

DISERTASI

SITOKIN Th1-Th2 DAN SUBSET LIMFOSIT T SEBAGAI RESPONS IMUN LOKAL DAN SISTEMIK PADA PENGOBATAN TUBERKULOSIS PARU PASCAPRIMER



Justinus Frans Palilingan

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

DISERTASI

SITOKIN Th1-Th2 DAN SUBSET LIMFOSIT T SEBAGAI RESPONS IMUN LOKAL DAN SISTEMIK PADA PENGOBATAN TUBERKULOSIS PARU PASCAPRIMER

KK.

Dik: K 18/02 .

Pal

1



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Justinus Frans Palilingan
NIM. 099411583 D

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001

**SITOKIN Th1-Th2 DAN SUBSET LIMFOSIT T SEBAGAI
RESPONS IMUN LOKAL DAN SISTEMIK PADA
PENGOBATAN TUBERKULOSIS PARU PASCAPRIMER**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
pada hari Selasa
tanggal 25 September 2001
pukul 10.00 WIB.

Oleh :
Justinus Frans Palilingan
NIM. 099411583 D

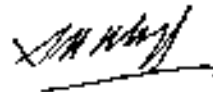
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga
Surabaya
2001

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
Pada tanggal 5 Desember 2001

Oleh

Promotor



Prof. S. Hood Alsagoff, dr., Sp.P.(K)
NIP. 130 345 887

Ko-Promotor



Prof. Dr. E.X. Budhianto S., dr., Sp.PK.
NIP. 130 261 497

Telah diuji pada ujian tertutup

Tanggal 11 Juni 2001

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof.Dr. Muhamad Amin, dr.,Sp.P.(K)

Anggota : 1. Prof. S. Hood Alsagaff, dr.,Sp.P.(K)
2. Prof.Dr. F.X. Budhianto Suhadi, dr., Sp.PK.(K)
3. Prof. R. Wasito, D.V.M ,M.Sc ,Ph D.
4 Prof Dr. Benjamin Paigunadi Margono, dr.,Sp.P.(K),FCCP.
5. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr.,MS.,Sp MK.
6. Dr Indro Handojo, dr.,Sp.PK.(K)
7. Dr. Irwan Setiabudi, dr.,Sp.PK.(K)
8. Widodo J. Pudjirahardjo, dr.,MPH.,Dr.PH

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 2047/JO3.11/PP/2001
Tanggal : 31 Mei 2001

PICAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama, saya mengucapkan puji syukur kehadiran Tuhan Allah yang Maha Pengasih serta Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNYA sehingga disertasi ini dapat diselesaikan

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya serta rasa hormat saya sampaikan kepada Prof S Hood Alsagoff, dr , SpP, atas kesediaannya sebagai promotor, yang dengan penuh perhatian, pengertian dan kesabaran serta memberikan dorongan yang kuat, bimbingan dan saran-saran sampai dengan selesainya disertasi ini

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada almarhum Prof Dr Noor Rachman, dr , SpMK sebagai mantan Ko-promotor I yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, pertimbangan dan saran

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof Dr F X Budhianto S , dr , SpPK, sebagai Ko-promotor II yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, pertimbangan dan saran selama pendidikan Doktor

Dengan selesainya disertasi ini, **perkenallah** saya menyampaikan juga terima kasih yang sebesar-besarnya kepada

Rector Universitas Airlangga Prof H Soedarto, dr , DTM&H, Ph D dan mantan Rector Universitas Airlangga Prof H Bambang Rahino Setokoesoemo, di atas kesempatan dan ijin yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah banyak membantu, memberikan bimbingan dan dorongan dalam menyelesaikan disertasi ini.

Staf pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga : Prof. H. Bambang Rahino Setokoesoemo, Alm Prof.Dr. Noor Rachman, dr., SpMK, Prof. Abdul Gani, S.H., Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH., Prof.Dr. Pitono Soeparto, dr., SpA(K), Prof. Poemomo Soerjohoedoyo, dr., Prof.Dr. Thomas V.M. Kardjito, dr., SpP., Prof.Dr P.G. Konthen, dr., SpPD(KAI), Prof.Dr. H. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc., Widodo J. Pudjirahardjo, dr., M.S., MPH., Dr.PH., Fuad Amsyari, dr., MPH., Ph.D., Prof.Dr. M. Zainuddin, Drs.Apt., MS., Prof. Dr. Sarmanu, Drh., MS., Dr. Subartono Taat Putra, dr., MS., Prof J. Glinka, Dr. Theodorus I. Setiawan, Prof. Sutandyo Wignyosubroto, Dr. Siti Pariani, dr., Dr. Irwan Setiabudi, dr., SpPK., Dr. F.M. Yudayana, dr., SpPK., MS., yang telah memberikan tambahan bekal ilmu dan wawasan yang sangat berguna bagi perjalanan karier saya selanjutnya sebagai pendidik.

Seluruh Staf dan karyawan Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan pendidikan program doktor saya.

Komite Etik RSUD Dr. Soetomo yang telah memberi izin kepada saya untuk melaksanakan penelitian pada penderita tuberkulosis paru RSUD Dr. Soetomo.

Para penderita tuberkulosis paru yang telah ikut serta secara sukarela dalam penelitian ini, sehingga kami dapat menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Benjamin Paigunadi Margono, dr., SpP., FCCP sebagai *Chief de Clinique* Laboratorium Ilmu Penyakit Paru RSUD Dr. Soetomo / FK Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dan segala bantuan pada saya dalam rangka menyelesaikan penelitian disertasi saya

Prof. Adji Widjaya, dr., SpP., FCCP, sebagai kepala Poli Paru RSUD Dr. Soetomo, Ibu Mistini, Ibu Sri Harini dan Ibu Sri Wahyuningsih serta seluruh staf / karyawan Poli Paru RSUD Dr. Soetomo dan Sdr. Eko Putranto dari Seksi Faal Paru RSUD Dr. Soetomo, yang telah memberi kesempatan dan bantuan pada saya untuk memperoleh penderita dalam rangka menyelesaikan penelitian disertasi saya.

Djati Sampoerno, dr., SpP. sebagai kepala OK Paru RSUD Dr. Soetomo pada saat saya melakukan penelitian disertasi, Bapak Kusnadi, Ibu Supartin - I Made Suastra, Bapak Ketut Sudijasa, Bapak Djamin beserta staf / karyawan OK Paru RSUD Dr. Soetomo yang telah memberi kesempatan dan bantuan pada saya untuk melakukan pengambilan spesimen darah dan pemeriksaan *fibre optic bronchoscopy* - BAL pada penderita dalam rangka menyelesaikan penelitian disertasi saya.

Seluruh tenaga medis, paramedis dan karyawan / karyawan di ruangan paru laki-laki RSUD Dr. Soetomo, yang telah terlibat langsung maupun tidak langsung dalam rangka menyelesaikan penelitian disertasi saya.

Seluruh Staf dan karyawan Laboratorium Ilmu Penyakit Paru RSUD Dr. Soetomo / F.K. Universitas Airlangga yang telah bekerja sama dan banyak membantu terlaksananya pendidikan program Doktor saya.

Prof.Dr. Thomas V.M. Kardjito, dr., SpP., Djoko Iman Santoso, dr., SpP., dan almarhum Prof. Sitiawan Kartosoedirdjo, dr., SpP. atas bantuan moral dan spiritual yang diberikan pada saya dalam menyelesaikan pendidikan program Doktor ini.

Ketua *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Prof.Dr. H. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc., Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., SpMK., Dadik Rahardjo, Drh., MSi., Haryanto Alimsardjono, dr., Lindawati Alimsardjono, dr., MKes, Marijam

Assoc Prof Nobumasa Kataoka, Ph.D (Kobe), A Widjaya, dr (Jakarta), Fumihiko Kawamoto, Ph.D (Nagasaki), Shoji Uga, Ph.D. (Kobe), Lina Sumara, dr (Bandung), Ugrasena, dr , SpA , Trimartini, dr., MS , Ibu Lidia Purwanta (Belanda), Ibu Juliana Sutedjo, Ibu Iksan Sutedjo (Singapura) dan semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu, yang memberi bantuan dalam penyediaan reagen, peralatan laboratorium dan literatur dan lain-lain, yang dibutuhkan dalam penelitian serta penyelesaian disertasi ini

Kepada kedua orang tua saya yang telah membesarkan dan mendidik saya sehingga saya dapat seperti sekarang ini, saya mengucapkan banyak terima kasih dengan iringan salam hormat saya

Kepada ibu mertua saya, saudara-saudara saya, keluarga dan handai taulan serta semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung dan memberikan doa kepada saya untuk menyelesaikan program pendidikan doktor ini

Kasih sayang dan terima kasih yang tulus kepada seluruh keluargaku, isteriku Linda, anakku Rudy serta Lily, Bobby dan Vania yang telah merelakan saya menvisihkan waktu untuk menyelesaikan pendidikan program Doktor ini. Saya mohon maaf telah banyak menyita waktu keluarga untuk penelitian. Terima kasih atas pengertian kalian yang tulus

Akhirnya saya menyampaikan mohon maaf atas segala sesuatu yang kurang berkenan, semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu melimpahkan rahmatNYA dan mudah mudahan hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi umatNYA. Amin

RINGKASAN

Sampai saat ini diperkirakan sepertiga penduduk seluruh dunia menurut WHO terkena infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga pada tahun 1993 dinyatakan adanya *global health emergency*. Saat ini Indonesia merupakan negara ketiga terbesar mengenai penderita tuberkulosis berdasarkan jumlah kasus baru yang ditemukan setiap tahunnya, setelah India dan Cina. Populasi penderita yang dapat diawasi meningkat menjadi 80% dalam tahun 1998 dan insiden kasusnya meningkat menjadi 12,2%. Keberhasilan pengobatan yang pada tahun 1997 mencapai 93%, justru menurun menjadi 55% pada tahun 2000.

Pertahanan tubuh terhadap kuman tuberkulosis diperankan oleh *cell mediated immunity* (CMI – imunitas seluler), yakni limfosit T dan makrofag. Limfosit T terutama terdiri dari sel T *helper* (sel Th) atau sel T CD4 (*cluster of differentiation -4*), dan sel T *suppressor* (Ts) atau sel T CD8. Pada sel T terdapat polarisasi sel berdasarkan profil sitokin yang dahasilkannya, yaitu kelompok sel Th1 yang memproduksi interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) dan limfotoksin (LT) yang mempunyai peran protektif, karena menguatkan makrofag untuk membunuh dan mencerna kuman yang telah diadagosit. Profil sitokin yang dihasilkan oleh kelompok sel Th2 ialah beberapa macam interleukin yaitu IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 yang pelepasannya merugikan tubuh. Obat antituberkulosis bekerja dengan membunuh kuman, sehingga jumlah kuman akan menurun. Keberhasilan pengobatan akan menyebabkan respons sel Th1 menjadi kuat, sehingga dapat menyebabkan lisis pada makrofag yang terinfeksi. Sebaliknya kegagalan pengobatan akan menimbulkan respons sel Th2 yang berlebihan, sehingga terjadi kerusakan jaringan.

Cairan lavas bronkus pada tuberkulosis paru, terbukti dapat meningkatkan kepekaan pemeriksaan baik pada hapusan maupun biakan dahak. Pemeriksaan respons imun dari cairan lavas pada beberapa penyakit paru interstisial, memberi gambaran yang mirip dengan hasil yang diperoleh dari biopsi paru, karena sel limfosit di ruang alveoli merupakan salah satu bagian atau kompartemen dari empat kompartemen limfosit yang ada di paru. Penelitian ini ingin membuktikan apakah terdapat perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1, yang bersifat protektif di lokal maupun sistemik, berupa perubahan pola limfosit T CD4 dan T CD8, serta meningkatnya IFN- γ dan menurunnya IL-4 di cairan lavas bronkus maupun darah tepi, dengan berkurangnya jumlah koloni atau jumlah koloni menjadi negatif pada biakan *Mycobacterium tuberculosis* dari cairan lavas bronkus, pada pengobatan penderita tuberkulosis paru pascaprimmer sesuai program WHO.

Setiap kasus dilakukan 2 kali pemeriksaan, yaitu pada awal dan akhir pengobatan pada 3 kelompok penderita, yaitu pada pengobatan bulan ke 0, bulan ke 2 dan bulan ke 4. Pemeriksaan limfosit T CD4 dan CD8, serta monosit / makrofag CD14, dilakukan dengan imunomagnetik. Produksi sitokin IFN- γ dan IL-4 dilakukan dengan uji ELISA dari supernatan biakan sel *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) dan cairan *broncho-alveolar lavage* (BAL), yang dipapar dengan *purified protein derivative* (PPD) dan *phytohaemagglutinin* (PHA).

Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat korelasi antara menurunnya jumlah atau tidak adanya koloni kuman pada biakan *M. tuberculosis* dari cairan BAL, dengan perubahan produksi sitokin IFN- γ dan IL-4, dan subset limfosit T CD4, CD8 serta monosit / makrofag CD14 pada akhir pengobatan. Namun terdapat penurunan produksi IFN- γ dan jumlah CD8 pada semua penderita, baik di cairan BAL maupun

dalam darah. Sebagian besar penderita menunjukkan biakan *M. tuberculosis* yang positif pada akhir pengobatan. Dari hasil penelitian ini nampaknya jumlah kuman yang masih hidup menghalangi pembentukan respons imun Th1, sehingga hasilnya menunjukkan respons imun Th2.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai biakan kuman yang masih positif dan pemantauan meningkatnya produksi sitokin Th1.

ABSTRACT

Cell-mediated immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection are important determinants in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. To gain a better understanding of this phenomenon, immunological profiles were evaluated in 26 patients with moderate-advanced pulmonary tuberculosis. A study on subsets of lymphocytes T CD4, CD8, monocytes/macrophages CD14, cytokines interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (IFN- γ) from peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cells was undertaken longitudinally comprising 3 groups of patients. In group A the first examination was carried out at the time of diagnosis. In group B and C the first examination was carried out at respectively two and four months following the commencement of antimicrobial chemotherapy. The second examination in all the 3 groups of patients was performed following completion of antimicrobial chemotherapy. Peripheral blood mononuclear cells and BAL cells were stimulated with purified protein derivative (PPD) and phytohaemagglutinin (PHA), and the supernatant was examined by ELISA. After completion of chemotherapy, culturing of BAL fluid specimens still revealed the presence of *M. tuberculosis*. The responses of immunocompetent cells T CD4, CD8 and monocytes/macrophages CD14 were found to be decreasing, the production of IFN- γ stimulated by PPD was lowered, whereas increased levels of IL-4 were observed. The decrease of the colony counts of cultures of *M. tuberculosis* had a significant correlation with the decrease of IFN- γ from BAL fluid, and the decrease of CD8 from blood in group C, as well as with the decrease of CD14 from BAL fluid in

group B. The immunosuppressive response as revealed by the study reported here was presumably generated by the existence of *M. tuberculosis* organisms in BAL fluid

Keywords: *M. tuberculosis* infection - cell-mediated immune response - immunopathogenesis

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xii
<i>Abstract</i>	xx
DAFTAR ISI	xxii
DAFTAR LABEL	xxiii
DAFTAR GAMBAR	xxv
DAFTAR LAMPIRAN	xxvii
DAFTAR SINGKATAN	xxix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan umum	7
1.3.2. Tujuan khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
1.4.1. Manfaat ilmiah	8
1.4.2. Manfaat praktis	8

	Halaman
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Kuman Penyebab dan Pengobatan Tuberkulosis Paru	10
2.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.1.2 Cara kerja kemoterapi obat antituberkulosis (OAT)	13
2.1.2.1 Dasar teori kemoterapi	16
2.1.2.2 Terapi tuberkulosis	19
2.2 Immunopatogenesis Tuberkulosis Paru	20
2.2.1 Infeksi awal dengan <i>M. tuberculosis</i>	20
2.2.2 Fagositosis	21
2.2.3 Fagositosis - asidifikasi - evasi	24
2.2.4 Sitokin	26
2.2.5 Molekul efektor toksik	31
2.2.6 Pembentukan granuloma	31
2.2.7 Limfosit T	36
2.2.7.1 Sel $\alpha\beta$ TCR CD4	38
2.2.7.2 Sel $\alpha\beta$ TCR CD8	44
2.2.7.3 Sel T $\gamma\delta$	48
2.2.8 Apoptosis pada tuberkulosis paru	50
2.2.9 Faktor genetik pada tuberkulosis paru	53
2.3 Lavas Bronkus	55
2.3.1 Cairan lavas bronkus	55
2.3.2 Pemeriksaan lavas bronkus pada tuberkulosis paru	58
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	63
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	63
3.2 Hipotesis Penelitian	64

BAB 4. METODE PENELITIAN	67
4.1 Jenis Penelitian	67
4.2 Sampel Penelitian	68
4.2.1 Besar sampel penelitian	68
4.2.2 Teknik pengambilan sampel	70
4.2.2.1. Kriteria inklusi	70
4.2.2.2 Kriteria eksklusi	70
4.2.2.3 Pembatalan penelitian	71
4.2.2.4 Pengobatan penderita	71
4.3 Identifikasi dan Pengukuran Variabel	71
4.3.1 Definisi variabel penelitian	71
4.3.2 Definisi operasional variabel	72
4.4 Tempat dan Waktu Penelitian	74
4.4.1 Tempat penelitian	74
4.4.2 Waktu penelitian	74
4.5 Cara Kerja	76
4.5.1. Pemeriksaan klinis dan laboratoris	76
4.5.2 Pengambilan bahan spesimen	77
4.5.3. Pemeriksaan mikrobiologis	78
4.5.4 Pemeriksaan imunologis	82
4.6 Analisis Data Penelitian	88
BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN	89
5.1. Karakteristik Sampel	89
5.2 Hasil Penelitian Mikrobiologis	90
5.2.1 Hasil pewarnaan <i>Ziehl Neelsen</i>	90
5.2.2 Hasil buakan <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	90

	Halaman
5.2.3 Hasil uji kepekaan obat antituberkulosis (OAT)	92
5.2.3.1 Penderita kelompok A	92
5.2.3.2 Penderita kelompok B	93
5.2.3.3 Penderita kelompok C	94
5.4 Hasil Penelitian Immunologis	95
5.3.1 Hasil pemeriksaan IL-4	95
5.3.1.1 Hasil pemeriksaan IL-4 dari PBMC	95
5.3.1.2 Hasil pemeriksaan IL-4 dari cairan BAL	98
5.3.2 Hasil pemeriksaan IFN- γ	100
5.3.2.1 Hasil pemeriksaan IFN- γ dari PBMC	100
5.3.2.2 Hasil pemeriksaan IFN- γ dari cairan BAL	103
5.4 Hasil Pemeriksaan Sel CD4, CD8, Monosit/Makrofag	106
5.4.1. Hasil pemeriksaan sel CD4, CD8, monosit/makrofag dari PBMC	106
5.4.2 Hasil pemeriksaan sel CD4, CD8, monosit/makrofag dari cairan BAL	109
BAB 6 PEMBAHASAN	117
6.1 Karakteristik Sampel	117
6.1.1. Penyakit tuberkulosis paru pascaprimar <i>moderately-advanced</i>	117
6.1.2 Pria	118
6.1.3 Umur	118
6.1.4 Tidak merokok	119
6.1.5 Penyakit infeksi dengan cacing dan penyakit atopi lainnya	121
6.1.6 Penyakit <i>diabetes mellitus</i> , keganasan ataupun penyakit imunokompromis, pengobatan dengan kortikosteroid ataupun imunosupresif lainnya	121
6.1.7 Pemeriksaan <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	122
6.1.8 Sitokin IFN- γ dan IL-4	127
6.1.9 Cairan lavas bronkus (BAL)	128

	Halaman
6.1.10 Kendala-kendala yang dihadapi dalam penelitian ini	129
6.2 Pembahasan Hasil Penelitian Mikrobiologis	132
6.2.1 Hasil pewarnaan <i>Ziehl Neelsen</i> dan biakan <i>M. tuberculosis</i>	132
6.2.2 Hasil uji kepekaan dengan OAT	135
6.3 Pembahasan Hasil Penelitian Immunologis	139
6.3.1 Sel respons imun seluler	139
6.3.2 Sitokin dan pola respons imun tuberkulosis paru	142
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	153
7.1 Kesimpulan	153
7.2 Saran	154
DAFTAR PUSTAKA	155
LAMPIRAN	169

DAFTAR TABEL.

		Halaman
Tabel 1	Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag, sel Th1 dan Th2	37
Tabel 2.	Jumlah penderita tuberkulosis paru pascaprimer yang diperiksa selama pengobatan dengan OAT	89
Tabel 3	Rerata dan simpang baku umur dan berat badan penderita tuberkulosis paru pascaprimer selama pengobatan dengan OAT	90
Tabel 4	Jumlah hasil positif pewarnaan <i>Ziehl Neelsen</i> dan biakan <i>M. tuberculosis</i> dari spesimen cairan BAL pada pemeriksaan I dan II penderita tuberkulosis paru pascaprimer selama pengobatan dengan OAT	91
Tabel 5	Rerata dan simpang baku jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari cairan BAL pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	92
Tabel 6.	Hasil uji kepekaan <i>M. tuberculosis</i> dari kultur spesimen BAL, penderita tuberkulosis paru pascaprimer pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	94
Tabel 7.	Rerata dan simpang baku sitokin IL-4 penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan PBMC dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	96
Tabel 8	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan banyaknya sitokin IL-4 penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan PBMC dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	97
Tabel 9.	Rerata dan simpang baku sitokin IL-4 penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan cairan BAL dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	99
Tabel 10	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan banyaknya sitokin IL-4 penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan cairan BAL dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	100

Tabel 11	Rerata dan simpang baku sitokin IFN- γ penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan PBMC dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	102
Tabel 12.	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan banyaknya sitokin IFN- γ penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan PBMC dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	103
Tabel 13	Rerata dan simpang baku sitokin IFN- γ penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan cairan BAL dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	105
Tabel 14	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan banyaknya sitokin IFN- γ penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari biakan cairan BAL dengan paparan PPD dan dengan PHA pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	106
Tabel 15	Rerata dan simpang baku jumlah sel CD-4, CD-8, monosit/makrofag penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari PBMC pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	109
Tabel 16	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan jumlah sel CD-4, CD-8, monosit/makrofag penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari PBMC pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	110
Tabel 17	Rerata dan simpang baku jumlah sel CD-4, CD-8, monosit/makrofag penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari cairan BAL pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	112
Tabel 18.	Korelasi antara berkurangnya jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dengan perubahan jumlah sel CD-4, CD-8, monosit/makrofag penderita tuberkulosis paru pascaprimer dari cairan BAL pada pemeriksaan I dan II selama pengobatan dengan OAT	113
Tabel 19	Uji beda antara perubahan banyaknya sitokin IL-4 dan IFN- γ dari biakan PBMC dan cairan BAL dengan paparan PPD dan PHA dengan jumlah koloni <i>M. tuberculosis</i> dari BAL yang menjadi negatif pada akhir pengobatan penderita tuberkulosis paru pascaprimer dengan OAT	114

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 Dinding sel <i>M. tuberculosis</i>	11
Gambar 2 Hipotesis populasi <i>M. tuberculosis</i>	18
Gambar 3 Skema respons imun seluler (sel T) pada deposisi antigen di parenkim paru direfleksi di ruang alveolar	59
Gambar 4 Skema respons imun pada infeksi dengan <i>M. tuberculosis</i> ..	65
Gambar 5 Waktu (bulan) pemeriksaan	67
Gambar 6 Bagan tatalaksana penelitian dan alur kerja	75
Gambar 7 Foto toraks penderita tuberkulosis paru kanan	Lamp II
Gambar 8 Pemeriksaan <i>fiberoptic bronchoscopy</i> BAL - segmen dari lobus superior paru	Lamp II
Gambar 9 Hasil bacaan di bawah mikroskop sel T CD4, T CD8 dan monosit/makrofag	Lamp II
Gambar 10 Hasil ELISA IL-4	Lamp II
Gambar 11 Kurva standar ELISA IL-4	Lamp II
Gambar 12 Hasil ELISA IFN- γ	Lamp II
Gambar 13 Kurva standar ELISA IFN- γ	Lamp II
Gambar 14 Biakan <i>M. tuberculosis</i> pada media <i>Lowenstein Jensen</i>	Lamp II
Gambar 15 Tes <i>maum</i>	Lamp II
Gambar 16 Tes nitrat	Lamp II
Gambar 17 Tes <i>mycobacterium growth indicator tube</i> (MGIT) dan tes kepekaan OAT MGIT	Lamp II
Gambar 18 Pembacaan hasil biakan <i>M. tuberculosis</i> pada media MGIT	Lamp II
Gambar 19 Pewarna <i>Ziehl Neelsen</i>	Lamp II

		Halaman
Gambar 20.	<i>Micro-pipette</i> dan <i>tips</i> – berbagai ukuran	Lamp II
Gambar 21	<i>Laminar flow</i> – <i>safety cabinet</i>	Lamp II
Gambar 22.	Sentrifus <i>Beckman</i> berpendingin	Lamp II
Gambar 23	Inkubator CO ₂	Lamp II
Gambar 24	<i>Deep-freezer</i> (-80 °C)	Lamp II
Gambar 25	<i>Immuno-washer</i>	Lamp II
Gambar 26	<i>ELISA</i> - <i>reader</i>	Lamp.II
Gambar 27	<i>Shaker</i>	Lamp.II
Gambar 28	<i>Rotator</i> - <i>DYNAL</i>	Lamp II
Gambar 29	Mikroskop fluoresen	Lamp.II
Gambar 30	<i>Autoclave</i>	Lamp II

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran I Keterangan kelaikan etik (*Ethical clearance*)
- Lampiran II Gambar peralatan dan hasil penelitian
- Gambar 7 Foto toraks penderita tuberkulosis paru kanan
- Gambar 8 Pemeriksaan *fiberoptic bronchoscopy* - BAL - segmen dari lobus superior paru
- Gambar 9 Hasil bacaan di bawah mikroskop sel T CD4, T CD8 dan monosit/makrofag
- Gambar 10 Hasil ELISA IL-4
- Gambar 11 Kurva standard ELISA IL-4
- Gambar 12 Hasil ELISA IFN- γ
- Gambar 13 Kurva standar ELISA IFN- γ
- Gambar 14 Biakan *M. tuberculosis* pada media *Lowenstein-Jensen*
- Gambar 15 Tes *macm*
- Gambar 16 Tes nitrat
- Gambar 17 Tes *mycobacterium growth indicator tube* (MGIT) dan tes kepekaan OAT *MGIT*
- Gambar 18 Pembacaan hasil biakan *M. tuberculosis* pada media MGIT
- Gambar 19 Pewarna *Ziehl Neelsen*
- Gambar 20 *Micro-pipette* dan *tips* - berbagai ukuran
- Gambar 21 *Laminar flow* - *safety cabinet*
- Gambar 22 Sentrifus *Beckman* berpendingin
- Gambar 23 Inkubator CO₂
- Gambar 24 *Deep-freezer* (-80 °C)

Gambar 25. *Immuno-washer*

Gambar 26. *ELISA - reader*

Gambar 27. *Shaker*

Gambar 28. *Rotator - DYNAL*

Gambar 29. Mikroskop fluoresen

Gambar 30. *Autoclave*

Lampiran III *Formulir Informed consent*

Lampiran IV *Data dan analisis hasil penelitian*

DAFTAR SINGKATAN

AO	<i>Acridine orange</i>
AFC	<i>Antibody forming cell</i>
AG	<i>Arabinogalactan</i>
AM	<i>Alveolar macrophage</i>
AMØ	<i>Activated alveolar macrophage</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
araLAM	<i>arabinose Lipocarabinomannan</i>
ATPase	<i>Adenosine-triphosphatase</i>
BAL	<i>Broncho-alveolar lavage</i>
baled4	Sel T CD4 dari BAL.
baled8	Sel T CD8 dari BAL.
baled14	Sel monosit/makrofag CD14 dari BAL.
BALT	<i>Bronchus (bronchial) - associated lymphoid tissue</i>
BCG	<i>Bacille Calmette Guerin</i>
BP4	Balai Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Paru
BRMP	<i>Biological Response Modifier Program</i>
BSO	Bronkoskopi serat optik
BTA	Basil tahan asam
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD4	<i>T-helper lymphocyte</i>
CD8	<i>T-suppressor lymphocyte</i>

CD14	<i>Monocytes macrophages</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>
cfu	<i>Colony forming unit</i>
CLB	<i>Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service</i>
CM1	<i>Cell mediated immunity</i>
CO₂	<i>Carbon dioxide</i>
CBP	<i>cAMP-response element (CRE)-binding protein</i>
CR	<i>Complement receptor</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CT Scan	<i>Computed tomography scanning</i>
CXC	<i>Chemoattractant cytokine chemokine</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNCB	<i>Dimethylchlorobenzene</i>
DOTS	<i>Directly observed treatment short course</i>
DTH	<i>Delayed type hypersensitivity</i>
E	<i>Etambutol</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ETZ	<i>Electron-transparent zone</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FOB	<i>Fiberoptic bronchoscopy</i>

Gcglobulin	<i>Group-specific component globulin</i>
GERDUNAS	Gerakan Terpadu Nasional
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
H /INH	<i>Isoniazid</i>
H37Ra	<i>Strain M. tuberculosis - avirulent</i>
H37Rv	<i>Strain M. tuberculosis - virulent</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
huIL-4	<i>Human interleukin - 4</i>
huIFN- γ	<i>Human interferon gamma</i>
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
ibapha	interferon-gama dari BAL yang dipapar dengan PHA
ibappd	interferon-gama dari BAL yang dipapar dengan PPD
ifmepha	interferon-gama dari PBMC yang dipapar dengan PHA
ifmcppd	interferon-gama dari PBMC yang dipapar dengan PPD
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-12R	<i>Interleukin-12 receptor</i>
ilbapha	interleukin-4 dari BAL yang dipapar dengan PHA
ilbappd	interleukin-4 dari BAL yang dipapar dengan PPD
ilmepha	interleukin-4 dari PBMC yang dipapar dengan PHA
ilmcppd	interleukin-4 dari PBMC yang dipapar dengan PPD

INH / H	<i>Isoniazid</i>
iNOS	<i>inductible Nitric oxide synthase</i>
KA / KB / KC	Kelompok penderita A, B, C
KD / kD / kDa	Kilo <i>dalton</i>
kg	Kilogram
LAK	<i>Lymphokine activated killer</i>
LAM	<i>Lipoarabinomannan</i>
LAMP	<i>Lysosome-associated membrane protein</i>
LFA	<i>Lymphocyte function antigen</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Lymphotoxin</i>
manLAM	<i>mannose Lipoarabinomannan</i>
MDR-TB	<i>Multidrug resistant tuberculosis</i>
mg	Miligram
MGIT	<i>Mycobacterium growth inhibition test</i>
MHC-kelas I/II	<i>Major histocompatibility complex kelas I / II</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
ml	Mililiter
MN	<i>Mononuclear</i>
MP	<i>Mononuclear phagocyte</i>
MR	<i>Mannose receptor</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natrium khlorida

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)</i>
NAAC	<i>N-acetyl-α-cysteine</i>
NaOH	Natrium hidroksida
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK cell	<i>Natural killer cell</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NRAMP	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
OI-4	Pemeriksaan penderita
OAT	Obat antituberkulosis
OADC	<i>Oleic acid, Bovine albumin, Dextrose, Catalase</i>
ONOO ⁻	<i>Peroxynitrite</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PANTA	<i>Polymyxin B, amphotericin B, naldixic acid, trimethoprim, dan azlocillin</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
pbmcc4	Sel T CD4 dari PBMC
pbmcc8	Sel T CD8 dari PBMC
pbmcc14	Sel monosit / makrofag CD14 dari PBMC
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	<i>Peptidoglycan</i>
pg	Pikogram

PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear</i>
PNG	<i>Polymorphonuclear granulocytes</i>
PPD	<i>Purified protein derivative</i>
P2TB	Program Pemberantasan Tuberkulosis Paru
R	<i>Rifampisin</i>
rIFN- γ	<i>Recombinant interferon-gamma</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediate</i>
ROI	<i>Reactive oxygen intermediate</i>
RPMPK	Kencana Penanggulangan, Pengawasan, Pengobatan Jangka Panjang Kesehatan
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSUD	Rumah Sakit Umum Daerah
S	Streptomisin
SB	Simpang baku
sIL-2R	<i>Soluble interleukin-2 receptor</i>
SIRE	Streptomisin, Isoniazid, Rifampisin, Ethambutol
SKRT	Sigi kesehatan rumah tangga
SMF	Staf Medik Fungsional
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TB	Tuberkulosis
TBP	Tuberkulosis Paru

TCR	<i>T cell receptor</i>
TDC	<i>Tropical Disease Center</i>
Ty δ	<i>T cell gamma -delta</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH	<i>T helper</i>
Th	<i>T helper cell</i>
Thp	<i>T helper precursor cell</i>
Thpp	<i>Proliferating T helper precursor cell</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor - alpha</i>
Ts	<i>T suppressor cell</i>
uv	Ultra violet
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Z	<i>Pyrazinamide</i>
ZN	<i>Ziehl Neelsen</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sebanyak 1,7 milyar penduduk seluruh dunia atau kurang lebih sepertiganya menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO) terkena infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis* sehingga pada tahun 1993 dinyatakan adanya *global health emergency*. Badan Kesehatan Dunia memperkirakan bahwa pada dekade 1990-1999 di seluruh dunia akan terdapat 88 juta kasus baru penderita tuberkulosis, dengan 8 juta akibat menurunnya daya tahan tubuh oleh infeksi *Human immunodeficiency virus* (HIV) (Kochi, 1991). Kasus penderita tuberkulosis yang diperkirakan akan meninggal adalah sebanyak 30 juta, dengan 2,9 juta yang bersamaan terkena infeksi HIV. Jumlah kasus baru akan terus meningkat setiap tahunnya, dari 7,5 juta (143 kasus tiap 100 000 penduduk) pada tahun 1990 menjadi 8,8 juta (152 kasus per 100 000 penduduk) pada tahun 1995 dan akan meningkat menjadi 10,2 juta (163 kasus per 100 000 penduduk) pada tahun 2000. Pada tahun 1995 di seluruh dunia diperkirakan terdapat 9 juta kasus baru dengan 3 juta kematian. Di negara sedang berkembang, kematian akibat tuberkulosis yang diperkirakan sebanyak 25-75% kasus, adalah penderita yang sedang dalam usia produktif (15-50 tahun) (WHO, 1997a).

Dengan prevalensi basil tahan asam (BTA) positif sebesar 0,28% diperkirakan jumlah seluruh kasus tuberkulosis menular di Indonesia adalah sebanyak 40-50 ribu orang yang harus diturunkan sebesar 50% pada tahun 2000 sesuai dengan sasaran program Pemerintah dalam RPJUPK (Rencana

Penanggulangan, Pengawasan, Pengobatan Jangka Panjang, Kesehatan) Apabila program pemberantasan tuberkulosis paru tersebut tidak berjalan baik, akan timbul berbagai masalah, antara lain banyaknya kasus kegagalan pengobatan dan penularan dengan kuman yang resisten terhadap banyak obat serta banyaknya kasus gagal napas akibat kerusakan paru yang luas dengan komplikasinya yang memerlukan perawatan, bahkan pembedahan (Manaf, 1995). Diperkirakan jumlah penderita mencapai 583 000 kasus baru, dengan angka kematian 140 000 kasus. Lima puluh persen yang terkena penyakit tuberkulosis paru (TBP) adalah penduduk miskin. Menurut Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) pada tahun 1980-1986 penyakit tuberkulosis paru merupakan penyebab kematian keempat, sedangkan hasil SKRT tahun 1992 dan 1995 menunjukkan adanya peningkatan sehingga menjadi penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskuler dan penyebab kematian nomor tiga setelah penyakit kardiovaskuler dan pernafasan (Sujudi, 2000).

Kenyataan saat ini, WHO menyatakan bahwa Indonesia merupakan negara ketiga terbesar berdasarkan jumlah kasus baru yang ditemukan setiap tahunnya, setelah India dan Cina. Populasi penderita yang dapat diawasi meningkat secara dramatis dari tahun 1997 sebesar 28% menjadi 80% dalam tahun 1998 dan kasusnya meningkat dari 7,4% menjadi 12,2%. Keberhasilan pengobatan yang pada tahun 1997 mencapai 93%, berubah menjadi kegagalan mengevaluasi 41% kasus, menurunkan angka keberhasilan pengobatan menjadi hanya 54%. Ditengarai juga bahwa di Indonesia pencarian kasus masih kurang intensif (WHO, 2000).

Upaya perbaikan pemberantasan penyakit tuberkulosis di Indonesia telah dilakukan dengan menggunakan rejimen obat rekomendasi WHO 1993 (*Indonesian-*

WHO Joint evaluation on National Tuberculosis Programme in Indonesia - April 1994), sehingga diharapkan tuberkulosis dapat diberantas dalam waktu dekat. Akhirnya penanggulangan tuberkulosis dilaksanakan dengan pembentukan GERDUNAS-TB (Gerakan Terpadu Nasional) yang dicanangkan pada tanggal 24 Maret tahun 1999, menggunakan strategi DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) sesuai anjuran WHO (Amin, 2000, Sujudi, 2000).

Pemantauan keberhasilan pengobatan pada rejimen rekomendasi WHO memakai bahan dahak untuk pemeriksaan hapusan dan biakan. Pemeriksaan bakteriologi dengan menggunakan bahan dahak ini mempunyai beberapa kelemahan (Grosset, 1993).

1. Pemeriksaan hapusan basil tahan asam (BTA) memang cepat, tetapi relatif tidak sensitif karena sekurang-kurangnya dibutuhkan kuman sebanyak $10^4/\text{ml}$ supaya menjadi positif pada pemeriksaan mikroskopik. Pemeriksaan bronkoskopi untuk mengambil cairan lavas bronkus dapat meningkatkan keberhasilan diagnosis bakteriologi.
2. Pemeriksaan hapusan BTA tidak spesifik karena tidak dapat membedakan antara kuman tuberkulosis dengan mikobakteri lainnya.
3. Pemeriksaan biakan dan identifikasi untuk diagnosis tuberkulosis membutuhkan waktu lama sampai beberapa minggu untuk pertumbuhan dan juga identifikasinya dilakukan dengan menggunakan prosedur yang rutin.
4. Bahan dahak sukar diperoleh pada akhir pengobatan karena biasanya penderita sudah tidak batuk lagi dan sudah tidak memproduksi dahak lagi. Pada program pengobatan di Cina, spesimen air ludah yang diperiksa dilaporkan sebagai dahak.

yang negatif. Di Botswana apabila bahan spesimen untuk pemeriksaan hapusan BTA berupa saliva, maka oleh petugas kesehatan dilaporkan sebagai tidak ada bahan dahak untuk pemeriksaan (Murray, 1994).

Pemeriksaan bahan dahak ini merupakan syarat penting yang harus dipenuhi untuk keberhasilan pengobatan pada program WHO yang sekarang dipergunakan dalam pemberantasan tuberkulosis karena banyaknya kuman yang ada pada seorang penderita akan menentukan perjalanan penyakit selanjutnya yang berkaitan dengan respons imun tubuh. Berbagai upaya telah dicoba untuk mengembangkan metode baru berdasarkan kemajuan di bidang imunologi, biokimiawi dan rekayasa genetika untuk mempercepat diagnosis kuman tuberkulosis dalam rangka memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk biakan dan identifikasinya (Kardjito, 1983, Handoyo, 1987, Grosset, 1993).

Pertahanan tubuh terhadap kuman tuberkulosis diperankan oleh *cell mediated immunity* (CMI = imunitas seluler), yakni limfosit T dan makrofag (Margono, 1980). Limfosit T terdiri dari sel T *helper* (sel Th) disebut juga sel T CD4 (*cluster of differentiation*) dan sel T *suppressor* (Ts) atau sel T CD8. Fungsi sel T CD4 terutama menguatkan respons imun dengan menghasilkan beberapa sitokin, sedangkan sel T CD8 mampu melakukan lisis pada sel target yakni makrofag yang terinfeksi dengan kuman tuberkulosis dan produksi sitokin interferon- γ (IFN- γ) yang menguatkan makrofag. Pada sel T CD4 terdapat polarisasi sel berdasarkan profil sitokin yang dihasilkannya, yaitu kelompok sel Th1 dan sel Th2. Sel Th1 memproduksi interleukin-2 (IL-2) dan IFN- γ yang mempunyai peran protektif karena menguatkan makrofag untuk membunuh dan mencerna kuman yang telah

difagositir. Profil sitokin yang dihasilkan oleh kelompok sel Th2 ialah beberapa macam interleukin, yaitu IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10 yang peranannya merugikan tubuh (Mosmann, 1996). Paparan dengan antigen mikobakteri yang terus menerus akan menyebabkan meningkatnya imunitas memori, sehingga menimbulkan *delayed-type hypersensitivity* yang sifatnya merusak jaringan paru (Ho dan Riley, 1997).

Obat antituberkulosis bekerja dengan membunuh kuman, sehingga pada pengobatan yang berhasil jumlah kuman akan menurun (Harding dan Bailey, 1994). Keberhasilan pengobatan yang dibuktikan dengan biakan kuman tuberkulosis dari dahak atau lavas bronkus, menyebabkan respons sel Th1 menjadi kuat dengan beban jumlah kuman yang sedikit, sehingga dapat menyebabkan lisis pada makrofag yang terinfeksi. Sebaliknya kegagalan pengobatan akan menimbulkan respons sel Th2 yang berlebihan karena beban jumlah kuman yang banyak, sehingga terjadi kerusakan jaringan sebagai akibat dari kerja enzim perusak dan pembentukan kaverna yang memudahkan pertumbuhan dan penyebaran kuman.

Cairan lavas bronkus pada tuberkulosis paru terbukti dapat meningkatkan kepekaan pemeriksaan baik pada hapusan maupun biakan dahak (Baughman dkk., 1991). Pemeriksaan respons imun dari cairan lavas pada beberapa penyakit paru interstitial memberi gambaran yang mirip dengan pemeriksaan biopsi paru (Hunninghake dkk., 1981, Semenzato dkk., 1985, Paradis dkk., 1986a, Paradis dkk., 1986b). Sel limfosit yang didapatkan di ruang alveoli merupakan salah satu bagian atau kompartemen dari empat kompartemen limfosit yang ada di paru. Limfosit yang ada di masing-masing kompartemen dapat saling berhubungan dan juga berhubungan dengan sistem imun tubuh (Pabst, 1990a).

Penelitian dengan menggunakan cairan lavas bronkus ini dilakukan dengan maksud untuk mengetahui respons imun secara lokal yang dapat mewakili gambaran sistemik pada pengobatan tuberkulosis di paru dan dapat dipergunakan untuk meramalkan keberhasilan pengobatan.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 lokal yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 di cairan lavas bronkus, dengan berkurangnya jumlah biakan *M. tuberculosis* pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimar sesuai program WHO
2. Apakah terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 lokal yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 di cairan lavas bronkus, dengan hasil biakan *M. tuberculosis* yang negatif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimar sesuai program WHO.
3. Apakah terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 sistemik yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 dalam darah, dengan berkurangnya jumlah biakan *M. tuberculosis* pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimar sesuai program WHO
4. Apakah terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 sistemik yang protektif, berupa peningkatan

IFN- γ serta menurunnya IL-4 dalam darah, dengan hasil biakan *M. tuberculosis* yang negatif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimmer sesuai program WHO.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa terdapat perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 yang protektif di lokal dan sistemik dengan berkurangnya jumlah biakan atau biakan *M. tuberculosis* yang menjadi negatif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimmer sesuai program WHO

1.3.2. Tujuan khusus

1. Untuk mengetahui dan membuktikan bahwa terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 lokal yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 di cairan lavas bronkus, dengan berkurangnya jumlah biakan *M. tuberculosis* pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimmer sesuai program WHO.
2. Untuk mengetahui dan membuktikan bahwa terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 lokal yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 di cairan lavas bronkus, dengan hasil biakan *M. tuberculosis* yang negatif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimmer sesuai program WHO

- 3 Untuk mengetahui dan membuktikan bahwa terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 sistemik yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 dalam darah, dengan berkurangnya jumlah biakan *M. tuberculosis* pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimer sesuai program WHO.
- 4 Untuk mengetahui dan membuktikan bahwa terdapat peningkatan jumlah limfosit T CD4, T CD8 dan perubahan pola respons imun dari Th2 menjadi Th1 sistemik yang protektif, berupa peningkatan IFN- γ serta menurunnya IL-4 dalam darah, dengan hasil biakan *M. tuberculosis* yang negatif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimer sesuai program WHO

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat ilmiah

- 1 Pemakaian bahan cairan lavas bronkus merupakan parameter yang lebih peka terhadap respons pengobatan dengan obat antituberkulosis dibandingkan dengan pemeriksaan bakteriologis pada dahak
- 2 Memberi gambaran perubahan respons imun lokal dari *tissue-damaging mechanism* menjadi respons imun protektif pada pengobatan tuberkulosis paru pascaprimer
- 3 Membuka jalan bagi pengembangan penelitian lanjutan untuk mendapatkan vaksin yang lebih murah, aman dan efektif daripada BCG
- 4 Untuk mendapatkan diagnosis yang lebih dini dan *end point of therapy* yang lebih tepat

5. Dikembangkan sebagai model untuk kasus penyakit paru yang gambaran radiologisnya serupa dengan penyakit tuberkulosis paru pascaprimier (infeksi karena penyebab lainnya).

1.4.2. Manfaat praktis

Menunjang program pemerintah dalam upaya pemberantasan tuberkulosis paru yang bertujuan untuk menurunkan prevalensi dengan cara memutuskan rantai penularan melalui pendekatan imunologis

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

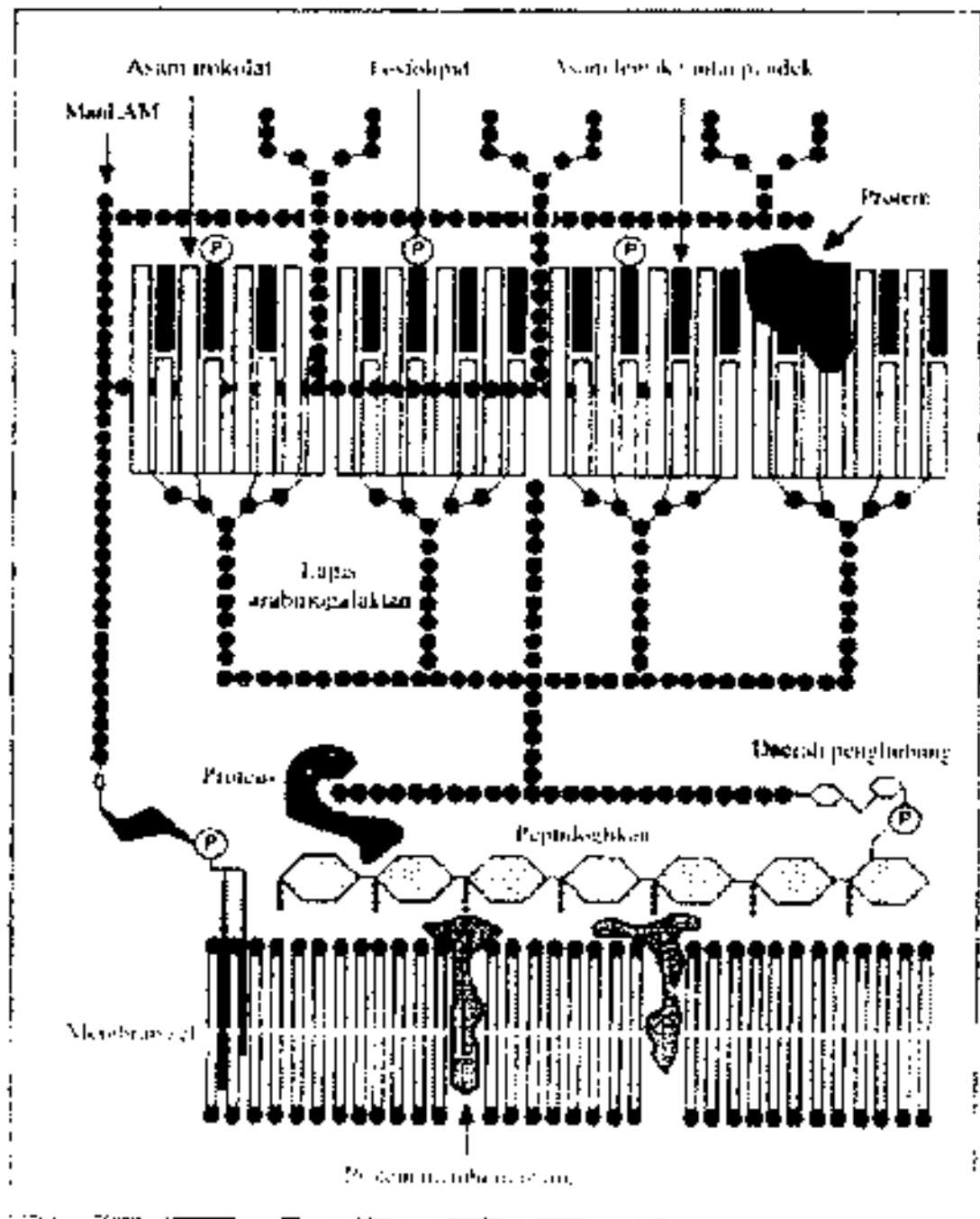
2.1. Kuman Penyebab dan Pengobatan Tuberkulosis Paru

2.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Penyakit tuberkulosis paru merupakan penyakit yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*, berbentuk batang langsing dengan panjang 2-5 μm dan tebal 0,2-0,3 μm (Grosset, 1993). Kuman terbungkus dalam membran sitoplasma lipida dua lapis, yang terletak dibawah peptidoglikan (PG) yang kaku. Sejumlah protein ditemukan berhubungan dengan PG dan juga diantara membran dengan PG, yang beberapa diantaranya bersifat imunogenik. Kesebelah luarnya PG secara kovalen dihubungkan oleh ikatan fosfodiester pada arabinogalaktan (AG), suatu polimer arabinosa dan galaktosa. Asam mikolat, suatu asam lemak rantai bercabang yang besar ($\text{C}_{60}\text{-C}_{90}$), bergabung pada bagian distal AG. *Cord factor* yang merupakan kompleks PG, AG dan mikolat dari trehalosa disakarida, juga berhubungan dengan kerangka dinding sel. Kelompok yang lain adalah *acylated trehalose-2'-sulfates*, yang berperan penting untuk virulensi kuman karena galur yang virulen menghasilkan asam kuat sulfolipid, yang terlibat dalam inaktivasi fagosit makrofag (Fenton dan Vermeulen, 1996).

Komponen dinding sel yang lainnya ialah lipoarabinomanan (LAM), yang walaupun berada di membran sel, diperkirakan berada di sepanjang lapisan ke arah permukaan. Senyawa LAM merupakan campuran heterogen dari arabinosa dan manosa lipopolisakarida. Pada terminal arabinosa LAM *M. tuberculosis* dan BCG

M. bovis terdapat penutup dari beberapa residu manosa (manLAM), yang mempunyai peran mempengaruhi respons makrofag (Fenton dan Vermeulen, 1996) (Gambar 1)



Gambar 1 Dinding sel *M. tuberculosis* (Orme J., 1995: Immunity to Mycobacteria p. 13)

Menurut Grosset (1980) dan Grosset (2000), ciri khas kuman tuberkulosis yang mempunyai arti penting dalam pengobatan, ialah

1. Kebutuhan akan oksigen

M. tuberculosis merupakan kuman aerobik obligat, sehingga tidak tumbuh pada keadaan anaerobik, tetapi akan tumbuh sesuai dengan banyaknya oksigen di sekitarnya. Kuman tumbuh baik dalam rongga kaverna, tetapi kurang baik dalam fokus pengejuan yang oksigennya rendah. Respons pengobatan akan dipengaruhi oleh status metabolisme dan perbedaan jumlah kuman pada satu fokus dengan fokus yang lainnya.

2. Kecepatan pertumbuhan yang lambat

Waktu untuk replikasi *M. tuberculosis* ialah sekitar 20 jam, sehingga pemberian obat sehari sekali cukup untuk menghentikan pertumbuhannya. Jangka waktu pemberian pengobatan juga membutuhkan waktu yang lama dibandingkan kuman lain yang pertumbuhannya cepat (*Escherichia coli* atau *Staphylococcus aureus* membutuhkan waktu hanya 20 menit untuk membagi diri).

3. Kecepatan mutasi untuk menjadi resisten terhadap obat

Adanya kecepatan mutasi, maka sebagai konsekuensinya terdapat banyak mutan resisten obat di dalam biakan kuman *M. tuberculosis*. Untuk isoniazid streptomisin dan erhanbutol sebanyak 10^3 - 10^4 kuman dan sebanyak 10^7 kuman untuk rifampisin. Inilah sebabnya pengobatan harus dengan paduan kombinasi beberapa macam obat.

Mycobacterium tuberculosis merupakan kuman yang multiplikasinya secara intraseluler, tetapi tidak berarti bahwa kuman harus selalu berada di dalam sel. Di dalam fokus pengejuan, apabila bahan kejuanya mengalami pencairan dan keluar, maka akan terbentuk suatu rongga (kaverna). Tekanan oksigen akan meningkat di dalam kaverna, sehingga keadaannya menjadi optimal untuk multiplikasi kuman. Jadi multiplikasi yang paling banyak adalah di dalam jaringan pengejuan yang mencair. Dari kaverna tersebut kuman akan menyebar, tertelan makrofag dan selanjutnya akan terbentuk fokus pengejuan baru dan seterusnya.

2.1.2. Cara kerja kemoterapi obat anti tuberkulosis (OAT)

Obat antituberkulosis yang telah digunakan antara lain, adalah isoniazid (H) menghambat kuman tuberkulosis pada kadar diatas 0,01 mg/l. bersifat bakterisidik terhadap kuman tuberkulosis yang tumbuh cepat, tetapi kurang aktif terhadap kuman yang tidak membelah. Obat H bekerja dengan cara menghambat sintesa asam mikolik yang menjadi bahan dinding sel. Mutasi kuman yang resisten terhadap H terjadi pada 1 dalam 10^7 kuman, mungkin oleh karena kuman kurang mengambil obat.

Obat H dapat diberikan secara oral atau intramuskular. Apabila H diberikan secara oral dalam keadaan puasa, akan diabsorpsi secara sempurna tetapi absorpsinya berkurang setelah pemberian makanan atau antasida. Dalam keadaan puasa kadarnya mencapai maksimal setelah 1-2 jam minum obat. Walaupun diserap baik, tetapi mempunyai bioavailabilitas yang tidak sempurna oleh karena

metabolisme di dinding usus dan hati lebih cepat pada penderita dengan asetilator cepat. Keadaan ini tidak dijumpai pada pemberian secara intramuskular.

Obat INH dimetabolisir secara ekstensif menjadi berbagai metabolit inaktif, terutama di hati dan usus halus. Obat yang belum dimetabolisme beserta metabolitnya akan diekskresikan terutama melalui air seni. Proses metabolisme merupakan faktor utama dalam eliminasi INH, dan status asetilator terhadap INH pada setiap individu merupakan faktor genetik, sehingga *half-life* ($t_{1/2}$) bervariasi antara 0,75 sampai 5 jam.

Rifampisin (R) bekerja dengan mempengaruhi transkripsi DNA melalui hambatan polimerase-RNA. Obat bersifat bakterisidal terhadap sebagian besar kuman tuberkulosis pada kadar diatas 1 mg/l. Pada umumnya mutan yang sangat resisten terjadi pada $1 \cdot 10^5$ - 10^7 jumlah kuman. Mekanisme resistensi belum dapat dimengerti sepenuhnya, mungkin akibat dari kombinasi menurunnya permeabilitas kuman terhadap obat dan mutasi dari polimerase-RNA yang tergantung pada DNA.

Rifampisin dapat diberikan secara oral maupun melalui suntikan secara intravena. Kadar maksimal dalam plasma dicapai dalam 1-2 jam dan bertambah panjang apabila diberikan sesudah makan. Obat didistribusikan ke seluruh jaringan intra maupun ekstraseluler dengan baik. Metabolisme oleh hati menjadi bahan yang bersifat aktif, tetapi lebih larut dalam air yaitu *desacetyl-R*, yang diekskresi melalui empedu dan air seni.

Pirazinamid (Z) dimetabolisme oleh pirazinamidase menjadi asam pirazinok yang bersifat bakterisidik. Obat Z diduga mempunyai aktivitas yang lebih

besar terhadap kuman intraseluler daripada ekstraseluler. Resistensi berkembang cepat apabila Z diberikan sebagai obat tunggal.

Obat Z hanya diberikan secara oral, yang sempurna diabsorpsi dan kadar maksimalnya tercapai dalam 1-2 jam. Sebanyak 50% obat terikat pada protein plasma dan secara ekstensif didistribusikan ke seluruh jaringan. Obat Z dimetabolisme menjadi asam pirazinoik yang kemudian diikuti oksidasi menjadi bahan yang inaktif. Ekskresi utamanya melalui air seni.

Etambutol (E) mungkin menghambat sintesa dinding sel mikobakteria, tetapi mekanisme yang sebenarnya belum diketahui. Obat E bersifat bakteriostatik, yang mempunyai aktivitas terhadap semua galur kuman mikobakteria, tetapi apabila diberikan sebagai obat tunggal, resistensi akan timbul sebanyak 50% dalam waktu 6 bulan.

Setelah pemberian secara oral, obat E akan diabsorpsi dengan baik dan dengan t_{max} sekitar 2 jam dan E sebesar 0,8. Absorpsi dihambat oleh aluminium hidroksida dan etanol tetapi tidak oleh makanan yang dikonsumsi. Obat E didistribusikan ke semua cairan tubuh dan sekitar 40% terikat pada protein plasma, tidak dapat melewati *blood-brain barrier*, tetapi berakumulasi di dalam paru. Sebagian besar obat E diekskresikan tanpa perubahan di dalam air seni, dengan bahan metabolit inaktifnya sebanyak 20%. Waktu $t_{1/2}$ dari E sekitar 10-15 jam pada ginjal normal.

Obat aminoglikosida secara aktif ditransportasikan melalui membran sel kuman, terikat pada protein dari bagian 30S subunit ribosom dan mempengaruhi sintesa protein. Obat kelompok aminoglikosida yang digunakan pada pengobatan tuberkulosis di negara berkembang, termasuk Indonesia ialah kanamisin (Ka), amik-

kasin (Am) dan streptomisin (S), dan terdapat resistensi silang diantara kelompok obat tersebut. Obat S aktif terhadap kuman tuberkulosis pada kadar 10 mg/l *in vivo*.

Obat S diberikan secara intramuskular karena absorpsi secara oral sangat kecil. Sekitar 50% obat S terikat pada protein plasma pada orang sehat dan berkurang pada penderita kwashiorkor; dan didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh, tetapi kurang sekali melewati *blood-brain barrier*. Lebih dari 90% obat S diekskresi tanpa perubahan, terutama melalui air seni. Pada orang sehat $t_{1/2}$ sekitar 3 jam, tetapi dapat mencapai 100 jam pada gagal ginjal (Winstanley, 1994).

2.1.2.1. Dasar teori kemoterapi

Untuk pengobatan tuberkulosis dengan kemoterapi terdapat dua prinsip pokok yang penting. Prinsip pertama adalah bahwa terapi yang berhasil, memerlukan minimal dua macam obat yang kumannya peka terhadap obat tersebut, dan salah satunya harus bersifat bakterisidik. Karena dapat timbul resistensi obat yang spontan pada sejumlah kecil kuman, monoterapi dengan obat bakterisidik yang potenpun dapat mengakibatkan kegagalan terapi dengan terjadinya perkembangan kuman yang resisten. Keadaan ini lebih banyak dijumpai pada penderita dengan populasi kuman yang besar, misalnya pada tuberkulosis dengan bentukan kavitas, oleh karena dapat terjadi 1 kuman resisten dari 10^9 kuman yang ada. Kemungkinan terjadinya resistensi spontan terhadap dua macam obat merupakan hasil probabilitas masing-masing obat, sehingga penggunaan dua macam obat yang aktif umumnya dapat mencegah perkembangan resistensi yang sekunder. Obat antituberkulosis mempunyai kemampuan yang berbeda dalam mencegah ter-

jadinya resistensi terhadap obat lainnya. Obat H dan R merupakan obat yang paling efektif, E dan S merupakan intermediat, sedangkan Z yang efektifnya paling kecil.

Prinsip kedua ialah, bahwa penyembuhan penyakit tuberkulosis membutuhkan pengobatan yang baik setelah perbaikan gejala klinisnya. Perpanjangan lama pengobatan diperlukan untuk mengeliminasi kuman yang persisten, yang merupakan suatu populasi kecil kuman yang metabolismenya inaktif. Pengobatan yang tidak cukup akan mengakibatkan bertambahnya kemungkinan kekambuhan, beberapa bulan - tahun mendatang setelah nampak sembuh. Rejimen pada pengobatan sekitar tahun 1950-1960 memerlukan waktu 18-24 bulan untuk jaminan menjadi sembuh. Dengan adanya cara pengobatan pada masa kini yang menggunakan paduan beberapa obat, pada umumnya penderita tuberkulosis berhasil disembuhkan secara baik dalam waktu 6 bulan. Kegagalan untuk menyelesaikan masa pengobatan secara sempurna merupakan penyebab dari kekambuhan penyakit tuberkulosis (Mitchison, 1998)

Berdasarkan prinsip tersebut, terapi tuberkulosis dibagi menjadi 2 fase, yaitu: fase bakterisidal awal dan fase sterilisasi. Obat yang bersifat bakterisidal aktif belum tentu merupakan obat sterilisator terbaik dan obat yang efektif pada fase sterilisasi belum tentu obat bakterisidal yang paling aktif. Telah diketahui bahwa obat H merupakan bakterisidal yang paling poten, sedangkan obat R dan Z merupakan sterilisator yang paling efektif. Pada hewan coba, obat H dapat menghambat aktivitas sterilisasi dari obat R dan Z.

2.1.2.2. Terapi tuberkulosis

Pengobatan tuberkulosis di Indonesia mengacu pada pedoman WHO (WHO 1997a), yaitu pengobatan jangka pendek sesuai dengan kategori penyakit, yaitu ada 4 kategori sebagai berikut :

Kategori I . Kasus tuberkulosis paru (TBP) dengan dahak positif dan kasus baru lainnya dalam keadaan berat, seperti meningitis tuberkulosis dan miliaris, perikarditis, peritonitis, pleuritis masif atau bilateral, spondilitis dengan gangguan neurologik, dahak negatif tetapi kelainan di paru luas, tuberkulosis usus dan saluran kemih

Pengobatan fase inisial terdiri dari 2 HRZSE), setiap hari selama dua bulan obat H, R, Z dan S atau E. Dahak yang positif setelah dua bulan diharapkan menjadi negatif, dan dapat dilanjutkan dengan fase lanjutan 4HR atau 4H₃R₃ atau 6HE. Apabila dahak masih tetap positif setelah dua bulan, fase intensif diperpanjang dengan 2-4 minggu lagi, tanpa melihat apakah dahak sudah negatif atau tidak.

Kategori II Kasus kambuh atau gagal dengan dahak positif

Pengobatan fase inisial terdiri dari 2HRZES/1HRZE, yaitu R dengan H, Z, E setiap hari selama 3 bulan, ditambah dengan S selama 2 bulan pertama. Apabila dahak menjadi negatif, fase lanjutan dimulai. Apabila dahak masih positif pada minggu ke-12, fase inisial dengan 4 obat dilanjutkan 1 bulan lagi. Bila akhir bulan ke-4 dahak masih positif, semua obat dihentikan selama 2-3 hari dan dilakukan

pemeriksaan dahak untuk biakan dan uji kepekaan. Obat dilanjutkan menggunakan cara fase lanjutan, yaitu 5H₃R₃E₃ atau 5HRE

Kategori III: Kasus TBP dengan dahak negatif tetapi kelainan paru tidak luas dan kasus ekstra-pulmonal (selain yang termasuk kategori I).

Pengobatan fase inisial terdiri dari 2HRZ atau 2 H₃R₃E₃Z₃, yang dilanjutkan dengan fase lanjutan 2HR atau 11R₃

Kategori IV: Tuberkulosis kronik

Pada penderita ini kemungkinan terdapat resistensi ganda, harus dilakukan biakan dan uji kepekaan obat. Untuk seumur hidup diberi H saja (WHO, 1993) atau sesuai rekomendasi WHO untuk pengobatan *multidrug resistant tuberculosis* (MDR-TB) (WHO, 1997b)

2.2. Imunopatogenesis Tuberkulosis Paru.

2.2.1. Infeksi awal dengan *M. tuberculosis*

Jalan masuknya kuman tuberkulosis ke dalam tubuh adalah melalui saluran nafas dengan cara inhalasi tetes-tetes dahak, yang berukuran cukup kecil (\pm 1-2 μ m) untuk dapat mencapai saluran nafas bawah. Tetes-tetes dahak yang lebih besar ukurannya secara efisien akan dikeluarkan dari saluran nafas bawah oleh rintangan fisik pada nasofaring dan saluran nafas atas. Sel-sel epitel bronkus saluran nafas resisten terhadap infeksi *M. tuberculosis*, tetapi mikobakteria yang virulen bersifat sitotoksik untuk sel-sel epitel alveoli tipe II. Sel-sel epitel bronkus dapat memproduksi peptida yang mempunyai sifat antimikroba dengan spektrum aktivitas yang luas.

Setelah kuman sampai di jalan nafas, kemungkinan dapat terjadi empat hal, yaitu 1) respons inang pada awalnya efektif sekali dan membunuh semua kuman, sehingga tidak ada kesempatan terjadinya tuberkulosis setiap waktu pada masa yang akan datang, 2) kuman dapat mulai multiplikasi dan tumbuh segera setelah infeksi, menjadi penyakit yang disebut tuberkulosis primer, 3) kuman mungkin menjadi dorman dan tidak pernah terjadi penyakit sama sekali, sehingga terdapat keadaan yang disebut infeksi laten. Infeksi laten tersebut dapat terdeteksi hanya pada uji tuberkulin yang hasilnya positif, 4) atau kuman yang laten akhirnya mulai tumbuh menjadi suatu keadaan yang disebut penyakit klinis, dikenal sebagai tuberkulosis reaktivasi (Ho dan Riley, 1997).

2.2.2. Fagositosis

Proses fagositosis meliputi ikatan antara kuman dengan sel inang, internalisasi dan akhirnya hambatan pertumbuhan atau pembunuhan kuman. Fagositosis diawali dengan sel fagosit yang melingkupi kuman yang masuk di dalam vakuola dengan batas membran yang kuat, yang dibuat pada saat pseudopodi mengelilingi kuman dan kemudian bergabung di bagian distalnya. Pembentukan vakuola atau fagosome ini disertai dengan ikatan kuman pada fagosit melalui reseptor komplemen CR1, CR3, CR4, reseptor manose (MR) dan molekul reseptor permukaan sel. Penambahan serum normal pada makrofag akan menguatkan ikatan kuman pada sel fagosit, menunjukkan pentingnya peran komplemen pada sistem ini (Ernst, 1998).

Kemungkinan, terdapat perbedaan mekanisme ikatan spesifik pada kuman mikobakteria antara galur virulen dan yang relatif avirulen karena apabila reseptor

komplemen dihalangi dengan antibodi monoklonal, akan terjadi hambatan pada fagositosis *M. tuberculosis* galur H37Ra (avirulen), Erdman dan H37Rv (virulen). Tetapi, menurunnya regulasi reseptor manose hanya berhubungan dengan ikatan galur yang virulen. Interaksi antara reseptor manose pada sel fagositik dengan mikobakteria, nampaknya diperantarai melalui glikoprotein lipoarabinomannan (LAM), yang terdapat pada dinding sel *M. tuberculosis*, termasuk galur yang virulen dengan diberi penutup oleh residu manose. Molekul LAM dengan terminal manan (manLAM) terutama dikenali oleh reseptor manose, sedangkan LAM tanpa manose dan mempunyai terminal arabinose (araLAM) dikenali oleh CD14. Reseptor Fc dan reseptor β -glukan nampaknya tidak terlalu penting pada infeksi *M. tuberculosis* (Kaufman, 1999).

Eksresi reseptor komplemen dan manose oleh makrofag, nampaknya dipengaruhi oleh berbagai mediator termasuk PGE₂, sitokin IFN- γ dan IL-4. Sitokin IL-4 dan PGE₂ merupakan sitokin tipe Th2, yang pada umumnya akan meningkatkan regulasi ekspresi reseptor CR dan MR. Sitokin IFN- γ dapat mengurangi ekspresi dan fungsi reseptor, yang berakibat menurunnya kemampuan mikobakteria untuk menempel pada makrofag. Nampaknya, efek negatif IFN- γ ini bertentangan dengan kemampuannya mengaktifkan makrofag, meningkatkan penghambatan pertumbuhan dan juga diduga mampu membunuh mikobakteria intraseluler (Fenton dan Vermeulen, 1996).

Adanya peran reseptor protein permukaan dapat diketahui karena adanya reseptor tersebut dapat meningkatkan penempelan *M. tuberculosis* pada makrofag manusia, apabila ditambah dengan surfaktan protein A (SP-A) yang berasal dari

penderita dengan proteinosis alveolar (juga SP-A rekombinan mencit). Menguatnya ikatan tersebut nampaknya tergantung pada bagian-bagian karbohidrat molekul SP-A, karena protein SP-A yang kurang karbohidratnya gagal untuk meningkatkan ikatannya pada makrofag (Ernst, 1998)

Pada tuberkulosis, terbukti bahwa CD14 mempunyai peranan yang penting yang diperlukan untuk menempelnya mikobakteria pada mikroglia, yang merupakan sel fagositik di jaringan otak, dan *hgan* ini mungkin penting untuk ikatan *M. tuberculosis* pada makrofag alveolar (Hoheisel dkk . 1995).

Nampaknya, reseptor pembersih mungkin berperan dalam memperantarai ikatan mikobakteria pada sel fagositik. Hal ini dibuktikan dengan menghalangi reseptor komplemen C1, C3, C4 dan reseptor manose dengan antibodi monoklonal, kemampuan fagositosis makrofag hanya berkurang sekitar 50-60%, sehingga diduga ada satu atau lebih reseptor lainnya yang berfungsi sebagai perantara antara makrofag dengan *M. tuberculosis*. Reseptor pembersih tersebut lokasinya ada pada permukaan makrofag dan mempunyai afinitas untuk berbagai macam ligan, termasuk lipoprotein densitas rendah, poliribonukleotida, polisakarida (termasuk sulfat dekstran), fosfolipid anionik, dan molekul lainnya, termasuk partikel asbestos dan endotoksin kuman (Zimmerli dkk., 1996).

Jenis reseptor lainnya yang berperan pada imunitas dini infeksi *M. tuberculosis*, yaitu *Toll-like receptors* (TLR) yang mirip dengan *Drosophila melanogaster Toll protein*. Sampai saat ini, telah dikenal enam jenis TLR. Infeksi dengan *M. tuberculosis* yang hidup dapat mengaktifkan sekurang-kurangnya dua

jenis TLR, yaitu TLR2 dan TLR4, dengan melibatkan banyak komponen kuman, antara lain lipoprotein 19 dan 38 kDa untuk interaksinya (Means dkk., 2000).

Monosit memproses antigen *M. tuberculosis* untuk disajikan pada sel T CD4⁺ dan sel T $\gamma\delta$ melalui mekanisme yang berbeda. Untuk sel T $\gamma\delta$, pengenalannya tergantung pada ekspresi reseptor sel T V δ 2, sedangkan untuk sel T CD4⁺ pengenalannya terbatas pada HLA-DR MHC kelas II. Jalur proses pengenalan untuk sel T CD4⁺ dan sel T $\gamma\delta$ juga dipengaruhi oleh bentuk antigen sewaktu diambil oleh monosit, sebagai partikel atau bentuk terlarut. Pemahaman ini diperlukan untuk pengembangan pemhuatan vaksin dan imunoterapi tuberkulosis yang lebih baik (Balaji dan Boun, 1998).

2.2.3. Fagositosis - asidifikasi - evansi

Setelah kuman patogenik diangkut oleh fagosit, sehingga masuk ke dalam fagosom, kuman menjadi subyek untuk dibunuh melalui beberapa mekanisme, termasuk fusi fagosom-lisosom dan generasi oksigen reaktif intermediet, terutama oksida nitrik. Pembentukan fagolisosom melalui tiga tahapan: 1) fagosom awal, yang bersifat sedikit asam (pH 6) dan ditandai membran, seperti reseptor manose, transferin dan reseptor transferin, 2) fagosom akhir, mempunyai pH < 5,5 dan terbentuk vakuola pompa adenosine trifosfatase (*ATPase*), yang fungsinya mengatur derajat keasaman di dalam fagosom. 3) fagolisosom, sebagai hasil fusi fagosom dan lisosom yang ditandai dengan pH < 5,5, *lysosome-associated membrane protein* (LAMP) dengan densitas tinggi dan adanya enzim lisosom

Ketiga tahapan ini tidak terpisah, tetapi merupakan suatu proses dinamis yang berkesinambungan (Kaufmann, 1999)

Mikobakteria mampu menghasilkan amonia yang dapat menghambat fusi fagosom-lisosom dan dengan alkanisasi isi intralisosom, dapat mengurangi potensi kompleks fusi. Sulfatida (derivat trehalose 2-sulfat suatu glikolipid yang dihasilkan oleh *M. tuberculosis*), dapat menghambat fusi fagosom-lisosom dan diproduksi oleh banyak spesies mikrobakteria, termasuk yang nonpatogen. Walaupun demikian peran sebenarnya sulfatida tersebut masih belum jelas. Adanya dinding sel mikobakteria yang kuat dan kaya lemak juga membuatnya mempunyai resistensi tinggi terhadap pengaruh enzim.

Beberapa peneliti, Yamamoto (1958), Draper dan Rees (1970, 1973), D'Arcy Hart (1972), seperti dikutip oleh Riley, pada pengamatan dengan mikroskop elektron mendapatkan adanya zona elektron-transparan (ETZ) setebal 50-100 nm atau *capsule-like substance* yang mengelilingi mikobakteria intraseluler. Struktur tersebut hanya didapatkan pada spesies mikobakteria yang menyebabkan penyakit. Diduga, bahwa ETZ diperlukan untuk melindungi kuman dengan cara menunda difusi dengan enzim lisosim (Riley, 1996)

Pada makrofag dari sumsum tulang, vakuola yang mengandung *M. avium* hanya dapat memperoleh protein membran lisosom LAMP-1, tetapi tidak ada vesikular proton-adenosin trifosfatase (ATPase) yang diperlukan untuk asidifikasi fagosom. Diperkirakan bahwa terjadi hambatan selektif pada fusi kuman mikobakteria dengan vesikel yang mengandung proton ATPase atau secara cepat disingkirkan dari fagosom (Sturgill-Koszycki dkk., 1994). Pertumbuhan *M.*

tuberculosis (termasuk beberapa galur virulen *M. tuberculosis* marmot) *in vitro*, hanya menunjukkan sedikit perbedaan pada pH asam 4,5 atau pertumbuhannya tidak berbeda sama sekali pada pH 7,0.

Mikobakteria virulen mampu menghindar dari fusi fagosom dan masuk ke dalam vakuola dengan membran anti fagosom pada mikobakteria dan bermultiplikasi (McDonough, 1993). Maturasi fagosom dapat dihambat oleh mikobakteria, yang ditunjukkan oleh Via seperti dikutip oleh Schluger, dikendalikan oleh rab5 dan rab7, suatu protein *GTP-binding* (Schluger dan Rom, 1998).

2.2.4. Sitokin

Interaksi makrofag dengan sel efektor lainnya terjadi dengan perantara sitokin dan kemokin. Molekul-molekul ini membantu untuk menarik sel efektor inflamasi lainnya seperti limfosit dan mengaktifkannya. Kemokin berasal dari kependekan *chemoattractant cytokines*, yang merekrut granulosit dan limfosit ke tempat terjadinya infeksi dan inflamasi (Krakauer dkk., 1999). Diduga, bahwa kemokin yang penting dalam interaksi inang patogen mikobakteria tersebut adalah IL-8, suatu anggota dari famili CXC kemokin. Kemokin IL-8 mempunyai fungsi lainnya, yaitu mampu merekrut netrofil, limfosit T dan basofil sebagai respons terhadap berbagai stimuli. Kemokin IL-8 selain terutama disekresi oleh monosit/makrofag, dapat juga diekspresi oleh fibroblast, keratinosit dan limfosit (Munk dan Emoto, 1995).

Pada penderita tuberkulosis paru dapat ditunjukkan bahwa kadar IL-8 meningkat di cairan BAL dan supernatan makrofag alveolar yang dibiakkan selama

24 jam. Ekspresi gen IL-8 juga meningkat pada makrofag dibandingkan dengan kontrol orang normal (Law dkk., 1996a) Zhang dan kawan kawan seperti dikutip oleh Schluger, membuktikan bahwa *M. tuberculosis* yang utuh atau komponen dinding sel LAM, tetapi bukan diasetilasi-LAM, dapat menstimulasi pelepasan IL-8 dari makrofag secara *in vitro* (Schluger dan Rom, 1998). Pelepasan ini dapat dihalangi secara kuat oleh antibodi yang menetralkan TNF- α dan atau IL-1 α atau β . Sel-sel BAL di daerah yang sakit berdasarkan hasil foto, melepaskan TNF- α , IL-1b (dan IL-6) dengan kadar yang meningkat, dibandingkan dengan sel di daerah paru yang normal atau kontrol orang normal (Law dkk., 1996b). Kedua sitokin tersebut juga diproduksi dalam jumlah besar oleh makrofag dan monosit, nampaknya terdapat pola *autocrine regulatory loop* dalam kerjanya selama stadium awal infeksi mikobakteria pada manusia (Krakauer dkk., 1999).

Kemokin lainnya yang terlibat dalam respons inang terhadap tuberkulosis adalah *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) yang meregulasi aktivasi normal ekspresi sel T dan sekresinya, yang keduanya menurun dalam fase konvalesen pengobatan, yang berlawanan dengan IL-8 (Kurashima dkk., 1997)

Pada model tuberkulosis dengan mencit, dapat ditunjukkan bahwa walaupun beberapa galur laboratorium *M. tuberculosis* dapat merangsang produksi kemokin (termasuk protein inflamasi makrofag dan protein yang diinduksi oleh interferon), sekresi TNF hanya distimulasi oleh galur tertentu mikobakteria. Sebagai tambahan, model dengan mencit pada tuberkulosis paru tidak mempunyai inflamasi neutrofil yang kuat seperti yang ada pada manusia. Penelitian ini menunjukkan betapa sulitnya mengekstrapolasi hasil penelitian dari hewan coba dan *in vitro*

kepada manusia, tetapi juga menunjukkan perlunya penelitian hewan untuk mengurai benang kusut pada sistim model pertahanan tuberkulosis, yang kemudian dapat diterapkan penelitiannya pada manusia (Rhoades dkk , 1995).

Peran TNF dalam pertahanan inang terhadap tuberkulosis adalah kompleks. Secara *in vitro*, pelepasan TNF- α dapat dihasilkan dari monosit dan makrofag oleh mikobakteria (dan oleh protein yang disekresinya), sitokin ini sebenarnya telah dilaporkan untuk membantu pertumbuhan mikobakteria yang virulen. Kindler dan kawan kawan seperti dikutip oleh Ho dan Riley, mendapatkan bahwa sitokin TNF- α dapat menginduksi pembentukan granuloma pada model mencit yang diinfeksi dengan BCG. Hal ini terbukti dengan terdapatnya pengecatan imun untuk TNF yang kuat pada granuloma yang terbentuk baik, tetapi mencit yang diberi antibodi anti-TNF gagal untuk membentuk granuloma dan mati oleh karena infeksi dengan BCG yang luas (Ho dan Riley, 1997). Mencit yang kehilangan reseptor TNF 55kD, menunjukkan bahwa TNF- α penting untuk kehidupannya terhadap infeksi *M. tuberculosis*, mungkin melalui induksi spesies nitrogen reaktif, dan juga telah ditunjukkan bahwa TNF- α bukan merupakan faktor penting untuk pembentukan nekrosis pengejuan (Schluger dan Rom, 1998).

Kemampuan makrofag untuk menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* nampaknya tergantung pada aktivasi sel efektor, yaitu pada peran sitokin interferon-gamma (IFN- γ) dan *transforming growth factor* (TGF- β), karena kemampuannya untuk aktivasi dan deaktivasi makrofag yang menghambat pertumbuhan mikobakteria. Pada respons terhadap suplementasi limfokin, replikasi mikobakteria

intraseluler sebenarnya meningkat. Adanya tambahan r -IFN- γ tidak berefek pada pertumbuhan mikobakteria intraseluler (Douvas dkk., 1985).

Aktivasi fungsi antimikroba pada mononukleus fagosit, belum sepenuhnya dimengerti karena pertama, produksi RNI dengan kadar tinggi oleh fagosit masih diperdebatkan, meskipun sekarang ini cenderung memang benar pada penderita dengan penyakit infeksi dan kedua, bahwa IFN- γ gagal secara konsisten menginduksi tuberkulostasis pada makrofag manusia. Keadaan tersebut dapat dicapai pada mononukleus fagosit dengan cara kostimulasi bersama IFN- γ dan TNF, dan keadaan tuberkulostasis maksimum dapat dicapai lebih jauh dengan penambahan 1,25-dihidroksi-vitamin D3, suatu bahan metabolit yang aktif dari vitamin D3. Steroid ini dapat diperoleh dari diet atau hasil dari produksi kulit setelah pemaparan dengan sinar ultraviolet. Vitamin D3 diubah oleh 1α -hidroksilasi untuk kemudian menjadi metabolit yang aktif. Makrofag mempunyai aktivitas 1α -hidroksilasi, yang dikontrol oleh IFN- γ . Nampaknya bahwa IFN- γ *in situ* dapat menginduksi produksi 1,25-dihidroksi-vitamin D3 secara autokrin, yang mungkin hilang dalam sistem *in vitro* pada keadaan tertentu (Kaufmann, 1999).

Pemberian IFN- γ secara sistimatis, untuk mengobati sekelompok penderita dengan infeksi sistemik karena *M. avium complex* dan mikobakteria non-tuberkulosis lainnya, memberi efek yang menguntungkan. Pemberian IFN- γ secara aerosol, pada beberapa penderita dengan MDR-TB yang sebelumnya gagal pada pengobatan (terbukti dengan hapusan positif yang persisten dan hiakan walaupun mendapat rejimen pengobatan yang terbaik), menunjukkan perbaikan pada beberapa parameter klinik, yaitu hapusan menjadi negatif, berat badan meningkat, lesi kavitas

pada *CT scan* membaik, waktu yang dibutuhkan untuk isolasi *M. tuberculosis* dari dahak meningkat, berarti terdapat penurunan beban kuman (Condos dkk., 1997). Suatu kohort penderita yang mengalami defek fungsi reseptor IFN- γ secara genetik, menyebabkan infeksi dengan mikobakteria yang biasanya nonpatogen (Jouanguy dkk., 1996).

Secara bersama, hasil penelitian-penelitian tersebut menunjukkan peran penting IFN- γ pada pertahanan tubuh dan tentunya sitokin ini bekerja terutama sebagai aktivator makrofag. Perbedaan antara efek IFN- γ *in vitro* dengan efek yang diamati, apabila sitokin ini diberikan sebagai obat untuk terapi, menunjukkan betapa kompleksnya jaringan imunologis yang menyangkut pertahanan inang terhadap tuberkulosis. Mungkin juga terdapat beberapa efek IFN- γ yang lain, selain penguatan langsung fungsi hambatan oleh fagosit. Sitokin IFN- γ mungkin juga memperbaiki atau menguatkan penyajian antigen, sehingga menyebabkan limfosit T CD4 direkrut dan atau bersama limfosit T sitotoksik, yang mungkin berpartisipasi dalam pembunuhan mikobakteria (Schluger dan Rom, 1998).

Suatu inaktivator makrofag yang penting dalam pertahanan manusia mungkin adalah TGF- β . Sitokin ini secara luas didistribusi dan diproduksi terutama oleh monosit dan makrofag. Walaupun mempunyai beberapa efek proinflamatori seperti memperbesar kemotaksis monosit dan menguatkan ekspresi reseptor Fc, TGF- β juga mempunyai efek antiinflamatori penting, termasuk menghambat aktivasi produksi makrofag untuk oksigen reaktif dan intermediat nitrogen, menghambat proliferasi sel T, berperan pada fungsi sel *natural killer* (NK) dan limfosit T sitotoksik, serta menurunkan regulasi pelepasan IFN- γ , TNF- α dan IL-1 (Krakauer dkk., 1999).

Beberapa penelitian telah dapat menjelaskan peran penting TGF- β dalam menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* oleh makrofag. Bila TGF- β ditambahkan pada ko-kultur fagosit mononukleus dan *M. tuberculosis*, maka fagositosis dan hambatan pertumbuhan keduanya dihambat dalam pola *dose dependent*. Sitokin TGF- β juga memblok efek TNF- α pada hambatan pertumbuhan. Bahan PPD menginduksi produksi TGF- β oleh monosit pada orang sehat dan meningkatkan produksi TGF- β dalam sel mononukleus darah perifer dan granuloma paru penderita tuberkulosis (Toossi dkk, 1995a; Toossi dkk., 1995b). Pada limfosit T darah penderita tuberkulosis yang dipapar dengan PPD, produksi gama interferon meningkat bersana dengan terdapatnya *tatural inhibitors* dari TGF- β . Nampaknya dapat dipercaya bahwa sedikitnya sebagian dari kemampuan makrofag untuk menghambat pertumbuhan mikobakteria mungkin tergantung pada pengaruh relatif sitokin IFN- γ dan TGF- β pada setiap fokus infeksi.

2.2.5. Molekul efektor toksik

Setelah makrofag diaktivasi, untuk menghambat pertumbuhan mikobakteria terdapat berbagai mekanisme seluler untuk penyelesaian fungsi efektor. Spesies oksigen reaktif seperti anion superoksida dan peroksida hidrogen merupakan komponen penting dalam pertahanan inang terhadap berbagai mikroorganisme, dan penelitian sebelumnya pada makrofag mencit menunjukkan kemungkinan adanya peran untuk intermediat oksigen reaktif (ROI) pada pertahanan inang terhadap mikobakteria (dengan menggunakan *M. microti*, yang merupakan anggota dari kompleks *M. tuberculosis*). Banyak peneliti kemudian menduga kuat bahwa ROI

hanya mempunyai peran yang terbatas. Pada penelitian tersebut, makrofag sumsum tulang mencit diinfeksi dengan *M. bovis* dan kemudian kemampuan makrofag ini diukur dalam hal penghambatan pertumbuhan mikobakteria, dalam keadaan ada atau tidak adanya pembersih (*scavenger*) dari spesies oksigen toksik. Dalam keadaan tanpa sel, yang akan menghambat pertumbuhan mikobakteria adalah peroksida hidrogen, bukan anion superoksida atau radikal hidroksil. Walaupun demikian, penambahan dismutase superoksida atau katalase pada makrofag yang terinfeksi *M. bovis* dan dipapar IFN- γ , tidak mempunyai efek pada pertumbuhan mikobakteria di dalam makrofag, yang berarti bahwa penghambatan terhadap pertumbuhan *M. bovis*, sedikitpun tidak dapat kembali seperti semula (Chan dan Kaufmann, 1994).

Oksida nitrik (NO) berasal dari terminal atom guanidino-nitrogen L-arginin. Reaksi ini dikatalisir oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), yang akan membentuk L-sitrulin dan NO*. Molekul NO* dapat bekerja sebagai bahan yang mengoksidasi atau berinteraksi dengan O_2^- untuk membentuk peroksinitrit yang tidak stabil. Molekul ini kemudian diubah menjadi anion yang lebih stabil, yaitu NO_2^- dan NO_3^- , atau dipecah menjadi NO*. Molekul NO* dan $ONOO^-$ merupakan bahan antimikroba yang sangat reaktif. Molekul NO* dapat berubah menjadi nitrosotiol yang mempunyai aktivitas antimikroba yang sangat poten. Sebaliknya, NO_2^- dan NO_3^- merupakan senyawa tanpa efek pada mikroorganisme.

Produksi NO* tergantung pada NADPH dan membutuhkan tetrahidrobiopterin sebagai kofaktor. Senyawa tiga isoensim NOS yang berbeda telah diketahui. Dua jenis NOSs (eNOSs) terdapat pada berbagai sel inang dan dipergunakan untuk sintesa basal NO, sedangkan iNOS terutama terdapat di fagosit profesional dan ber-

tanggung jawab terhadap pembunuhan kuman. Induksinya dikontrol oleh rangsangan dari luar seperti IFN- γ . Rangsangan terhadap iNOS menghasilkan suatu letupan dengan kadar RNI yang tinggi, yang dibutuhkan untuk membunuh kuman. Kadar NO yang rendah, sebagai hasil eNOS, diperlukan untuk fungsi fisiologis. Senyawa RNIs menghasilkan aktivitas bakterisidal dengan menginaktivasi langsung enzim yang mengandung besi-sulfur, nitrosilasi S pada protein, merusak DNA atau melakukan sinergisme dengan ROI (Kaufmann, 1999).

Ikatan kuman pada CR1/CR3 tidak menginduksi letupan respiratoris dan produksi ROI, sehingga CR merupakan jalan masuk kuman yang kurang patogen. Suatu kompleks polisakarida yang berhubungan dengan dinding sel *M. tuberculosis*, yaitu lipoarabinomanan (LAM), yang diproduksi dalam jumlah banyak (15mg/g kuman), dapat meniadakan mekanisme radikal oksigen. Mekanisme kerja LAM adalah, 1) merupakan pembersih ROI yang efektif, dan 2) LAM dapat menghambat aktivitas protein kinase C sehingga menghalangi aktivasi letupan respiratoris; mekanisme ini juga dapat mengganggu aktivitas iNOS. Banyak kuman intraseluler memproduksi dismutase superoksida dan katalase, yang dapat mendetoksifikasi radikal oksigen dan hidrogen peroksida. Molekul ROI dan iNOS juga mempengaruhi molekul inang, sehingga bila produksinya berlebihan akan membahayakan inangnya juga (Chan dan Kaufmann, 1994).

Proteksi terhadap ROI oleh mikobakteria juga dapat dicapai oleh berbagai komponen atau produk bakteri, termasuk efek detoksifikasi oleh spesies oksigen yang toksik. Sulfanida dapat mensupresi produksi spesies oksigen toksik dalam sistem *in vitro* (Kaufmann, 1999).

2.2.6. Pembentukan granuloma

Granuloma merupakan suatu fokus proteksi antibakteria yang menjadi tempat pertemuan kuman intraseluler dengan pertahanan inang. Gagalnya pembentukan granuloma atau pecahnya suatu granuloma yang sudah terbentuk, umumnya mengakibatkan timbulnya eksaserbasi penyakitnya, dengan konsekuensi fatal. Pada saat yang sama, granuloma yang tumbuh, mengganggu fungsi fisiologis jaringan sehingga menjadikannya sebagai pusat patogenesis penyakit. Granuloma yang ideal seharusnya, mempunyai struktur yang kuat dan merupakan suatu lesi yang terorganisir, terdiri dari limfosit T dari berbagai fenotipe, dan mononukleus fagosit (MP) pada berbagai tingkatan maturasi dan diferensiasi. Struktur granuloma juga termasuk sel datia dengan banyak inti, sel epiteloid, monosit yang baru bermigrasi, dan MP yang matur, dengan sel T CD4 yang tersebar diantaranya. Semua struktur tersebut dikelilingi oleh suatu bungkusan yang terdiri dari limfosit T CD8. Kuman terletak di dalam granuloma. Sel di dalam granuloma yang mengalami kematian mengalami nekrosis, dan akan mengakibatkan terjadinya pengejutan, tetapi pusat di tengahnya masih solid. Akhirnya lesi tertungkus oleh jaringan fibrosis dan terjadi kalsifikasi.

Fase awal pembentukan granuloma, dimulai dengan terjadinya ekstrasvasasi granulosit polimorfonukleus (PNG) dan berikutnya monosit yang diinduksi oleh sinyal proinflamasi yang diakibatkan oleh komponen bakteri, komponen komplemen dan sitokin. Sel MP yang terinfeksi kuman menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi, seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α , berbagai macam kemokin, yang merangsang sel endotel lokal dan fagosit darah. Proses inflamasi di dalam jaringan paru, terus berlanjut dengan melibatkan substansi P, suatu neuropeptida yang dihasilkan oleh

sel neuron sensoris, dan makrofag *migration inhibitory factor* (MIF). Sel endotel di sekitar lesi mengalami inflamasi, mengekspresikan molekul adhesi dalam jumlah banyak. Ekstravasasi yang terjadi diperantarai oleh interaksi antara lekosit dan sel endotel melalui berbagai macam molekul adhesi, seperti macam-macam selektin, integrin, dan superfamili imunoglobulin. Reaksi inflamasi yang terjadi menyebabkan sel respons imun dapat bermigrasi ke tempat infeksi, dengan menggelinding, kemudian melekat pada sel endotel dan bertransmigrasi keluar melalui dinding pembuluh darah. Fagosit juga mengeluarkan enzim proteolitik untuk membunuh kuman, yang juga dapat menimbulkan kerusakan jaringan inang. Sel limfosit T selama proses inflamasi menjadi aktif dan berinteraksi dengan MP, melalui pelepasan berbagai sitokin, antara lain TNF dan IFN- γ .

Beberapa kemungkinan dapat terjadi pada granuloma tuberkulosis, antara lain, pertama terjadi balans yang labil antara kuman yang persisten dengan sistim imun proteksi lokal, yang berhasil membuat keadaan imun yang kekal tanpa terjadinya penyakit. Lebih dari 90% orang yang terinfeksi dengan *M. tuberculosis*, infeksiya tertahan pada tingkat ini. Kedua, jarang terjadi adanya granuloma yang berhasil menenyapkan kuman patogen dan kemudian granulomanya menghilang. Pada keadaan respons imun yang kuat, terjadi reaksi nekrotik, dan dapat terjadi kerusakan jaringan. Sekresi sitokin fibrogenik yang banyak, termasuk TNF dan TGF menyebabkan terjadinya fibrosis paru. Kuman masih sering tetap berada di dalam jaringan nekrotik. Apabila mekanisme destruksi berlanjut, granuloma menjadi eksudatif dan mencair. Kuman akan tumbuh terus tak terkendali dan terjadi kerusakan jaringan yang luas. Sitokin TNF yang dihasilkan akan masuk ke sirkulasi

lepromatik mempunyai karakteristik sebagai kelainan kulit yang ekstensif dengan batas tak jelas, yang menginfirasi kulit secara difus. Pada keadaan ini, kuman *M. leprae* mudah ditunjukkan dengan pengecatan pada jaringan kulit yang nampak normal. Sebaliknya lesi tuberkuloid mempunyai batas jelas dan jumlahnya satu atau hanya beberapa pada kulit. Pada lesi tuberkuloid dengan pemeriksaan histologis didapatkan granuloma nonkaseosa dengan kuman yang jumlahnya sedikit atau tidak ada. Lesi lepromatik (yang kurang mampu mengontrol pertumbuhan kuman) ternyata mengandung sel yang mengekspresi gen IL-4, IL-5 dan IL-10, sedangkan lesi tuberkuloid yang resisten, mengandung sel yang mengekspresi gen sitokin IFN- γ dan IL-2. Pola ekspresi gen sitokin pada sel T *helper* nampaknya berhubungan dengan manifestasi klinis penyakit yang berbeda, sehingga paradigma Th1/Th2 nampaknya dapat dipertahankan pada manusia (Schluger dan Rom, 1998).

2.2.7.1. Sel α/β TCR CD4

Profil Th1/Th2 diteliti pada respons proliferasi dan produksi sitokin sel mononukleus darah perifer penderita tuberkulosis dan orang normal dengan reaksi PPD positif, terhadap paparan dengan antigen mikobakteria *in vitro*. Didapatkan bahwa pada penderita tuberkulosis terdapat peningkatan proliferasi sel yang menghasilkan sekresi IL-4 tetapi bukan IFN- γ , sebagai respons terhadap stimulasi dibandingkan dengan sel orang sehat (Surcel dkk., 1994). Penelitian pada 45 penderita tuberkulosis paru dan 16 kontrol PPD positif, mendapatkan bahwa penderita tuberkulosis mempunyai IFN- γ kurang daripada kontrol, sedangkan produksi IL-4 lebih banyak daripada kontrol. Disimpulkan bahwa penderita tuberkulosis

mempunyai respons tipe Th2 dalam darah perifer, sedangkan penderita PPD positif mempunyai respons Th1 (Sanchez dkk., 1994).

Penelitian respons imun seluler pada lokasi penyakit menunjukkan bahwa mungkin sebenarnya terdapat kompartementalisasi dari imun seluler pada penderita tuberkulosis aktif. Pada pemeriksaan darah dan cairan pleura penderita pleuritis tuberkulosa, diukur produksi sitokin dan ekspresi mRNA sitokin supernatan biakan sel mononukleus cairan pleura dan PBMC yang dipapar *in vitro* dengan *M. tuberculosis*. Ekspresi mRNA sitokin IFN- γ dan IL-2 lebih banyak pada sel mononukleus cairan pleura daripada PBMC. Kadar IFN- γ dan IL-2 supernatan yang dihasilkan lebih tinggi secara bermakna daripada yang dihasilkan oleh PBMC. Ekspresi mRNA sitokin IL-4 menurun pada sel mononukleus cairan pleura dibanding dengan PBMC, sedangkan mRNA IL-5 hampir tidak dapat dideteksi. Ekspresi mRNA IL-10 dalam cairan pleura maupun darah, banyaknya adalah kurang lebih sama. Di cairan pleura ekspresi mRNA IL-10 terbukti lebih banyak diproduksi oleh makrofag. Sel PBMC lebih banyak memproduksi IL-10 daripada sel cairan pleura. Sitokin IL-4 dan IL-5 tidak dapat dideteksi dari supernatan sel cairan pleura maupun PBMC. Sel yang mengekspresi mRNA sitokin IFN- γ dalam cairan pleura meningkat 20-60 kali daripada sel dalam darah setelah dipapar dengan *M. tuberculosis*, menunjukkan bahwa sitokin IFN- γ yang meningkat dalam cairan pleura berasal dari sel-sel tersebut. Dapat disimpulkan bahwa terdapat kompartementalisasi sitokin Th1 dan IL-10 di lokasi penyakit tuberkulosis paru dengan respons imun yang menurun. Sitokin IL-10 yang dihasilkan oleh makrofag

dan yang kadarnya meningkat dalam cairan pleura, diduga berfungsi menurunkan regulasi respons imun lokal di cairan pleura (Barnes dkk., 1993b)

Suatu penelitian oleh Zhang dan kawan kawan seperti dikutip oleh Schluger mengenai produksi sitokin pada cairan pleura penderita pleuritis tuberkulosis, didapatkan kadar IL-12 yang tinggi setelah rangsangan sel cairan pleura dengan kuman *M. tuberculosis*. Seperti diketahui bahwa IL-12 menginduksi respons tipe Th1 pada sel CD4⁺ yang belum berdiferensiasi, maka peneliti ini menyimpulkan bahwa terdapat respons Th1 pada lokasi penyakit (Schluger dan Rom, 1998)

Beberapa penelitian telah dilakukan mengenai produksi sitokin pada kelenjar limfa penderita dengan dan tanpa infeksi HIV, yang dibandingkan dengan kontrol orang sehat. Pada penderita didapatkan produksi IFN- γ yang tinggi dan tidak ada sekresi IL-4 oleh limfosit pada kelenjar limfa. Kedua IL-12 dan IL-10 dihasilkan oleh makrofag di dalam kelenjar limfa, tetapi tidak dihasilkan oleh limfosit. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terdapat penguatan respons Th2 pada lokasi penyakit pada penderita tuberkulosis (Lin dkk., 1996). Menurut Szabo, seperti dikutip oleh Schluger dan Rom, respons Th1 dan Th2 mungkin dikontrol oleh reseptor IL-12 subunit beta 2. Sitokin IL-4 menurunkan regulasi ekspresi reseptor IL-12, menyebabkan hilangnya respons IL-12 pada sel T CD4⁺. Sebaliknya, IFN- γ menguatkan ekspresi IL-12R beta 2 dan mencegah respons terhadap Th2. Pada penderita tuberkulosis MDR-TB dengan kontrol orang yang PPD negatif dan PPD positif, dapat ditunjukkan oleh McDyer seperti dikutip Schluger dan Rom, bahwa sel mononukleus perifer penderita MDR-TB yang dipapar dengan *M. tuberculosis*, PPD atau mitogen, mempunyai proliferasi dan sekresi

sitokin IL-12 dan IFN- γ yang kurang dibanding kontrol orang sehat dengan PPD positif atau PPD negatif. Produksi IFN- γ dapat kembali, jika pada PBMC diberi tambahan IL-12 sebelum dipapar, sedangkan pemberian antibodi terhadap IL-12 menyebabkan penurunan lebih lanjut produksi IL-12 pada stimulasi dengan PPD (Schluger dan Rom, 1998).

Pada penderita tuberkulosis yang peka terhadap obat anti-tuberkulosis, sel BAL yang memproduksi sitokin IFN- γ dan IL-12 jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan sel BAL penderita tuberkulosis inaktif (Taha dkk., 1997). Pemicu pelepasan IL-12 nampaknya adalah fagositosis *M. tuberculosis* oleh makrofag yang juga ditunjukkan oleh peneliti lainnya. Pelepasan IL-12 nampaknya merupakan suatu proses awal dan mungkin merupakan suatu respons nonspesifik terhadap fagositosis (Fulton dkk., 1996).

Sitokin IL-12 dilepaskan oleh makrofag *in vitro* setelah terinfeksi *M. tuberculosis* atau setelah fagositosis dengan *latex beads*, tetapi TNF dan IL-12 hanya dilepaskan setelah infeksi dengan mikobakteria (Ladel dkk., 1997).

Penelitian dengan hibridasi *in situ* untuk deteksi ekspresi gen sitokin pada sel BAL 9 penderita tuberkulosis aktif dibandingkan dengan kontrol sehat. Terdapat peningkatan kadar mRNA IFN- γ yang lokasinya terutama pada limfosit T (80% sel yang mengekspresi mRNA IFN- γ adalah limfosit T, sedangkan sisanya adalah makrofag alveolar). Kadar proteinnya (IFN- γ) sebenarnya tidak diperiksa. Juga, dilaporkan pada penelitian tersebut tidak terdapat perbedaan pada ekspresi gen IL-2, IL-4 atau IL-5 (Robinson dkk., 1994).

Penelitian pada kelompok penderita dengan kriteria yang sama, mendapatkan bahwa mayoritas limfosit di dalam paru penderita tuberkulosis adalah sel T aktif yang mengekspresi reseptor α/β , yang ditunjukkan dengan adanya ekspresi CD69 dan HLA-DR (Schwander dkk., 1996). Pada penderita HIV, jumlah absolut dan keadaan aktivasi imun limfosit CD4⁺ mungkin menurun. Penelitian ini menunjukkan bahwa respons imun seluler lokal pada tuberkulosis paru sedikitnya dibangun sebagian oleh CD4⁺ Th1 (Law dkk., 1996a).

Pada penderita tuberkulosis dengan keadaan klinis dan kelainan radiografis yang minimal (tapsan dahak negatif, tanpa kavitasi pada foto toraks), terdapat alveolar limfositosis pada lokasi paru yang sakit dan limfosit ini menghasilkan IFN- γ dengan kadar tinggi. Pada penderita dengan penyakit *far-advanced* atau kavitasi, tidak terdapat limfositosis dengan respons Th1 (Condos dkk., 1998). Pada pemeriksaan darah 16 penderita tuberkulosis paru dan kontrol orang sehat, terdapat depresi terhadap produksi IL-12 dan IFN- γ disertai meningkatnya IL-10 pada penderita tuberkulosis paru aktif dengan paparan antigen mikobakteria 30 atau 32 kDa, yang meningkat setelah pemberian pengobatan antituberkulosis selama dua bulan (Song dkk., 2000).

Interaksi antara CD40 pada *antigen-presenting cells* (APC) dan ligan CD40 (CD40L) pada sel T meningkatkan perkembangan respons Th1 karena menyokong peningkatan produksi IL-12 oleh makrofag dan sel dendritik serta juga meningkatkan ekspresi molekul kostimulator kelompok B7 pada APC. Pada penelitian terhadap 16 penderita tuberkulosis paru aktif dan 13 kontrol orang sehat PPD positif pemberian agonis CD40L meningkatkan produksi IFN- γ oleh PBMC

yang dipapar dengan *M. tuberculosis*, sedangkan penambahan anti-CD40 atau antibodi anti-CD40L menurunkan produksinya. Ekspresi CD40L pada PHMC menurun dengan paparan terhadap sel B dan terhadap faktor terlarut dari monosit yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis*. Diduga bahwa disregulasi CD40L ikut berperan pada produksi IFN- γ manusia (Samten dkk., 2000).

Selain aktivasi makrofag oleh sitokin yang disekresi, terdapat bukti bahwa limfosit dapat membunuh mikobakteria langsung melalui aktivitas limfosit T sitotoksik (CTL). Klon sel T $CD4^+$ darah manusia mempunyai kemampuan sitotoksik yang lebih besar terhadap monosit yang dipapar dengan PPD, dibanding terhadap monosit yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* yang hidup (Boom dkk., 1991). Menurut Tan, seperti dikutip Schluger dan Rom, limfosit paru normal mempunyai kemampuan lebih besar untuk melakukan lisis terhadap monosit perifer, dibanding terhadap makrofag alveolar yang dipapar dengan antigen mikobakteria. Ekspansi sel CTL hanya melalui MHC kelas II apabila diaktifkan oleh PPD, sedangkan apabila diekspansi dengan PPD dan IL-2, maka kedua CTL kelas I dan II akan mengalami ekspansi. Walaupun pendapat umum menyatakan bahwa $CD4^+$ merupakan komponen terpenting pada imunitas seluler penyakit tuberkulosis, penelitian ini juga menunjukkan kemampuan $CD8^+$ yang berarti melakukan fungsinya sebagai CTL juga. Percobaan ini menunjukkan peran langsung CTL pada mekanisme pertahanan tubuh terhadap tuberkulosis yang melengkapi peranannya sebagai stimulator dan fungsi makrofag (Schluger dan Rom, 1998).

2.2.7.2. Sel α/β TCR CD8

Sel α/β TCR CD8 ini berpartisipasi langsung pada lisis sel yang terinfeksi dan menginduksi apoptosis sel sasaran. Flynn dan kawan-kawan menunjukkan pentingnya proses tersebut pada $\beta 2$ -mikroglobulin *knockout mice* yang tidak dapat mengekspresikan molekul MHC Kelas I, sehingga menjadi sangat peka terhadap infeksi dengan mikobakteria (Flynn, 2000).

Limfosit cairan pleura penderita pleuritis tuberkulosis yang anergik memberi respons proliferasi terhadap PPD, sedangkan limfosit dalam darah tidak memberi respons. Sel T cairan pleura yang berproliferasi mengandung populasi CD4⁺ dan CD8⁺, sehingga diduga bahwa fase anergik pada tuberkulosis pleuritis mungkin berasosiasi dengan sekuestrasi sel CD4⁺ dan CD8⁺ di dalam rongga pleura (Rossi dkk., 1987).

Laporan oleh Bose dan kawan-kawan, seperti dikutip oleh Schluger dan Rom, mendapatkan bahwa rasio CD4/CD8 dalam darah mengalami depresi pada penderita yang penyakitnya baru didiagnosa atau pada penderita kronis yang tidak memberi respons, tetapi rasio tersebut menjadi normal apabila penderita memberi respons baik pada pengobatan (Schluger dan Rom, 1998).

Dari hasil pengamatan tersebut, beberapa kelompok peneliti berusaha untuk mengetahui peran sel CD8⁺ dalam darah dan di jaringan paru pada penderita tuberkulosis paru, walaupun masih terdapat konflik dari data yang diperoleh.

Faith dan kawan-kawan serta Nowakowski dan kawan-kawan, seperti dikutip oleh Schluger dan Rom, mendapatkan penurunan rasio CD4/CD8 di

dalam sel BAL penderit tuberkulosis paru, sedangkan rasionya di darah perifer tidak begitu mengalami depresi. Menurunnya rasio ini diduga akibat berkurangnya sel CD4+ dibandingkan dengan proliferasi sel CD8+ (Schluger dan Rom, 1998)

Pada pemeriksaan sel BAL 40 penderita tuberkulosis paru dengan kontrol orang sehat, ditemukan bahwa penderita tuberkulosis mempunyai rasio CD4+/CD8 yang normal. Meskipun demikian, pada penelitian ini tidak diadakan pengelompokan berdasarkan keadaan klinis dan gambaran radiologis (Hoheneset dkk., 1994)

Dilakukan penelitian tentang populasi CD4 dan CD8 dalam cairan BAL dan pada penderita penyakit tuberkulosis paru selama pengobatan, yaitu yang perjalanan penyakitnya cepat, lambat atau sedang. Pada keadaan yang regresnya lambat terdapat peningkatan sel CD8+ dalam BAL. (Yu dkk., 1995)

Di dalam BAL penderita tuberkulosis aktif didapatkan peningkatan sel CD8+, bersama dengan meningkatnya secara mencolok jumlah sel BAL yang mengekspresi mRNA IFN- γ dan mRNA IL-12 (Taha dkk., 1997)

Sel T CD8+ dapat ditunjukkan mampu untuk melisis makrofag yang terinfeksi mikobakteria dengan mekanisme *Fas-independent granule-dependent* yang menghasilkan matinya kuman. Sel T ini adalah *CD1-restricted* dan mempunyai kemampuan untuk mengenali antigen lipid dan lipoglikan *M. tuberculosis*, mereka membunuh dengan eksositosis perforin gransin A (Schluger dan Rom, 1998). Pada penelitian dengan mencit, separuh sel T CD4+CD8+ dan 64% sel T CD4+CD8- mempunyai fungsi sebagai sitotoksik. Kemampuan sitotoksitas ini berhubungan dengan ekspresi CD44 yang tinggi

dan produksi interferon gama. Kebanyakan klon sitotoksik CD4⁺ CD8⁺ (86%) melakukan lisis pada sel target melalui jalur Fas-FasL, sedangkan kebanyakan klon sitotoksik CD4⁺ CD8⁺ (83%) melakukan lisis melalui sitotoksik granul. Hanya klon yang menggunakan jalur granul dapat menyebabkan banyak kematian pada *M. tuberculosis* yang virulen selama lisis makrofag yang terinfeksi (Silva dan Lowrie, 2000).

Sel T CD8⁺ dapat berfungsi sebagai sitotoksik terhadap sel target dan menghasilkan sitokin. Sel T CD4⁺ maupun CD8⁺ dapat menghasilkan IFN- γ , tetapi jelas dari percobaan pada hewan mencit, tidak satupun subset sel T tersebut dapat secara adekuat mengkompensasi satu dengan lainnya dalam proteksi terhadap tuberkulosis. Kinetik atau perbedaan tempat spesifik dalam hal produksi sitokin, mungkin yang menyebabkan kebutuhan timbal-balik pada keduanya untuk mengontrol penyakit. Sitokin IFN- γ mutlak diperlukan untuk mengontrol infeksi tuberkulosis tetapi sel T yang memproduksi IFN- γ dapat diisolasi dari kebanyakan individu yang terinfeksi, menandakan bahwa mekanisme ini tidak memadai untuk mengeliminasi infeksi. Hambatan respon makrofag terhadap IFN- γ , merupakan suatu mekanisme kuman untuk mencegah supaya tidak dieliminasi. Adanya mekanisme imuno-evasi tersebut, ditunjang dengan adanya penelitian oleh Ting dan kawan-kawan (1999), bahwa infeksi *M. tuberculosis* pada makrofag menghambat sebagian respons transkripsi pada IFN- γ oleh karena hilangnya interaksi antara faktor transkripsi NF- κ B dengan koaktivator transkripsi CBP dan p300. Mekanismenya masih belum jelas, kemungkinan termasuk sekuestrasi langsung NF- κ B atau CBP/p300 oleh bakteri atau kompetisi untuk jumlah

terbatas dari CBP/p300 oleh faktor transkripsi lainnya (misalnya diaktifkan oleh TLR). Apabila adanya hambatan pada respons terhadap IFN- γ mengurangi efisiensinya terhadap tuberkulosis, maka dibutuhkan vaksin yang efektif untuk mengatasi fenomena ini atau mem-hypox-nya dengan menguatkan mekanisme efektor yang lain.

Peran aktivitas sitolitik sel T CD8⁺ dapat membantu proteksi melalui dua cara. Pertama adalah lisis makrofag yang tidak mampu diaktifkan untuk membunuh *M. tuberculosis* intraseluler, sehingga mikobakteria dapat keluar dan dimakan oleh makrofag yang aktif. Kedua, sel T CD8⁺ juga dapat langsung membunuh kuman intraseluler dan membantu proteksi dengan cara ini. Sel T CD8⁺ *CD1-restricted*, terutama yang mengadakan lisis pada makrofag yang terinfeksi kuman dengan mekanisme yang tergantung pada perforin, dapat membunuh kuman melalui protein granul sel T sitolitik, granulin (Flynn, 2006). Protein ini mempunyai hubungan dengan protein antimikroba dan dapat membunuh *M. tuberculosis in vitro*. Perforin, suatu protein granul yang membuat lubang dalam membran plasma sel sasaran, mutlak diperlukan untuk menjadi perantara pada lisis makrofag dan mekanisme *granulysin-dependent*, untuk membunuh kuman. Fagosome yang mengandung mikobakteria hidup mempunyai lubang yang cukup untuk lewatnya molekul besar, granulin yang dihantar ke sitoplasma mungkin mempunyai akses pada fagosome *M. tuberculosis*. Aktivitas limfosit T sitotoksik pada infeksi tuberkulosis, ekspresi perforin pada sel T CD8⁺ dalam paru mencit yang terinfeksi dapat dideteksi dengan pewarnaan intraseluler imunohistokimia (Flynn, 2006).

2.2.7.3. Sel T γ/δ

Peranan sel T γ/δ dalam respons terhadap tuberkulosis belum diketahui jelas. Sel ini berupa limfosit granular besar yang mengalami pengawasan menjadi dendrit dalam jaringan limfoid, yang jumlahnya dalam darah adalah kurang dari 10% limfosit T (Kaufmann, 1999). Sel T γ/δ mengekspresikan reseptor TCR-1, yang berbeda dengan sel T α/β (yang kebanyakan adalah sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺). Pada umumnya, sel T γ/δ diperkirakan berupa *non-MHC-restricted* dan berfungsi sebagai sel T sitotoksik. Molekul CDI dapat ditunjukkan menyajikan antigen *M. tuberculosis* oleh sel T CD4 dan CD8, yang mengekspresi reseptor TCR-1 atau TCR-2 (Kaufmann, 1999).

Percobaan pada hewan mencit dan spesies lainnya menurut North dan kawan-kawan, dan Izzo dan kawan-kawan, seperti dikutip oleh Schluger dan Rom, menunjukkan bahwa sel γ/δ memainkan peranan yang berarti pada respons inang terhadap tuberkulosis. Pada mencit dengan keadaan imunodefisiensi yang sangat berat dan yang tidak membentuk granuloma, akan cepat mati setelah infeksi dengan BCG, tetapi dapat hidup apabila dilakukan juga *graft* dengan sel kelenjar limfe ko-isogenik tanpa sel CD4⁺ dan CD8⁺. Diperkirakan bahwa sel T γ/δ yang berperan pada respons tersebut. Pada mencit imunokompeten, sel T γ/δ jumlahnya meningkat pada kelenjar limfe yang mengalir lokasi inokulasi tuberkulosis primer (Schluger dan Rom, 1998).

Sel T γ/δ yang reaktif terhadap *M. tuberculosis* dapat ditemukan dalam darah perifer orang sehat PPD positif, dan sel tersebut bersifat sitotoksik terhadap

monosit yang dipapar dengan antigen mikobakteria dan mensekresi sitokin yang mungkin berperan dalam pembentukan granuloma (Munk dkk., 1990).

Barnes dan kawan-kawan seperti dikutip oleh Schluger dan Rom, menunjukkan bahwa sel T $\gamma\delta$ relatif lebih banyak didapatkan (25-30% dari jumlah total) pada sel T limfosit di darah perifer penderita yang respons imunisasinya protektif (penderita PPD positif atau tuberkulosis pleuritis) dibandingkan dengan sel mononukleus darah perifer penderita yang respons imunitasnya inepektif (tuberkulosis paru lanjut atau pada tuberkulosis miliaris), yang hanya didapatkan sebanyak 2-9% dari jumlah totalnya (Schluger dan Rom, 1998). Penelitian dilakukan pada orang sehat yang kontak dengan penderita tuberkulosis dan dibandingkan dengan orang sehat yang belum pernah kontak. Kontrol orang sehat dengan PPD positif yang sering kontak dengan kasus aktif, mempunyai sel T $\gamma\delta$ dalam darah perifer yang lebih banyak daripada mereka yang tanpa kontak konstan dengan kasus aktif. Pada penderita tuberkulosis aktif juga tidak didapatkan peningkatan sel T $\gamma\delta$ sebagai persentasi total sel limfosit T darah perifer. Kemungkinan hal ini karena terjadi sekuesisasi sel T $\gamma\delta$ di jaringan patologis, seperti pada tuberkulosis kelenjar dan pada lesi penderita lepra. Kemungkinan lainnya adalah bahwa sel T $\gamma\delta$ di darah berada dalam keadaan toleran terhadap tuberkulosis akibat adanya antigen mikobakteri yang terdapat dalam jumlah besar, termasuk *self-stress protein* inang (Ueta dkk., 1994). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang menunjukkan tidak adanya peningkatan sel T $\gamma\delta$ dalam darah perifer kelompok penderita tuberkulosis aktif dibandingkan dengan kontrol normal PPD negatif (Lazri dkk., 1992).

2.2.8. Apoptosis pada tuberkulosis paru

Apoptosis berasal dari kata Yunani yang berarti gugurnya dedaunan. Apoptosis merupakan kematian sel melalui perubahan morfologis dan tahapan biokimiawi yang terprogram secara genetik (Hrgovic dkk., 2000)

Suatu mekanisme pertahanan tubuh yang penting untuk pertumbuhan dan pertahanan hidupnya kuman adalah apoptosis pada makrofag inang. Setelah terjadi fagositosis mikobakteria oleh makrofag alveolar, TNF- α yang dilepaskan oleh makrofag akan menyebabkan aktivasi sintase NO dan produksi NO. Makrofag yang mempunyai alel *Nramp-1-resistant* memproduksi lebih banyak NO pada paparan terhadap *M. tuberculosis*, dan lebih peka terhadap apoptosis daripada makrofag yang tidak mempunyai gen tersebut. Gen *Nramp-1* dikenal sebagai determinan inang yang penting dalam resistensi terhadap *M. tuberculosis*.

Penutupan LAM dengan manose merupakan faktor virulen mikobakteria yang menghambat apoptosis makrofag walaupun terdapat faktor proapoptotik seperti tingginya kadar NO. Molekul FasL menyebabkan apoptosis makrofag yang mengekspresi Fas pada permukaannya. Infeksi pada makrofag manusia dengan *M. tuberculosis* menyebabkan terjadinya apoptosis yang diperantarai oleh Fas-FasL, akan sangat mengurangi kehidupan *M. tuberculosis*. Jadi ekspresi Fas pada permukaan makrofag merupakan suatu determinan yang penting dalam hal kepekaan makrofag alveolar terhadap apoptosis oleh *M. tuberculosis* (Behnia dkk., 2004).

Pada percobaan dengan sel T CD4+ mencit BALB/c (galur peka) dan C3H/HeJ (galur resisten) yang diinfeksi dengan *M. tuberculosis* (galur H37Rv) dan

dipapar dengan forbol miristat asetat (PMA), terdapat supresi CMI pada mencit galur peka yang diinfeksi, berupa proliferasi yang inisiasi terutama pada minggu ketiga setelah infeksi, sedangkan pada mencit galur resisten yang diinfeksi, proliferasinya baik. Menurunnya respons tersebut karena sejumlah besar sel T mencit galur peka mengalami apoptosis, sehingga diduga bahwa sel T CD4⁺ pada mencit galur peka tidak dapat bertahan hidup setelah paparan antigen. Untuk mengetahui mekanisme defeknya sel T tersebut, diperiksa ekspresi Bcl-2 (yang merupakan protein kehidupan) dan Fas. Ternyata sel T CD4⁺ mencit galur peka yang diinfeksi, kurang mengekspresi Bcl-2 daripada mencit yang tidak diinfeksi dan juga terdapat ekspresi Fas yang lebih besar. Karena ekspresi Bcl-2 yang kurang dan ekspresi Fas yang meningkat, diduga sel T CD4⁺ mengalami apoptosis (Das dkk . 1999)

Terdapat ketidaksamaan pada kematian sel Th1 dan Th2, yaitu Th1 yang lebih cepat mengalami apoptosis yang dimediasi oleh Fas/FasL setelah stimulasi ulang dengan antigen. Ketidaksamaan apoptosis juga terjadi pada keadaan tanpa stimulasi ulang setelah suatu periode *lag* yang lebih panjang, yang diinduksi jalur non-Fas. Apabila sel-sel Th1 dan Th2 dibiakkan bersama, ternyata Th2 lebih tahan hidup, sehingga diduga terdapat faktor intrinsik yang berperan. Sel-sel Th1 dan Th2 mengekspresi Fas dan FasL, tetapi hanya Th2 yang mengekspresi *Fas-associated phosphatase* (FAP-1) dengan kadar tinggi, yang mungkin berfungsi menghambat sinyal untuk Fas (Varadhachary dkk . 1997, Zhang dkk . 1997)

Profil sitokin mencit galur peka yang diinfeksi, mengalami penurunan sitokin IL-2 dan IFN- γ daripada mencit yang tidak diinfeksi. Tidak didapatkan

perubahan pada sekresi IL-4 oleh sel Th mencit galur peka yang diinfeksi. Diduga bahwa sel T 'CD4' yang mengalami apoptosis adalah sel Th1. Sebaliknya sel T 'CD4' mencit galur resisten, menunjukkan profil sitokin IL-2 yang lebih rendah pada mencit yang diinfeksi daripada yang tidak diinfeksi, tetapi hal tersebut tidak terjadi pada IL-4 dan IFN- γ . Sebenarnya, kedua sitokin tersebut tidak menunjukkan variasi pada galur resisten yang diinfeksi. Hal ini menunjukkan adanya perubahan perbandingan profil sitokin pada infeksi *M. tuberculosis* mencit galur peka dan mencit galur resisten, dan diduga pada mencit galur peka sel Th1 mengalami apoptosis, sedangkan regulasi IL-2 yang menurun selektif hanya terdapat pada mencit galur resisten (Das dkk., 1999).

Beberapa mekanisme apoptosis sel T telah dikemukakan. Hilangnya faktor pertumbuhan seperti IL-2, sitoksisitas oleh TNF- α dan interaksi CD95-95L, adalah beberapa mediator utama untuk terjadinya apoptosis. Hilangnya IL-2 diketahui dapat menyebabkan apoptosis pada sel T, sehingga rendahnya IL-2 pada supernatan biakan sel T mencit galur peka, diperkirakan dapat menyebabkan kematian pada sel Th1. Walaupun terdapat IL-2, sel T dapat mengalami apoptosis, sehingga nampaknya kadar IL-2 yang rendah tersebut disebabkan oleh apoptosis sel Th1. Sitokin TNF- α sampai saat ini diketahui dapat menyebabkan apoptosis sel T 'CD8', sedangkan sel T 'CD4' tetap utuh. Interaksi CD95-95L telah diketahui tidak spesifik untuk Th1. Adanya perbedaan subset Th dalam menginduksi Bcl-2 atau Bcl-X_L, masih dalam penelitian (Das dkk., 1999).

2.2.9. Faktor genetik pada tuberkulosis paru

Menurut Kaufmann, 1999 terdapat tiga tingkatan pada hubungan inang-parogen sebagai target potensial untuk faktor kontrol genetik inang

1. Faktor genetik menentukan apakah infeksi menjadi abortif, atau menetap menjadi penyakit yang stabil. Bukti yang meyakinkan untuk kontrol faktor genetik pada tingkat ini belum ada.
2. Faktor genetik mengontrol transisi dari infeksi menjadi penyakit. Langkah kontrol ini memisahkan individu yang peka dan yang resisten.
3. Faktor genetik mengontrol berat-ringan atau bentuknya penyakit. Pada penyakit lepra umumnya diterima bahwa MHC kelas II mengkode faktor yang mempengaruhi perjalanan penyakit menjadi kutub tuberkuloid atau lepromatik, yang mungkin disebabkan karena adanya balans Th1/Th2 yang terganggu.

Adanya gen yang menentukan resistensi terhadap tuberkulosis telah diduga sejak lama. Usaha untuk menemukan rantai antara kepekaan untuk terjadinya tuberkulosis dengan gen HLA kelas I (HLA-A dan B) tidak berhasil. Penelitian pada gen kelas II (HLA-D) telah dapat menunjukkan, bahwa gen HLA-DR2 nampaknya merupakan predisposisi untuk perkembangan tuberkulosis paru, terutama stadium lanjut dengan gambaran radiologis kelainan parenkim paru yang lanjut dengan dahak positif. Spesifisitas HLA-DR2 dapat mempengaruhi pengenalan antigen, karena seseorang dengan genotipe ini mempunyai kadar antibodi yang lebih tinggi terhadap epitop pada protein 38-kDa daripada mereka yang tidak mempunyai genotipe ini. Gen kelas II juga mempengaruhi reaktivitas uji kulit terhadap tuberkulin. Jadi pada uji kulit dengan berbagai sensitin mikobakteria menunjukkan

bahwa orang yang tidak mempunyai gen HLA-DR3 memberi respons yang kurang terhadap semua sensitin, sedangkan mereka yang mempunyai fenotipe HLA-DR4 memberi respon yang relatif kuat terhadap antigen spesifik-spesies *M. tuberculosis* (Grange, 1998)

Pada penelitian mencit *inbred strain* telah dapat diidentifikasi adanya gen tunggal dominan yang mengendalikan resistensi alamiah terhadap infeksi dengan kuman patogen intraseluler, yaitu *Bcg* (dikenal juga sebagai *Lsh Ity*). Terdapat dua fenotipe yang berbeda yaitu *Bcg*⁺ yang peka dan *Bcg*⁻ yang resisten terhadap stadium awal infeksi dengan *M. bovis*, *M. avium complex* dan kuman intraseluler lainnya. Suatu gen yang berhasil diisolasi yang disebut gen *natural-resistance-associated macrophage protein 1* (Nramp 1), diekspresi hanya pada sel retikuloendotel. Homologi gen Nramp 1 pada manusia disebut NRAMP 1, merupakan gen yang kuat untuk tuberkulosis manusia. Gen NRAMP 1 telah berhasil diklon dan dipetakan pada kromosom 2q35 manusia.

Protein ini nampaknya diperlukan untuk transportasi nitrik dari kompartemen intraseluler seperti sitosol ke lingkungan yang lebih asam seperti fagolisosom yang dapat mengubahnya menjadi NO. Gangguan pada produksi atau fungsi NRAMP diperkirakan dapat menjurus pada berkurangnya produksi oksida nitrik dan meningkatnya kepekaan terhadap patogen intraseluler seperti mikobakteria. Secara potensial, hasil-hasil penelitian pada gen NRAMP dapat menjelaskan sebagian perbedaan kepekaan terhadap infeksi tuberkulosis pada populasi manusia tertentu, seperti di Eskimo dan orang Amerika Afrika (Stead, 1992).

Pada gen NRAMP 1 ditemukan adanya empat polimorfisme di antara 410 penderita tuberkulosis paru dahak positif di negara Gambia, Afrika Barat. Masing-masing polimorfisme tersebut berasosiasi secara bermakna dengan tuberkulosis. Salah satunya adalah varian 3'UTR yang sangat jarang terdapat pada bangsa Eropa, tetapi terdapat pada seperempat populasi Afrika Barat. Hal ini mungkin dapat sebagian menerangkan, mengapa masyarakat kulit hitam di Amerika lebih peka terhadap tuberkulosis daripada masyarakat kulit putih (Bellamy dkk., 1995b).

Suatu gen *interferon- γ receptor 1* (IFN- γ R1) yang mengalami mutasi, berperan pada infeksi dengan mikobakteri, ditemukan pada empat anak di suatu dusun di Malta yang mengalami infeksi berat (*M. fortuitum*, *M. avium* dan *M. chelonae*). Mutasi ini menyebabkan IFN- γ R1 tidak akan diekspresikan pada permukaan sel (Newport dkk., 1996). Suatu kelainan mutasi lain pada reseptor IFN- γ 1 (IFN- γ R1) sehingga tidak terekspresi, terjadi pada seorang anak bangsa Tunisia yang mendapat imunisasi dengan *Bacille Calmette-Guérin* (BCG). Kelainan tersebut menyebabkan terjadinya infeksi hebat karena BCG menginduksi manifestasi klinis berupa kegagalan multiorgan dan kematian (Jouanguy dkk., 1996).

2.3. Lavas Bronkus

2.3.1. Cairan lavas bronkus

Dengan disempurnakannya bronkoskop serat optik (BSO) pada pertengahan tahun enam puluhan dan disusul kemudian dengan laporan Ikeda dan kawan-kawan, tentang penggunaannya yang dapat menjangkau cabang bronkus yang lebih dalam, diagnosis dan pengobatan penyakit di bidang paru mengalami

kemajuan pesat. Teknik penggunaan BSO tersebut kemudian disesuaikan untuk mengambil bahan dari saluran nafas bawah, yang disebut lavas bronkus (BAL) (Reynolds, 1995). Sejak saat itu, penggunaan BSO dan lavas bronkus mengalami kemajuan pesat karena dapat membantu memberi keterangan tentang bahan-bahan seluler seperti netrofil, eosinofil, makrofag, limfosit beserta subsetnya maupun bahan nonseluler seperti imunoglobulin, komplemen, enzim, produk sekresi makrofag di dalam saluran nafas distal dan alveoli (Reynolds, 1995). Inflamasi di dinding alveoli dan paren-kim paru mungkin dicerminkan oleh akumulasi sel di intra alveoli dan kebocoran akibat kerusakan sel-sel endotel kapiler serta membran basalis ke dalam cairan alveoli. Bahan lavas bronkus ruang alveoli mungkin dapat melacak perubahan ini (American Thoracic Society, 1990, The BAL Cooperative Group Steering Committee, 1990).

Menurut Pabst (1990a), limfosit di paru dapat dikelompokkan dalam 4 kelompok atau kompartemen yang satu sama lainnya saling berhubungan

1. *Intravascular pulmonary pool.*

Intravascular pulmonary pool merupakan kelompok yang spesifik karena limfosit yang berada di dalamnya berbeda dengan limfosit yang berada dalam sirkulasi sistemik. Mungkin peranannya penting dalam pengenalan antigen dan juga mungkin berfungsi sebagai depot untuk meningkatkan limfosit di sirkulasi sistemik.

2. *Interstitial pulmonary pool.*

Interstitial pulmonary pool merupakan limfosit jaringan interstisial paru. Limfosit manusia pada kelompok ini banyaknya sekitar $15-48 \times 10^6/g$ dengan sel

T 40% dan sel B 10%. Limfosit paru terdiri dari banyak sel yang lebih besar daripada limfosit dalam darah. Petanda limfositnya tidak menunjukkan banyak perbedaan.

3 Ruang alveoli.

Sel yang terdapat di ruang alveoli dapat diperoleh dengan melakukan lavas bronkus, banyaknya sekitar 70×10^6 sel. Limfosit di bronkoalveoli jumlahnya kurang lebih 10% dari limfosit di kelompok interstisial. Sel bronkoalveolar orang normal tidak merokok terdiri dari makrofag 80-85%, limfosit 10-15% dan netrofil serta eosinofil sekitar 3%. Limfosit yang terbanyak ialah sel T sekitar 60% dan sel B 10% dengan rasio CD4/CD8 sekitar 1,5-1,8 (Reynolds, 1995). Limfosit lainnya sekitar 40%, yaitu *null cells* dan mungkin *natural killer cells* (sel NK) (Berman dkk., 1990). Pada penderita dengan sarkoidosis (Hunninghake dkk., 1981; Paradis dkk., 1986a), pneumonitis hipersensitif (Semenzato dkk., 1985) dan fibrosis paru idiopatik (Paradis dkk., 1986b), hitung jenis sel lavas bronkus menunjukkan hasil yang mewakili hasil biopsi jaringan paru, walaupun pada beberapa penyakit masih kontroversial. Beberapa bukti menunjukkan bahwa limfosit bronkoalveoli dapat berasal dari limpa dan sirkulasi sistemik. Mungkin limfosit di bronkoalveoli terdiri dari limfosit yang cepat dan yang lambat pergantiannya. Masuknya limfosit ke dalam ruang alveoli dapat dipengaruhi oleh inflamasi akibat bahan alergen, bahan yang bersifat patogen maupun nonspesifik di saluran nafas, walaupun tidak diketahui apakah terdapat sitokin ataupun faktor lainnya yang mempengaruhi limfosit

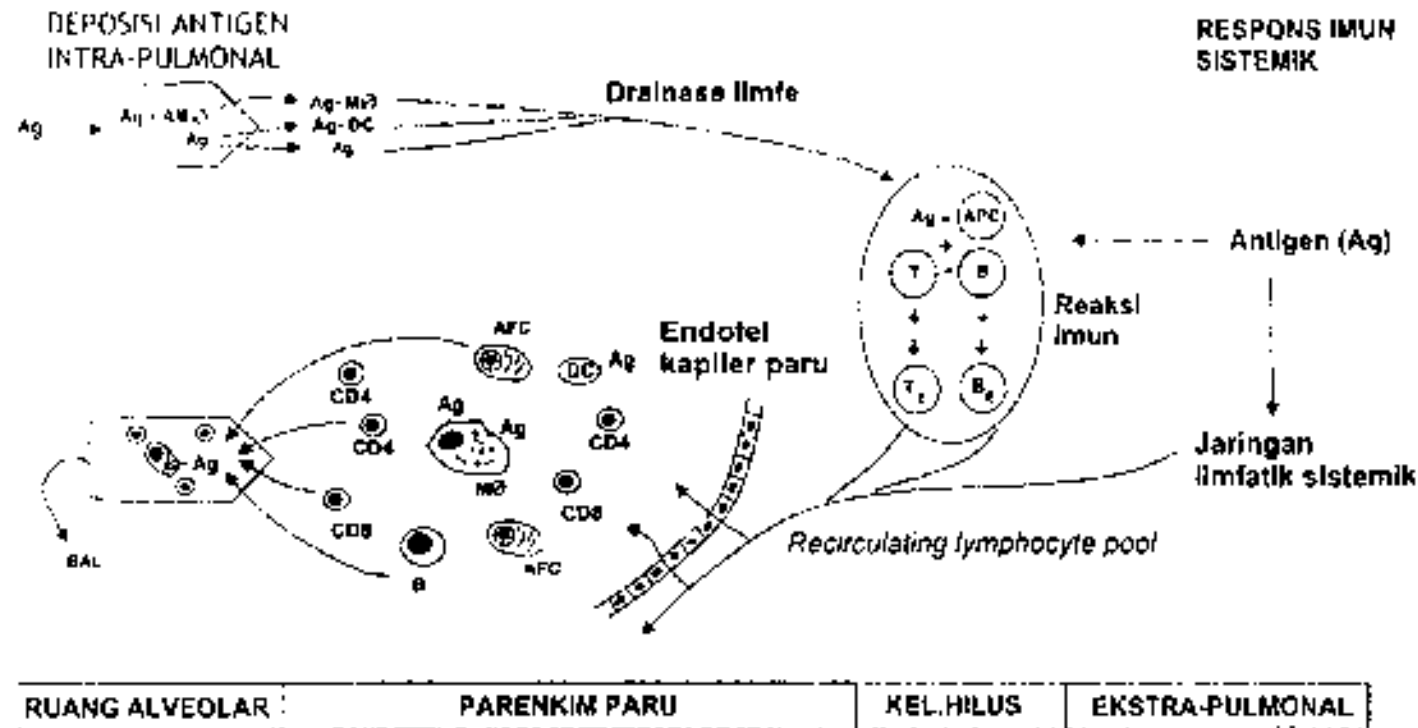
bronkoalveoli selain dapat masuk ke dalam parenkim paru dan kelenjar limfe lokal, juga dapat bermigrasi ke seluruh bagian tubuh

4. *Bronchus (bronchial) - associated lymphoid tissue*

Adanya *bronchus (bronchial) - associated lymphoid tissue* (BALT) dapat dijumpai pada mamot dewasa dan mencit, tetapi tidak dapat ditemukan pada paru kucing dan manusia yang tidak mempunyai riwayat atau menderita infeksi paru kronis (Pabst dkk., 1990b). Pada beberapa keadaan misalnya pada infeksi kronis atau rangsangan patogen kronis, struktur menyerupai BALT dapat berkembang pada beberapa spesies, termasuk manusia (Kaltreider, 1994). Pada dua puluh penderita perokok dengan karsinoma paru perifer, sebanyak 65% pada satu dari lima saluran nafas yang diperiksa, ditemukan koleksi jaringan limfoid di dinding luar saluran nafas. Pada manusia, keadaan ini berbeda dengan mencit yang terdapat di dalam submukosa (Bosken dkk., 1992) (Gambar 3).

2.3.2. Pemeriksaan lavas bronkus pada tuberkulosis paru

Bahan spesimen yang paling tepat untuk memahami imunopatogenesis tuberkulosis paru adalah bahan biopsi paru di tempat terjadinya infeksi *M. tuberculosis*. Bahan tersebut tidak selalu mudah diperoleh mengingat tindakan biopsi paru transkutan maupun biopsi transbronkial merupakan tindakan invasif dan dapat menyebabkan komplikasi yang berbahaya seperti perdarahan dan pneumotoraks sehingga diperlukan indikasi yang kuat untuk melakukannya (American Thoracic Society, 1990). Untuk itu perlu dicari cara pendekatan diagnostik lain yang kurang invasif daripada biopsi paru.



Gambar 3 Skema respons imun seluler (sel T) pada deposisi antigen di parenkim paru direflesi di ruang alveolar (Kaltreider, 1994 textbook of Respiratory Medicine, 2nd, p 370-401)

Keterangan :

AFC = *Antibody-forming cell*; Ag = *Antigen*; AM2/MΦ = *Makrofag alveolar*; APC = *Antigen-presenting cell*; BAL = *Broncho-alveolar lavage*; DC = *Sel dendritik*; T_e, B_e = *Sel T, B efektor*
 KEL. HILUS = *Kelenjar Hilus*

Pemeriksaan cairan BAL dengan bronkoskop yang fleksibel merupakan suatu teknik untuk mendapatkan komponen seluler dan nonseluler permukaan epitel saluran pernafasan bawah. Biasanya cairan untuk pemeriksaan BAL berkisar antara 200-300 ml larutan salin dan ujung distal bronkoskop ditancapkan sampai mencapai percabangan bronkus ke -1 sampai 6. Hal ini berbeda dengan *bronchial washing* yang merupakan sekedar aspirasi sekret atau hanya sejumlah kecil larutan salin (30-50 ml) yang diinstilasikan ke dalam saluran nafas besar, sehingga tidak sampai mencapai percabangan saluran nafas kecil (Hunninghake dkk . 1979)

Pada awalnya, diperkirakan bahwa profil cairan BAL dapat secara akurat mencerminkan jenis dan perjalanan proses inflamasi di paru, sehingga disebut juga *liquid lung biopsy* (Turner-Warwick dan Haslam. 1987). Pada penelitian penyakit paru interstisial, seperti sarkoidosis dan fibrosis paru idiopatik diperoleh kesamaan pola sel respons imun yang diperoleh dari cairan BAL dengan sel biopsi paru. Pada 26 penderita sarkoidosis dan 7 penderita pneumonitis hipersensitivitas dilakukan pemeriksaan evaluasi jenis sel dan distribusinya menggunakan antibodi monoklonal dengan teknik imunohistokimiawi. Jumlah sel yang diperoleh dari cairan BAL dan biopsi paru berkorelasi secara bermakna pada kedua jenis paru interstisial tersebut. Pada penderita dengan derajat alveolitis yang lebih berat, terdapat lebih banyak makrofag pada hasil biopsi daripada dalam cairan BAL, dan derajat limfosit lebih tinggi di cairan BAL daripada biopsi. Khususnya, pada kelompok penderita ini, di cairan BAL terdapat lebih sedikit makrofag daripada pemeriksaan biopsi dan terdapat lebih banyak limfosit daripada yang terdapat di dalam jaringan parenkim. Hal ini terutama lebih banyak pada penderita pneumonitis hipersensitivitas yang

4.5. Cara Kerja

4.5.1. Pemeriksaan klinis dan laboratoris

- a. Data penderita : anamnesis dan pemeriksaan fisik lengkap
- b. Uji fungsi paru
- c. Foto toraks paru (postero-anterior dan lateral)
- d. Elektrokardiografi
- e. Tinja
- f. Darah tepi
 1. Laju endap darah, hemoglobin dan jumlah total leukosit
 2. Jumlah sel T CD4, sel T CD8 dan monosit / makrofag
 3. Kadar sitokin IFN- γ dan IL-4 dari supernatan biakan PBMC darah tepi yang dipapar dengan PPD dan PHA
- g. Lavas bronkus (pagi hari jam 8-10 dan lokasi lavas berdasarkan hasil foto toraks posteroanterior dan lateral)
 1. Hapusan dengan pewarnaan *Ziehl Neelsen*
 2. Jumlah koloni kuman tuberkulosis pada biakan dan uji kepekaan obat anti-tuberkulosis isoniazid, rifampisin dan ethambutol
 3. Jumlah sel T CD4, sel T CD8 dan monosit / makrofag
 4. Kadar sitokin IFN- γ dan IL-4 dari supernatan biakan limfosit cairan BAL yang dipapar dengan PPD dan PHA

4.5.2. Pengambilan bahan spesimen

Spesimen penelitian berasal dari penderita yang berobat di Poliklinik Paru RSUD Dr. Soetomo yang setuju untuk dilakukan pemeriksaan lavas paru dan darah, setelah diberi penjelasan lengkap mengenai pemeriksaan tersebut, beserta risiko yang mungkin terjadi.

Sehari sebelum pengambilan cairan lavas penderita mendapat tablet kodein 10 mg sebanyak 3 kali sehari. Penderita dipuasakan pada pagi hari kecuali obat kodein 1 tablet. Pengambilan cairan lavas dilakukan di ruang operasi Paru RSUD Dr. Soetomo, dan penderita datang dengan disertai pengantar. Penderita menanda tangani surat persetujuan untuk persetujuan pemeriksaan. Premedikasi dilakukan dengan pemberian atropin sulfas 0,5 mg secara intramuskular, midazolam 0,75 mg/kg berat badan, secara intravena, dan anestesi lokal mukosa rongga mulut dan tenggorokan dengan lidokain 0,5% melalui rongga mulut. Pada penelitian ini juga dilakukan pengambilan darah vena sebanyak 10 ml dengan sempit 20 ml yang dibasahi heparin tanpa bahan pengawet.

Cairan lavas diambil dengan alat bronkoskop fiberoptik, yang sebelumnya dilakukan desinfeksi dengan larutan glutaraldehid 2% dan alkohol 70%, serta selama semalam dilakukan penyinaran dengan sinar ultraviolet (Nelson dkk., 1983; Spach, 1995). Ujung alat bronkoskop fiberoptik dimasukkan sampai menancap ke dalam segmen paru yang terkena infeksi, yang sesuai dengan kelainannya pada foto toraks posteroanterior dan lateral. Selanjutnya sebanyak 4 kali 50 ml larutan NaCl 0,9% yang sudah dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37 °C dimasukkan ke dalam segmen paru tersebut. Setiap kali pemberian 50 ml larutan tersebut,

