuklear menjadi Makrofag	15
	2.2.2	Morfologi Makrofag	17
	2.2.3	Aktivasi Makrofag	17
	2.2.4	Peran Makrofag dalam Infeksi *M.tuberculosis*.....	19
	2.2.5	Reseptor-reseptor pada Makrofag	20
	2.3	Interleukin 12 pada Tuberkulosis	22
	2.3.1	Peran penting Interleukin 12 pd infeksi *M.tuberculosis*	22
	2.3.2	Proses sekresi Interleukin 12	22
	2.3.3	Faktor-faktor yg mempengaruhi sekresi Interleukin 12	23
	2.3.4	Struktur Interleukin 12	24
	2.3.5	Hubungan Interleukin 12 dengan sitokin-sitokin lain pada infeksi *M.tuberculosis*.....	24
	2.3.6	Sekresi Interleukin 12 pada penelitian sebelumnya	26
	2.3.7	Interleukin 12 dan Pembentukan granuloma pada tuberkulosis	27
	2.3.8	Aplikasi Klinis Interleukin 12	28
BAB	**3**	**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**	
	3.1	Landasan teori	29
	3.2	Kerangka Konseptual	32
	3.3	Hipotesis Penelitian	33
BAB	**4**	**METODE PENELITIAN**	
	4.1	Rancangan Penelitian	34
	4.2	Sampel dan Besar Sampel	35
	4.2.1	Sampel.....	35
	4.2.2	Besar Sampel	35
	4.3	Variabel Penelitian	36
	4.3.1	Klasifikasi Variabel Penelitian	36
	4.3.2	Definisi Operasional Variabel	36
	4.4	Bahan dan Alat Penelitian	37
	4.4.1	Persiapan Makrofag	37
	4.4.2	Persiapan Suspensi *M.tuberculosis*.....	38

4.4.3	Uji Interleukin 12	38
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian	40
4.5.1	Lokasi Penelitian	40
4.5.2	Waktu Penelitian	40
4.6	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	40
4.6.1	Persiapan Penderita dan Individu Sehat berisiko Tuberkulosis	40
4.6.2	Preparasi kultur sel-sel makrofag dari darah tepi.....	40
4.6.3	Maturasi Monosit menjadi makrofag	42
4.6.4	Preparasi *Mycobacterium tuberculosis*	42
4.6.5	Pengukuran Produksi Interleukin-12	43
4.7	Tehnik Analisis Data	45
4.8	Kerangka Operasional Penelitian	45

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1	Hasil Uji Sekresi IL-12 pada kultur makrofag dari penderita TB paru dan Individu sehat berisiko TB paru yang diinfeksi *M.tuberculosis*.....	46
5.1.1	Prinsip Uji IL-12 dengan kit ELISA *Accucyte Human* IL-12	46
5.1.2	Hasil Uji IL-12 pada konsentrasi standards	48
5.1.3	Pengelompokan sampel supernatan kultur makrofag dari penderita TB paru dan individu sehat berisiko TB paru berdasarkan Perlakuan	51
5.1.4	Hasil Uji IL-12 pada kelompok sampel supernatan kultur makrofag dari penderita TB paru dan Individu sehat berisiko TB paru berdasarkan Perlakuan	52
5.2	Analisis Hasil Uji Sekresi IL-12 pada kultur makrofag dari penderita TB paru dan individu sehat berisiko TB paru yang diinfeksi *M.tuberculosis*.....	54
5.2.1	Perbandingan antara kedelapan kelompok Perlakuan terhadap konsentrasi IL-12 dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan LSD	55
5.2.2	Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur	

makrofag dari penderita TB yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis* dengan uji LSD 56

5.2.3 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD..... 57

5.2.4 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam dengan uji LSD..... 58

5.2.5 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dg uji LSD.. 58

5.2.6 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis* dengan uji LSD..... 59

5.2.7 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr individu sehat berisiko TB yg diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD..... 60

5.2.8 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 24 dan 48 jam dg uji LSD..... 60

5.2.9 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 24 jam dengan uji LSD..... 61

5.2.10 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dengan uji LSD..... 62

5.2.11 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr penderita TB dg Individu sehat berisiko TB yg diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 24 jam dg uji LSD..... 62

5.2.12 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr penderita TB dg Individu sehat berisiko TB yg diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 48 jam dg uji LSD 63

5.3 Hasil Pemeriksaan mikroskopik kultur makrofag dari penderita TB dan individu sehat berisiko TB sebelum dan setelah diinfeksi *M.tuberculosis* dg uji LSD 64

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Sekresi IL-12 pada kultur makrofag penderita TB dan individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* 69

6.1.1 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis*..... 70

6.1.2 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam 71

6.1.3 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam..... 71

6.1.4 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam..... 72

6.1.5 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinkubasi 24 dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis* 73

6.1.6 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr individu sehat berisiko TB yg diinfeksi dg yg tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 24 jam 74

6.1.7 Perbandingan sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 24 dan 48 jam..... 75

6.1.8 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 24 jam 77

6.1.9 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 48 jam 78

6.1.10 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 24 jam 79

6.1.11 Perbandingan Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 48 jam 81

6.2 Kultur makrofag dari sel PBMC penderita TB dan individu sehat berisiko TB 84

6.3 Infeksi *M.tuberculosis* pada kultur makrofag 87

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan 92

7.2 Saran 92

DAFTAR PUSTAKA 93

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.5.2 Jadwal Penelitian 40

Tabel 5.1.2 Nilai Absorbance (OD) Interleukin 12 yang diperoleh dari uji ELISA terhadap berbagai konsentrasi Standards 50

Tabel 5.1.3 Delapan kelompok perlakuan pada penelitian..... 51

Tabel 5.1.4 Konsentrasi Interleukin 12 pada kedelapan kelompok sampel dari 6 penderita TB paru dan 6 individu sehat... berisiko TB paru berdasarkan perlakuan 52

Tabel 5.2.1 Hasil Uji ANOVA 55

Tabel 5.2.2 Hasil Analisis sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis*..... 56

Tabel 5.2.3 Hasil Analisis sekresi Interleukin 12 antera kelompok kultur makrofag dari penderita TB paru yang tidak di infeksi dengan yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam 57

Tabael 5.2.4 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam dengan uji LSD..... 58

Tabel 5.2.5 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dg uji LSD.. 58

Tabel 5.2.6 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *M.tuberculosis* dengan uji LSD..... 59

Tabel 5.2.7 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr individu sehat berisiko TB yg diinfeksi dengan yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD..... 60

Tabel 5.2.8 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko TB yang diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 24 dan 48 jam dg uji LSD..... 60

Tabel 5.2.9 Hasil analisis Sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 24 jam dengan uji LSD..... 61

Tabel 5.2.10 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita TB dengan Individu sehat berisiko TB yang tidak diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dengan uji LSD..... 62

Tabel 5.2.11 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr penderita TB dg Individu sehat berisiko TB yg diinfeksi *M.tuberculosis* pd inkubasi 24 jam dg uji LSD 62

Tabel 5.2.12 Hasil analisis sekresi IL-12 antara kelompok kultur makrofag dr penderita TB dg Individu sehat berisiko TB yg diinfeksi *M.tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dg uji LSD 63

DAFTAR SINGKATAN

TB	: Tuberkulosis
M.tb	: *Mycobacterium tuberculosis*
IL-12	: Interleukin 12
MHC	: Major Histocompatibilitas Complex
IFN-γ	: Interferon γ
TGF-β	: Transforming Growth Factor β
IL-10	: Interleukin 10
IL-18	: Interleukin 18
IL-1β	: Interleukin 1β
IL-6	: Interleukin 6
iNOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase
RNI	: Reactive Nitrogen Intermediate
ROI	: Reactive Oxygen Intermediate
TNFα	: Tumor Necrotic Factor α
BTA	: Bakteri Tahan Asam
CR1	: Complemen Receptor 1
CR3	: Complemen Receptor 3
TLR	: Toll Like Receptor
MR	: Mannose Receptor
SR	: Scavenger Receptor
IRAK	: Interleukin 1 Receptor Associated kinase
MyD 88	: Myloid Differentiation Protein 88
NO	: Nitric Oxide
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cells
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
LAM	: Lipo Arabino Mannan
PILAM	: Phospho Inositol capped LAM
LM	: LipoMannan
TRAF-6	: TNF Raceptor Associated Factor-6
NFkB	: Nuclear Factor kB
MCP-1	: Monocyte Chemotactic protein 1

TIR	: Toll/IL-1 Receptor Resisten
TRIF	: TIR Adapter Inducing IFN-β
TRAM	: TRIF Related Adaptor Molecule

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 2002, tuberkulosis (TB) menyebabkan kira-kira 2 juta kematian pada negara berkembang dan pada abad terakhir tuberkulosis dinyatakan sebagai penyebab kematian kira-kira 100 juta penduduk dunia (Frieden TR *et al.,* 2003; http://who.int/mediacentre, 2004). Data WHO 2003 menunjukkan, Indonesia adalah penyumbang kasus tuberkulosis ke tiga di dunia, setelah India dan Cina. Diperkirakan, sekitar 140.000 orang Indonesia meninggal setiap tahunnya akibat tuberkulosis (Aditama, 2002; Anonim 1, 2004). Pada suatu penelitian disebutkan, setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dalam waktu 1-2 tahun, sekitar 5-10% menjadi tuberkulosis (Crevel *et al.*, 2002).

Infeksi HIV memperbesar masalah tuberkulosis, ko-infeksi HIV meningkatkan risiko menjadi tuberkulosis aktif sebesar 5-10%. Tahun 2000 prevalensi HIV dan tuberkulosis meningkat tajam, WHO mengestimasi prevalensi HIV pada orang dewasa dan anak seluruh dunia sebanyak 36,1 juta dan 11,8 juta orang dengan ko-infeksi HIV. Saat ini 12% penderita tuberkulosis menderita HIV positif dan 22,5% kematian penderita tuberkulosis disebabkan HIV. *Multi Drug Resistance* tuberkulosis meningkatkan epidemi HIV (Soewondo, 2002; Lulu, 2005).

Penderita tuberkulosis yang terlambat diobati atau mendapat pengobatan tidak lengkap sering mengalami komplikasi yang meningkatkan morbiditas dan tidak jarang menyebabkan kematian. Tanpa pengobatan, setelah 5 tahun, 50% penderita tuberkulosis akan meninggal, 25% akan sembuh sendiri dengan daya tahan tubuh

tinggi dan 25% sebagai "kasus kronik" yang tetap menular (DepKes, 2002; Garay, 2005).

Pengobatan tuberkulosis di Indonesia mengikuti anjuran WHO, melalui program DOTS (*Directly Observe Treatment Short Course*) yaitu penggunaan OAT (Obat Anti Tuberkulosis) minimal selama 6 bulan untuk mengobati tuberkulosis dengan pengawasan. Namun tetap saja kegagalan pengobatan cukup tinggi yang menyebabkan peningkatan jumlah penderita tuberkulosis. Kegagalan pengobatan disebabkan berbagai faktor seperti pengobatan lama sehingga terjadi *erratic drug intake* (pengobatan tidak lengkap / interuptus) yang menimbulkan resistensi obat. Resistensi OAT juga disebabkan pengobatan dengan satu obat anti tuberkulosis. Resistensi obat anti tuberkulosis terutama *Multi Drug Resistance* (MDR) saat ini menjadi masalah kesehatan di dunia. Di Indonesia *Collaborating Centre for TB-Persahabatan Hospital Jakarta* melaporkan angka MDR sebesar 4,3% pada kasus baru dan 34,44% pada kasus yang diobati. Pengobatan tuberkulosis dengan MDR tidaklah mudah disamping pembiayaan tinggi juga memerlukan kapabilitas, pengalaman dokter serta sarana dan kualitas laboratorium yang diakui. Umumnya resistensi OAT terutama yang bersifat MDR terjadi pada kasus kronik (*chronic case*), gagal pengobatan (*treatment failure*) atau pengobatan ulang (*retreatment*). (Pablos - Mendez *et al.*,1998 ; Pillai *et al.*, 1999; Aditama, 2000; Soedarsono, 2005).

Tuberkulosis terjadi dimana saja dalam tubuh namun kebanyakan timbul sebagai infeksi jaringan paru (Crevel *et al.*, 2002). Berbagai manifestasi yang timbul akibat infeksi *Mycobacterium tuberkulosis* menggambarkan adanya keseimbangan antara *Mycobacterium tuberculosis* dengan mekanisme pertahanan tubuh hospes (*host immunity*) dimana mekanisme pertahanan tubuh hospes menentukan hasil akhir yang ditimbulkan. Terdapat peran penting makrofag sebagai eksekutor non spesifik dan sel

T sebagai mediator spesifik dalam menghancurkan *Mycobacterium tuberculosis*. Fagositosis, produksi sitokin dan mekanisme efektor lain merupakan peran dari *innate immunity*. Makrofag teraktivasi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* memproduksi sitokin terutama Interleukin 12. Faktor pada makrofag terutama molekul-molekul reseptor permukaan sel makrofag seperti *Toll Like Receptor* (TLR) terutama TLR2, TLR4 dan TLR9 memiliki fungsi spesifik untuk berinteraksi dengan komponen *Mycobacterium tuberculosis*. (Crevel *et al.*, 2002; Dao, 2004).

Patogenesis penyakit tuberkulosis paru terutama didasari proses imunopatologik akibat interaksi antara *Mycobacterium tuberculosis* dengan sel-sel imun dan sitokin-sitokinnya (Bohlson *et al.*,2001). *Mycobacterium tuberculosis* berkemampuan hidup intraseluler, dapat bertahan hidup predominan dalam makrofag. Kemampuan mengatasi respon fagositik makrofag karena mampu menekan produksi dari Interleukin 12, menghambat apoptosis makrofag yang terinfeksi, memiliki komponen dinding sel yang terdiri dari lipid, karbohidrat dan protein kompleks antara lain *mycolic acid, lipoarabinomannan, phenolic glycolipid-1* sehingga mampu menghambat fusi lisosom-fagosom, menghambat acidikasi dalam fagosom, resisten terhadap *Reactive Oxidative Intermediate* (ROI) dan *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) (Abbas *et al.*, 2000; Dao, 2003). Pada awal infeksi *Mycobacterium tuberculosis*, terjadi pengenalan *Mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag diikuti respon inflamasi dengan peran penting sitokin. Aktivasi makrofag pada mekanisme awal pertahanan hospes menentukan mikroorganisme dapat segera dibunuh atau *dormant* (Crevel *et al.*,2002). Kinetik aktivasi makrofag dipengaruhi : fungsi tertentu, kondisi kultur dan terdapat limfosit atau tidak. Pada 24 jam inkubasi sebagai *monolayer* setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, dimana *adherence* merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan

penting pada awal aktivasi makrofag selanjutnya *adherence* akan memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga dapat dilihat sejumlah aktivitas makrofag seperti peningkatan fagositosis yang diikuti sekresi enzim dan sitokin (termasuk Interleukin 12). Perubahan oksidasi glukosa dan fagositosis biasanya terjadi pada 48-72 jam, dimana 72 jam setelah infeksi terjadi peningkatan molekul MHC klas II dan penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag (CR3, CR4 dan FcγRII) serta *Mycobacterium tuberculosis* mulai multiplikasi intraseluler (Territo dan Cline. 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002).

Interferon-γ adalah sitokin yang sangat penting untuk eradikasi infeksi karena mampu menginduksi mekanisme bakterisidal makrofag. Sekresi Interleukin 12 oleh makrofag teraktivasi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* merupakan awal regulasi respon imun, sebagai sitokin proinflamatori yang memiliki potensi sangat tinggi dalam menginduksi produksi IFN-γ oleh sel Th1 dan sel NK, serta sangat penting dalam perkembangan sel Th1. Kedua sitokin tersebut diatas memegang peranan yang sangat penting dalam pertahanan *host* melawan infeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Mekanisme mikrobisidal *activated* makrofag yang diinduksi IFN-γ meliputi fusi fagolisosom, *respiratory burst*, produksi berbagai enzim litik dan sitokin lebih tinggi dibandingkan *resting* makrofag. Interleukin 12 disebut sebagai *crucial cytokine* dalam mengkontrol infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* dimana penurunan sekresi Interleukin 12 berdampak peningkatan *intraselular survival*, sedangkan peningkatan Interleukin 12 menstimuli profil Th1 sehingga meningkatkan produksi IFN-γ (Zabaleta *et al.*,1998; Joost, 2001; Koguchi *et al.*,2003; Flynn, 2004). Sekresi Interleukin 12 pada tiap individu tidak lepas dari pengaruh genetik pada masing-masing individu dimana defek terhadap gen yang menyandi Interleukin 12 ternyata dilaporkan terjadi pada penderita tuberkulosis paru (Lee *et al.*,2002). Orang dengan

mutasi pada gen Interleukin 12p40 atau gen reseptor Interleukin 12 bermanifestasi dalam penurunan produksi IFN-γ oleh sel T (IFNγ diproduksi dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan individu yang tidak mengalami mutasi) dan orang ini lebih peka terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Collin HL, 2001; Flynn,2004). Penelitian sebelumnya pada donor sehat dengan mengunakan tehnik ELISA ditemukan sekresi Interleukin 12 oleh makrofag terinfeksi *Mycobacterium bovis* mulai terukur dalam konsentrasi sangat kecil pada 12 jam setelah infeksi dan meningkat secara bertahap pada 24 jam dan mencapai kadar maksimal pada 48 jam (Koguchi *et al.,* 2003). Penelitian lain dengan tehnik yang sama menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis yang distimulasi dengan antigen PPD dari *Mycobacterium tuberculosis* mulai terukur pada 18 jam kemudian meningkat pada 48 jam setelah infeksi (Lee *et al.*,2002).

Adanya dua fakta yang berlawanan dimana disatu pihak makrofag dengan berbagai senjata yang dimilikinya seperti Interleukin 12, mekanisme ROI dan RNI, serta enzim-enzim litik dalam fagolisosom seharusnya mampu membunuh (*killing*) mikroba intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis*, namun kenyataannya *Mycobacterium tuberculosis* mampu multiplikasi dalam makrofag yang merupakan fagosit profesional sehingga menimbulkan penyakit tuberkulosis, dalam penelitian ini dikelompokkan sebagai penderita tuberkulosis paru. Selain itu terdapat juga kelompok lainnya yang mendapat infeksi *Mycobacterium tuberculosis* berulang yaitu paramedis yang bekerja di UPF penyakit paru atau laboratorium mikrobiologi selama lebih dari 5 tahun tapi tidak menderita tuberkulosis paru. Apakah Interleukin 12 berperan dalam terjadinya hal ini? Sehingga perlu dipertanyakan bagaimanakah sekresi Interleukin 12 oleh makrofag yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Pada penelitian ini akan diuji secara *in vitro* sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag penderita

tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.*

1.2 Rumusan Masalah:

1.2.1 Apakah sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru ?

1.2.2 Apakah sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru ?

1.3 Tujuan :

1.3.1 Tujuan Umum :

Mengukur sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

1.3.2 Tujuan Khusus :

a. Mengukur sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.*

b. Mengukur sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.*

1.4 Manfaat Penelitian:

1.4.1 Keilmuwan :

Diharapkan dari penelitian ini dapat diketahui peran Interleukin 12 dalam mekanisme imunitas makrofag yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* sehingga dapat menjadi dasar pengembangan penelitian imunologi pada penderita tuberkulosis.

1.4.2 Praktis :

Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi dasar pengembangan pengobatan penderita tuberkulosis seperti memberikan imunoterapi atau imunomodulator.

BAB 2

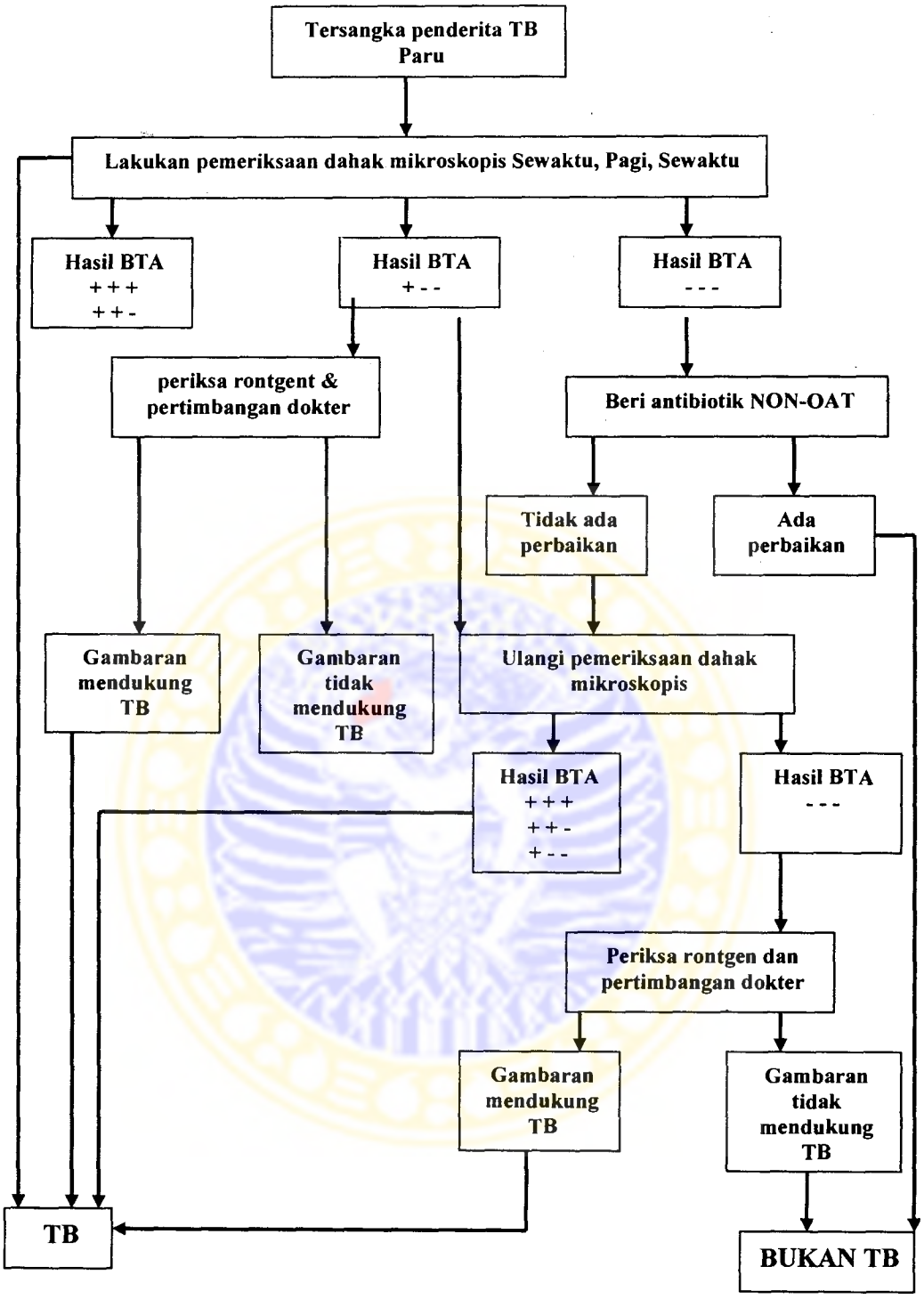
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular langsung yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, umumnya menyerang jaringan paru manusia (tuberkulosis paru), tetapi dapat juga mengenai organ tubuh lainnya seperti : kelenjar limfe,otak, kulit, tulang, usus serta ginjal (tuberkulosis ekstra paru) (Kaufmann, 2002)

2.1.1 Epidemiologi :

Pada populasi individu terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* kira-kira 0,4% berkembang menjadi penderita tuberkulosis yaitu dari 2 milyar populasi terinfeksi sekitar 8 juta berkembang menjadi tuberkulosis (dye *et al.*,1999). Penelitian berikutnya menyebutkan setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dalam waktu 1-2 tahun, sekitar 5-10% menderita tuberkulosis (Crevel *et al.*, 2002). Penelitian lain menyebutkan kurang lebih 90 % orang terpapar *Mycobacterium tuberculosis* berisiko infeksi, namun tidak langsung bermanifestasi menjadi sakit dan jika bakteri tidak dieradikasi, penyakit tuberkulosis akan berkembang di kemudian hari (Forbes *et al.*, 1998; kaufmann, 2002). Tuberkulosis sebagai penyakit infeksi dapat dicegah (*preventable*) dan disembuhkan (*curable*) apabila sejak awal dilakukan diagnosis tepat dan cepat kemudian diikuti pengobatan tepat sehingga terjadi kesembuhan, penurunan morbiditas, mencegah komplikasi atau progresifitas, tidak memberi kesempatan infeksi laten (*dormant stage*) serta meniadakan risiko penularan. Tahap awal dalam usaha pengendalian tuberkulosis dimulai dengan penegakan diagnosis tuberkulosis (Perkins, 2000).



Gambar 2.1 Bagan Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru pada Orang Dewasa (DepKes, 2005)

Saat ini tuberkulosis dan HIV/AIDS merupakan masalah kesehatan global. tuberkulosis merupakan infeksi *opportunistic* potensial untuk penderita HIV/AIDS, karena kondisi imunosupresif seluler yang terjadi pada penderita HIV/AIDS mempermudah penyebaran infeksi tuberkulosis primer, sebaliknya infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* pada penderita HIV/AIDS mempercepat perjalanan infeksi HIV stadium dini menjadi stadium lanjut (AIDS) yang fatal (Selwyn *et al.*,1992; Moreno *et al.*,1993; Suelar *et al.*, 1993; Antonucci,1995). Antara infeksi HIV dan tuberkulosis terjadi interaksi patogenik dua arah (*bidipzectional pathogenic interaction*), yang memperburuk prognosis penderita. Resiko kematian paling tinggi terjadi pada penderita HIV stadium lanjut (AIDS) dengan tuberkulosis-aktif (Soewondo, 2002).

2.1.2 Perjalanan Alamiah Penyakit :

Pertama-tama terjadi **pemaparan** penderita tuberkulosis terhadap individu sehat dimana bakteri masuk ke dalam paru lalu mengalami multiplikasi, menuju ke sistem sirkulasi bergerak ke berbagai bagian tubuh (ginjal, sumsum tulang dan otak). Bakteri bertahan dalam sputum basah beberapa bulan dan sputum kering beberapa minggu. Infeksi tuberkulosis lebih sering terjadi akibat pemaparan terus menerus dibandingkan dengan kontak biasa. Pada fase berikutnya terjadi **Infeksi tuberkulosis** dimana bakteri tuberkel memasuki tubuh namun akibat sistem imun tubuh, bakteri tidak mampu bermultiplikasi dan menyebabkan penyakit. Pada keadaan ini tidak bersifat infektious jadi tidak mampu menularkan infeksi pada orang lain. Fase terakhir yaitu **Penyakit tuberkulosis** dimana tidak semua yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* berkembang menjadi penyakit tuberkulosis (± 10%). Risiko progresifitas

menjadi penyakit tuberkulosis ditentukan mekanisme pertahanan alami dan dapatan dalam melawan organisme penyerang. Penyakit tuberkulosis dibagi menjadi :

- Tuberkulosis Primer : dimulai dari lesi yang dikenal dengan fokus Ghon's yang terletak di daerah tengah paru. Bakteri tuberkulosis yang difagosit makrofag di bawa ke bagian lain paru kemudian bakteri menyebar melalui limfatik menuju nodus tracheobronchial dan mediastinal membentuk komplek primer.
- Tuberkulosis Sekunder / Tuberkulosis Post Primer : terjadi rekuren tuberkulosis pada kemudian hari akibat reaktivasi fokus laten dari episode primer atau terjadi reinfeksi dengan tuberkulosis (Kim, 2002).

2.1.3 Gejala Klinis :

Penyakit infeksi kronik ini berjalan dengan fase sembuh-kambuh berulang. Penderita tuberkulosis paru dewasa mengalami gejala batuk berdahak terus menerus selama lebih dari tiga minggu dan sering disertai dahak bercampur darah, batuk darah, sesak nafas dan rasa nyeri di dada, badan lemah, nafsu makan dan berat badan menurun, rasa kurang enak badan (malaise), berkeringat malam dan demam. (Ernst, 1998; Bohlson *et al.*, 2001; Crevel *et al.*,2002).

2.1.4 *Mycobacterium tuberculosis*

Hanya sedikit mikroorganisme yang bertahan hidup dalam makrofag karena adanya vakuola fagosit yang bersifat asam dan enzim hidrolitik. *Mycobacterium tuberculosis* memiliki mekanisme *evasion* khusus yang memungkinkan bakteri ini bisa bertahan hidup dan bermultiplikasi dalam makrofag. Beberapa dihubungkan dengan keadaan fisikokimia pada permukaan *Mycobacterium tuberculosis* yang tidak

lazim. Pembungkus (*envelope*) dari *Mycobacterium tuberculosis* secara umum tersusun atas suatu membran plasma, dinding sel dan lapisan luar seperti kapsul (*a capsule like outhermost layer*). Pada elektron mikroskop dengan metode substitusi beku (*freeze-substitution methode*) terlihat paling sedikit 4 lapisan yang memiliki perbedaan yang khas yaitu :

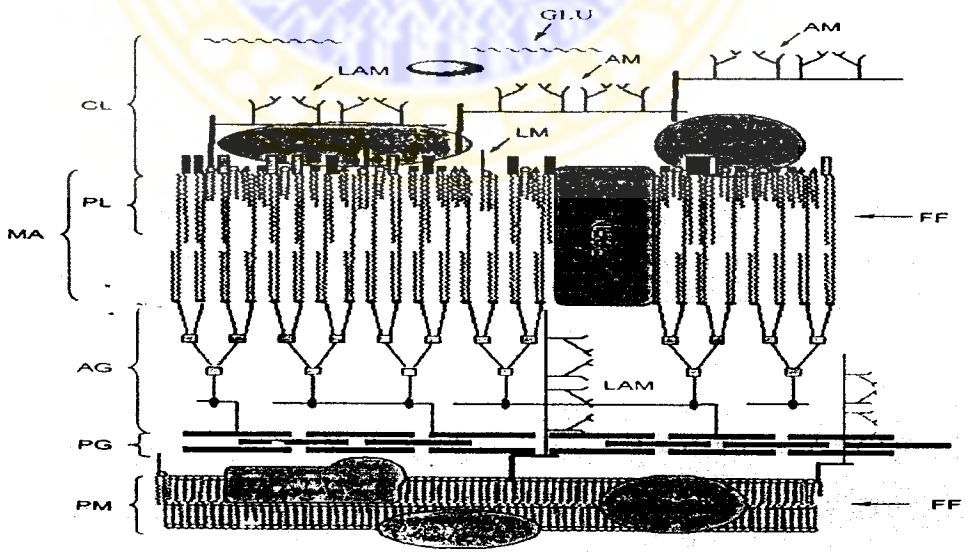
(1). *Inner plasma membrane* (PM); lapisan bilayer dengan ketebalan 4-4,5 nm

(2). *An electron-dense layer* (EDL); terdiri dari lapisan peptidoglikan (PG) dan terletak diluar lapisan PM

(3). *An electrone transparant zone* (ETZ); terdiri dari mycolic acids (MAs). Lapisan ini memiliki ketebalan 9-10 nm, bersifat *hidrofobic* sehingga zat yang larut dalam air tidak bisa menembusnya.

(4). *An outer-electron-dense layer* (OL); terdiri dari lipid, protein, glukan, mannan, arabinomannan (Ams), xylan dan lipoarabinomannan (LAM).

Bervariasi dalam ketebalan, densitas elektron, penampakan diantara spesies, kondisi tumbuh dan metode persiapan untuk mikroskop.



Gambar 2.2 Model Skematik Pembungkus Sel *(Cell envelope) Mycobacterium tuberculosis* (Fenton *et al.*,1996; Crick *et al.*, 2005).

Mycobacterium tuberculosis merupakan bakteri berbentuk batang berukuran : panjang 2-4μm dan lebar 0,2-0,5 μm, nonmotil, obligat aerob. Bakteri ini bersifat intraselular fakultatif, menginfeksi dan bertahan hidup serta bermultiplikasi dalam fagosit mononuklear (makrofag), memiliki waktu generasi 15-20 jam yang berkontribusi pada virulensinya (Joklik *et al.*, 1992; Todar, 2002; Brooks *et al.*, 2000).

Media yang digunakan untuk menumbuhkan *Mycobacterium tuberculosis* adalah meiddlebrook, Lowensterin-Jensen dan Ogawa. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* berukuran kecil dan berwarna buram ketika ditumbuhkam pada media pertumbuhan, tumbuh dalam 2-8 minggu. (Joklik *et al.*, 1992; Todar, 2002).

Mycobacterium tuberculosis memiliki dinding sel yang kaya akan parafin/lilin sehingga diklasifikasikan sebagai basil tahan asam, memiliki sifat impermeabel terhadap pengecatan tertentu, mampu mempertahankan warna saat dipanaskan dan diberi komponen organik bersifat asam. Suatu metode pengecatan tahan asam untuk *Mycobacterium tuberculosis* adalah pengecatan Ziehl-Neelsen. Basil tahan asam terlihat berwarna *pink* pada suatu latar belakang yang kontras (Collin, 2001; Todar, 2002).

Terdapat kemungkinan bahwa perbedaan virulensi diantara berbagai strain *Mycobacterium tuberculosis* memegang peranan dalam hasil akhir penyakit, namun secara umum dipercaya bahwa presentasi klinis penyakit tergantung keadaan sistem imun. Salah satu strain virulen yang dipakai pada penelitian ini adalah strain H37RV (Ernst, 1998; Rom and Condos, 2005)

2.1.5 Patogenesis Tuberkulosis

Sumber penularan tuberkulosis adalah penderita tuberkulosis BTA positif. Daya penularan seorang penderita ditentukan oleh banyaknya kuman yang

dikeluarkan dari parunya. Kemungkinan seseorang terinfeksi tuberkulosis ditentukan oleh konsentrasi *droplet* (percikan dahak) dalam udara dan lamanya menghirup udara tersebut (Anonim1, 2004). *Droplet* dengan diameter ≤ 5µm yang dikeluarkan saat berbicara atau batuk kemudian dihirup oleh individu yang peka/individu yang belum *immunized.* Jumlah kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang terdapat dalam *droplet* berukuran ≤ 5µm diperkirakan antara 1-10, atau sekitar 1- >400 kuman permilimeter *droplet-droplet.* Kuman tunggal memiliki potensi menimbulkan penyakit namun biasanya diperlukan sekitar 5-200 kuman yang terhirup, untuk menimbulkan infeksi pada manusia (Garay, 2005).

Patogenesis penyakit tuberkulosis terutama didasari oleh adanya proses imunopatologik akibat interaksi antara *Mycobacterium tuberculosis* dengan sel-sel imun dan sitokin-sitokinnya (Bohlson *et al.,* 2001). Patogenesis tuberkulosis membutuhkan kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk masuk dan replikasi dalam makrofag orang terinfeksi. Selama infeksi primer, *nuclei droplet-aerosol* yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* terdeposit pada bronkiolus respirotorius bagian distal atau alveoli paru kemudian difagosit makrofag alveolar. *Mycobacterium tuberculosis* memasuki makrofag melalui *receptor-mediated* . fagositosis yang merupakan suatu proses yang melibatkan TLR (*Toll Like* Receptor), reseptor komplemen (CR1, CR3 dan CR4), CD-14, Sp-A receptor (*Surfactant Protein* A), reseptor mannose dan *scavenger receptor.* Bakteri kemudian dihancurkan atau sebaliknya bermultiplikasi tergantung kemampuan *cidal* makrofag yang meliputi fusi fagolisosom, *respiratory burst,* produksi sitokin (terutama interleukin 12) yang membatasi pertumbuhan organisme dan aktivasi limfosit. Multiplikasi intraseluler dari bakteri berlangsung beberapa hari diikuti kematian makrofag. Makrofag terinfeksi mengeluarkan faktor-faktor kemotaktik yang menarik monosit dalam

sirkulasi. Sekitar 3-4 minggu kemudian, multiplikasi bakteri kemudian diikuti oleh timbulnya *cell mediated immunity*. Makrofag alveolar teraktivasi dan *lymphokine-activated T lymphocytes* meningkatkan kemampuannya merusak bakteri intraseluler. Hasil dari proses inflamasi patologi ini dikenal sebagai tuberkel atau granuloma (mengandung agregat dan sel-sel raksasa, *apoptotic bodies* dan makrofag terinfeksi). Infeksi paru primer yang disebabkan oleh *tubercle bacillus* menimbulkan suatu bronkopneumonia perkejuan, lesi primer ini biasanya terletak pada lapangan paru tengah dan bawah dalam suatu lokasi subpleura. Selama beberapa minggu pertama setelah infeksi *tubercle bacilli* bermultiplikasi mengandung eksudat inflamasi kemudian memasuki peredaran darah melalui sistem limfa dan vena kecil pada paru. Lesi primer dengan limfonod dan sistem limfatik yang mengalirinya membentuk suatu komplek yang dikenal sebagai *Ghon complex*. Saat lesi primer tereradikasi, masih ada basil sisa yang hidup dalam granuloma (*dormant stage*) sampai suatu saat bisa mengalami reaktivasi kembali jika imunitas host terganggu (*loss of cellular immunity or no host respon*) (Ernst, 1998; Giacomini *et al*., 2001; Lucy *et al*.,2002; Garay, 2005; Jagirdar *et* al., 2005).

2.2 Makrofag

2.2.1 Proliferasi dan diferensiasi Sistem Fagosit Mononuklear menjadi makrofag

Makrofag adalah kunci pengendalian terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri bermultiplikasi dalam *resting macrophages* namun sebaliknya dihambat pertumbuhannya atau dibunuh jika makrofag dalam keadaan teraktivasi (*activated macrophages*). Sel-sel darah diproduksi di sumsum tulang dan dilepaskan ke sirkulasi dalam bentuk; granulosit, eritrosit, platelet, limfosit, dan monosit. Proliferasi dan diferensiasi klasik dari sistem fagosit mononuklear (*the mononuclear*

phagocyte systeme) : promonoblast→ monoblast→ promonosit→ monosit→ makrofag. Pembelahan satu monoblast menghasilkan dua sel promonosit yang masing-masing membelah menjadi dua monosit. Promonosit akan mengalami pembelahan mitosis dua atau tiga kali sekitar 2-2,5 hari. Produksi monosit ini dikontrol oleh sejumlah faktor antara lain Interleukin-3 (IL-3) dan faktor pertumbuhan seperti GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*). Perkembangan dari monoblast menjadi monosit umumnya berlangsung 6 hari. Monosit dilepaskan ke sirkulasi darah dalam 12-24 jam setelah prekursornya lengkap mengalami pembelahan mitosis. Monosit diperkirakan memiliki waktu paruh dalam sirkulasi darah sekitar 8,5 jam. Selama memasuki jaringan, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag untuk membentuk fungsi pemeliharaan dan pengaturan jaringan penting seperti fagositosis, aktivitas tumorisidal dan bakterisidal, presentasi antigen dan sekresi berbagai substansi termasuk: enzim, komponen komplemen, faktor pembekuan jaringan, faktor pertumbuhan dan penghambat, dan substansi imunoregulator (Miller *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1994; Turgeon, 1999).

Monosit yang baru terbentuk berada dalam sumsum tulang kurang dari 24 jam sebelum akhirnya dilepas ke sirkulasi sebagai sel yang belum mengalami maturasi atau diferensiasi sempurna kemudian bermigrasi dari pembuluh darah ke jaringan dan rongga-rongga serosa setelah kurang lebih 24 jam menjadi makrofag yang matang dan berdiferensiasi lengkap dibawah pengaruh faktor-faktor pertumbuhan hematopoetik. Masa hidup makrofag dapat mencapai beberapa bulan bahkan beberapa tahun (Walker, 1976; Turgeon, 1999; Paulnock, 2000).

Makrofag terdapat diberbagai organ dan jaringan penyambung serta memiliki nama sesuai lokasi spesifiknya; seperti histiosit (dalam jaringan penyambung), mikroglia (dalam sistem saraf), sel kupffer (dalam sinusoid vaskular hepar), makrofag

alveolar (dalam paru), makrofag pleural dan peritoneal (dalam rongga serosa), makrofag jaringan tetap (*fixed tissue macrophage*) dan makrofag bebas (dalam limpa, limfonodi, sumsum tulang dan jaringan lain (Abbas *et al*, 2000).

2.2.2 Morfologi Makrofag

Pada waktu inflamasi, jumlah makrofag meningkat cepat karena peningkatan jumlah monosit dari darah dan peningkatan pembelahan makrofag dalam jaringan. Terkadang ditemukan fagosit besar berinti banyak yang disebut sel datia (*giant cell*). Sel ini berasal dari fusi beberapa sel makrofag atau dari pembelahan makrofag berulang tanpa sitokinesis (Parslow *et el.*,2001). Makrofag mempunyai ukuran, densitas dan morfologi bervariasi. Ukuran sel makrofag berkisar antara 10-30μm, inti berbentuk tapal kuda atau seperti ginjal berukuran 6-12 μm dan terletak eksentrik. Makrofag mempunyai tiga lapisan membran sel dengan banyak penonjolan dan invaginasi. Sitoplasmanya mengandung ribosom, mitokondria, vakuola pinositik dan vakuola fagositik. Lisosom dalam jumlah banyak tersebar dalam sitoplasma. Mikrotubuli terbentang sepanjang sitoplasma hingga membran sel (Territo *et al.*, 1976; Sears, 1997).

2.2.3 Aktivasi Makrofag

Aktivasi makrofag dapat terjadi melalui 2 jalur yaitu jalur klasik dan jalur alternatif. Pada jalur klasik dibutuhkan signal primer dari IFN-γ dimana saat mendapat stimuli dari bakteri, terjadi aktivasi klasik makrofag yang berperan sebagai *host defence* terutama terhadap infeksi bakteri termasuk *Mycobacterium tuberculosis.* Sedangkan pada jalur alternatif tidak diperlukan adanya *priming* dimana stimuli dari IL-42 dan atau IL-1326 sudah dapat menyebabkan aktivasi alternatif makrofag dan ini

terutama terjadi pada infeksi parasit dan pada beberapa keadaan patologi seperti alergi dan asma (Anonim 1, 2005). Makrofag yang teraktivasi (*activated macrophages*) memiliki morfologi, aktivitas metabolisme serta kapasitas fungsi yang berbeda dengan makrofag normal atau istirahat (*normal/ resting/resident macrophages*),yaitu :

1. Perubahan struktur atau morfologi : dengan mikroskop elektron tampak pada makrofag teraktivasi terjadi : ukuran sitoplasma membesar, organel dan lipatan membran lebih banyak termasuk granul lisososom yang lebih banyak.
2. Perubahan biokimia : peningkatan glikolisis dan transport nutrien, aktivasi reseptor C3b, peningkatan ekspresi MHC, reseptor Fc dan reseptor non imun lainnnya serta terjadi peningkatan produksi radikal bebas NO/$O2^-$.
3. Perubahan fungsi : peningkatan kecepatan migrasi dan kemampuan mikrobisidal, peningkatan produksi sitokin dan komplemen serta memiliki aktivitas anti tumor (Territo dan Cline, 1976; Werb, 1982; Bouley *et al.*, 2001; Schlesinger, 2003)

Kinetik aktivasi makrofag dipengaruhi : fungsinya, kondisi kultur dan terdapat limfosit atau tidak. Pada 24 jam inkubasi sebagai *monolayer* setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, dimana *adherence* merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan penting pada awal aktivasi makrofag selanjutnya *adherence* akan memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga dapat dilihat sejumlah aktivitas makrofag seperti peningkatan fagositosis yang diikuti sekresi enzim dan sitokin (termasuk Interleukin 12). Perubahan oksidasi glukosa dan fagositosis biasanya terjadi pada 48-72 jam, dimana 72 jam setelah infeksi terjadi peningkatan molekul MHC klas II dan penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag (CR3, CR4 dan FcγRII) serta *Mycobacterium*

tuberculosis mulai multiplikasi intraseluler (Territo dan Cline. 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002)

2.2.4 Peran Makrofag dalam infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Monosit dan makrofag memainkan peranan utama pada permulaan dan pemeliharaan respon imun terhadap patogen dan respon inang terhadap tumor, sebagian melalui sekresi beberapa produk poten dan sitokin makrofag (Giacomini *et al.*, 2001; Han *et al* ., 2002) Beberapa peneliti melaporkan adanya abnormalitas regulasi respon imun yang terutama diperankan oleh sel makrofag dan limfosit T. Makrofag memiliki kemampuan membunuh *Mycobacterium* dengan mekanisme ROI dan RNI juga berperan dalam mekanisme mikrobisidal melalui fusi fagolisosom. Pada infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* terjadi reaksi fagositosis oleh makrofag teraktivasi. Aktivasi makrofag dapat terjadi melalui sitokin khususnya IFN γ yang diproduksi oleh sel T. Bakteri akan merangsang produksi Interleukin 12 oleh makrofag yang merangsang sel Th1 memproduksi IFN-γ yang mengaktifkan makrofag untuk memproduksi ROI dan enzim-enzim yang dapat membunuh bakteri. Namun *Mycobacterium tuberculosis* yang dinding selnya mengandung lipoarabinomannan dapat mencegah fusi (penggabungan) lisosom dengan fagosom, menghambat fagositosis, pembentukan ROI/RNI atau terjadinya *Respiratory (oxidative) Burst* atau mengelak dari perangkap fagosom sehingga ia tetap bebas dalam sitoplasma dan terhindar dari proses pembunuhan selanjutnya, terutama terjadi pada *non activated* makrofag. Selain itu terjadi juga lisis sel yang terinfeksi oleh sel T-$CD8^+$. Protein bakteri intraseluler dapat merangsang sel T-$CD4^+$ (melalui komplek antigen-MHC kelas II) maupun sel T-$CD8^+$ (melalui komplek antigen-MHC kelas I) (Abbas *et al.*, 2000; Schorey *et al.*, 2002; Flynn, 2004).

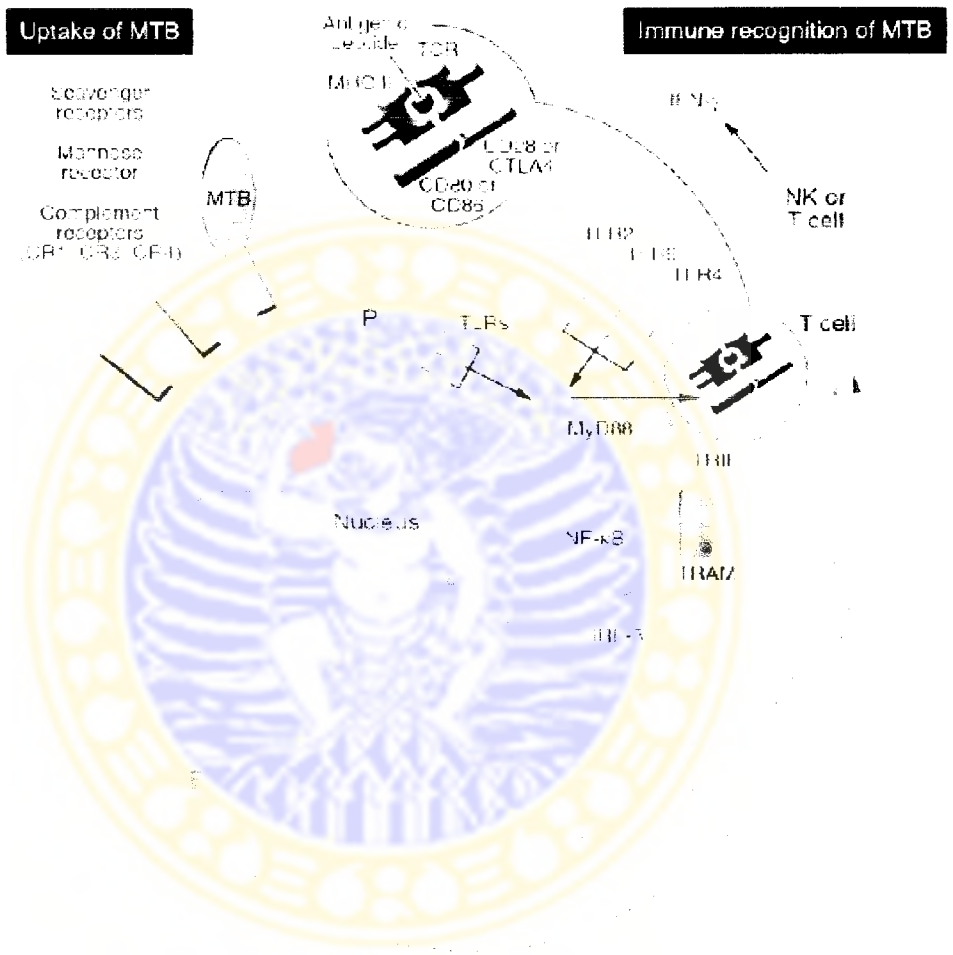
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Makrofag mempunyai peran penting dalam imunitas alami dan spesifik. Dalam imunitas alami makrofag dapat memfagosit partikel asing seperti mikroba, makromolekul, jaringan atau sel yang rusak diikuti degradasi sel, memproduksi sitokin dan berperan dalam biosintesa protein sistem komplemen (C1, C2, C3, C4, C5, Properdin, Faktor B, Faktor D, inaktivator C3b dan akselerator inaktivator C3b). Dalam imunitas spesifik makrofag bertindak sebagai APC (*Antigen Precenting Cell*), mempermudah eliminasi antigen teropsonisasi, memproduksi sitokin (IL-12, IL-18, IL-1, IL-6, dan TNF-α) (Abbas *et al.*, 2000; Parslow *et al.*, 2001; Crevel *et al.*, 2002).

2.2.5 Reseptor-reseptor pada Makrofag

Faktor pada makrofag terutama molekul-molekul reseptor permukaan makrofag seperti *Toll Like Receptor* (TLR) terutama TLR2, TLR4 dan TLR9 memiliki fungsi spesifik untuk berinteraksi dengan komponen *Mycobacterium tuberculosis* seperti TLR2 yang berinteraksi dengan LAM (Lipoarabinomannan) yang merupakan komponen dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* yang virulen, TLR4 berikatan dengan *undefined heat labille cells associated factor*, TLR9 berikatan dengan DNA *Mycobacterium tuberculosis*. TLR berperan dalam *Immune recognition* terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Sebagian besar TLR akan berikatan dengan IRAK melalui MyD 88 kecuali TLR3 yang melalui TRAM dan TRIF. Ekspresi TLR_s yang mengalami mutasi akan menyebabkan menurunnya produksi sitokin termasuk Interleukin 12. Polimorfisme genetik atau mutasi pada TLR yang relevan dapat berefek pada respon alami hospes terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Reseptor TLR berperan utama pada imunitas alami di awal infeksi, bekerja sama dengan reseptor lain pada permukaan makrofag seperti CD-14, *Complemen Reseptor* (CR) terutama CR3 dan CR4, FcγR, *mannose receptor,*

scavenger receptor yang mengikat determinan antigen mikroba sehingga menimbulkan signal tranduksi tertentu diikuti faktor transkipsi tertentu sehingga terekspresi molekul protein tertentu pula (Zabaleta *et al.,* 1998 ; Portales-Perez *et al.,* 2002)



Gambar 2.3 Hubungan *Innate* dan *adaptive immunity* pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Peran berbagai reseptor permukaan makrofag dan sitokin yang disekresi makrofag teraktivasi *Mycobacterium tuberculosis* (Doherty *et al.*, 2004)

2.3 Interleukin 12 pada Tuberkulosis

2.3.1 Peran Penting Interleukin 12 pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* menginduksi sekresi sejumlah sitokin, beberapa diantaranya penting dalam mengendalikan infeksi dan terlibat dalam patologi kerusakan yang terjadi pada tuberkulosis. Interferon-γ adalah sitokin yang sangat penting untuk eradikasi infeksi karena mampu menginduksi mekanisme bakterisidal makrofag. Sekresi Interleukin 12 oleh makrofag teraktivasi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* merupakan awal regulasi respon imun, sebagai sitokin proinflamatori yang memiliki potensi sangat tinggi dalam menginduksi produksi IFN-γ oleh sel Th1 dan sel NK, serta sangat penting dalam perkembangan sel Th1. Kedua sitokin tersebut diatas memegang peranan yang sangat penting dalam pertahanan *host* melawan infeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Mekanisme mikrobisidal *activated* makrofag yang diinduksi IFN-γ meliputi fusi fagolisosom, *respiratory burst*, produksi berbagai enzim litik dan sitokin lebih tinggi dibandingkan *resting* makrofag. Interleukin 12 disebut sebagai *crucial cytokine* dalam mengkontrol infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* dimana penurunan sekresi Interleukin 12 berdampak peningkatan *intraselular survival*, sedangkan peningkatan Interleukin 12 menstimuli profil Th1 sehingga meningkatkan produksi IFN-γ (Zabaleta *et al.,*1998; Joost, 2001; Koguchi *et al.,*2003; Flynn, 2004).

2.3.2 Proses Sekresi Interleukin 12

Proses sekresi Interleukin 12 diawali fagositosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis.* Terdapat peranan beberapa reseptor pada permukaan makrofag yaitu *complement receptors, mannose receptor* dan *scavenger receptors* . *Complement receptors* berperan dalam *uptake Mycobacterium tuberculosis* dengan opsonisasi;

mannose receptor dan *scavenger receptors* untuk *uptake Mycobacterium tuberculosis* yang non-opsonisasi. LAM (LipoArabinoMannan) merupakan komponen dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* disebut sebagai faktor virulen *Mycobacterium tuberculosis.* TLRs berperan dalam pengenalan imunitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, berikatan dengan LAM. Kemudian melalui MyD 88 (*Myeloid Differentiation protein* 88) suatu protein adaptor intraseluler yang menghubungkan TLRs dengan IRAK (IL-1 *Receptors Associated Kinase*) dan TRAF (*TNF Receptor Associated Faktor*) yang kemudian dapat mengaktivasi faktor translokasi NFkB (*Nuclear Factor k B*) dan transkripsi gen sehingga terjadi produksi interleukin 12. (Crevel *et al.,* 2002; Fremond *et al.,* 2004).

2.3.3 Faktor-faktor yang mempengaruhi sekresi Interleukin 12

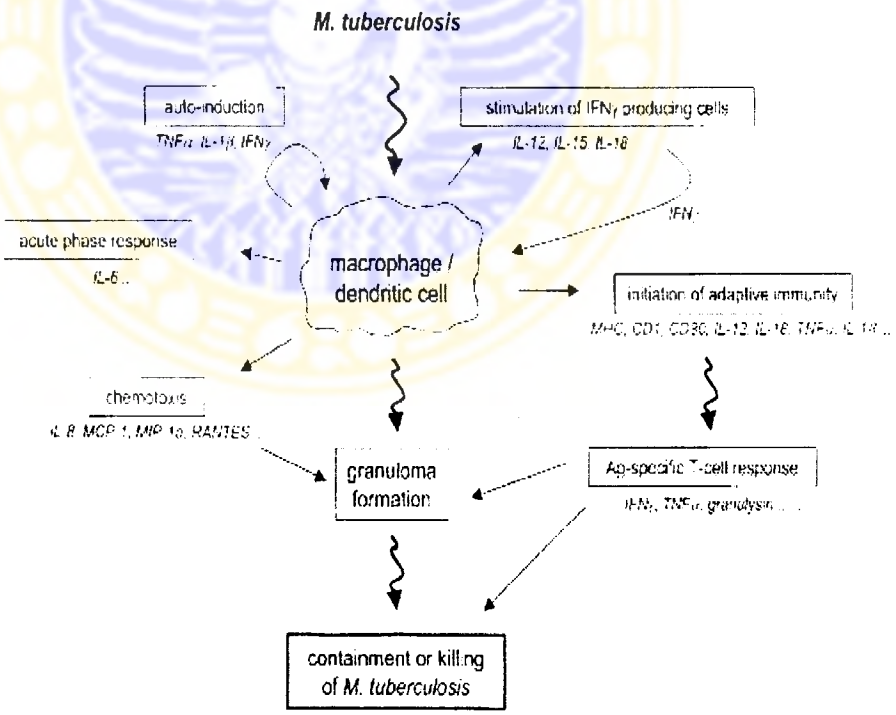
Sekresi Interleukin 12 pada tiap individu tidak lepas dari pengaruh genetik pada masing-masing individu dimana defek terhadap gen yang menyandi Interleukin 12 ternyata dilaporkan terjadi pada penderita tuberkulosis paru (Lee *et al.*,2002). Orang dengan mutasi pada gen Interleukin 12p40 atau gen reseptor Interleukin 12 bermanifestasi dalam penurunan produksi IFN-γ oleh sel T (IFNγ. diproduksi dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan individu yang tidak mengalami mutasi) dan orang ini lebih peka terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Selain itu dilaporkan juga individu dengan defisiensi IFN-γ sebagai akibat mutasi gen yang menyandi reseptor IFN-γ ternyata lebih peka terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Collin HL, 2001; Flynn,2004). Selain faktor internal (genetik), beberapa faktor ekternal yang mempengaruhi produksi Interleukin 12 oleh makrofag seperti komponen pada LAM yang merangsang *activated* makrofag memproduksi Interleukin

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

12 (PILAM$_s$ dan LM$_s$), sitokin anti inflamasi seperti ; IL-10, TGF-β, IL-4 menekan sekresi Interleukin 12 dan IFN-γ, (Crevel *et al.*, 2002; Dao *et al.*,2004)

2.3.4 Struktur Interleukin 12

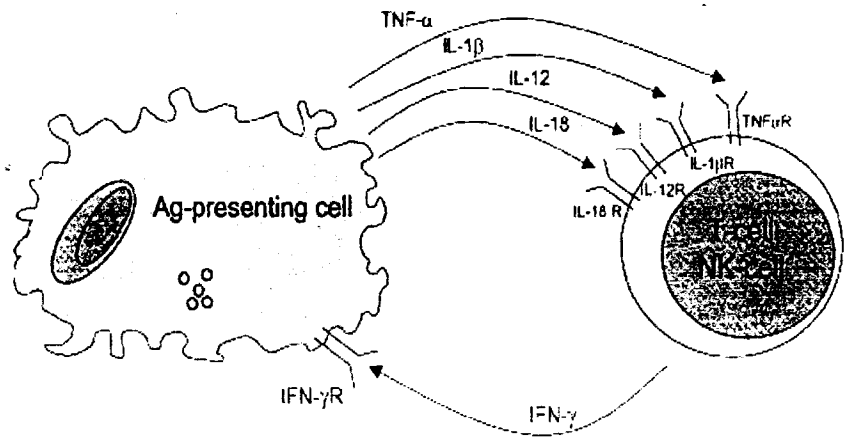
Interleukin 12 adalah sitokin heterodimerik, dihubungkan ikatan disulfida yang terdiri dari dua subunit 40-kd (p40) dan 35-kd (p35), dimana gen p35 selalu diekspresikan namun gen p40 hanya diekspresikan pada sel-sel yang memproduksi Interleukin 12 *bioaktif* (Gubler, 1991; Bertagnolli, 1992; Pathak *et al.*,2005). Ekspresi gen Interleukin 12 p35 sangat penting dalam produksi Interleukin 12 P70 heterodimer. gen Interleukin 12 p35 berperan dalam pengikatan reseptor dan tranduksi signal sedangkan gen Interleukin 12 P40 lebih berperan pada pengikatan reseptor (*receptor binding*) (Zou JJ, 1995).



Gambar 2.4 Respon inflamasi sel fagosit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Crevel *et al.*, 2002)

2.3.5 Hubungan Interleukin 12 dan sitokin-sitokin lain pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Interleukin 12 dibantu oleh sitokin proinflamatori lainnya (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-15 dan IL-18) dapat bekerja *autokrin* dan *parakrin* (Zabaleta *et al.*,1998). Interleukin 12 dan Interleukin 18 merupakan sitokin proinflamatori yang disekresi makrofag dan keduanya memiliki fungsi yang hampir sama dalam hal menginduksi produksi IFN-γ oleh sel Th1, namun ada beberapa perbedaaan sifat antara kedua sitokin ini dimana Interleukin 18 juga merupakan ko-inducer untuk sel Th2, pada tuberkulosis aktif Interleukin 18 produksinya tidak menurun sedangkan Interleukin 12 dan IFN-γ diproduksi menurun, Interleukin 18 membutuhkan Interleukin 12 dalam menginduksi produksi IFN-γ dan Interleukin 18 dapat disekresi sel monosit, makrofag, dendritik dan sel T sedangkan Interleukin 12 terutama diproduksi *activated* makrofag. Interleukin 15 juga menstimuli produksi IFN-γ oleh sel Th1 namun mRNA Interleukin 15 terekspresi lebih kuat pada infeksi *Mycobacterium leprae* dan perannya pada tuberkulosis masih belum jelas. TNF-α dan Interleukin 1β berperan terutama dalam pembentukan granuloma setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Song *et al.*,2000; Crevel *et al.*,2002). Interleukin 12 berperan dalam perkembangan prekursor sel T menjadi Th1 yang memperantarai resistensi melawan *Mycobacterium tuberculosis* (Munk *et al.*,1996; Rogge *et al.*, 1999). Interleukin 12 juga meningkatkan sitotoksisitas dan meningkatkan proliferasi dari sel T sitolitik-spesifik antigen dan sel NK (Copper, 1995). Fungsi reseptor Interleukin 12 diekspresikan secara primer pada sel T *activated* dan sel NK (Zhang *et al.*, 1999).



Gambar 2.5 Sitokin dan Reseptor Sitokin yang berperan dalam Imunitas tipe I melawan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Crevel *et al.*,2002).

2.3.6 Sekresi Interleukin 12 pada Penelitian sebelumnya

Penelitian sebelumnya pada donor sehat dengan mengunakan tehnik ELISA ditemukan sekresi Interleukin 12 oleh makrofag terinfeksi *Mycobacterium bovis* mulai terukur dalam konsentrasi sangat kecil pada 12 jam setelah infeksi dan meningkat secara bertahap pada 24 jam dan mencapai kadar maksimal pada 48 jam (Koguchi *et al.*, 2003). Penelitian lain dengan tehnik yang sama menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis yang distmulasi *invitro* dengan antigen PPD dari *Mycobacterium tuberculosis* mulai terukur pada 18 jam kemudian meningkat pada 48 jam setelah infeksi (Lee *et al.*,2002). Pada tuberkulosis, Interleukin 12 dapat dideteksi pada infiltrat paru (Casarini *et al.*, 1999), cairan pleura (Zhang *et al.*,1994), granuloma (Bergeron *et al.*, 1997) dan pada limfadenitis (Lin *et al.*,1996).

2.3.7 Interleukin 12 dan pembentukan granuloma pada Tuberkulosis

Interleukin 12 bertindak sebagai *antigen spesifik cell T response* sehingga sel T mensekresi IFN-γ. IFN-γ akan menginduksi sekresi TNF-α, Interleukin 1β oleh *activated* makrofag yang berperan dalam pembentukan granuloma setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Song *et al.*,2000; Crevel *et al.*,2002). Analisa granuloma matur pasien tuberkulosis paru menunjukkan Interleukin 12p40 dan IFN-γ dalam jumlah yang berlebihan (Fenhalls, 2002). Granuloma merupakan manifestasi reaksi DTH (*Delayed Tipe Hipersensitivity*) yang bersifat fisiologis terhadap antigen protein *Mycobacterium tuberculosis. Mycobacterium tuberculosis* memiliki beberapa mekanisme *evasion* dari *killing* oleh makrofag sehingga bisa tetap *dormant/containment* dalam makrofag dan menimbulkan *chronic antigenic stimulation* terhadap sel T dan *activated* makrofag sehingga terjadi perekrutan fagosit mononuklear dan sel T ke tempat replikasi bakteri dan bersama makrofag terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* membentuk akumulasi seluler. Sel T dan *activated* makrofag memproduksi berbagai sitokin dan chemokines yang mengaktifkan sel terinfeksi untuk mengendalikan *mycobacterial load* dan sel T sitotoksik sehingga terbentuk granuloma. Granuloma dengan bagian sentralnya *caseosa* mengandung makrofag, sel epiteloid, Langhans *giant cells*, jaringan nekrosis, debris sel dan *Mycobacterium tuberculosis* yang telah terbunuh. Pada granuloma terjadi mekanisme imunitas *host* membatasi penyebaran infeksi (*containment of infection*) serta *killing* sel yang terinfeksi dan *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler seperti ; aktivasi makrofag oleh IFN-γ, produksi iNOS, produksi TNFα dan LTα3 (limphotoxin α3) oleh sel T CD4 yang penting dalam pembentukan dinding kapsul granuloma serta aktivasi sel T CD8 yang membunuh *Mycobacterium tuberculosis* dalam makrofag melalui granulisin dan perforin. Granuloma selain berperan dalam melokalisasi dan

mencegah penyebaran *Mycobacterium tuberculosis* juga menimbulkan gangguan fungsi berat yang disebabkan nekrosis jaringan dan fibrosis (Crevel *et al.,* 2002; Abbas *et al.*, 2003; Ulrich *et al.,*2005). Selain bersifat fisiologis berupa pembentukan granuloma, DTH juga bisa bersifat patologi dimana terjadi respon imun yang berlebihan akibat *mycobacterial load* sehingga selain merusak *Mycobacterium tuberculosis* dan *non activating macrophages*, reaksi DTH yang bersifat patologi ini juga menimbulkan kerusakan berat jaringan sekitarnya. Pada DTH yang bersifat patologi ini terjadi nekrosis kaseosa *liquifaction* (Schlossberg D, 1999).

2.3.8 Aplikasi klinis Interleukin 12

Imunoterapi merupakan modalitas yang sering dipakai pada pasien dengan *Drug Resistent Tuberculosis*. Salah satu pendekatan dengan imunoterapi adalah pemberian vaksin yang merangsang peningkatan sitokin Th1. Strategi imunoterapi alternatif adalah pemberian sitokin yang langsung dapat meningkatkan eliminasi basil seperti IFN-γ, dan Interleukin 12. Suatu penelitian menunjukkan bahwa pemberian DNA Interleukin 12 ternyata mengurangi jumlah bakteri pada mencit yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Hal ini memberi masukan bahwa induksi Interleukin 12 merupakan faktor penting dalam vaksin terhadap tuberkulosis (Flyn, 2004; Condos *et al*, 2005).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Landasan Teori

Berbagai manifestasi yang timbul akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis* menggambarkan adanya keseimbangan antara *Mycobacterium tuberculosis* dengan mekanisme pertahanan tubuh hospes (*host immunity*) dimana terdapat peran penting dari makrofag sebagai eksekutor non spesifik dan sel T sebagai mediator spesifik dalam menghancurkan *Mycobacterium tuberculosis* (Joost, 2001).

Makrofag adalah kunci dalam pengendalian terhadap infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini dapat bermultiplikasi dalam *resting macrophages* namun sebaliknya dapat dihambat pertumbuhannya atau dibunuh jika makrofag dalam keadaan teraktivasi (*activated macrophages*). Makrofag yang teraktivasi (*activated macrophages*) memiliki morfologi, aktivitas metabolisme serta kapasitas fungsi yang berbeda dengan makrofag normal atau istirahat (*normal/ resting/resident macrophages*). Aktivasi makrofag dapat terjadi melalui sitokin khususnya IFN γ yang diproduksi oleh sel T. Sel Th1 memproduksi IFN-γ mengaktifkan makrofag untuk memproduksi ROI dan enzim-enzim yang dapat membunuh bakteri (Territo dan Cline, 1976; Turgeon, 1999; Schorey *et al.,* 2002; Schlesinger, 2003). Aktivasi makrofag pada 24 jam inkubasi setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, selanjutnya *adherence* akan memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga terjadi peningkatan fagositosis diikuti sekresi sitokin termasuk Interleukin 12. Pada 48-72 jam terjadi perubahan oksidasi glukosa dan fagositosis karena penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag kemudian *Mycobacterium tuberculosis* mulai multiplikasi

intraseluler (Territo dan Cline. 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002).

Pada fagositosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* terdapat peranan beberapa reseptor pada permukaan makrofag yaitu *complement receptors, mannose receptor* dan *scavenger receptors* . LAM (LipoArabinoMannan) merupakan komponen dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* disebut sebagai faktor virulen *Mycobacterium tuberculosis.* TLRs berperan dalam pengenalan imunitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis.* Kemudian melalui MyD 88 (*Myeloid Differentiation protein* 88) suatu protein adaptor intraseluler yang menghubungkan TLRs dengan IRAK (IL-1 *Receptors Associated Kinase*) dan TRAF (*TNF Receptor Associated Faktor*) yang kemudian dapat mengaktivasi faktor translokasi NFkB (*Nuclear Factor k B*) dan transkripsi gen sehingga terjadi produksi sitokin Interleukin 12 (Crevel *et al.*, 2002; Fremond *et al.*, 2004).

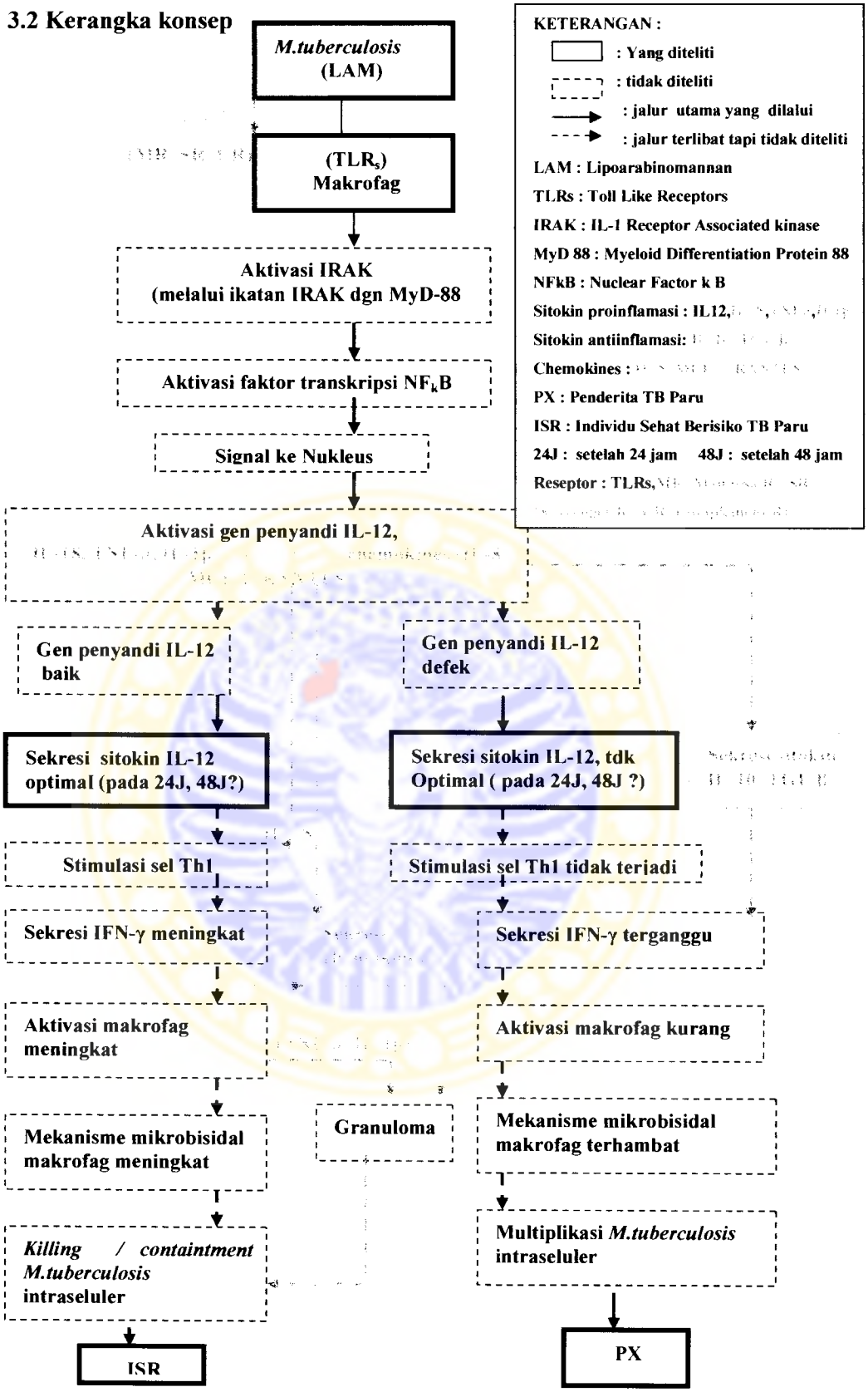
Interferon-γ mampu menginduksi mekanisme bakterisidal makrofag. Sekresi Interleukin 12 merupakan awal regulasi respon imun, sebagai sitokin proinflamatori yang memiliki potensi sangat tinggi dalam menginduksi produksi IFN-γ oleh sel Th1 dan sel NK. Kedua sitokin tersebut diatas memegang peranan yang sangat penting dalam pertahanan hospes melawan infeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Interleukin 12 disebut *crucial cytokine* dalam mengkontrol infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* dimana penurunan sekresi Interleukin 12 berdampak peningkatan *intraselular survival*, sedangkan peningkatan Interleukin 12 menstimuli profil Th1 sehingga meningkatkan produksi IFN-γ (Zabaleta *et al.*,1998; Joost, 2001; Koguchi *et al.*,2003; Flynn, 2004).

Sekresi Interleukin 12 pada individu dipengaruhi genetik pada masing-masing individu. Selain faktor internal (genetik), beberapa faktor ekternal yang

mempengaruhi produksi Interleukin 12 oleh makrofag seperti komponen pada LAM yang merangsang *activated* makrofag memproduksi Interleukin 12 (PILAM$_s$ dan LM$_s$), sitokin anti inflamasi seperti ;IL-10, TGF-β, IL-4 menekan sekresi Interleukin12 dan IFN-γ, (Crevel *et al.*, 2002; Dao *et al.*,2004)

Interleukin 12 bertindak sebagai *antigen spesifik cell T response* sehingga sel T mensekresi IFN-γ. IFN-γ akan menginduksi sekresi TNF-α, Interleukin 1β oleh *activated* makrofag yang berperan dalam pembentukan granuloma setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Song *et al.*,2000; Crevel *et al.*,2002). Analisa granuloma matur pasien tuberkulosis paru menunjukkan Interleukin 12p40 dan IFN-γ dalam jumlah yang berlebihan (Fenhalls, 2002). Granuloma merupakan manifestasi reaksi DTH (*Delayed Tipe Hipersensitivity*) terhadap antigen protein *Mycobacterium tuberculosis.* Pada granuloma terjadi mekanisme imunitas hospes membatasi penyebaran infeksi (*containment of infection*) serta *killing* sel yang terinfeksi dan *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler (Crevel *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*,2005).

3.2 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual Penelitian

3.3 Hipotesis Penelitian:

Hipotesa penelitian ini adalah :

a. Sekresi Interleukin 12 pada supernatan kultur makrofag dari individu sehat yang berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru.

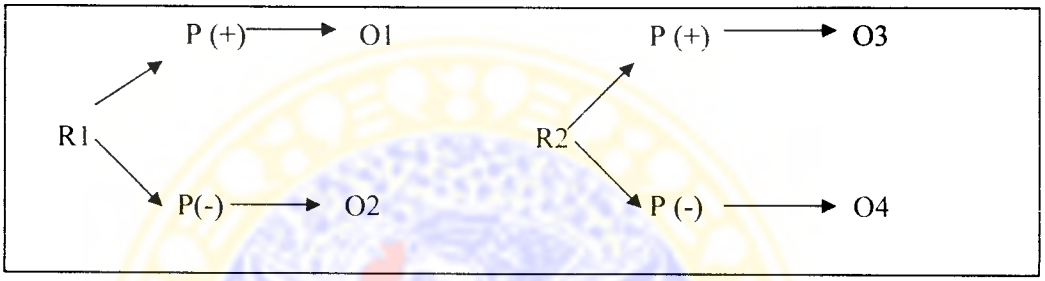
b. Sekresi Interleukin 12 pada supernatan kultur makrofag dari individu sehat yang berisiko tuberkulosis paru setelah 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada penderita tuberkulosis paru.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian :

Penelitian ini merupakan penelitian " Eksperimental Laboratorium" dengan rancangan penelitian *Post test only control group design*, mengukur kadar Interleukin 12 pada supernatan kultur makrofag yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat yang berisiko tuberkulosis paru.



Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian

Secara random (R1), makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru di kelompokkan menjadi 2 yaitu kelompok perlakuan /P (+) dan kelompok kontrol / P (-)

Secara random (R2), makrofag dari penderita tuberkulosis paru di kelompokkan menjadi 2 yaitu kelompok perlakuan / P (+) dan kelompok kontrol / P (-)

Kepada kelompok **perlakuan** diberikan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* / P(+) sedangkan pada kelompok **kontrol** tidak diberikan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* / P (-)

Ukur Interleukin 12 dengan Elisa kit setelah 24 jam dan 48 jam perlakuan baik pada kelompok perlakuan (O1 dan O3) maupun kontrol (O2 dan O4)

4.2 Sampel dan Besar Sampel

4.2.1 Sampel

a. Sampel makrofag penderita tuberkulosis paru adalah makrofag yang berasal dari penderita tuberkulosis paru.

b. Sampel makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru adalah makrofag yang berasal dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru

4.2.2 Besar Sampel

Besar sampel (n) minimal sesuai rumus Widodo : $(Z\alpha + Z\beta)^2 = (1{,}65 + 0{,}842)^2 = 6$, diambil secara tehnik random; masing-masing 6 orang penderita tuberkulosis paru dan 6 orang individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

Jumlah makrofag yang digunakan tiap pengulangan/replikasi : 10^5 sel/ml (Zhang *et al.*,1998; Li *et al.*,2002). Jumlah pengulangan ditentukan berdasarkan rumus :

$(p-1)\ (u-1) \geq 15$

$(8-1)(u-1) \geq 15$

$7\ (u-1) \geq 15$

$7u - 7 \geq 15$

$7u \geq 15 + 7$

$u \geq 22 / 7$

$u \geq 3{,}14$

$u = 4$

Keterangan : p = perlakuan = 8 perlakuan. u = ulangan

Jadi, ulangan untuk tiap perlakuan minimal 4 kali. Dalam penelitian ini dipakai 6 kali pengulangan karena menyesuaikan dengan jumlah sampel yaitu masing-masing 6

orang. Sehingga besar sampel masing-masing penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru adalah 6 x 8 x 2 x 10^5 makrofag.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel bebas meliputi jenis makrofag (makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru)

b. Variabel tergantung meliputi konsentrasi Interleukin12.

c. Variabel kendali meliputi jumlah sel makrofag yang digunakan (2 x 10^5) dan jumlah *Mycobacterium tuberculosis* yang dipaparkan (1,5 x 10^5 CFU/ml).

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

a. Penderita tuberkulosis paru : penderita yang menjalani perawatan di UPF Penyakit Paru RSU Soetomo dengan batuk produktif lebih dari 3 minggu (klinis positif), pemeriksaan X-ray dada dan kultur sputum *Mycobacterium tuberculosis* positif (DepKes, 2002).

b. Individu sehat berisiko tuberkulosis paru : paramedis yang bekerja di UPF Penyakit Paru atau laboratorium mikrobiologi lebih dari 5 tahun dengan pekerjaan berisiko terpapar kuman *Mycobacterium tuberculosis*, hasil pemeriksaan klinis, X-ray foto dada negatif dan kultur sputum *Mycobacterium tuberculosis* negatif (DepKes, 2002).

c. Makrofag : Sel imun monosit yang dapat diperoleh dari darah tepi (dari darah vena cubiti) (Zabaleta *et al.*, 1998)

d. Sekresi Interleukin 12 oleh makrofag : kemampuan makrofag memproduksi Interleukin 12 yang diukur menggunakan teknik ELISA (Portales Perez *et al*, 2002).

e. *Mycobacterium tuberculosis* : kultur murni strain *Mycobacterium tuberculosis* H37RV (ATCC 27294) yang berumur 3-4 minggu.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian

4.4.1 Persiapan Makrofag

a. PBMC (*Periheral Blood Mononuclear Cells*)

b. Ficoll-Histopaque (Sigma)

c. Heparin

d. RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)- (Merck)

e. PBS (Phospate Buffer Saline)- (Sigma)

f. *Heat inactivated human serum* 10%

g. Penicillin G

h. Natrium Bicarbonat

i. FCS (*Fetal Cow Serum*) 10%

j. Kapas dan alkohol 70% untuk desinfeksi

k. Larutan Giemsa untuk pengecatan makrofag

l. Spuit 10 cc

m. Millipore

n. Pipet pasteur

o. 24 *well tissue culture plate* (Nunc Ltd)

p. Mikropipet

q. Sentrifus (*Swinging Bucket Rotor*)

r. Coverslip

s. Tabung sentrifus conical polipropilen 15 ml dan 50 ml

4.4.2 Persiapan Suspensi *Mycobacterium tuberculosis*

a. Kuman *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (ATCC 27294), dari Laboratorium Tuberkulosis TDC Universitas Airlangga

b. *Glass bead*

c. Ose Platina

d. Mikropipet

e. Medum cair 7H9

f. Tabung *screw cap*

g. Bunsen

h. Vortek

i. Gliserin

4.4.3 Uji Sekresi Interleukin 12

a. Kit komersial ELISA-Accucyte Human Interleukin 12 (p70) (Cyt Science Inc, Maryland), yang terdiri dari :

- Larutan Buffer pencuci (*wash buffer*); dalam botol 50 ml
- Larutan Pengencer (*diluent* 1 dan 2) ; dalam botol masing-masing 30 ml
- Standard Interleukin 12; vial (*lyophilized*)
- Antibodi Interleukin 12; vial (*lyophilized*)
- Konjugat Interleukin 12; vial (lyophilized)
- *Plate sealer*; Acetate *plate sealer*
- Color reagen A dan Color reagen B; dalam botol masing-masing 12 ml
- Streptavidin Alkaline Phosphatase; vial *lyophilized* enzyme
- *Stop solution*; dalam botol 10 ml yang mengandung 0,5M sulfuric acid

- *Pre-coated 96-well mikrotiter plate*; *goat anti-rabbit pre-coated 96-well microtiter plate sealed in a foil pouh*

Wash buffer, Diluent 1 dan 2, Color reagen A dan B mengandung sodium azide yang dapat bereaksi dengan tembaga dapat menimbulkan ledakan. Selama pembuangan bersihkan dengan air yang banyak serta cegah kontak dengan kulit.

Stop solution merupakan *caustic material* (dapat membakar kulit), mengandung 0,5M *sulfuric acid*, sehingga saat memakai larutan ini lindungi mata, tangan dan wajah.

b. ELISA *Reader*

Untuk mendapatkan presisi yang tinggi perlu hasil yang bersifat kuantitatif yang dalam penelitian ini dipakai ELISA *reader*.

c. Multi Channel pipettor

d. Vortek mekanik

e. Tips

f. Tabung sentrifus

g. Tabung tes

h. Larutan fisiologis (NaCl 0,9%)

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Tuberkulosis TDC (*Tropical Disease Centre*) Universitas Airlangga.

4.5.2 Waktu Penelitian

Proses penelitian dilakukan dari bulan Agustus 2005 sampai Mei 2006, dengan jadwal sebagai berikut :

Tabel 4.5.2 Jadwal Penelitian

Kegiatan	Bulan Pelaksanaan (2005-2006)									
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
Studi Kepustakaan	*	*	*	*						
Penulisan Proposal					*	*	*			
Ujian Proposal								*		
Perbaikan Proposal								*		
Persiapan Penelitian								*		
Penelitian									*	
Penulisan Tesis									*	*
Ujian Tesis										*

4.6 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.6.1 Persiapan penderita tuberkulosis paru dan individu sehat.

Calon peserta penelitian mendapat penjelasan tujuan penelitian dan menyetujui ikut serta dalam penelitian dengan menandatangani surat pernyataan kesediaan.

4.6.2 Preparasi kultur sel-sel makrofag dari darah tepi (penderita tuberkulosis paru maupun individu sehat berisiko tuberkulosis paru).

a. Darah tepi diambil secara aseptik dari vena cubiti sebanyak ±10 ml dituang kedalam botol erlenmeyer yang berisi 5-10 glass beads berdiameter 2 mm (steril).

b. Defibrinasi dilakukan dengan mengocok hati-hati selama 10 menit

c. Kemudian ditambahkan 5 ml RPMI digoyang-goyang perlahan hingga campuran homogen

d. Lakukan pemisahan sel mononuklear dengan mengalirkan campuran darah tersebut menggunakan pipet pasteur secara perlahan-lahan pada dinding tabung (3 tabung) yang masing-masing mengandung 3ml Ficoll-Histopaque (Sigma) (Zhang *et al.*,1998; Li *et al.*,2002)

e. Sentrifus pada *swinging bucket rotor sentrifuse* dengan kecepatan 2000 rpm, selama 30 menit pada suhu 20^0C.

f. *Buffy coat* diambil dengan memakai pipet pasteur lalu dipindahkan ke tabung conical.

g. Tambahkan 5 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline)* steril kedalam tabung conical yang berisi *buffy coat*

h. Sentrifus pada *swinging bucket rotor sentrifuse* dengan kecepatan 2000 rpm, selama 10 menit pada suhu 20^0C

i. Buang lapisan atasnya kemudian Peletnya dibilas dengan PBS sebanyak 3 kali.

j. Lalu disentrifus lagi pada *swinging bucket rotor sentrifuse* dengan kecepatan 2000 rpm, selama 10 menit pada suhu 20^0C

k. Kemudian dilakukan pengujian dan penghitungan viabilitas sel-sel pada suspensi tersebut dengan uji *tryphan blue.* Sel-sel dikatakan viabel jika ≥ 95 % sel-sel tersebut sitoplasmanya tidak tercat (MacDonal, 1994; Zhang *et al.,* 1998).

l. Menghitung persentase monosit dalam mononuklear dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000 x dengan melihat 100 lapangan pandang secara beraturan pada apusan yang dicat dengan Giemsa. Persentase monosit dalam mononuklear ± 10-20% (Paulnock, 2000).

m. Peletnya ditambah RPMI 1640 (Gibco) yang disuplementasi dengan 10%. *Heat inactivated human serum* dan penicillin, kemudian inkubasi dalam inkubator CO2 5% selama 30 (Zabaleta *et al.*, 1998)

4.6.3 Persiapan maturasi monosit menjadi makrofag (*in vitro*):

a. Setelah inkubasi selama 30-60 menit pada 37°C dan 5% CO_2, kemudian ditambahkan 1 ml medium RPMI 1640 yang disuplementasi dengan 10% HIPHS (*Heat Inactivated Poolen Human Serum*) dan penicillin.

b. Setelah diinkubasi 24 jam diamati pertumbuhan sel dengan *inverted microscope*, lalu lakukan pencucian dengan cara menyedot hati-hati tepi atas masing-masing *well* dengan mikropipet tapi jangan sampai kering kemudian masukkan 1 ml RPMI (tanpa HIPHS dan penisilin) atau bisa dengan PBS ke masing-masing *well* secara hati-hari, kemudian sedot lagi secara perlahan tepi *well* jangan sampai kering (dilakukan lebih kurang 5x sehingga dapat dipastikan tidak ada sel lain selain monosit.

c. Kemudian lakukan *feeding* dengan memasukkan 500 µl RPMI (mengandung HIPHS dan penisilin) kedalam masing-masing *well* . Lalu diinkubasi lagi pada pada 37°C dan 5% CO_2 (Nan *et al*, 2002; Portales-Peres *et al.*, 2002)

4.6.4 Preparasi suspensi *Mycobacterium tuberculosis*

a. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC-27294 umur 3-4 minggu pada media Lowenstein-Jensen (L-J) diambil 1 (satu) ose (diameter 2 mm) disuspensikan ke dalam 5 ml medium RPMI (+ 3 % gliserin + 10 % serum HIPHS) dalam tabung + glass beads (diameter 2 mm; 6-8 beads)

b. Vortex sampai homogen, kemudian dibiarkan 30 menit, sehingga bagian gumpalan kasar dibawah. Bagian atas kandungan *Mycobacterium tuberculosis* setara 1,5 x 10^7 per ml (S) diambil 0,2 ml disuspensikan dalam 3,8 ml RPMI (S1) diperoleh kandungan *Mycobacterium tuberculosis* setara dengan 7,5 x 10^5 CFU/ml.

c. Untuk persiapan 200 µl (1,5 x 10^5 CFU) ditambahkan kedalam setiap sumuran (kelompok perlakuan); satu set eksperimen dengan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* yang sama (*a single batch of mycobacteria*) (Fulton *et al.*, 1996)

4.6.5 Pengukuran produksi Interleukin 12

Pengukuran produksi Interleukin 12 dari supernatan kultur yang diamati, menggunakan kit komersial ELISA (Cyt Science Inc, Maryland), dikerjakan dan diukur level produksinya sesuai prosedur buku pedoman pada *Accucyte Human Interleukin 12*. Prinsip uji ELISA Interleukin 12 pada *Accucyte human Interleukin 12* adalah merupakan *competitive enzyme imunoasai* (EIA) dimana secara umum terdapat antibodi spesifik yang diikat pada fase padat kemudian ditambahkan standards/sampel yang mengandung antigen yang tidak diketahui, antibodi Interleukin 12 dan konjugat Interleukin 12 sehingga terjadi kompetisi dalam mengikat sejumlah terbatas antibodi yang terikat pada fase padat, setelah itu penambahan enzim dan *color development system*. Berikut dijabarkan langkah-langkahnya secara lebih mendetail yang disesuaikan dengan buku petunjuk *Accucyte Human* Interleukin 12:

a. Masukkan masing-masing 100 µl standar 0-6 ke dalam well A-G (contoh : standar 0 dimasukkan ke well A demikian seterusnya)

b. Masukkan masing-masing 100 µl supernatan kultur ke dalam well-well yang telah ditentukan

c. Tambahkan masing-masing 25 µl *Rabbit anti human Interleukin 12* ke tiap-tiap well kemudian ditutup dengan *seal* dan diinkubasi selama 3 jam dalam suhu kamar.

→ sambil: campurkan *color reagen* A dan B (tiap well 200 µl)

d. Lepaskan *seal* dengan hati-hati, tambahkan 25 µl Interleukin 12 *conjugate* ke tiap-tiap well lalu pasang *seal* nya kembali kemudian inkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar

e. Cuci sebanyak 5 kali dengan multi channel, pada saat pencucian yang ke 5 soak selama 10 menit

f. Tambahkan 50 µl streptavidin pada tiap well kemudian inkubasi

g. Cuci lagi sebanyak 5 kali dengan multi channel, pada saat pencucian yang ke 5 soak selama 10 menit

h. Tambahkan 200 µl campuran *color reagen* A dan B pada tiap well lalu inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit.

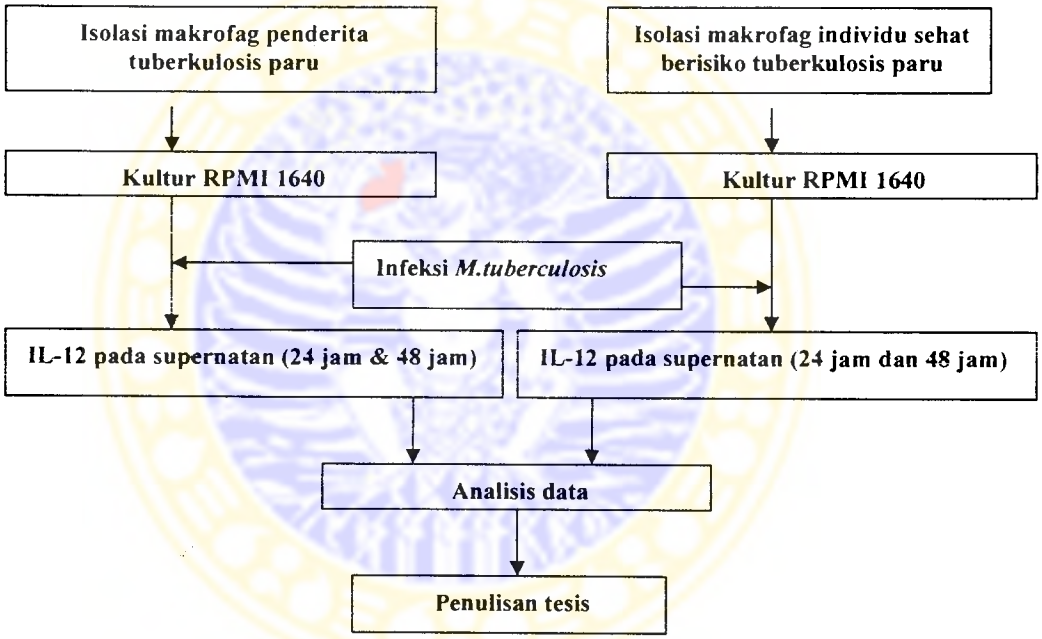
→ sebelum di baca "tap-tap" terlebih dahulu

i. Baca dengan ELISA reader pada 490 nm, pada saat O.D (*Optic Density*) pada standar 0 mencapai 1,6→ print, kemudian tambahkan 50 µl *stop solution* pada tiap well sesuai penambahan *color reagen* → lalu di baca lagi dan *print*.

4.7 Tehnik Analisis Data :

Hasil penelitian dicatat kemudian dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan uji F pada taraf nyata 5% (Sudjana,1996). *Analysis of Variance* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan terhadap konsentrasi Interleukin 12. Hasil analisis yang bermakna dilanjutkan dengan uji *Least Square Different* (LSD).

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 Skema Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN

ANALISIS HASIL PENELITIAN

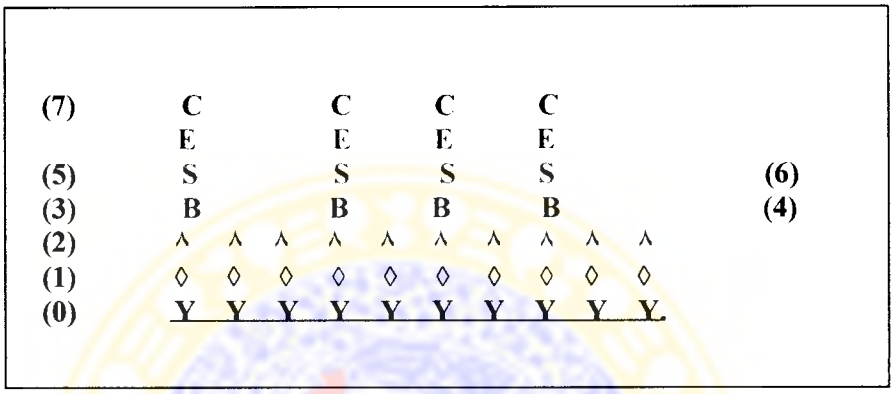
5.1 Hasil Uji Sekresi Interleukin 12 pada Kultur Makrofag dari Penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Data hasil uji sekresi interleukin diperoleh dengan memeriksa supernatan kultur makrofag dari ke dua kelompok sampel. Kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan yang dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan pengukuran pada inkubasi 24 jam dan 48 jam. Pengukuran dilakukan dengan tehnik ELISA menggunakan kit komersial ELISA *Accucyte Human* IL-12. dikerjakan dan diukur level produksinya sesuai prosedur (Cyt Science Inc, Maryland) .

5.1.1 Prinsip Uji Interleukin 12 dengan kit ELISA *Accucyte Human* IL-12 (Cyt Science Inc, Maryland)

Prinsip uji ELISA Interleukin 12 pada *Accucyte human Interleukin 12* adalah merupakan *competitive enzyme immuno assay* (EIA) dimana secara umum terdapat *goat anti-rabbit* anti Interleukin 12 yang diikat pada fase padat kemudian ditambahkan standards/sampel yang diperkirakan mengandung Interleukin 12, antibodi Interleukin 12 dan *biotinylated conjugate* Interleukin 12 (*competitive ligand*) sehingga terjadi kompetisi dalam mengikat sejumlah terbatas anti Interleukin 12 yang terikat pada fase padat, setelah itu dilakukan penambahan enzim alkaline phosphatase

yang telah berikatan dengan streptavidin (streptavidin alkaline phosphatase) yang nantinya akan berikatan dengan *biotinylated conjugate* Interleukin 12 dan terakhir ditambahkan *color development system.* Sehingga terbentuk warna merah yang berbanding terbalik dengan konsentrasi Interleukin 12 yang terkandung pada sampel. Skema prinsip Uji Interleukin 12 dengan kit ELISA *Accucyte Human* IL-12 (Cyt Science Inc, Maryland) dapat dilihat pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Skema prinsip Uji Interleukin 12 dengan kit ELISA *Accucyte Human* IL-12 (Cyt Science Inc, Maryland).

Keterangan Gambar 5.1:

B = *Biotinylated conjugate* Interleukin 12

S = Streptavidin

E = Enzim (Alkaline phosphatase) disini sudah berikatan dengan streptavidin

C = *Color*

(0) : Fase padat yang dilapisi *goat anti-rabbit anti* Interleukin 12

(1) : Penambahan standar /sampel yang mengandung Interleukin 12, terdapat 6 sampel yang mengandung Interleukin 12 yang terikat pada fase padat sehingga sisa yang tidak terikat ada 4.

(2) :Penambahan antibodi I terhadap Interleukin 12 jadi berikatan dengan Interleukin 12 pada sampel yang telah terikat pada fase padat.

(3) : Penambahan *biotinylated conjugate* Interleukin 12 yang bersifat kompetitif akan berikatan dengan fase padat sisa yang tidak mengikat Interleukin 12 pada standar/sampel yaitu ada 4.

(4) : Pencucian tahap I

(5) : Penambahan streptavidin alkaline phosphatase, dimana streptavidin akan berikatan dengan biotin (*biotinylated conjugate* Interleukin 12).

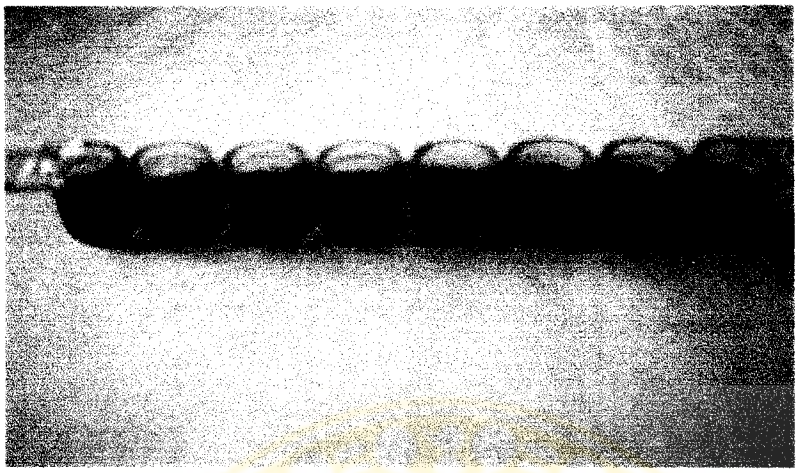
(6) : Pencucian tahap II

(7) : Penambahan substrat berkromogen yang nantinya akan bereaksi dengan enzim alkaline phosphatase sehingga membentuk warna merah. Jadi karena yang terikat dengan *biotinylated conjugate* Interleukin 12 ada 4 sehingga yang terakhir memberi warna hanya ada 4 saja sehingga terbentuk warna merah yang muda sedangkan yang tidak membentuk warna ada 6 (yang mengandung Interkeukin 12). Ini menimbulkan hubungan terbalik (*inverse relationship*) antara konsentrasi Interleukin 12 dengan warna merah yang terbentuk.

5.1.2 Hasil Uji Interleukin 12 pada Konsentrasi Standards

Pertama-tama, sebelum dilakukan uji ELISA terhadap sampel yang dalam penelitian ini berupa supernatan kultur makrofag maka terlebih dahulu diuji Standards ELISA Interleukin 12 ini. Pada penelitian ini prosedur pengujiannya berpedoman pada buku petunjuk *Accucyte Human IL-12*. Dengan konsentrasi awal yang diketahui dapat dilakukan uji ELISA sehingga diketahui absorbance dari Standards. Setelah dilakukan pengenceran berturut-turut diperoleh 7 konsentrasi standards. Perlunya uji ELISA untuk Standards terutama berguna untuk menentukan apakah uji ELISA untuk sampel-sampel berikutnya layak dilakukan atau tidak dimana jika kurva untuk

standards sesuai dengan buku petunjuk barulah hasil uji ELISA untuk sampel-sampel itu benar.



Gambar 5.2 ELISA sumur-sumur Standar (7 sumur pertama) dan 1 sumur sampel (1 sumur terakhir). Secara kualitatif menunjukkan hasil yang positif (ditunjukkan warna merah).

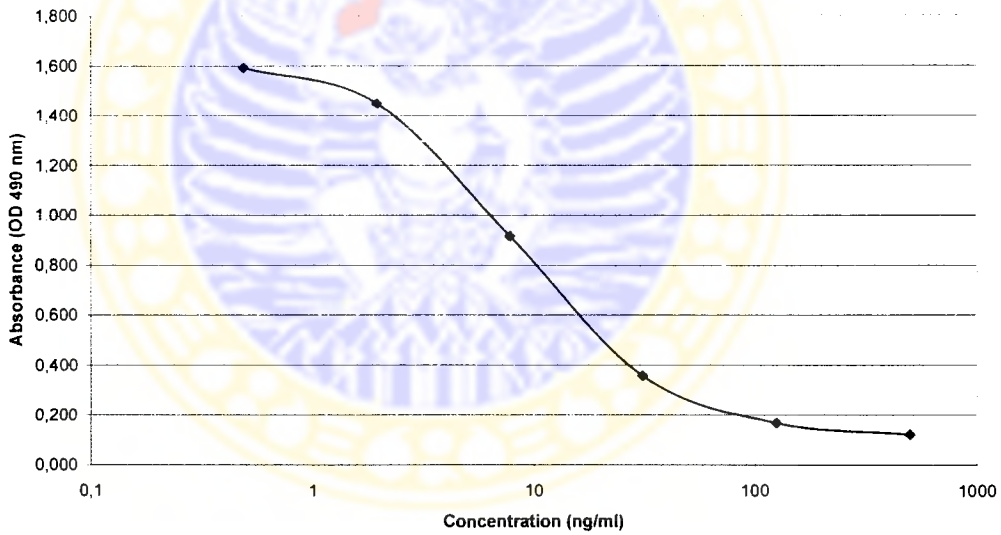
Gambar 5.2 memperlihatkan ELISA sumur-sumur standards sebagai dasar untuk pengukuran konsentrasi Interleukin 12. Tampak 7 sumur untuk standards serta 1 sumur sampel menunjukkan warna merah dengan intensitas yang berbeda-beda serta mengabsorbsi cahaya pada 490 nm. Warna merah bersifat kualitatif, yang menunjukkan bahwa hasil positif mengandung Interleukin 12. Sedangkan untuk uji kuantitatif dilakukan melalui pembacaan angka hasil spektrofotometer/absorbance menggunakan ELISA *reader*, kemudian ditarik garis-garis pada kurva standar sehingga ditemukan angka konsentrasi interleukin 12.

Tabel 5.1.2 menyajikan data hasil absorbance dari Standards Interleukin 12 yang diuji ELISA dimana konsentrasi untuk standards sudah diketahui sebelumnya dari buku petunjuk *Accucyte Human* IL-12.

Tabel 5.1.2 Nilai Absorbance (OD= 490 nm) Interleukin 12 yang diperoleh dari uji ELISA terhadap berbagai konsentrasi (ng/ml) standards Interleukin 12.

Standards	Konsentrasi (ng/ml)	Absorbance (OD= 490)
A	0.000	1.665
G	0.488	1.615
F	1.953	1.338
E	7.812	0.813
D	31.25	0.5
C	125	0.369
B	500	0.35

Kurva standards menunjukkan hubungan yang terbalik (*inverse relationship*) antara *Optical Density* (OD) dengan konsentrasi sitokin, dimana sampel yang memiliki OD yang lebih tinggi akan memiliki konsentrasi sitokin yang lebih rendah (sesuai *Accucyte* human IL-12).



Gambar 5.3 Kurva standards Interleukin 12. Tampak hubungan terbalik antara OD (*Optical Density*) dengan konsentrasi Interleukin 12.

Langkah-langkah pengukuran disesuaikan dengan buku petunjuk *Accucyte Human* IL-12. Pembacaan hasil dengan ELISA reader pada 490 nm, dan didapatkan hasil berupa nilai absorbance (OD/*Optic Density* pada 490 nm). Kemudian

konsentrasi bisa dihitung dengan cara manual yaitu menggunakan bantuan kurva standar (gambar 5.3) dimana dari nilai absorbance yang diperoleh ditarik garis horisontal sehingga memotong kurva, kemudian ditarik garis vertikal kebawah (arah axis X) sehingga diperoleh konsentrasi Interleukin 12.

5.1.3 Pengelompokan Sampel Supernatan Kultur Makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru berdasarkan Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat delapan kelompok perlakuan yang ditunjukkan pada tabel 5.1.3.

Tabel 5.1.3 Delapan kelompok perlakuan pada penelitian. Terdiri dari 4 kelompok dari penderita tuberkulosis paru dan 4 kelompok dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

Kelompok	Subyek	Infeksi *M.tuberculosis*	Inkubasi (jam)
1	Penderita Tuberkulosis Paru	-	24
2	Penderita Tuberkulosis Paru	-	48
3	Penderita Tuberkulosis Paru	+	24
4	Penderita Tuberkulosis Paru	+	48
5	Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru	-	24
6	Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru	-	48
7	Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru	+	24
8	Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru	+	48

5.1.4 Hasil Uji Interleukin 12 pada Kelompok Sampel Supernatan Kultur Makrofag dari Penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru berdasarkan Perlakuan

Hasil uji Interleukin 12 pada kedelapan kelompok sampel berdasarkan perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan waktu inkubasi dapat dilihat pada tabel 5.1.4. Nilai konsentrasi Interleukin 12 rata-rata menunjukkan rata-rata konsentrasi Interleukin 12 untuk setiap kelompok perlakuan.

Tabel 5.1.4 Konsentrasi Interleukin 12 (ng/ml) pada kedelapan kelompok sampel dari 6 penderita tuberkulosis paru dan 6 individu sehat berisiko tuberkulosis paru berdasarkan perlakuan.

Waktu Inkubasi	Penderita Tuberkulosis				Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis			
	M.tb -		*M.tb* +		*M.tb* -		*M.tb* +	
	TB	Kons	TB	Kons	Ind	Kons	Ind	Kons
24 JAM	1	1.16 (a1)	1	1.62 (c1)	1	1.6 (e1)	1	3.15 (g1)
	2	1.2 (a2)	2	1.58 (c2)	2	1.58 (e2)	2	3.08 (g2)
	3	1.21 (a3)	3	1.6 (c3)	3	1.59 (e3)	3	3.24 (g3)
	4	1.17 (a4)	4	1.58 (c4)	4	1.59 (e4)	4	3.15 (g4)
	5	1.2 (a5)	5	1.58 (c5)	5	1.58 (e5)	5	3.08 (g5)
	6	1.21 (a6)	6	1.6 (c6)	6	1.59 (e6)	6	3.24 (g6)
		Xa= 1.190		Xc= 1.593		Xe= 1.590		Xg= 3.156
48 JAM	1	1.17 (b1)	1	1.79 (d1)	1	1.62 (f1)	1	3.42 (h1)
	2	1.21 (b2)	2	1.83 (d2)	2	1.59 (f2)	2	3.45 (h2)
	3	1.2 (b3)	3	1.78 (d3)	3	1.6 (f3)	3	3.44 (h3)
	4	1.16 (b4)	4	1.79 (d4)	4	1.58 (f4)	4	3.46 (h4)
	5	1.21 (b5)	5	1.83 (d5)	5	1.59 (f5)	5	3.45 (h5)
	6	1.2 (b6)	6	1.78 (d6)	6	1.6 (f6)	6	3.44 (h6)
		Xb= 1.190		Xd= 1.8		Xf= 1.598		Xh= 3.446

Keterangan Tabel 5.1.4

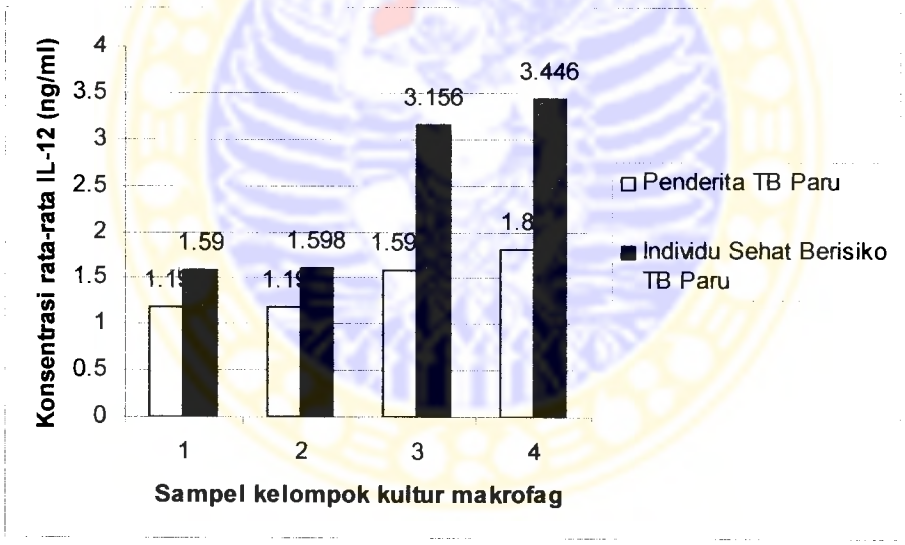
- Kelompok 1 (a1 s/d a6) dan 2 (b1 s/d b6) merupakan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak di infeksi dengan *Mycobacterium*

tuberculosis dipakai sebagai kontrol untuk kelompok 3 (c1 s/d c6) dan 4 (d1 s/d d6).

- Kelompok 3(c1 s/d c6) dan 4 (d1 s/d d6) merupakan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi masing-masing 24 jam dan 48 jam.

- Kelompok 5 (e1 s/d e6) dan 6 (f1 s/d f6) merupakan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak di infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* dipakai sebagai kontrol untuk kelompok 7 (g1 s/d g6) dan 8 (h1 s/d h6).

- Kelompok 7 (g1 s/d g6) dan 8 (h1 s/d h6) merupakan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi masing-masing 24 jam dan 48 jam.



Gambar 5.4 Grafik balok nilai rata-rata konsentrasi Interleukin 12 (ng/ml) pada sampel kelompok kultur makrofag dari 6 orang penderita tuberkulosis paru dan 6 orang individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

Pada grafik balok diatas, pada axis (X) terdapat 4 kelompok balok yang masing-masing kelompok terdiri dari 2 balok yaitu :

- (1) : Terdiri dari kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi 24 jam.

- (2) : Terdiri dari kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi 48 jam.

- (3) : Terdiri dari kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi 24 jam.

- (4) : Terdiri dari kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi 48 jam.

5.2 Analisis Hasil Uji Sekresi Interleukin 12 pada Kultur Makrofag dari Penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Data konsentrasi Interleukin 12 pada penelitian ini terdapat dalam 8 kelompok perlakuan dengan 6 replikasi. Data konsentrasi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji statistik *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan uji F pada taraf nyata 5% (Sudjana,1996). ANOVA digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan terhadap konsentrasi Interleukin 12. Hasil analisis yang bermakna dilanjutkan dengan uji *Least Square Difference* (LSD).

5.2.1 Perbandingan antara kedelapan kelompok perlakuan terhadap konsentrasi Interleukin 12 dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan dengan uji *Least Square Difference* (LSD).

Data kedelapan kelompok sebelumnya diuji normalitasnya dan didapatkan data kedelapan kelompok berdistribusi normal karena p>0,05 (lihat lampiran 2). Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa sekresi Interleukin 12 antara makrofag penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam dan 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* memiliki perbedaan yang bermakna (p<0,05). LSD menunjukkan perbedaan signifikan pada 24 jam setelah infeksi dengan d=1,5600; p=0,000 dan pada 48 jam setelah infeksi dengan d=1,6450; p=0,000. Uji ANOVA secara umum pada kedelapan kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna karena p< 0,05 (F=4912,216 dan p=0,000) disajikan pada tabel 5.2.1.

Tabel 5.2.1 Hasil Uji Anova

Kelompok	Mean (X)	SD	Anova
1	1,1917	$2,137 \times 10^{-2}$	F = 4912,216
2	1,1917	$2,137 \times 10^{-2}$	P = 0,000
3	1,5933	$1,633 \times 10^{-2}$	
4	1,8000	$2,366 \times 10^{-2}$	
5	1,5883	$7,528 \times 10^{-3}$	
6	1,5967	$1,366 \times 10^{-2}$	
7	3,1567	$7,174 \times 10^{-2}$	
8	3,4433	$1,366 \times 10^{-2}$	

Kesimpulan :
P < 0,05 → Ho ditolak

Berarti : Ada perbedaan sekresi interleukin 12 (IL-12) antara kedelapan kelompok.

Hasil ANOVA yang menunjukkan adanya perbedaan sekresi Interleukin 12 antara kedelapan kelompok. Meliputi 4 kelompok kultur yang diinfeksi

Mycobacterium tuberculosis (kelompok 3,4,7 dan 8) yaitu terdapat perbedaan sekresi interleukin 12 pada kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru (kelompok 3 dan 4) dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru (kelompok 7 dan 8) yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Karena ANOVA menunjukkan adanya perbedaan maka dilanjutkan dengan uji LSD. Analisis ANOVA dan LSD lebih lengkap bisa dilihat pada lampiran 2. Pada sub bab- sub bab berikut akan diuraikan beberapa perbandingan konsentrasi Interleukin 12 yang merupakan hasil analisis dengan uji LSD yang nantinya akan dibahas pada Bab 6.

5.2.2 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan uji LSD

Tabel 5.2.2 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Waktu Inkubasi	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Infeksi *M.tb* (-)	LSD
24 Jam	1.19	d= 0.0000
48 Jam	1.19	p=1.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan tidak adanya perbedaan.

5.2.3 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.3 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam

infeksi *M.tb*	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) pd inkubasi 24 jam	LSD
(-)	1.190	d= 0.4017
(+)	1.593	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.4 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.4 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam

infeksi *M.tb*	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) pd inkubasi 48 jam	LSD
(-)	1.190	d= 0.6083
(+)	1.8	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.5 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.5 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam

Waktu Inkubasi	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Infeksi *M.tb* (+)	LSD
24 Jam	1.593	d= 0.2067
48 Jam	1.8	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dibandingkan dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 24 jam, dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.6 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan uji LSD

Tabel 5.2.6 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Waktu Inkubasi	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Infeksi *M.tb* (-)	LSD
24 Jam	1.590	d= 8,333x 10^{-3}
48 Jam	1.598	p= 0.636

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan tidak adanya perbedaan.

5.2.7 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.7 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam

infeksi *M.tb*	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) pd inkubasi 24 jam	LSD
(-)	1.590	d= 1.5683
(+)	3.156	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.8 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.8 Hasil analisis Sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam

Waktu Inkubasi	Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Infeksi *M.tb* (+)	LSD
24 Jam	3.156	d= 0.2867
48 Jam	3.446	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dibandingkan dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 24 jam, dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.9 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.9 Hasil analisis sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam.

Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Pada Infeksi *M.tb* (-), dg Inkubasi 24 jam		LSD
Penderita TB paru	1.19	d= 0.3967
Ind. Sehat Berisiko TB paru	1.59	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang bermakna.

5.2.10 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.10 Hasil analisis sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam.

Konsentrasi IL-12 (ng/ml) Pada Infeksi *M.tb* (-), dg Inkubasi 48 jam		LSD
Penderita TB paru	1.19	D= 0.4050
Ind. Sehat Berisiko TB paru	1.598	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna.

5.2.11 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dengan uji LSD

Tabel 5.2.11 Hasil analisis sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam

Sampel	Konsentrasi IL-12 (ng/ml)		LSD
	Infeksi *M.tb*	Inkubasi 24 jam	
Penderita TB paru	(+)	1.593	d= 1.5633
Ind. Sehat Berisiko TB paru	(+)	3.156	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna.

5.2.12 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam dengan uji LSD

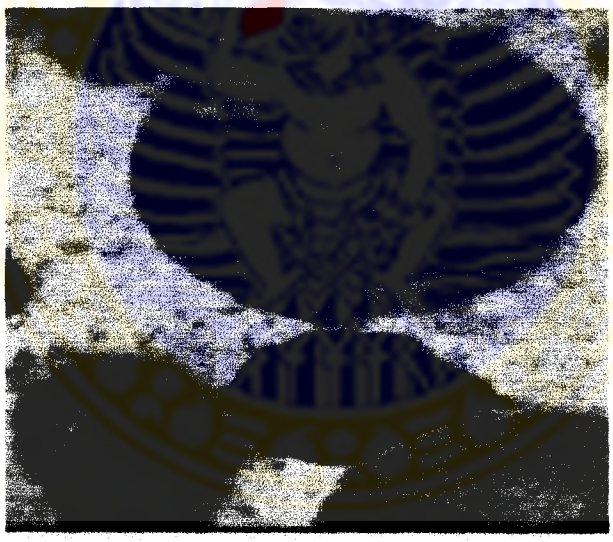
Tabel 5.2.12 Hasil analisis sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam

Sampel	Konsentrasi IL-12 (ng/ml)		LSD
	Inkubasi	Infeksi *M.tb* (+)	
Penderita TB paru	48 jam	1.8	d= 1.6433
Ind. Sehat Berisiko TB paru	48 jam	3.446	p= 0.000

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna.

5.3 Hasil Pemeriksaan Mikroskopik kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru, yang tidak diinfeksi dan yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*

Penelitian ini melalui suatu proses perlakuan sebelum dilakukan uji sekresi Interleukin 12 pada kultur makrofag. Pertama-tama dilakukan kultur *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) dari darah vena cubiti penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Sel-sel PBMC yang dikultur pada media RPMI dengan suplementasi serum manusia dan penicillin, secara invitro tampak berdiferensiasi dari monosit menjadi makrofag seperti terlihat pada gambar 5.5, 5.6 dan 5.7



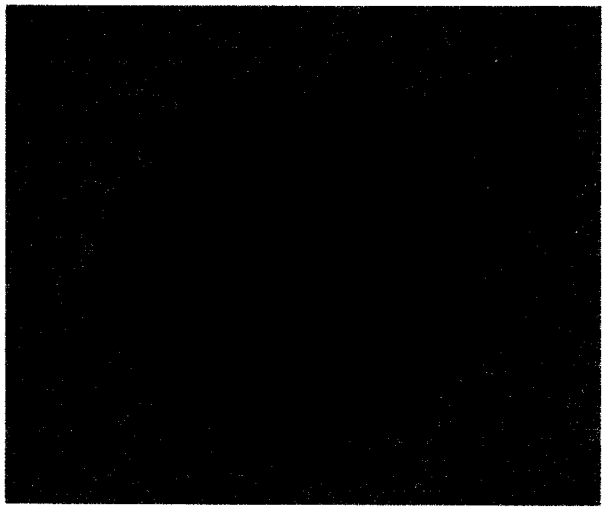
Gambar 5.5 Apusan sel-sel mononuclear (PBMC) dari *buffy coat*. Tampak monosit dengan inti besar irregular (atas) dan limfosit dengan inti bulat hampir menutupi sitoplasma (kiri bawah). Pengecatan Giemsa, mikroskop cahaya Olympus CX41 dengan perbesaran 1000 kali.

Pertama-tama sebelum dilakukan pembagian PBMC kedalam *well culture plate* perlu dihitung konsentrasi monosit yang akan dikultur menjadi makrofag dengan pengujian viabilitas dengan uji *trypan blue* dan membuat apusan dari *buffy coat*

dengan menggunakan pengecatan Giemsa untuk menghitung persentase sel mononuklear (monosit dan limfosit). Pada penelitian ini terdapat 95,08 % sel viabel sehingga saat pengecatan *trypan blue* sitoplasmanya tampak jernih (hasil perhitungannya bisa dilihat pada lampiran 2). Hasil pengecatan Giemsa pada penelitian ini menunjukkan prosentase sel monosit 12,7 % dari *buffy coat* (hasil perhitungan bisa dilihat pada lampiran 2). Menurut Bloom (1976) sekitar 10-20% dari *buffy coat* adalah monosit dan sebagian besar sisanya adalah limfosit, dimana dengan pengecatan Giemsa persentase antara monosit dengan limfosit dapat dihitung dengan tepat.

PBMC yang didapatkan dari darah tepi (vena cubiti) 12 sukarelawan yang darahnya dijadikan sampel, yaitu 6 orang penderita tuberkulosis paru dan 6 individu sehat berisiko tuberkulosis paru mengisi 48 sumuran (masing-masing 24 sumuran untuk penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru). Dari 1 orang diambil 10 ml darahnya dipakai untuk 4 sumuran.

PBMC yang telah dimasukkan ke dalam lempengan sumuran (*well plate)* kemudian diinkubasi dalam inkubator CO2 5%, 37^0C, dimana pada hari ke dua kultur dilakukan pencucian dengan RPMI 5x (disedot tepi atas secara pelan-pelan lalu dituangkan RPMI baru demikian diulang-ulang lebih kurang 5 kali) untuk menghilangkan limfosit. Kemudian kultur dilanjutkan dan dilakukan penggantian media setiap hari. Pada hari ke empat, monosit sudah mengalami maturasi menjadi makrofag. Gambar 5.6 dan 5.7, kultur makrofag yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* .

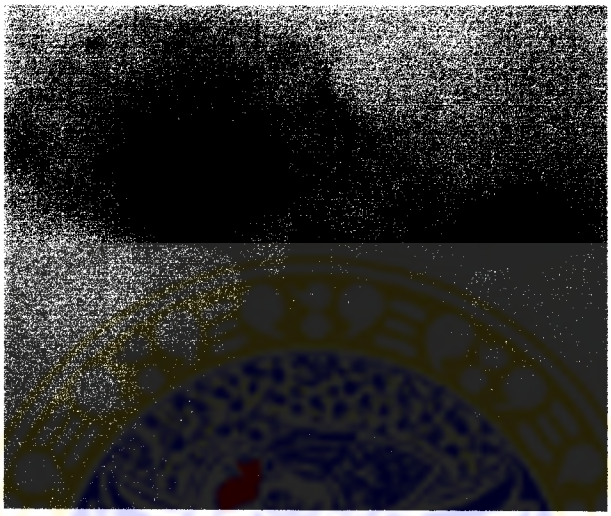


Gambar 5.6 Kultur PBMC yang menjadi sel makrofag dari penderita tuberkulosis paru, yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Tampak sel makrofag dengan pseupodia yang tumpul dan inti disentral lebih kecil dari monosit, berbentuk bulat. Pengecatan Giemsa, mikroskop cahaya Olympus CX41 dengan perbesaran 1000 kali.

Gambar 5.7 Kultur PBMC yang menjadi sel makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru, yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Tampak sel makrofag dengan pseupodia yang tumpul dan inti eksentrik lebih kecil dari monosit, berbentuk tidak teratur. Pengecatan Giemsa, mikroskop cahaya Olympus CX41 dengan perbesaran 1000 kali.

Gambar 5.6 dan 5.7 memperlihatkan sel makrofag penderita tuberkulosis dan individu sehat berisiko tuberkulosis yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Keduanya tampak hampir tidak berbeda dimana sel makrofag memiliki tonjolan-

tonjolan dinding sel, sitoplasma dengan beberapa bentukan padat didalamnya serta inti yang lebih bulat pada penderita tuberkulosis paru dibandingkan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang intinya terkesan ireguler dengan sitoplasma yang lebih banyak bentukan padatnya.



Gambar 5.8 Kultur makrofag penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Tampak Giant cell berwarna biru dengan vakuola yang didalamnya terdapat *Mycobacterium tuberculosis* (batang merah). Pengecatan Kinyoun-Gabbet, mikroskop cahaya Olympus CX41 dengan perbesaran 1000 kali.

Gambar 5.9 Kultur makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Tampak Giant cell berwarna biru dengan vakuola yang didalamnya terdapat *Mycobacterium tuberculosis* (batang merah). Pengecatan Kinyoun-Gabbet, mikroskop cahaya Olympus CX41 dengan perbesaran 1000 kali.

Pada kelompok kultur makrofag yang berumur empat hari, beberapa *well* yang telah ditentukan diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*. Gambar 5.8 dan 5.9 memperlihatkan *giant cell macrophage* dengan vakuola-vakuola yang jelas terlihat dalam sitoplasma dan batang-batang merah (batang tahan asam) baik utuh maupun terfragmentasi tampak menyebar dalam sitoplasma makrofag. Tampak perubahan morfologi makrofag dimana sitoplasmanya lebih besar dengan lebih banyak vakuola dan bentukan-bentukan padat pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis paru.

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Sekresi Interleukin 12 pada Kultur Makrofag dari Penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberculosis Paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Pada gambar 5.2 tampak sumuran-sumuran ELISA standards menunjukkan warna merah yang mengabsorbsi cahaya pada 490 nm. Warna merah secara kualitatif berarti positif mengandung interleukin 12, warna merah dengan gradien yang berbeda-beda menunjukkan perbedaan konsentrasi interleukin 12 serta OD (*Optical Density*) dari masing-masing sumuran dimana menurut teori warna yang semakin merah memiliki konsentrasi yang semakin rendah dan OD yang semakin tinggi dan untuk mendapatkan nilai kuantitatifnya maka dilakukan pembacaan dengan ELISA *reader*. *Accucyte* menggunakan dua tahapan sistem pembentukan warna, dimana pada penelitian ini alkaline phosphatase dephosphorylates NADPH (substrat) menjadi NADH. NADH kemudian bertindak sebagai kofaktor yang mengaktivasi reaksi siklus redoks yang dipengaruhi oleh alkohol dehodrogenase dan diaphorase. Reaksi akhir membentuk produk warna merah yang dalam (formazan) yang mengabsorbsi cahaya pada 490 nm. Pembentukan warna yang merupakan pembacaan visual bersifat subyektif hanya untuk tes kualitatif saja sehingga perlu dilakukan pembacaan dengan ELISA *reader* yang bersifat kuantitatif dan memiliki presisi yang tinggi. Pada penelitian ini semakin tinggi konsentrasi interleukin 12 dalam sampel semakin rendah OD dan memberi warna yang kurang merah (Handojo, 2003).

Pada penelitian ini digunakan tehnik ELISA dengan sampel berupa kultur PBMC (makrofag) dimana imunoasai terhadap suatu sitokin seperti Interleukin 12 memiliki keuntungan : spesifik, terdapat dalam bentuk kit, hasil bisa diperoleh dalam beberapa jam sehingga imunoasai ini banyak disukai. Imunoasai pada supernatan kultur PBMC memberikan keuntungan : dapat menghindari kelemahan dari serum dan plasma dimana sampel dari serum kurang baik karena waktu paruh sangat cepat, leukosit teraktivasi selama pembekuan darah sehingga memproduksi sitokin,serta adanya protease dalam serum penderita yang dapat mengganggu asai sedangkan plasma lebih baik dari serum jika diproses cepat dan segera disimpan beku. Imunoasai dengan menggunakan sampel supernatan kultur PBMC juga memberikan ukuran yang andal dari kemampuan sel memproduksi sitokin serta dapat mengukur beberapa jenis sitokin meskipun diperlukannya waktu yang cukup lama merupakan salah satu kelemahan memakai PBMC karena memerlukan waktu untuk kultur (Handojo,2004).

6.1.1 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan tidak adanya perbedaan (p=1.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.2 (p=1.000).

Hal ini sesuai teori bahwa *Mycobacteri* dan *Mycobacterial product* adalah *inducer* paling kuat untuk sekresi Interleukin 12 (Ibelgauft, 2003). Jadi tanpa adanya perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* perpanjangan waktu inkubasi tidak menyebabkan peningkatan sekresi Interleukin 12.

6.1.2 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.3.

Hal ini membuktikan bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru meningkatkan konsentrasi Interleukin 12 secara bermakna. Ini didukung teori bahwa infeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* akan merangsang makrofag teraktivasi untuk mensekresikan Interleukin 12 sebagai awal regulasi respon imun (Scholessberg D, 1999; Flynn, 2004).

6.1.3 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam

menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.4.

Hal ini membuktikan bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* mempengaruhi sekresi Interleukin 12 pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru secara bermakna, dimana konsentrasi Interleukin 12 menjadi lebih tinggi. Ini didukung teori dari Flynn, seperti yang telah disebutkan pada 6.1.2.

6.1.4 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dibandingkan dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 24 jam, dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.5.

Hal ini membuktikan bahwa perbedaan waktu inkubasi akan mempengaruhi konsentrasi Interleukin 12 yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru jika pada kelompok kultur makrofag tersebut diberikan perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis*, sedangkan jika tidak diberikan perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* maka perbedaan waktu

inkubasi tidak akan berpengaruh terhadap sekresi Interleukin 12. Pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 yang lebih tinggi dibandingkan pada 24 jam, hal ini sesuai teori dimana pada inkubasi 24 jam sebagai *monolayer* setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, dimana *adherence* merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan penting pada awal aktivasi makrofag selanjutnya *adherence* akan memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga dapat dilihat sejumlah aktivitas makrofag seperti peningkatan fagositosis yang diikuti sekresi enzim dan sitokin terutama Interleukin 12. Sampai pada 48 jam setelah infeksi sekresi Interleukin 12 cenderung meningkat dan setelah 48-72 jam terjadi perubahan fagositosis karena adanya penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag (CR3, CR4 dan FcγRII) (Territo dan Cline, 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002).

6.1.5 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam tanpa diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan tidak adanya perbedaan (p=0.636), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.6.

Hampir sama dengan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru, dimana perbedaan waktu inkubasi pada keadaan tidak adanya infeksi *Mycobacterium tuberculosis* tidak akan mempengaruhi konsentrasi Interleukin 12 yang disekresikan oleh makrofag sebab sesuai teori infeksi *Mycobacterium*

tuberculosis terhadap makrofag yang kemudian diikuti fagositosis *mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag merupakan signal awal sekresi Interleukin 12 oleh makrofag teraktivasi (Fulton SA *et al.,* 1996; Joost 2001).

6.1.6 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.7.

Hal ini membuktikan bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru meningkatkan konsentrasi Interleukin 12 secara bermakna. Ini juga didukung teori bahwa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* terhadap makrofag yang kemudian diikuti fagositosis *mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag merupakan signal poten untuk produksi Interleukin 12 oleh makrofag teraktivasi, dimana komponen pada LAM (PILAM$_s$ dan LM$_s$) yang menyusun dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* merupakan salah satu faktor ekternal yang dapat merangsang *activated* makrofag

memproduksi interleukin 12 (Fulton SA *et al.*, 1996 ; Crevel *et al.*, 2002; Dao *et al.*,2004). Sehingga pada kelompok kultur makrofag yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kultur makrofag yang tidak diinfeksikan *Mycobacterium tuberculosis*.

6.1.7 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 48 jam dibandingkan dengan yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada inkubasi 24 jam, dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.8.

Hal ini membuktikan bahwa perbedaan waktu inkubasi pada pemberian perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* mempengaruhi konsentrasi Interleukin 12 yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dimana pada waktu inkubasi yang lebih panjang, konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi. Perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* saja telah merangsang sel makrofag mensekresikan Interleukin 12 apalagi disertai perpanjangan waktu inkubasi dari 24 jam menjadi 48 jam tentu akan lebih meningkatkan konsentrasi Interleukin 12. Hal sesuai teori seperti yang telah

disebutkan pada 6.1.4, hanya saja pada individu sehat berisiko tuberkulosis paru ini konsentrasi Interleukin 12 yang disekresikan pada inkubasi 48 jam setelah diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* jauh lebih tinggi dibandingkan pada pasien tuberkulosis paru, dimana dalam teori tersebut dinyatakan pada inkubasi 24 jam setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, yang merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan penting pada awal aktivasi makrofag. *Adherence* memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga terjadi peningkatan fagositosis yang diikuti sekresi enzim dan sitokin terutama Interleukin 12. Sampai pada 48 jam setelah infeksi sekresi Interleukin 12 cenderung meningkat dan setelah 48-72 jam terjadi penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag (CR3, CR4 dan FcγRII) (Territo dan Cline, 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002). Penurunan reseptor fagositosis akan menyebabkan penurunan signal aktivasi pada makrofag sehingga terjadi penurunan sekresi Interleukin 12, dan ini mungkin menyebabkan sekresi Interleukin 12 paling tinggi pada inkubasi 48 jam. Penelitian sebelumnya, menunjukkan sekresi Interleukin pada PBMC *Health donor* yang diinfeksi *M.bovis* mulai terukur sangat rendah pada 12 jam kemudian meningkat secara bertahap pada 24 jam dan puncaknya sampai 48 jam (Koguchi, 2003).

6.1.8 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.9.

Hal ini mungkin karena adanya perbedaan karakteristik internal pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dimana kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sudah lebih aktif dibandingkan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru sehingga Interleukin 12 yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru lebih tinggi dibandingkan dengan yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Ini didukung penelitian sebelumnya dari Portales-Perez, 2003 dimana disebutkan bahwa pasien tuberkulosis adalah *susceptible individual* yang memiliki sel-sel yang mengalami defek pada sekresi sitokin dan ini merupakan ciri khas pada *susceptible individual* (pasien tuberkulosis). Selain itu dalam teori disebutkan bahwa sekresi Interleukin 12 pada tiap individu tidak lepas dari pengaruh genetik dimana defek terhadap gen yang menyandi

Interleukin 12 ternyata dilaporkan terjadi pada penderita tuberkulosis paru (Collin HL, 2001; Lee *et al.*,2002). Jadi mungkin pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru sejak awal telah terjadi defek sekresi Interleukin 12 yang disebabkan oleh adanya defek terhadap gen yang menyandi Interleukin 12.

6.1.9 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.10.

Ini hampir mirip dengan pembahasan pada 6.1.8. Jadi meskipun tidak diinfeksikan *Mycobacterium tuberculosis* namun kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Ini mungkin karena kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sudah lebih aktif dibandingkan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru sehingga Interleukin 12 yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru lebih tinggi

dibandingkan dibandingkan yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Tanpa infeksi *Mycobacterium tuberculosis* konsentrasi Interleukin 12 yang disekresikan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sudah lebih tinggi dibandingkan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Mungkin karena kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sudah lebih aktif dibandingkan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Didukung penelitian sebelumnya dari Portales-Perez, 2003 mengenai penderita tuberkulosis sebagai *susceptible individual* yang mengalami defek sekresi Interleukin 12. Penelitian dari Collin HL, 2001 dan Lee *et al.*,2002 mengenai adanya pengaruh genetik berupa defek pada gen yang menyandi Interleukin 12 pada penderita tuberkulosis paru. Jadi kemungkinan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru sejak awal telah terjadi defek sekresi Interleukin 12 yang disebabkan oleh adanya defek terhadap gen yang menyandi Interleukin 12.

6.1.10 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 24 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari

penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.11.

Ini mungkin karena pada keadaan infeksi, kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru jauh lebih aktif dibandingkan dengan kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru yang sejak awal sudah mengalami defek sekresi Interleukin 12 akibat defek pada gen penyandi Interleukin 12 sehingga pada pemberian perlakuan berupa infeksi *Mycobacterium tuberculosis*, kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis tidak menjadi seaktif kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru. Pemberian perlakuan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan aktivasi kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sehingga secara aktif mensekresikan Interleukin 12. Ini didukung penelitian yang mirip dari Zabaleta, 1998 yang membandingkan kemampuan *adherence* dan *ingestion* pada MDM (*Monocyte Derived Macrophage*) pasien tuberkulosis dengan *healty control* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dan diperoleh hasil; MDM pasien tuberkulosis menunjukkan kemampuan *adherence* dan *ingestion* yang lebih rendah dibandingkan dengan MDM dari *healty control* yang diperkirakan disebabkan adanya abnormalitas reseptor CR1 atau CR3 (Zabaleta, 1998). Jadi dalam penelitian ini perbedaan hasil yang diperoleh pada pasien tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru mungkin disebabkan defek sekresi sitokin interleukin12 yang terjadi pada *susceptible individual* (penderita tuberkulosis paru), abnormalitas reseptor CR1 dan CR3 pada pasien tuberkulosis paru yang menimbulkan gangguan dalam *adherence* dan *ingestion* sehingga pada akhirnya juga mengakibatkan gangguan sekresi interleukin 12. Menurut teori CR1 dan CR3 berperan dalam proses *adherence* dan *ingestion* yang merupakan signal awal dalam sekresi interleukin 12. Selain itu dalam

teori disebutkan bahwa sekresi interleukin 12 pada tiap individu tidak lepas dari pengaruh genetik dimana defek terhadap gen yang menyandi interleukin 12 ternyata dilaporkan terjadi pada penderita tuberkulosis paru (Lee *et al.*,2002). Orang dengan mutasi pada gen interleukin-12p40 atau gen reseptor interleukin 12 bermanifestasi dalam penurunan produksi IFN-γ oleh sel T (IFNγ diproduksi dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan individu yang tidak mengalami mutasi) dan orang ini lebih peka terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis.* Dilaporkan juga individu dengan defisiensi IFN-γ sebagai akibat mutasi gen yang menyandi reseptor IFN-γ ternyata lebih peka terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Collin HL, 2001; Flynn,2004). Selain faktor internal (genetik), beberapa faktor ekternal yang mempengaruhi produksi interleukin 12 oleh makrofag seperti komponen pada LAM yang merangsang *activated* makrofag memproduksi interleukin 12 ($PILAM_s$ dan LM_s), sitokin anti inflamasi seperti ;interleukin 10, TGF-β, interleukin 4 menekan sekresi interleukin 12 dan IFN-γ, (Crevel *et al.*, 2002; Dao *et al.*,2004).

6.1.11 Perbandingan sekresi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam.

Perbandingan konsentrasi Interleukin 12 antara kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang sama-sama diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada waktu inkubasi 48 jam menunjukkan konsentrasi Interleukin 12 lebih tinggi pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru dibandingkan pada kelompok kultur

makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang sangat bermakna (p=0.000), seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2.12.

Pada penelitian ini, konsentrasi Interleukin 12 paling tinggi disekresikan kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dengan waktu inkubasi 48 jam. Ini mungkin disebabkan beberapa hal yaitu :

1. Pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru tidak terjadi defek sekresi Interleukin 12 dan tidak terjadi abnormalitas reseptor CR1 dan CR3 yang dapat menimbulkan gangguan dalam *adherence* dan *ingestion* sehingga pada akhirnya juga mengakibatkan gangguan sekresi interleukin 12 seperti yang diperkirakan terjadi pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru (sesuai teori yang disebutkan pada 6.1.10).
2. Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* seperti disebutkan sebelumnya akan diikuti fagositosis *Mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag yang merupakan signal bagi makrofag teraktivasi untuk mensekresikan Interleukin 12, dimana salah satu faktor ekternal yang mempengaruhi sekresi Interleukin 12 oleh makrofag adalah komponen LAM ($PILAM_s$ dan LM_s) yang menyusun dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* dapat merangsang *activated* makrofag memproduksi interleukin 12 (Schlossberg, 1999; Crevel *et al.*,2002; Dao *et al.*, 2004).
3. Waktu inkubasi 48 jam memberikan waktu yang cukup untuk terjadinya fagositosis secara maksimal sehingga sekresi Interleukin 12 juga maksimal pada 48 jam dimana setelah itu akan terjadi penurunan reseptor makrofag untuk fagositosis dan ini mungkin menimbulkan penurunan sekresi Interleukin

12. Ini didukung penelitian Koguchi dan kawan-kawan pada tahun 2003 yang juga dilakukan dengan tehnik ELISA dimana pada donor sehat ditemukan sekresi interleukin 12 oleh makrofag terinfeksi *Mycobacterium bovis* mulai terukur dalam konsentrasi sangat kecil pada 12 jam setelah infeksi dan meningkat secara bertahap pada 24 jam dan mencapai kadar maksimal pada 48 jam. Penelitian lain dari Lee dan kawan-kawan, 2002 juga menemukan konsentrasi Interleukin 12 pada makrofag individu sehat berisiko tuberkulosis yang distimulasi *invitro* dengan antigen PPD dari *Mycobacterium tuberculosis* mulai diukur pada 18 jam kemudian meningkat pada 48 jam setelah infeksi. Ini sesuai teori dimana 24 jam inkubasi sebagai *monolayer* setelah infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* mulai terjadi *adherence*, dimana *adherence* merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan penting pada awal aktivasi makrofag selanjutnya *adherence* akan memodulasi transkripsi gen pada makrofag sehingga dapat dilihat sejumlah aktivitas makrofag seperti peningkatan fagositosis yang diikuti sekresi enzim dan sitokin terutama IL-12. Perubahan oksidasi glukosa dan fagositosis biasanya terjadi pada 48-72 jam, dimana 72 jam setelah infeksi terjadi peningkatan molekul MHC klas II dan penurunan jumlah reseptor fagositosis pada permukaan makrofag (CR3, CR4 dan FcγRII) serta *Mycobacterium tuberculosis* mulai multiplikasi intraseluler (Territo dan Cline. 1976; Vishwanath *et al.*,1998; Gessani *et al.*,2000; DesJardin *et al.*, 2002).

6.2 Kultur Makrofag dari Sel PBMC penderita Tuberkulosis Paru dan Individu Sehat Berisiko Tuberkulosis Paru

Darah diambil dari vena cubiti pasien tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis kemudian ditampung dalam tabung yang mengandung *glass beads* yang berfungsi sebagai *defibrinating* kemudian sambil terus dikocok sehingga tidak terjadi penggumpalan sel-sel darah. Setelah diencerkan dengan medium RPMI dilakukan pemisahan sel PBMC dengan menggunakan Ficoll Histopaque (sigma) yang prinsip pemisahannya secara *density gradient centrifugation.* Pada prinsip ini densitas merupakan hal yang penting dimana setelah dilakukan pemisahan dengan cara ini diperoleh; substansi/sel yang mempunyai densitas yang paling tinggi akan berada paling bawah sebaliknya substansi/sel dengan densitas yang rendah setelah disentrifugasi akan berada diatas (Paulnock, 2000). Ficoll Histopaque merupakan larutan dari polisukrosa dan sodium diatrizoat dimana larutan ini membantu mempercepat pemulihan sel mononuklear setelah sebelumnya mengalami defibrinasi dan sentrifugasi. Setelah disentrifugasi akan terbentuk lapisan-lapisan yang berturut-turut dari paling atas kebawah yaitu plasma, sel mononuklear (*buffy coat*), ficoll histopaque dan yang paling bawah adalah eritrosit dan granulosit. Sedangkan sebagian besar platelet dapat dipisahkan dengan sentrifugasi kecepatan rendah selama tahap pembilasan.

Lapisan *buffy coat* kemudian diambil dan dibilas dengan PBS untuk selanjutnya dilakukan pengecatan *Trypan blue* untuk mengetahui derajat viabilitas sel. Prinsip dasar pengecatan ini adalah sel hidup (viabel) akan mempunyai membran sel yang intak sehingga tidak dapat diwarnai dengan pengecatan seperti *Trypan blue*, dimana pada pengecatan ini sel viabel akan memiliki sitoplasma yang jernih sehingga tidak tercat sedangkan sel nonviabel sitoplasmanya akan berwarna biru. Normalnya

terdapat ≥ 95 % sel viabel dari keseluruhan sel (Macdonal, 1994). Pada penelitian ini terdapat 95,08% sel viabel sehingga saat pengecatan *trypan blue* sitoplasmanya tampak jernih (hasil perhitungan bisa dilihat pada lampiran 2).

Kemudian dibuat apusan dengan pengecatan Giemsa, untuk menghitung prosentase monosit yang terkandung pada *buffy coat*. Hasil perhitungan prosentase monosit dari pembacaan apusan dalam 100 lapangan pandang pada penelitian ini menunjukkan prosentase monosit 12,7 dari *buffy coat* (hasil perhitungan bisa dilihat pada lampiran 2). Ini sesuai dengan teori dimana menurut Bloom (1976) sekitar 10-20% *buffy coat* adalah monosit dan sisanya adalah limfosit namun dengan pengecatan Giemsa prosentase monosit dan limfosit dapat dihitung dengan tepat. Apusan dengan pengecatan Giemsa ditunjukkan pada gambar 5.5, 5.6 dan 5.7. Gambar 5.5 menunjukkan monosit dan limfosit, identifikasi morfologi monosit memerlukan ketelitian dan pengalaman namun menurut teori monosit memiliki pola kromatin inti yang khas (tampak bergerombol), ukuran sel monosit juga sekitar 3 kali netrofil, dengan bentuk inti bisa bulat, seperti ginjal atau tidak beraturan dan jika telah berdiferensiasi menjadi makrofag ukuran sel sekitar 5 kali netrofil dengan bentuk bervariasi, sitoplasma lebih besar dari monosit dengan tonjolan-tonjolan sitoplasma yang tumpul, serta inti dengan bentuk bulat,oval, *convoluted* sedangkan limfosit memiliki bentuk sel yang lebih bulat dengan ukuran yang lebih kecil serta bentuk inti yang bulat besar sehingga hampir memenuhi sitoplasma. (Diggs, 2005).

Pada media kultur dipakai RPMI yang ditambahkan penicillin dan HIPHS (*Heat Inactivated Poolen Human Serum*). Tujuan penambahan penicillin adalah untuk menjaga kultur sel bebas dari kontaminasi, dimana penicillin juga tidak mengganggu pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* karena bakteri ini memiliki resistensi terhadap penicillin namun yang terpenting dalam mencegah kontaminasi adalah selalu

bekerja dalam keadaan aseptik. Penambahan HIPHS adalah untuk suplemen makanan untuk makrofag, dalam mempersiapkan serum ini perlu dilakukan pemanasan serum 56^0C selama 30 menit dalam *water bath shaker* untuk meminimalkan efek komplemen dalam stimulasi monosit sehingga tidak terjadi lisis sel makrofag yang tidak diharapkan dan tidak mengganggu pengamatan sekresi Interleukin 12 (MacDonal, 1994; Hussain *et al.*,2000).

Pada penelitian ini, hari ke dua kultur dilakukan pencucian pada kultur dengan jalan menyedot tepi atas *well plate* secara perlahan-lahan lalu menambahkan RPMI kemasing-masing *well plate* demikian diulang-ulang sebanyak lebih kurang 5 kali sehingga dipastikan pada kultur tersebut hanya ada sel-sel monosit, yang selanjutnya dengan dilakukan pada medium yang mengandung HIPHS, sel-sel monosit akan berdiferensiasi menjadi sel makrofag. Pencucian perlu dilakukan sebab menurut Bloom (1976) sekitar 10%-20% buffy coat adalah monosit sedangkan sebagian besar sisanya adalah limfosit dimana monosit akan melekat lebih kuat pada *cover slip* yang ada pada dasar *well plate* dibandingkan dengan limfosit sehingga jika dilakukan pencucian, limfosit akan ikut tercuci. Gambar 5.6 dan 5.7 (pengecatan Giemsa) menunjukkan makrofag dari penderita tuberkulosis paru dan individu sehat berisiko tuberkulosis paru yang tidak diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis,* tampak pada kedua apusan tersebut hampir tidak berbeda hal ini mungkin karena pada kedua kelompok individu ini memang telah mengalami paparan atau *exposure* dari *Mycobacterium tuberculosis* meskipun memberi manifestasi yang berbeda yang satu sakit sedangkan yang lainnya sehat. Sedikit perbedaan pada morfologi dimana makrofag pada individu sehat berisiko tuberkulosis paru, intinya terkesan lebih ireguler serta sitoplasmanya mengandung lebih banyak bentukan padat jika dibandingkan dengan makrofag dari penderita tuberkulosis paru, hal ini mungkin

disebabkan karena makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru sudah lebih aktif dibandingkan makrofag dari penderita tuberkulosis paru sehingga memberi bentukan morfologi yang terkesan ireguler dengan sitoplasmanya yang banyak bentukan padatnya. Menurut Paulnock, 2000 disebutkan bahwa monosit memiliki *life span* dalam peredaran darah kira-kira 24 jam kemudian akan bermigrasi ke berbagai jaringan untuk kemudian berdiferensiasi menjadi makrofag. Sehingga pada penelitian ini pada kultur hari 4 merupakan kultur makrofag dan sudah bisa diinfeksikan dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

6.3 Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada Kultur Makrofag

Pada penelitian ini tiap *well plate* mengandung 2 x 10^5 makrofag dan untuk menginfeksi makrofag sejumlah tersebut maka diperlukan 1,5 x 10^5 CFU *Mycobacterium tuberculosis* strain virulen H37Rv yang ditambahkan kedalam setiap sumuran (kelompok perlakuan), ini sesuai dengan penelitian Fulton *et al.*, 1996.

Hanya sedikit mikroorganisme yang bertahan hidup dalam makrofag karena adanya vakuola fagosit yang bersifat asam dan enzim hidrolitik. Namun *Mycobacterium tuberculosis* memiliki mekanisme *evasion* khusus yang memungkinkan bakteri ini bisa bertahan hidup dan bermultiplikasi dalam makrofag. Kemampuan mengatasi respon fagositik makrofag karena mampu menekan produksi Interleukin 12, menghambat apoptosis makrofag yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, memiliki komponen dinding sel yang terdiri dari lipid, karbohidrat dan protein kompleks antara lain *mycolic acid, lipoarabinomannan, phenolic glycolipid-1* sehingga mampu menghambat fusi lisosom-fagosom, menghambat acidikasi dalam fagosom, resisten terhadap *Reactive Oxidative Intermediate* (ROI) dan *Reactive NitrogenIintermediate* (RNI) (Abbas *et al.*, 2000; Dao, 2003).

Sebelum dilakukan penambahan suspensi *Mycobacterium tuberculosis* ke dalam *well plate* kultur makrofag yang telah ditentukan, sel-sel *Mycobacterium tuberculosis* harus dalam keadaan satu-satu, tidak bergerombol, karena sel-sel *Mycobacterium tuberculosis* satu-satu ini akan lebih mudah melekat pada reseptor-reseptor di dinding sel makrofag, sehingga memudahkan fagositosis. Selanjutnya proses fagositosis mengaktivasi sekresi interleukin-interleukin terutama Interleukin 12. Untuk mendapatkan sel-sel *Mycobacterium tuberculosis* yang satu-satu, tidak bergerombol perlu adanya homogenitas suspensi sel-sel *Mycobacterium tuberculosis* dimana suspensi sel dibuat dalam beberapa tabung *screw cap* yang mengandung glass beads lalu divortek (Zabaleta *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini dilakukan pengecatan Kinyoun-Gabbet dengan tujuan melihat dengan jelas *Mycobacterium tuberculosis* yang diinfeksikan dan makrofag yang terinfeksi dimana dengan pengecatan ini *Mycobacterium tuberculosis* tampak berwarna merah dan makrofag berwarna biru. Dengan pengecatan Kinyoun Gabbet maka struktur atau morfologi makrofag akan tampak lebih jelas oleh karena dalam metode ini tidak dilakukan pemanasan yang bisa berefek pada perubahan struktur morfologi makrofag. Hasil pengecatan Kinyoun-Gabbet pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 5.8 dan 5.9, tampak adanya makrofag yang dalam pengecatan Kinyoun-Gabbet berwarna biru serta ada bentukan kuman berupa batang yang berwarna merah. Pada kedua apusan tersebut, makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru tampak menangkap kuman batang merah lebih banyak sehingga kuman batang merah yang terdapat dalam sitoplasmanya lebih banyak dibandingkan makrofag dari penderita tuberkulosis paru. Ini mungkin karena makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru lebih aktif sehingga mampu memfagosit kuman batang merah lebih banyak dibandingkan makrofag dari penderita

tuberkulosis paru, dimana tampak makrofag maupun *giant cell* yang dalam vakuolanya mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (batang merah), hal ini berhubungan dengan sekresi Interleukin 12 yang lebih tinggi pada individu sehat berisiko tuberkulosis paru dimana fagositosis *Mycobacterium tuberculosis* merupakan kelanjutan *adherence* yang merupakan signal aktivasi untuk makrofag dan memegang peranan penting pada awal aktivasi makrofag yang akhirnya terjadi sekresi Interleukin 12. Meskipun secara teori, pengecatan ini tidak bisa membedakan bakteri difagositosis atau cuma menempel pada permukaan sel makrofag namun dalam penelitian ini dianggap penempelan (*adherence*) juga nantinya akan terfagositosis dan ini penting dalam sekresi interleukin 12 yang diukur dalam penelitian ini (Zabaleta *et al*.,1998).

Pada penelitian ini ada beberapa faktor yang secara *invivo* tidak dapat diamati dengan metode *invitro* seperti adanya kemungkinan kumulasi interleukin 12 pada kultur makrofag sebelum diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* namun hal ini bisa diatasi dimana pada analisisnya dianggap konsentrasi interleukin 12 awal sama untuk setiap kelompok makrofag sebelum perlakuan infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis.* Pada keadaan *invivo,* makrofag memproduksi interleukin 12 sebagai respon terhadap *Mycobacterium tuberculosis.* Selain makrofag, limfosit B dan sel dendritik juga memproduksi Interleukin 12 namun pada infeksi *Mycobacterium tuberculosis,* peran makrofag lebih dominan dalam memproduksi Interleukin 12. Sekresi interleukin 12 akan menstimulasi sel NK dan sel limfosit T untuk memproduki IFN-γ, yang kemudian mengaktivasi makrofag untuk membunuh *Mycobacterium tuberculosis* yang telah difagositosis.

Interleukin 12 memiliki fungsi yang penting dalam diferensiasi sel limfosit Th0 menjadi sel Th1, stimulasi produksi IFN-γ oleh sel Th1 dan sel NK, dan

meningkatkan fungsi sitolitik dari sel NK yang teraktivasi dan sel limfosit T sitolitik $CD8^+$ sehingga terjadi *killing* sel yang terinfeksi.

Pada penderita tuberkulosis paru terjadi defek sekresi Interleukin 12 sehingga sekresi Interleukin 12 terganggu yang selanjutnya mengganggu fungsi Interleukin 12 seperti :

1. Tidak terjadi stimulasi sel limfosit T dan sel NK sehingga tidak diproduksi IFN-γ yang mengakibatkan tidak terjadi *killing Mycobacterium tuberculosis* melalui aktivasi makrofag.
2. Tidak terjadi aktivitas sitolitik sehingga tidak terjadi *killing* sel terinfeksi *Mycobacterium* tuberculosis.

Sedangkan pada individu sehat berisiko tuberkulosis tidak terjadi defek sekresi Interleukin 12 sehingga fungsi Interleukin 12 tidak mengalami gangguan. Sekresi Interleukin 12 dipengaruhi faktor internal seperti defek gen penyandi Interleukin 12, gen penyandi reseptor untuk Interleukin 12 dan faktor ekternal seperti LAM, Interleukin 10, TGF-β. Pada penderita tuberkulosis telah dilaporkan terjadinya defek gen berupa mutasi pada gen Interleukin 12p40 atau gen reseptor Interleukin 12.

Penelitian ini masih sebatas *invitro* jadi hanya bisa menyimpulkan secara *invitro* saja sedangkan untuk memperoleh fungsi sesungguhnya dari penelitian ini tentu harus dilakukan penelitian lanjutan *invivo*. Kultur makrofag dalam penelitian dengan metode *invitro* ini juga menghilangkan pengaruh IFN-γ yang disekresi oleh limfosit Th1 dimana secara *invivo* IFN-γ berperan penting dalam aktivasi makrofag sehingga lebih meningkatkan sekresi Interleukin 12 oleh makrofag.

Penelitian ini merupakan penelitian imunoasai sitokin Interleukin 12 yang disekresikan oleh *activated* makrofag secara *invitro*. Ini menekankan pada peranan makrofag terutama pada periode *innate immunity* dimana belum diperlukan peran

IFN-γ yang disekresi oleh sel limfosit. Secara praktis ini berperan untuk preventif pada anak atau individu yang baru terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* diperlukan imunomodulator yang dapat meningkatkan potensi makrofag sehingga bisa mengeliminasi *Mycobacterium tuberculosis* pada *innate immunity*.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Sekresi Interleukin 12 pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 24 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000).

2. Sekresi Interleukin 12 pada kelompok kultur makrofag dari individu sehat berisiko tuberkulosis paru setelah 48 jam diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kultur makrofag dari penderita tuberkulosis paru dengan perbedaan yang bermakna (p=0.000).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian *invitro* untuk mengetahui efek Interleukin 12 terhadap komponen sistem imun lainnya seperti pada kultur limfosit untuk mengetahui efek Interleukin 12 terhadap sekresi IFN-γ.

2. Perlu dilakukan penelitian *invivo* untuk mengetahui apakah Interleukin 12 bisa berperan sebagai imunomodulator yang nantinya bisa digunakan untuk imunoterapi terutama pada tuberkulosis.

3. Perlu dilakukan penelitian mengenai adanya defek gen penyandi Interleukin 12 pada penderita tuberkulosis paru.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas AK, Litcmann AH, Pober JS. 2003. Celluler and Molecular Immunology. 5 th ed Philadelphia. WB Saunders Co.

Aditama TJ. 2000. Tuberkulosis, Diagnosis, Terapi dan Masalahnya. Jakarta. Laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan/ WHO Collaborating Center for TB.

Antonucci G, Giradi E, Reviglione MC *et al.*,1995. Risk factor for tubercullosis in HIV infected persons; a prospective cohort study. JAMA 274; 143-148

Bergeron, A., M. Bonay, M. Kambouchner, D. Lecossier, M. Riquet, P.Soler, A. Hance, and A. Tazi. 1997. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas: correlations with histopathologic features of the granulomatous response. J. Immunol. 159:3034–3043.

Bertagnolli MM, Lin B-Y, Young D *et al.*, 1992. IL-12 augments antigent-dependent proliferation of activated T lymphocytes. Journals Immunol 1992; 149 : 3778-3783

Bohlson SS, Strasser JA, Bower JJ and Schovey JS. 2001. Role of Complement in *Mycobacterium avium* pathogenesis; *in vivo* and *in vitro* Analysis of the Host Response to Infection in the absence of Complement Component C3.

Brooks GF, Butel JS and Morse RA. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta : Penerbit Salemba Medika. 453-464.

Casarini, M., F. Ameglio, L. Alemanno, P. Zangrilli, P. Mattia, G. Paone A. Bisetti, and S. Giosue. 1999. Cytokine levels correlate with a radiologic score in active pulmonary tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med.159:143–148.

Collin HL *et al.*, 2001. The Many Face of Host Responses to tuberculosis. Immunology Reviev Article. 103. 1-9.

Condos R and Rom WN. 2005. Cytokine Response in Tuberculosis. Dalam. Rom WN ed. Tubercullosis 2nd. New York. P 286-308.

Copper AM *et al.*, 1995. The Role of Interleukin-12 in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Immunology. 84:423-432.

Crevel, Tom HM, Ottenhoff, Jos WM. 2002. Innate Immunity To Mycobacterium tuberculosis. Dalam. Clinical Microbiology Review. p.294-309.

Crick DC, Brennan PJ, Mcneil MR. 2005. The Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis.* Dalam . Rom WN ed. Tubercullosis 2nd. New York. P 115-134.

Dao DN *et al.*, 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Inducer Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages. Dalam Infection and Immunity Journals. Vol. 72 no 4. p 2067-2074.

Denis M. 1994. IL-12 augment cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis* infected human monocytes. Cells Immunol. 156: 529-536.

Delespesse G *et al.*, 1997. *Invitro* maturation of naïve $CD4^+$ T lymphocytes into Th, Th2 effectors. *Int Arch Allergy Immunol.* 113: 157-159

DesJardin LE *et al.* 2002. *Mycobacterium tuberculosis*-infected human macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and/or function of complement receptors, FcγRII and mannose receptors. Microbiology. 148. 3161-3171

DepKes. 2002. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Penanggulangan Penyakit Tuberkulosis, tahun 2002. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

DepKes. 2004. Dinas Kesehatan Propinsi Bali. 2004. Pelatihan Pemeriksaan Tuberkulosis

DepKes. 2005. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Penanggulangan Penyakit Tuberkulosis, tahun 2005. Departemen Kesehatan Republik Indonesia

Diggs, Sturn, Bells. 2005. The morphology of human blood cells. 7 ed. Tennesee University. Memphis. Abbot publisher.

Doherty TM *et al.*, 2004. TB or not TB : That is The Questions does TLR Signaling Hold The Answer? The Journal of Clinical Investigation. Vol.114. No. 12. Http//www.jci.org

Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, and M. C. Raviglione. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 282:677-686)

Ernst JD. 1998. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immunity Minireview. P1277-1281.

Fenton MJ and Vermeulen MW. 1996. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. Infection and Immunity Minireview. P. 683-690.

Flynn JL. 2004. Immunology of Tuberculosis and Implications in Vaccine Development.TuberculosisReview.84.93-101. www.elsevierhealth.com/journals/tube

Forbes BA *et al.,* 1998. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 10 th Edition. Texas : Mosby Inc. pp. 717-748.

Fremond CM *et al.*,2004. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* Infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. Clinical Investigation. 114: 1790-1799.

FriedenTR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, and Dye C. 2003. Tuberculosis. *Lancet.* 362 : 887 –899

Fulton, S. A., J. M. Johnsen, S. F. Wolf, D. S. Sieburth, and W. H. Boom.1996. Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. Infect. Immun. 64:2523–2531.

Garay SM. 2005. Pulmonary tuberculosis. Dalam . Rom WN ed. Tuberculosis 2nd. New York. P 345-394.

Gessani S *et al.*,2000. Purification of Macrophages. Dalam. Macrophages A Practical Approach. Paulnock DM ed. Oxford University Press. p.31-57.

Giacomini *et al.*, 2001. Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with *Mycobacterium tuberculosis* Induce a Differential Cytokine Gene Expression that Modulates T Cell Response. The American Association of Immunology.

Gubler U *et al.*, 1991. Coexpression of two distinct genes required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 4143-4147

Guellaar A, Gatell JM, Verdejo *et al.*, 1993. a Prospective study of the risk of tuberculosis among HIV-infected patients,AIDS 7; 1345-1349

Handojo I. 2003. Pengantar Imunoasai Dasar. Cetakan 1. Surabaya. Airlangga University Press.

Http://who.int/mediacen-tre/factsheets/fs104/en/2004. Tuberculosis. Fact sheet number 104.

Hussain R *et al.*, 2000. PPD-spesific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. Clin Exp Immunol 119: 449-455.

Jagirdar J *et al.*, 2005. Pathology and Insight into Pathogenesis of Tuberculosis. Dalam Rom WN ed. Tuberculosis 2nd. New York. P 323-344.

Johnson BJ *et al.*, 1997. rhuIL-12 adjunctive therapy in multidrug resistant tuberculosis : a comparison of two treatment regimens and placebo. *Tuber lung Dis*. 78: 195-203

Joklik WK *et al.*, 1992. Zinsser Microbiology. 20th Edition. USA : Appleton & Lange.pp. 497-501.

Joost J Openheim. 2001. Cytokines .Dalam. Tristram GP, Daniel PS, Abba IT. Medical Immunology 10 th ed. California. P 95-112.

Kaufmann SH. 2001. How Can Immunology Contribute to The Control of Tuberculosis?. Macmillan Magazines Ltd. www.nature.com/reviews/immunol.

Kaufmann SH. 2002. Protection Against Tuberculosis : Cytokines, T Cells and Macrophage. Ann Rheum Dis 61 (Suppl II) : ii54-ii68.

Kim SJ. 2002. Etiologi and Pathogenesis. Dalam. Narain JP editor. Tuberculosis Epidemiology and control. WHO. New Delhi. P 3-13.

Koguchi Y *et al.*,2003. High Plasma Osteopontin Level and Its Relationship with Interleukin-12 mediated Type 1 T Helper Cell Response in Tuberculosis

Ladel CH *et al.* 1997. Interleukin 12 Secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Infect immun.* 65 : 1936-8.

Lee JS *et al.*,2002. Depressed Interleukin -12 production by peripheral blood mononuclear cells after in vitro stimulation with the 30-kDa antigen in recurrent pulmonary tuberculosis patients. Med Micro Immunol (2003). 192: 61-69

Lin Y, M. Zhang, F. M. Hofman, J. Gong, and P. F. Barnes. 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. Infect. Immun.64:1351–1356

Lucy *et al.*, 2002. *Mycobacterium tuberculosis* – Infected Human Macrophages exhibit enhanced cellular Adhesion with Increase Expression of LFA-1 and ICAM-1 and Reduced Expression and/or Function of Complement Receptors, FcγRII and The Mannose Receptors. Microbiology. 148 : 3161-3171.

Lulu M. 2005. Treatment on Tuberculosis Patient Associated with HIV-AIDS. Dalam Simposium TB. TDC Unair.

MacDonal C, 1994. Primary culture and the establisment of cell lines. In (Davis JM). Basic Cell Culture A Practical Approach. Oxford : Oxford University Press, pp 151.

Macrophage activation/htm .2005. Macrophage Activation. IL-12

Male D, Cook A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. 1996. Immune response to patogen. dalam Advance Immnunology, 3 rd ed. london. Moby Co. 16.1-16.16.

Miller LE *et al.*, 1991. Manual of Laboratory Immunology. 2 nd Edition. Philadelphia : Lea & Febiger. Pp. 159-189

Moreno S, Baram ektaburu Y, Bauza E *et al.*, 1993. Risk for Developing Tuberculosis among anergic policuts infected with HIV. Ann Intern Med. 119; 194-198

Munk ME *et al.*, 1996.Increase number of IL-12 producing cells in Human Tuberculosis. *Infect Immun.*64: 1078-1080

Nan GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, and Young RA. 2002. Human Macrophage activation programs induced by bacterial pathogens

Pablos - Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F *et al.*, 1994 – 1997. Global surveillance for anti tuberculosis - drug resistance. New England Journal of Medicine 1998; 338: 1641 – 9.

Parslow TG *et al.*, 2001. Natural Immunity. In Medical Immunology. 10 th Edition. USA : Lange Medical Books. Mc Graw-Hill Medical Publishing Division.

Pathak SK *et al* ., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoarabinomannan-mediated IRAK-M Induction Negatively Regulates Toll-like Receptor-dependent Interleukin-12 p40 Production in Macrophages. Journals Biol. Chem. Vol. 280. Issue 53. 42794-42800

Paulnock DM. 2000. Macrophages 'A Practical Approach'. USA. Oxfort University Press.

Perkins MD. 2000. New Diagnostic Tools for Tuberculosis. Int. J. Tuberc Lung Dis. 4 (12) : S182-S188

Pillai G, Fourie PB, Padayatchi N, Onyebujoh PC, McIlleron H, Smith PJ *et al.*, 1999. Recent bioequivalence studies on fixed-dose combination anti-tuberculosis drug formulations available on the global market. International Journal of Tuberculosis & Lung Disease. 3:S309–S316; discussion S17–S21.

Portales-Peres DP, Varanda L, Layseca E, Fierro NA, de la Feunte H, Rosenstein Y, and Gonzalez-Amoro R. 2002. Comparative and Prospective study of Different Immune Parameter in Healthy Subjects at Risk For Tuberculosis and in Tuberculosis patient. Clin.Diag. Lab. Immun. Vol.9.No.2,p.299-307.

Rogge L *et al.*, 1999. Antibodies to IL-12 Receptor beta chain mark human Th1 but not Th2 cells *in vitro and in vivo*. Journals Immunol. 162:3926-3932.

Romagnani S.1997. The Th1/Th2 Paradigm. *Immunol Today.*18: 263-267.

Selwyn PA *et al.*, 1992. high risk at active tubercullosis in HIV-infected Drugs users with cutaneousbAnergy. JAMA 260; 504-509

Schlossberg D, 1999. Immunology of Tuberculosis. Tuberculosis and Nontuberculosis Mycobacterial Infections. 4ed. WB Saunders Co.USA.p.29-40

Schorey JS, Carrol MC, Brown EJ. 2002. A Macrophage Invation Mechanism of Pathogenic Mycobacteria. http//www.scienmag.org/cgi/content/full/277/5329/1091

Sears DW. 1997. Cells and Organs of The Immune Systeme. USA : WH. Freeman & Co and Sumanas Inc. pp. 712-722

Soedarsono. 2005. Resistensi Obat Tuberkulosis : Problema dan Penatalaksanaannya. Dalam Simposium TB. TDC Unair.

Soewondo ES. 2002. Penatalaksanaan Penderita HIV / AIDS dengan Tubercullosis Paru. H.152-165

Song CH *et al.*, 2000. Deppressed Interleukin-12 (IL-12), but not IL-18, Production in Response to a 30- or 32-kilodalton *Mycobacterial* Antigen in Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. IAI journal.p.4477-4484. vol.68. no.8.

Stewart CC *et al.*, 1994. Introduction : The Proliferation and Differentiation of Macrophages. Dalam. Zwilling B S and Eisenstein T K ed. Macrophages-Pathogen Interactions. P. 3-27.

Territo and Cline. 1976. Macrophage and Their Disorder in Man. In (Nelson DS) : Immunobiology of Macrophage. San Fransisco : A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publisher. Academic Press. pp. 598-605

Todar. 2002. Tuberculosis. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Turgeon ML. 1999. Clinical Hematology Theory and Procedures. 3rd Edition. USA : Lippincott Williams & Wilkins.

Trinchieri G. 1997. Function and Clinical Use of Interleukin 12. Current Opinion Hematology.p..59-66 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9050381&dopt=Abstract

Tjandra Yoga Aditama. 2002. Tuberkulosis. Jakarta : Yayasan Penerbit IDI: p.54 http://www.ppmplp.depkes.go.id/detil.asp?m=2&s=2&i=4

Ulrich T. 2005. Cell Mediated Immune Response. Dalam . Rom WN ed. Tubercullosis 2nd. New York. P 251- 262.

Vishwanath V *et al.*,1998. The Fate of *M.*tuberculosis in activated human macrophages. Tuberculosis Research Centre. India.

Vogin GD. 2004. BCG Vaccine Efficacy Persist for 50 to 60 Years. Medscape Medical News. http://www.medscape.com/viewarticle/475012

Walker WS. 1976. Functional Heterogenity of Macrophage . In (Nelson DS) : Immunobiology of Macrophage. San Fransisco : A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publisher. Academic Press. pp. 91-93.

WHO. 2002. Operational Guide for National Tuberculosis Control Program on the introduction and use of fixed-dose combination drugs. Geneva : World Health Organization 2002 : 5-6.

WHO. 2003. World TB Day. Geneve : World Health Organization , 2003 : http://www.ppmplp.depkes.go.id/detil.asp?m=2&s=2&i=4

Widodo JP. 1993. Metode Penelitian dan Statistik terapan. Hal.49-60.

Wolf SF. Sieburt D and Sypek J. 1994. Interleukin 12 : a key modulator of immune function. http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/12/2/154

Zabaleta J, Arias M, Maya JR, and Garcia LF. 1998. Diminished Adherence and/or ingestion of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Monocyte-Derived Macrophages from Patient with Tuberculosis.

Zhang, M., M. K. Gately, E. Wang, J. Gong, S. F. Wolf, S. Lu, R. L. Modlin,and P. F. Barnes. 1994. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis.J. Clin. Investig. 93:1733–1739.

Zhang M *et al.*, 1999. Expression of the IL-12 receptors beta 1 and beta 2 subunits in human tuberculosis. Journals Immunol. 162: 2441-2447.

Zou JJ *et al.*, 1995. Structure- function analysis of the p35 subunit of mouse IL-12. Article. vol. 270. no. 11. pp. 5864-5871. Jbc online. American society for biochemistry and molecular biology Inc.

Lampiran 1

BEBERAPA PROSEDUR TAMBAHAN PADA PENELITIAN

A. HEAT INACTIVATED HUMAN SERUM

1. Digunakan serum donor golongan darah AB
2. Darah yang beku dibiarkan 1 jam pada temperatur kamar
3. Sentrifus pada 1100 g selama 20 menit
4. Serum dipanaskan pada 56^0C selama 30 menit dengan menggunakan *water bath shaker*

B. MENGHITUNG SEL DENGAN HEMACYTOMETER

1. Teteskan sel yang sudah tercat pada ujung permukaan tepi coverslip, biarkan sel-sel memenuhi kamar hitung
3. Tutupkan coverslip ke kamar hitung
4. Hitung sel pada masing-masing 4 kotak (terdiri dari 16 kotak) yang berada disudut kamar hitung
5. Hitung sel-sel pada sebelah kiri dan bawah perimeter dimana sel-sel yang berkelompok dianggap satu sel
6. Hitung jumlah sel per ml kultur

- Rata-rata jumlah sel/0,1 mm^3 volume = total sel pada empat kotak /4
- Total jumlah sel per ml (sel/cm^3) = (rata-rata jumlah sel/0,1 mm^3 volume) x 10^4

C. UJI TRYPAN BLUE

1. Resuspensikan sel *buffy coat* dalam 1ml PBS
2. Pipet 10-20 µl 0,4% trypan blue dan 10-20 µl suspensi sel→ campu dalam tabung eppendorf 2 ml
3. Campur homogen, inkubasi dalam temperatur kamar selama 3 menit→ sel dihitung dalam waktu 3-5 menit setelah inkubasi
4. Ambil 20 µl campuran tersebut dan teteskan pada kamar hitung
5. Lihat dibawah mikroskop pada perbesaran 10 x
6. Hitung sel yang tidak tercat (viable) dan yang tercat biru (nonviable)

Jumlah total sel yang viable per ml aliquot = jumlah total sel yang viable x 2 (faktor dilusi trypan blue) →A

Jumlah total sel per ml aliquot= jumlah total sel viable + jumlah total sel nonviable x2 → B

Sel yang viable (%) = A/B x 100

D. PENGECATAN GIEMSA

1. Membuat sediaan hapus
2. Sentuhkan 1 tetes pelet pada kaca obyek sekitar 2 cm dari tepi kanan
3. Letakkan kaca obyek lain disebelah kiri tetesan dan gerakkan kekanan hingga mengenai tetesan
4. Tunggu penyebaran tetesan hingga ½ cm dari sudut kaca penggeser→ segera geser kaca kekiri sambil memegang miring dengan sudut 30-45^0
5. Setelah sediaan kering, teteskan metil alkohol ke atas sediaan→menutupi seluruh hapusan→ biarkan 5 menit

6. Kelebihan metil alkohol pada kaca→ dibuang

7. Teteskan Giemsa pada sediaan dan biarkan 20 menit

8. Setelah dibilas dengan air suling→ letakkan sediaan dalam posisi vertikal dan biarkan mengering→ bisa dilihat dibawah mikroskop cahaya

E. PENGECATAN KINYOUN-GABBET

Bahan/cat yang digunakan:

1. Kinyoun : 4 gr basic fuchsin, 8 ml phenol liquid, 20 ml alkohol 95% dan 100 ml aquadest.
2. Gabbet : 1 gr methylin blue, 20 ml as.sulfat, 30 ml alkohol absolut dan 50 ml aquadest.

Cara pengecatan:

1. Sediaan difiksasi→ rendam dengan cat Kinyoun selama 3 menit
2. Cuci dengan air mengalir sampai bersih
3. Rendam dengan cat Gabbet selama 1 menit
4. Cuci dengan air mengalir sampai bersih→ keringkan diudara

Interpretasi hasil : BTA berwarna merah sedangkan bakteri non BTA berwarna biru

Lampiran 2

Tabel Nilai absorbance (OD=490 nm) dan Konsentrasi interleukin12 (ng/ml) pada kelompok kultur makrofag dari 6 penderita tuberkulosis paru dan 6 individu sehat berisiko tuberkulosis paru dengan masing-masing 6 kali replikasi

	PASIEN TB				INDIVIDU SEHAT BERISIKO TB PARU			
	TB -		TB +		TB -		TB +	
	Abs.	Kons.	Abs.	Kons.	Abs.	Kons.	Abs.	Kons.
24 JAM	1.504	1.16	1.459	[a] 1.62	1.461	1.6	1.304	[b] 3.15
	1.501	1.2	1.463	[a] 1.58	1.463	1.58	1.311	[b] 3.08
	1.500	1.21	1.461	[a] 1.6	1.462	1.59	1.295	[b] 3.24
	1.503	1.17	1.463	[a] 1.58	1.462	1.59	1.304	[b] 3.15
	1.501	1.2	1.463	[a] 1.58	1.463	1.58	1.311	[b] 3.08
	1.500	1.21	1.461	[a] 1.6	1.462	1.59	1.295	[b] 3.24
48 JAM	1.503	1.17	1.442	[c] 1.79	1.459	1.62	1.278	[d] 3.42
	1.500	1.21	1.437	[c] 1.83	1.462	1.59	1.275	[d] 3.45
	1.501	1.2	1.443	[c] 1.78	1.461	1.6	1.276	[d] 3.44
	1.504	1.16	1.442	[c] 1.79	1.463	1.58	1.274	[d] 3.46
	1.500	1.21	1.437	[c] 1.83	1.462	1.59	1.275	[d] 3.45
	1.501	1.2	1.443	[c] 1.78	1.461	1.6	1.276	[d] 3.44

Hasil Uji Tryphan Blue

Kamar Hitung	Sel Viable	Sel Non Viable	Total
Pertama	19	1	20
Kedua	34	2	36
Ketiga	36	2	38
Keempat	27	1	28
TOTAL	116	6	122

Jumlah total sel yang viable per ml aliquot = jumlah total sel yang viable x 2 (faktor dilusi tryphan blue)
= 116 x 2 = 232

Jumlah total sel per ml aliquot = juml. total sel viable + juml. total sel non viable x 2.
= (116 + 6) x 2 = 122 x 2 = 244

$$\text{Sel yang viable (\%)} = \frac{\text{jumlah total sel viable per ml aliquot x 100}}{\text{jumlah total sel per ml aliquot}}$$

$$= \frac{232 \times 100}{244}$$

$$= 95{,}08\ \%$$

Jadi hasil uji tryphan blue pada penelitian ini adalah viabilitas = 95,08 %

Hasil Perhitungan persentase monosit pada sediaan apusan yang dicat dengan pewarnaan Giemsa dalam 100 lapangan pandang.

Lapangan Pandang	Sel Monosit	Sel Limfosit	Total Sel
1	2	18	20
2	3	22	25
3	4	26	30
4	7	43	50
5	5	30	35
6	2	14	16
7	5	35	40
8	4	32	36
9	3	25	28
10	6	39	45
11	4	26	30
12	7	43	50
13	5	30	35
14	2	14	16
15	2	18	20
16	3	22	25
17	4	26	30
18	7	43	50
19	5	35	40
20	4	32	36
21	3	25	28
22	6	39	45
23	2	18	20
24	3	22	25
25	4	26	30
26	7	43	50
27	5	35	40
28	4	32	36
29	4	32	36
30	3	25	28
31	6	39	45
32	4	26	30
33	7	43	50
34	5	30	35
35	2	14	16
36	3	25	28
37	6	39	45
38	4	26	30
39	7	43	50
40	5	30	35
41	2	14	16
42	7	43	50

43	5	30	35
44	2	14	16
45	3	25	28
46	6	39	45
47	5	30	35
48	2	14	16
49	3	25	28
50	6	39	45
51	4	26	30
52	5	35	40
53	4	32	36
54	4	32	36
55	3	25	28
56	6	39	45
57	4	26	30
58	3	25	28
59	6	39	45
60	2	18	20
61	3	22	25
62	4	26	30
63	7	43	50
64	5	35	40
65	4	32	36
66	4	32	36
67	3	25	28
68	6	39	45
69	4	32	36
70	4	32	36
71	3	25	28
72	6	39	45
73	4	26	30
74	7	43	50
75	5	30	35
76	2	14	16
77	3	25	28
78	6	39	45
79	4	26	30
80	4	26	30
81	7	43	50
82	5	30	35
83	2	14	16
84	5	35	40
85	4	32	36
86	3	25	28
87	6	39	45
88	4	26	30
89	7	43	50
90	5	30	35

91	**5**	**35**	**40**
92	**4**	**32**	**36**
93	**4**	**32**	**36**
94	**3**	**25**	**28**
95	**6**	**39**	**45**
96	**4**	**32**	**36**
97	**4**	**32**	**36**
98	**3**	**25**	**28**
99	**6**	**39**	**45**
100	**4**	**26**	**30**
Total	**435**	**3000**	**3435**

Persentase sel monosit dalam 100 lapangan pandang = $\frac{435 \times 100\%}{3435}$

= 12,7%

Uji Normalitas

NPar Tests
Kelompok 1: Penderita TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (-), inkubasi 24 jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.1917
	Std. Deviation	2.137E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.318
	Positive	.195
	Negative	-.318
Kolmogorov-Smirnov Z		.780
Asymp. Sig. (2-tailed)		.577

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests
Kelompok 2: Penderita TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (-), inkubasi 48 jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.1917
	Std. Deviation	2.137E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.318
	Positive	.195
	Negative	-.318
Kolmogorov-Smirnov Z		.780
Asymp. Sig. (2-tailed)		.577

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests
Kelompok 3: Penderita TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (+), inkubasi 24 jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.5933
	Std. Deviation	1.633E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.293
	Positive	.293
	Negative	-.207
Kolmogorov-Smirnov Z		.717
Asymp. Sig. (2-tailed)		.682

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests
Kelompok 4: Penderita TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (+), inkubasi 48 jam

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.8000
	Std. Deviation	2.366E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.330
	Positive	.330
	Negative	-.231
Kolmogorov-Smirnov Z		.809
Asymp. Sig. (2-tailed)		.529

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests

Kelompok 5: Individu sehat berisiko TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (-), inkubasi 24 jam.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.5883
	Std. Deviation	7.528E-03
Most Extreme Differences	Absolute	.254
	Positive	.246
	Negative	-.254
Kolmogorov-Smirnov Z		.623
Asymp. Sig. (2-tailed)		.833

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests

Kelompok 6: Individu sehat berisiko TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (-), inkubasi 48 jam.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	1.5967
	Std. Deviation	1.366E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.237
	Positive	.237
	Negative	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.580
Asymp. Sig. (2-tailed)		.889

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests

Kelompok 7: Individu sehat berisiko TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (+), inkubasi 24 jam.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	3.1567
	Std. Deviation	7.174E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.211
	Positive	.204
	Negative	-.211
Kolmogorov-Smirnov Z		.516
Asymp. Sig. (2-tailed)		.953

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

NPar Tests

Kelompok 8: Individu sehat berisiko TB paru, infeksi *M.tuberculosis* (+), inkubasi 48 jam.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		interleukin 12
N		6
Normal Parameters [a,b]	Mean	3.4433
	Std. Deviation	1.366E-02
Most Extreme Differences	Absolute	.237
	Positive	.146
	Negative	-.237
Kolmogorov-Smirnov Z		.580
Asymp. Sig. (2-tailed)		.889

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Data dari kedelapan kelompok berdistribusi normal karena P > 0,05

Oneway

Descriptives

interleukin 12

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
pasien, tb-, 24 jam	6	1.1917	2.137E-02	8.724E-03	1.1692	1.2141	1.16	1.21
pasien, tb-, 48 jam	6	1.1917	2.137E-02	8.724E-03	1.1692	1.2141	1.16	1.21
pasien, tb+, 24 jam	6	1.5933	1.633E-02	6.667E-03	1.5762	1.6105	1.58	1.62
pasien, tb+, 48 jam	6	1.8000	2.366E-02	9.661E-03	1.7752	1.8248	1.78	1.83
sehat berisiko, tb-, 24 jam	6	1.5883	7.528E-03	3.073E-03	1.5804	1.5962	1.58	1.60
sehat berisiko, tb-, 48 jam	6	1.5967	1.366E-02	5.578E-03	1.5823	1.6110	1.58	1.62
sehat berisiko, tb+, 24 jam	6	3.1567	7.174E-02	2.929E-02	3.0814	3.2320	3.08	3.24
sehat berisiko, tb+, 48 jam	6	3.4433	1.366E-02	5.578E-03	3.4290	3.4577	3.42	3.46
Total	48	1.9452	.8185	.1181	1.7075	2.1829	1.16	3.46

ANOVA

interleukin 12

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.448	7	4.493	4912.216	.000
Within Groups	3.658E-02	40	9.146E-04		
Total	31.485	47			

Hasil Uji Anova

Kelompok	Mean (X)	SD	Anova
1	1,1917	$2{,}137 \times 10^{-2}$	F = 4912,216
2	1,1917	$2{,}137 \times 10^{-2}$	P = 0,000
3	1,5933	$1{,}633 \times 10^{-2}$	
4	1,8000	$2{,}366 \times 10^{-2}$	
5	1,5883	$7{,}528 \times 10^{-3}$	
6	1,5967	$1{,}366 \times 10^{-2}$	
7	3,1567	$7{,}174 \times 10^{-2}$	
8	3,4433	$1{,}366 \times 10^{-2}$	

Kesimpulan :

P < 0,05 → Ho ditolak

Berarti : ada perbedaan sekresi interleukin 12 (IL-12) antara kedelapan kelompok

Multiple Comparisons

Dependent Variable: interleukin 12

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
pasien, tb-, 24 jam	pasien, tb-, 48 jam	.0000	1.746E-02	1.000	-3.5289E-02	3.529E-02
	pasien, tb+, 24 jam	-.4017*	1.746E-02	.000	-.4370	-.3664
	pasien, tb+, 48 jam	-.6083*	1.746E-02	.000	-.6436	-.5730
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	-.3967*	1.746E-02	.000	-.4320	-.3614
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	-.4050*	1.746E-02	.000	-.4403	-.3697
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.9650*	1.746E-02	.000	-2.0003	-1.9297
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-2.2517*	1.746E-02	.000	-2.2870	-2.2164
pasien, tb-, 46 jam	pasien, tb-, 24 jam	.0000	1.746E-02	1.000	-3.5289E-02	3.529E-02
	pasien, tb+, 24 jam	-.4017*	1.746E-02	.000	-.4370	-.3664
	pasien, tb+, 48 jam	-.6083*	1.746E-02	.000	-.6436	-.5730
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	-.3967*	1.746E-02	.000	-.4320	-.3614
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	-.4050*	1.746E-02	.000	-.4403	-.3697
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.9650*	1.746E-02	.000	-2.0003	-1.9297
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-2.2517*	1.746E-02	.000	-2.2870	-2.2164
pasien, tb+, 24 jam	pasien, tb-, 24 jam	.4017*	1.746E-02	.000	.3664	.4370
	pasien, tb-, 48 jam	.4017*	1.746E-02	.000	.3664	.4370
	pasien, tb+, 48 jam	-.2067*	1.746E-02	.000	-.2420	-.1714
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	5.000E-03	1.746E-02	.776	-3.0289E-02	4.029E-02
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	-3.3333E-03	1.746E-02	.850	-3.8622E-02	3.196E-02
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.5633*	1.746E-02	.000	-1.5986	-1.5280
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-1.8500*	1.746E-02	.000	-1.8853	-1.8147
pasien, tb+, 48 jam	pasien, tb-, 24 jam	.6083*	1.746E-02	.000	.5730	.6436
	pasien, tb-, 48 jam	.6083*	1.746E-02	.000	.5730	.6436
	pasien, tb+, 24 jam	.2067*	1.746E-02	.000	.1714	.2420
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	.2117*	1.746E-02	.000	.1764	.2470
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	.2033*	1.746E-02	.000	.1680	.2386
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.3567*	1.746E-02	.000	-1.3920	-1.3214
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-1.6433*	1.746E-02	.000	-1.6786	-1.6080
sehat berisiko, tb-, 24 jam	pasien, tb-, 24 jam	.3967*	1.746E-02	.000	.3614	.4320
	pasien, tb-, 48 jam	.3967*	1.746E-02	.000	.3614	.4320
	pasien, tb+, 24 jam	-5.0000E-03	1.746E-02	.776	-4.0289E-02	3.029E-02
	pasien, tb+, 48 jam	-.2117*	1.746E-02	.000	-.2470	-.1764
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	-8.3333E-03	1.746E-02	.636	-4.3622E-02	2.696E-02
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.5683*	1.746E-02	.000	-1.6036	-1.5330
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-1.8550*	1.746E-02	.000	-1.8903	-1.8197
sehat berisiko, tb-, 48 jam	pasien, tb-, 24 jam	.4050*	1.746E-02	.000	.3697	.4403
	pasien, tb-, 48 jam	.4050*	1.746E-02	.000	.3697	.4403
	pasien, tb+, 24 jam	3.333E-03	1.746E-02	.850	-3.1955E-02	3.862E-02
	pasien, tb+, 48 jam	-.2033*	1.746E-02	.000	-.2386	-.1680
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	8.333E-03	1.746E-02	.636	-2.6955E-02	4.362E-02
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	-1.5600*	1.746E-02	.000	-1.5953	-1.5247
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-1.8467*	1.746E-02	.000	-1.8820	-1.8114
sehat berisiko, tb+, 24 jam	pasien, tb-, 24 jam	1.9650*	1.746E-02	.000	1.9297	2.0003
	pasien, tb-, 48 jam	1.9650*	1.746E-02	.000	1.9297	2.0003
	pasien, tb+, 24 jam	1.5633*	1.746E-02	.000	1.5280	1.5986
	pasien, tb+, 48 jam	1.3567*	1.746E-02	.000	1.3214	1.3920
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	1.5683*	1.746E-02	.000	1.5330	1.6036
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	1.5600*	1.746E-02	.000	1.5247	1.5953
	sehat berisiko, tb+, 48 jam	-.2867*	1.746E-02	.000	-.3220	-.2514
sehat berisiko, tb+, 48 jam	pasien, tb-, 24 jam	2.2517*	1.746E-02	.000	2.2164	2.2870
	pasien, tb-, 48 jam	2.2517*	1.746E-02	.000	2.2164	2.2870
	pasien, tb+, 24 jam	1.8500*	1.746E-02	.000	1.8147	1.8853
	pasien, tb+, 48 jam	1.6433*	1.746E-02	.000	1.6080	1.6786
	sehat berisiko, tb-, 24 jam	1.8550*	1.746E-02	.000	1.8197	1.8903
	sehat berisiko, tb-, 48 jam	1.8467*	1.748E-02	.000	1.8114	1.8820
	sehat berisiko, tb+, 24 jam	.2867*	1.746E-02	.000	.2514	.3220

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

jam								
Cetak	-1.9650*	-1.9650*	-1.5633*	-1.3567*	-1.5683*	-1.5600*	-.2867*	

Lampiran 3

LEMBAR PERSETUJUAN
MENGIKUTI PENELITIAN
(Informed Consent)

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : .....

Umur/ Jenis Kelamin : .....tahun, Laki-laki/Perempuan.....

Alamat : .....

Untuk : ☐ Diri sendiri ☐ Istri

☐ Anak ☐ Orang tua

☐ Lainnya

Nama pasien :.....

Umur : .....

Alamat : .....

Nomor register : .....

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya, bahwa secara sadar, sukarela dan tanpa paksaan bersedia :

1. Ikut berpartisipasi dalam penelitian dan akan mengikuti semua prosedur penelitian
2. Akan mengikuti tindakan dalam penelitian tersebut berupa pengambilan darah sebanyak 10 ml melalui vena cubiti
3. Setelah mempelajari tatacara penelitian dan penjelasan dari peneliti, saya memahami akan maksud dan tujuan penelitian tersebut seta metode yang digunakan. Saya mengerti bahwa penelitian semacam ini pernah dilakukan dan tidak ada laporan mengenai pengaruh buruk pada peserta penelitian
4. Saya mengeti bahwa saya dapat membatalkan pernyataan ini dan dapat menarik diri dari penelitian setiap waktu tanpa mempengaruhi perawatan yang seharusnya diterima

Surabaya, ...

Suami	Saksi	Penderita
(.....)	(.....)	(.....)

Dokter

(.....)

LEMBAR PERSETUJUAN
TINDAKAN MEDIK

Yang bertanda tangan di bawah ini :
Nama : .....
Umur/ Jenis Kelamin : .....tahun, Laki-laki/Perempuan.....
Alamat : .....
Dengan ini menyatakan telah memberikan ***PERSETUJUAN*** untuk dilakukan tindakan medis berupa :

Pengambilan darah sebanyak 10 (sepuluh) mililiter

Untuk : ☐ Diri sendiri ☐ Istri
☐ Anak ☐ Orang tua
☐ Lainnya

Nama pasien :.....
Umur : .....
Alamat : .....
Nomor register : .....
Yang tujuan, sifat dan perlunya tindakan medis tersebut diatas, serta risiko yang dapat ditimbulkan telah cukup dijelaskan oleh dokter dan saya mengerti sepenuhnya.

Demikianlah surat persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya, ...

Suami	Saksi	Penderita
(.....)	(.....)	(.....)

Dokter

(.....)

PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 15/Panke.KKE/2004

PANITIA KELAIKAN ETIK FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA - RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

" Hubungan Imunostimulan dari Senyawa Diterpena
Lakton - Sambiloto pada Makrofag dan Efek Bakterisidalnya
Terhadap Mycrobacterium Tubercolosis "

PENELITI UTAMA : DR.dr. Ni Made Mertaniasih, SpMK,MS

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSU Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.

SURABAYA, ...

KETUA I

(Prof.dr. H.R Hariadi, SpOG-K)