

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI GEN *MBL2* DAN KADAR PROTEINNYA PADA
PENDERITA TB PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA**

***ANALYSIS OF MBL2 GENE EXPRESSION AND ITS PROTEIN LEVEL IN
PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS AND
THEIR HOUSEHOLD CONTACTS***

YANTI LEMAN

C013172016



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU
KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI GEN *MBL2* DAN KADAR PROTEINNYA PADA
PENDERITA TB PARU DAN KONTAK SERUMAHNYA**

Disusun dan diajukan oleh


**YANTI LEMAN
C013172016**

*Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Ujian Disertasi dalam rangka
Penyelesaian Studi pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 17 Januari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor


Prof. dr. Muh. Nasrudin Massi, Ph.D, Sp.MK
NIP. 196709101996031001


Co Promotor


Prof. dr. Peter Kabo, Ph.D, Sp.JP(K)
NIP. 195003291976121001


Co Promotor


Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D
NIP. 196712311991031020

Ketua Program Studi Doktor
Ilmu Kedokteran,


dr. Agussalim Bukhari, M.Med,Ph.D,Sp.GK(K)
NIP. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K),M.Med.Ed
NIP. 19661213 199503 1 009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Yanti Leman
NIM : C013172016
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Analisis Ekspresi Gen MBL2 dan Kadar Proteinnya pada Penderita TB Paru dan Kontak Serumah

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 19 Oktober 2021

Yang menyatakan,



Yanti Leman

ABSTRAK

YANTI LEMAN. *Analisis Gen Ekspresi MBL2 dan Proteinnya pada Pasien Tuberkulosis Paru dan Kontak Serumah* (dibimbing oleh Muhammad Nasrun Massi, Peter Kabo, dan Ahyar Ahmad).

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbandingan ekspresi gen *manose-binding lectin 2 (MBL2)* dan konsentrasi proteinnya antara tuberkulosis aktif dan laten.

Penelitian sebelumnya telah mempelajari polimorfisme *Manosa-binding lectin 2 (MBL2)* dalam kerentanan tuberkulosis. Namun, belum ada penelitian yang mengeksplorasi peran *MBL2* dalam perkembangan tuberkulosis pada mereka.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lebih rendah secara signifikan pada TB aktif disbanding pada TB laten, namun pada pria ditemukan ekspresi dan kadar yang lebih tinggi pada TB aktif disbanding pada TB laten, kemungkinan banyak faktor yang mempengaruhi yang perlu diteliti lebih lanjut. Korelasi ekspresi gen *MBL2* dengan kadar protein MBL pada TB laten lebih kuat dibandingkan pada TB aktif.

Kata Kunci: Gen *MBL2*, IGRA, TB Laten



ABSTRACT

YANTI LEMAN. *Analysis of MBL2 Expression Gene and Its Protein in Pulmonary Tuberculosis Patients and their Household Contacts* (Supervised by **Muhammad Nasrum Massi, Peter Kabo, and Ahyar Ahmad**)

This study aims to investigate the comparison of *Mannose-binding lectin 2* (*MBL2*) gene expression and its protein concentration between active and latent tuberculosis.

Previous researches had been studied the role of *Mannose-binding lectin 2* (*MBL2*) polymorphism in tuberculosis susceptibility. However, there had been no study exploring the role (*MBL2*) in the development of tuberculosis in those infected with TB. This study was a cross-sectional study involving 39 new active pulmonary TB patients and 25 individuals with latent TB (LTBI) based on IGRA (interferon-gamma release assay) who were recruited from people living with TB patients. *MBL2* gene expression was examined by a relative quantitative real-time PCR method while *MBL2* protein was determined by the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method.

The *MBL2* gene expression is higher in the LTBI group than active TB but does not reach a significant value ($p=0.154$). The MBL protein concentration in LTBI does not differ significantly from the active TB group (median (minimal-maximal) 199.02 (59.11-526.77) ng/mL vs 194.97 (65.85-498.65) ng/mL, $p=0.799$). In women, it is found that the expression of the *MBL2* gene is found to be lower in active TB than in latent TB, but in men it is found that the expression and levels are higher in active TB than in latent TB due to the possibility of many influencing factors that are needed further investigation. The correlation between *MBL2* gene expression and MBL protein levels in latent TB is stronger than in active TB.

Keywords: MBL2, IGRA, Tuberculosis



PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh. Alhamdulillah, segala puji serta syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis diberi semangat, kekuatan, dan kemampuan untuk menyelesaikan disertasi dengan judul “Analisis Ekspresi Gen *MBL2* dan Kadar Proteinnya pada Penderita TB Paru dan Kontak Serumahnya”. Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor dari Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih terdapat kesalahan dan masih jauh dari sempurna, sehingga terdapat kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Karena itu, dengan rendah hati penulis mengharapkan masukan, koreksi dan saran yang membangun untuk memperkuat kelemahan dan melengkapi kekurangan tersebut.

Penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK** selaku Ketua Tim Promotor, yang telah memberikan inspirasi dan motivasi selama masa studi terutama saat masa riset dan penulisan disertasi untuk menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor (S- 3) Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Penulis juga menyampaikan terima kasih untuk **Prof. dr. Peter Kabo, Ph.D, SP.JP(K)** dan **Prof. Ahyar**

Ahmad, Ph.D selaku kopromotor, yang berkenan memberi bimbingan, arahan dan masukan selama masa studi penulis dan penyelesaian disertasi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada:

1. **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A.** selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar;
2. **Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.** selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar;
3. **Prof. dr. Budu, Sp.M (K), M.Med, Ph.D** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar;
4. **dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Sp.GK, Ph.D** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar;
5. Seluruh tim penguji: **Dr. dr. Ni Nyoman Sri Budayanti, Sp.MK(K); Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, Sp.PD(K), Sp.P; dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIN; dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K); Dr. dr. St. Rafiah, M.Si; Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)** atas waktu dan kesempatannya dalam menguji serta arahan dan masukannya agar disertasi ini menjadi lebih baik.
6. **dr. Syamsuridzal Bali, MBA**, selaku Kepala Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat (BBKPM) Makassar telah menerima penulis untuk bekerja dan melakukan penelitian di BBKPM Makassar.

7. Staf Laboratorium HUM-RC Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, **Kak Handayani Halik, S.Si, M.Si, Yusuf, S.Si, Yuliana Sari, S.Si, Fathur, A.Md.A.K., Rina, S.Si, Gaby Maulida, S.Si, M.Si, Kak Uli, dan Kak Safri** serta **Kak Syahrani Hidayatullah, S.Si., M.Kes** atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
8. Staf S3 Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd.FT dan Bapak Rahmat**) atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi.
9. Staf Departemen Farmakologi Kedokteran Universitas Hasanuddin (**Ibu Zaenab Malik**) atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian.
10. **Dr. dr. Najdah Hidayah** yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis dalam penyusunan disertasi.
11. Suami saya, **Akhmad Panguriseng Mursad**, dan anak-anak saya **Fakhrul Hijri A.P.** dan **Tiffary Nadhira** yang senantiasa memberikan doa restu, kasih sayang, dan bantuan untuk penulis.
12. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian, yaitu kepada para pasien dan kontak serumahnya yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Dengan memperhatikan dan mengikuti bimbingan, arahan dan perbaikan dari tim promotor dan penguji, penulis berharap disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua yang pembacanya.

Makassar, 15 Januari 2022

Yanti Leman

DAFTAR ISI

HALAMAN Sampul	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian	8
D. Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
A. Definisi Tuberkulosis.....	9
B. Etiologi Tuberkulosis.....	9
C. Patogenesis Tuberkulosis.....	12
1. Tuberkulosis Paru Primer	12
2. Tuberkulosis Paru Sekunder	14

D.	Imunopatogenesis Tuberkulosis	17
1.	Imunitas Seluler <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2.	Imunitas Humoral <i>Mycobabacterium tuberculosis</i>	24
E.	Klasifikasi Tuberkulosis.....	26
1.	Berdasar hasil pemeriksaan dahak (basil tahan asam/BTA) ...	28
2.	Berdasarkan Tipe Penderita	29
F.	Diagnosis Tuberkulosis.....	32
1.	Gejala klinik	32
2.	Pemeriksaan Fisik	33
3.	Pemeriksaan Bakteriologik	34
4.	Pemeriksaan biakan kuman	36
5.	Pemeriksaan Radiologik.....	36
6.	Pemeriksaan Penunjang Lainnya	38
G.	Penatalaksanaan Tuberkulosis.....	44
H.	Gen <i>Mannose Binding Lectin</i>	49
1.	Stuktur <i>Mannose-Binding Lectin</i>	52
2.	Fungsi <i>Mannose-Binding Lectin</i> Dalam Mengikat Mikroorganisme	53
3.	Fungsi <i>Mannose-Binding Lectin</i> Dalam Mekanisme Efektor....	54
4.	Genetik <i>Mannose-Binding Lectin</i>	58
5.	Distribusi Jaringan MBL di Paru-Paru	60
6.	Terjadinya Defisiensi MBL Sebagai Bentuk Pertahanan Terhadap Tuberkulosis	61
I.	Interferon-Gamma Release Assay (IGRA).....	62
J.	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	67

1.	Prinsip Kerja	67
2.	Kegunaan	69
3.	Waktu yang Dibutuhkan	69
4.	Reagen Khusus	70
5.	Peralatan Khusus	71
6.	Komponen PCR lainnya.....	71
7.	Tahapan <i>Polymerase Chain Reaction</i>	72
8.	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	74
9.	Metoda Deteksi Produk <i>Polymerase Chain Reaction</i>	75
K.	Kerangka Teori	76
L.	Hipotesis	76
M.	Kerangka Konsep	77
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		78
A.	Rancangan penelitian	78
B.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	78
C.	Populasi dan Sampel Penelitian	78
1.	Populasi	78
2.	Sampel.....	78
D.	Metode Pengumpulan Sampel.....	79
E.	Alat dan Bahan	80
1.	Alat	80
2.	Bahan	80
F.	Definisi Operasional dan Kriteria Obyektif	80
G.	Teknik Analisis.....	81

H.	Cara Kerja.....	81
1.	Tahap-tahap Pengumpulan Sampel	81
2.	Pemeriksaan sputum	82
3.	Dekontaminasi sputum	82
4.	Smear dengan pewarnaan Ziehl-Neelsen.....	82
5.	Kultur pada medium cair MGIT 960 (<i>Mycobacterium Growth Indicator Tube/MGIT</i>).....	83
6.	Pemeriksaan IGRA (Uji QuantiFERON-TB Gold Plus/QFT-Plus)	83
7.	Pemeriksaan QuantiFERON-TB Gold In-Tube	83
8.	Ekstraksi RNA Dari Sampel Darah	85
9.	Amplifikasi <i>complementary</i> DNA (cDNA) dengan <i>Reverse Transcriptase-PCR</i>	87
10.	Pemeriksaan ekspresi gen MBL2 dengan <i>real time PCR</i>	88
11.	Pemeriksaan Kadar <i>MBL2</i>	88
I.	Analisis Data	89
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		91
A.	Hasil.....	91
1.	Karakteristik sampel berdasarkan jenis kelamin	91
2.	Karakteristik sampel berdasarkan usia	91
3.	Karakteristik sampel berdasarkan indeks massa tubuh (kg/m ²) 92	
4.	Frekuensi sampel berdasarkan riwayat merokok.....	92
5.	Frekuensi sampel berdasarkan riwayat konsumsi alkohol.....	93
6.	Frekuensi sampel pasien TB paru aktif berdasarkan hasil sputum BTA (tertinggi)	93
7.	Frekuensi sampel TB laten berdasarkan hubungan dengan	

pasien TB paru aktif kontak serumah.....	94
8. Frekuensi sampel TB laten yang sekamar dan tidak sekamar dengan pasien TB paru aktif serumah	95
9. Perbedaan ekspresi gen <i>MBL2</i> pada kasus TB aktif dan kasus TB laten	96
10. Perbedaan kadar protein MBL pada kasus TB aktif dan kasus TB laten	97
11. Perbedaan ekspresi gen <i>MBL2</i> antara kasus TB aktif dan kasus TB laten pada sampel laki-laki dan perempuan	98
12. Perbedaan kadar protein MBL antara kasus TB aktif dan kasus TB laten pada sampel laki-laki dan perempuan.....	99
B. Pembahasan.....	102
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	110
A. Kesimpulan	110
B. Saran	110
DAFTAR PUSTAKA.....	112
LAMPIRAN.....	111

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perbandingan uji diagnostik yang tersedia untuk infeksi TB laten, diadaptasi dari Pai M, Sotgiu G.....	64
Tabel 2. Karakteristik sampel berdasarkan jenis kelamin.....	91
Tabel 3. Karakteristik sampel berdasarkan usia.....	92
Tabel 4. Karakteristik sampel berdasarkan IMT (kg/m ²).....	92
Tabel 5. Frekuensi sampel berdasarkan riwayat merokok	93
Tabel 6. Frekuensi sampel berdasarkan riwayat konsumsi alkohol.....	93
Tabel 7. Frekuensi sampel pasien TB paru aktif berdasarkan hasil sputum BTA (nilai tertinggi).....	94
Tabel 8. Frekuensi sampel TB laten berdasarkan hubungan dengan pasien TB paru aktif serumah	95
Tabel 9. Frekuensi sampel TB laten yang sekamar dan tidak sekamar dengan pasien TB paru aktif	95
Tabel 10. Ekspresi gen <i>MBL2</i> (kuantitatif relatif) pada TB laten dan TB aktif	96

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Patogenesis TB Paru Primer.....	14
Gambar 2. Skema perkembangan sarang tuberkulosis post primer dan perjalanan penyembuhannya	16
Gambar 3. Fungsi MBL dalam memicu opsonofagositosis	57
Gambar 4. Fungsi MBL dalam apoptosis	58
Gambar 5. Kerangka Teori.....	76
Gambar 6. Kerangka Konsep.....	77

DAFTAR SINGKATAN

AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i>
ART	<i>Anti-Retroviral</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BAL	<i>Bronchoalveolar Lavage</i>
BBKPM	<i>Balai Besar Kesehatan Paru</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BJH	<i>Biopsi Jarum Halus</i>
BTA	<i>Basil Tahan Asam</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFP	<i>Complement Factor Properdin</i>
CMI	<i>Cell Mediated Immunity</i>
CMR	<i>Cell Mediated Reactions</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-Cell</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DM	<i>Diabetes Melitus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
DTH	<i>Delayed Type Hipersensitivity</i>
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzym Linked Immunospot Assay</i>
ESAT	<i>Early Secretory Antigenic Target</i>
FIM	<i>Fosfatidil Inositol Mannosida</i>
H	<i>Isoniazid</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HUM-RC	<i>Hasaanuddin University Medical-Research Center</i>
ICT	<i>Immunochromatographic Tuberculosis</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGRAs	<i>Interferon-Gamma Release Assay</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IMT	<i>Indeks Massa Tubuh</i>
LAM	<i>Lipoarabinomannan</i>
LED	<i>Laju Endap Darah</i>
LJ	<i>Lowenstein-Jensen</i>
MASP	<i>MBL-Related Serine Protease</i>
MBL	<i>Mannose Binding Lectin</i>

MDR	<i>Multidrug Resistant</i>
MGIT	<i>Mycobacterium Growth Indicator Tube</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOTT	<i>Mycobacterium Other Than Tuberculosis</i>
MR	<i>Monoresistant</i>
MTB	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NOS2	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
OAT	<i>Obat Anti Tuberkulosis</i>
PAP	<i>Peroksidase Anti-Peroksidase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR	<i>Poliresistant</i>
QFT-GIT	<i>Quanti Feron-TB Gold in Tube Test</i>
R	<i>Rifampicin</i>
RD	<i>Region of Difference</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RR	<i>Rifampicin Resistant</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDGs	<i>Sustainability Development Goals</i>
SP-A	<i>Surfaktan Paru-A</i>
SP-D	<i>Surfaktan Paru-D</i>
TB	<i>Tuberkulosis</i>
TBLB	<i>Trans Bronchial Lung Biopsy</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TH1	<i>T-Helper 1</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TST	<i>Tuberculin Skin Test</i>
TTB	<i>Trans Thoracal Biopsy</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	<i>Extensive Drug Resistant</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular yang masih menjadi permasalahan di dunia kesehatan hingga saat ini (Delogu et al., 2013). Tuberkulosis diperkirakan sudah ada di dunia sejak 5000 tahun sebelum masehi, namun kemajuan dalam hal penemuan dan pengendalian TB baru terjadi dalam dua dekade terakhir (Kementerian Kesehatan RI, 2016). Walaupun dengan kemajuan pengobatan selama dekade terakhir, TB tetap merupakan penyebab utama global dari penyakit infeksi dan menyebabkan tingkat morbiditas pada jutaan orang setiap tahunnya (Liu et al., 2016).

Tuberkulosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* [MTB] (Amin and Bahar, 2014). Diperkirakan sekitar seperempat penduduk dunia telah terinfeksi MTB (Houben and Dodd, 2016; World Health Organization, 2020). Infeksi dengan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan salah satu faktor predisposisi TB. Risiko berkembangnya TB diperkirakan sekitar 16 – 27 kali lebih besar pada orang dengan infeksi HIV (World Health Organization, 2020).

Pada tahun 2019 penyebab kematian akibat TB diperkirakan 1,2 juta pada orang dengan HIV negatif dan terdapat sekitar 208 ribu kematian dari TB dengan HIV positif (World Health Organization,

2020). Diperkirakan sekitar 95% kasus TB dan 98% kematian akibat TB di dunia terjadi pada negara-negara berkembang. Sejak tahun 2015 hingga 2019, terjadi penurunan global dalam jumlah kematian TB sebesar 14%. Wilayah Eropa WHO mencapai reduksi jumlah kematian sebesar 31% dari 2015 hingga 2019, dan Wilayah Afrika juga telah membuat kemajuan yang baik dengan mencapai penurunan angka kematian sebesar 19%. Di antara 30 negara dengan beban TB tinggi, tujuh telah mencapai *milestone* penurunan jumlah kematian sebesar 35%, yaitu Bangladesh, Kenya, Mozambik, Myanmar, Federasi Rusia, Sierra Leone dan Republik Persatuan Tanzania (World Health Organization, 2020).

Berdasarkan *World Health Organization (WHO) Global Tuberculosis Report 2020*, diperkirakan insiden TB di Indonesia mencapai 845 ribu kasus dengan angka mortalitas sekitar 97 ribu kasus. Jumlah ini membuat Indonesia berada di urutan ke-2 tertinggi untuk kasus TB setelah India dan China (World Health Organization, 2020).

Insiden TB sudah mencapai 10 juta kasus baru TB setiap tahun. Oleh sebab itu, hingga saat ini TB masih menjadi prioritas utama di dunia dan menjadi salah satu tujuan *Sustainability Development Goals [SDGs]* (World Health Organization, 2020). Berdasarkan jenis kelamin, jumlah kasus baru TB tahun 2019, pada laki-laki 1,75 kali lebih besar dibandingkan pada perempuan. Bahkan berdasarkan survei prevalensi

TB, prevalensi pada laki-laki 1,3 hingga 2 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan (World Health Organization, 2020). Sekitar 75% pasien TB adalah kelompok usia yang paling produktif secara ekonomis (15 – 20 tahun). Selain merugikan secara ekonomis, TB juga memberi dampak buruk lainnya secara sosial stigma, bahkan dikucilkan oleh masyarakat (World Health Organization, 2018).

Tuberkulosis umumnya menyerang paru-paru tetapi dapat juga menyerang organ tubuh lainnya. Penyebarannya melalui udara jika penderita infeksi TB aktif batuk, bersin atau ditularkan dari saliva (Alsahy et al., 2017). Tidak semua orang yang terpapar MTB akan terinfeksi penyakit TB (Esmail et al., 2014). Kebanyakan infeksi pada manusia menyebabkan gejala asimtomatik, infeksi laten dan kurang lebih $\frac{1}{10}$ dari kasus infeksi laten akhirnya berkembang menjadi penyakit aktif yang jika tidak diobati dapat menyebabkan kematian sekitar 50% dari kasus terinfeksi, sehingga identifikasi dan pengobatan pasien dengan TB laten merupakan hal penting dalam mengontrol penyakit ini (Alsahy et al., 2017; Holland et al., 2016).

Pertumbuhan bakteri dihubungkan dengan beberapa faktor risiko yang meningkatkan terjadinya penyakit TB antara lain usia, gizi buruk (malnutrisi), penyakit diabetes melitus (DM), yang dapat memudahkan seseorang terkena infeksi karena penurunan sistem imun (Gengenbacher and Kaufmann, 2012; Schaible and Kaufmann, 2007; Wang et al., 2012). Respon imun alamiah pada manusia mengaktivasi

sistim imun tipe T-helper 1 (TH1), dan memainkan peranan penting dalam pertahanan *host* melawan terjadinya TB (Liu et al., 2016; Van Crevel et al., 2002).

Interaksi antara *host* dan kuman patogen serta faktor lingkungan berperan terhadap terjadinya TB. Variabilitas genetik *host* merupakan faktor risiko penting yang berperan dalam kerentanan dan perkembangan timbulnya penyakit TB pada manusia (Liu et al., 2016). Variabilitas dalam kerentanan TB nampak pada beberapa pasien kontak yang menjadi sakit TB sedangkan yang lain tidak menampakkan gejala sama sekali.

Hal ini memperlihatkan bahwa predisposisi genetik merupakan salah satu faktor *host* yang mempengaruhi berkembangnya penyakit TB (Dubos and Dubos, 1987; Qu et al., 2011).

Beberapa studi telah melaporkan hubungan antara TB dan polimorfisme genetik terhadap imunitas bawaan pada manusia. Salah satu dari polimorfisme pada skala global termasuk *mannose binding lectin* (MBL), suatu reseptor pola pengenalan sistim imun bawaan (Denholm et al., 2010; Nuytinck and Shapiro, 2004).

Mannose binding lectin di sandi oleh gen *MBL2* yang berlokasi di kromosom 10. *Mannose binding lectin* adalah protein serum fase akut dari famili collectin yang di produksi di hepar dan dapat mengopsonisasi bakteri melalui perlekatan pada permukaan kuman

patogen untuk memfasilitasi pengenalan dan fagositosis (Garred et al., 2006; Mandal et al., 2019).

Lectin merupakan protein yang mengikat molekul gula pada permukaan bakteri (Esmail et al., 2014). *Mannose binding lectin* memperantarai perlindungan terhadap infeksi dengan mengaktifkan sistem komplemen melalui jalur lectin (Mandal et al., 2019), tetapi dapat meningkatkan infektivitas mikroorganisme tertentu dengan memanfaatkan pertahanan *host* (Eisen, 2010).

Mannose binding lectin memegang peranan penting dalam pertahanan *host* melawan patogen termasuk bakteri, jamur, parasit dan virus (Guo et al., 2017). Defisiensi MBL dihubungkan dengan meningkatnya frekuensi terjadinya berbagai infeksi (Verdu et al., 2006).

Peranan MBL terhadap TB masih kontroversial oleh karena ketidaksesuaian dari berbagai studi (Areeshi et al., 2016; Da Cruz et al., 2013). Beberapa studi klinik dan genetik telah dilakukan untuk mengetahui dampak dari berbagai polimorfisme gen *MBL2* terhadap perkembangan TB (Areeshi et al., 2016).

Studi sebelumnya menemukan bahwa beberapa varian gen *MBL2* dihubungkan dengan level serum MBL yang rendah dan kerentanan terhadap TB (Areeshi et al., 2016). Hal ini memberikan dugaan bahwa secara genetik level MBL rendah dapat menyebabkan menurunnya perlindungan terhadap mikroorganisme tertentu seperti

MTB melalui ikatan terhadap residu di lipo-arabino-mannan pada membran sel (Holland et al., 2016).

Tetapi studi yang lain mengatakan bahwa level serum MBL yang tinggi dapat meningkatkan infeksi TB melalui opsonisasi MTB. Dengan berikatan terhadap MTB, maka MBL bekerja sebagai opsonin, meningkatkan komplemen dependen dan fagositosis serta merangsang inflamasi yang menyebabkan pelepasan sitokin (Guo et al., 2017).

Penelitian yang dilakukan pada populasi di China menemukan mutasi pada promotor 221 (Y/X) dapat menyebabkan level serum MBL yang rendah dan akhirnya meningkatkan kerentanan terhadap TB. Studi ini juga memperlihatkan level serum MBL secara bermakna lebih rendah pada pasien kontrol dibanding pasien TB (Guo et al., 2017).

Suatu meta-analisis tentang efek genotip *MBL2* dan / atau level MBL dengan infeksi TB melaporkan tidak terdapat hubungan yang bermakna diantara genotip *MBL2* dan infeksi TB paru (Guo et al., 2017). Pada penelitian ini juga menunjukkan level MBL hampir sama pada pasien TB aktif maupun TB in-aktif (Alsahy et al., 2017).

Hasil yang tidak konsisten dari berbagai studi kemungkinan dapat disebabkan oleh keragaman etnis dalam populasi, deteksi genotip jumlah sampel kecil, uji statistik dan kurangnya studi individu untuk mengetahui keseluruhan efeknya (Areeshi et al., 2016; Liu et al., 2016).

Beberapa penelitian telah dilakukan tentang hubungan antara polimorfisme gen *MBL2* dan kerentanan terhadap TB, namun belum ada penelitian serupa dengan topik penelitian ini yang dilakukan di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana ekspresi gen *MBL2* dan kadar protein MBL pada penderita TB dan kontak serumahnya, sehingga diharapkan dengan penelitian ini dapat memberikan informasi tentang genetika *host* dan bermanfaat untuk identifikasi individu dengan risiko tinggi terhadap kerentan TB.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ada perbedaan ekspresi gen *MBL2* antara penderita TB dan kontak serumah ?
2. Apakah ada perbedaan kadar protein MBL serum antara penderita TB dan kontak serumah ?
3. Apakah ada korelasi antara ekspresi gen *MBL2* dengan kadar protein MBL serum?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Untuk menganalisa aktivitas ekspresi gen *MBL2* dan kadar proteinnya pada penderita TB dan kontak serumah.

2. Tujuan khusus

- a. Membandingkan ekspresi gen *MBL2* antara penderita TB dan kontak serumah.
- b. Membandingkan kadar protein MBL antara penderita TB dan kontak serumah.
- c. Mengidentifikasi korelasi antara ekspresi gen *MBL2* dengan kadar protein MBL.

D. Manfaat Penelitian

1. Bidang Akademik

Memberikan pengetahuan tentang ekspresi gen *MBL2* dan kadar proteinnya pada penderita TB aktif dan TB laten.

2. Bidang Klinik

Memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas gen *MBL2* pada penderita TB aktif dan TB laten sehingga dapat dilakukan deteksi dini terhadap faktor risiko penyakit TB.

3. Bidang Masyarakat

Memberikan pemahaman kepada masyarakat tentang penularan dan perkembangan penyakit TB.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyerang berbagai organ tubuh, terutama paru-paru (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Nama tuberkulosis berasal dari tuberkul yang berarti tonjolan kecil dan keras yang berbentuk sewaktu sistem kekebalan membentuk dinding mengelilingi bakteri dalam paru. Tuberkulosis paru ini bersifat menahun dan secara khas ditandai oleh pembentukan granuloma dan menimbulkan nekrosis jaringan (Indonesia, 2011; Kasper et al., 2015)

B. Etiologi Tuberkulosis

Mycobacterium tuberculosis adalah mikrobakteri penyebab utama TB. Pada manusia MTB sering disebut sebagai *tubercle bacillus*. Bakteri ini berbentuk batang, bersifat non motil (tidak dapat bergerak sendiri) dan dapat memiliki panjang 1 – 4 μm dan lebar 0,13 – 0,56 μm (Smith, 2003).

Mycobacterium tuberculosis merupakan organisme *obligate aerob* yang berarti membutuhkan oksigen untuk tumbuh. Oleh karena itu, kompleks MTB banyak ditemukan di lobus paru-paru bagian atas yang dialiri udara dengan baik. Selain itu bakteri ini merupakan parasit

intraseluler fakultatif, yaitu patogen yang dapat hidup dengan memperbanyak diri didalam sel hospes maupun diluar sel hospes (sel fagositik), khususnya makrofag dan monosit. Kemampuan MTB dalam bertahan di makrofag hospes dikendalikan oleh proses kompleks dan terkoordinir. Sistem ini dikontrol dengan baik oleh ESX-1 sebagai sistem sekresi protein bakteri. Sistem sekresi protein adalah faktor keganasan utama dari bakteri patogen (Raghavan et al., 2008; Stanley et al., 2003). Terdapat 5 jenis sistem sekresi pada MTB yaitu ESX-1 hingga ESX-5 (Abdallah et al., 2007).

ESX-1 diperlukan untuk virulensi penuh dari MTB karena ESX-1, sangat penting untuk translokasi dari fagosom ke dalam sitosol makrofag terinfeksi sehingga bakteri mungkin akan menetap pada lingkungan terlindung. ESX-1 mengeluarkan ESAT-6 dan CFP-10 yang merupakan protein kecil sangat imunogenik sebagai dasar diagnosis imunologi infeksi MTB pada metode *interferon-gamma release assay* (IGRA) *Interferon-gamma release assay* dapat digunakan untuk deteksi MTB termasuk pada subyek yang sebelumnya telah menerima vaksin BCG, karena BCG kekurangan ESX-1 dan tidak mengekspresikan ESAT-6 dan CFP-10 (Delogu et al., 2013; Raghavan et al., 2008).

Mycobacterium tuberculosis tidak diklasifikasikan sebagai Gram positif maupun Gram negatif karena dinding sel bakteri ini tidak memiliki karakteristik membran luar bakteri Gram negatif. Namun, MTB

memiliki struktur peptidoglikan-arabinogalaktan-asam mikolat sebagai *acid-fast*. Jika pewarnaan Gram dilakukan pada MTB, warna Gram positif yang muncul sangat lemah atau tidak berwarna sama sekali (Smith, 2003).

Pada penggunaan metode *Ziehl-Neelsen Stain* terhadap MTB, bakteri ini akan menunjukkan warna merah muda. *Mycobacterium tuberculosis* tumbuh lambat dengan kecepatan pembelahan 12 hingga 24 jam dan waktu kultur hingga 21 hari pada media pertumbuhan. Penyebab lambatnya pertumbuhan MTB belum diketahui. Namun terbatasnya penyerapan nutrient akibat dinding sel yang permeabel dan lambatnya sintesis RNA diduga sebagai penyebab lambatnya pertumbuhan MTB (Abdallah et al., 2007).

Struktur dinding sel MTB bersifat unik dibandingkan organisme prokariot lainnya karena memberikan barrier berupa kekedapan yang sangat kuat terhadap komponen berbahaya dan obat serta memainkan peran dasar dalam keganasan bakteri ini. Kelebihan tersebut diakibatkan kandungan lipid kompleks yang tinggi. Lebih dari 60% dinding sel mikroba adalah lipid (Raghavan et al., 2008).

Mycobacterium tuberculosis tidak mengandung fosfolipid pada membran luar. Dinding sel MTB mengandung glikolipid dalam jumlah besar, khususnya asam mikolat, peptidoglikan, lipo-arabinomannan/LAM, fosfatidil inositol mannosida/FIM, *phthiocerol dymicocate cord factor*, sulfolipid dan wax-D. Komponen unik ini

mengganggu jalur pertahanan hospes dan menentukan pertahanan bakteri didalam fagosom (Alderwick et al., 2007).

C. Patogenesis Tuberkulosis

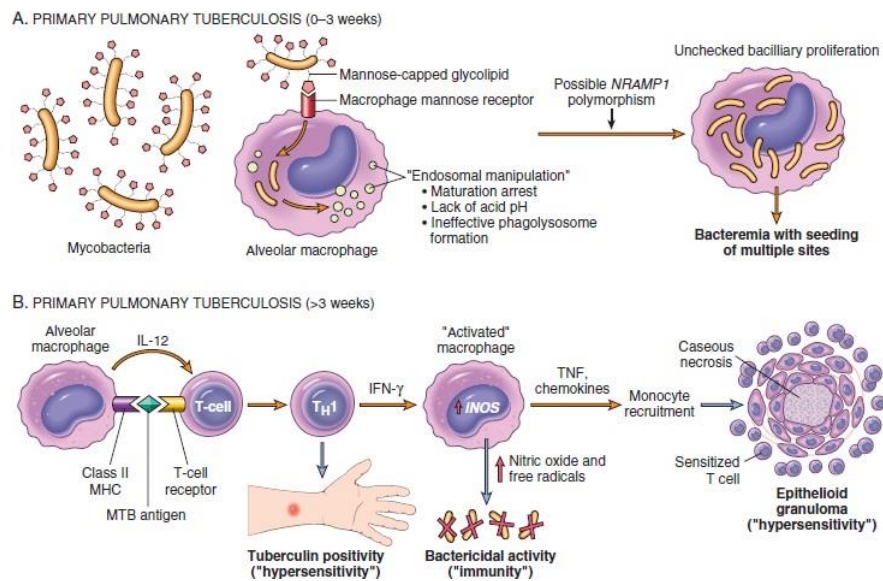
Mycobacterium tuberculosis ditularkan melalui udara bukan melalui kontak permukaan. Infeksi MTB terjadi jika beberapa tuberkel basili beredar di udara dari pasien dengan TB paru aktif mencapai alveoli dari *host*. Bakteri ini akan berada didalam gelembung cairan bernama *droplet nuclei*. Partikel ini dapat bertahan di udara selama beberapa jam dan tidak dapat dilihat karena memiliki diameter sebesar 1 – 5 μm (Indonesia, 2011).

Tuberkulosis paru dapat diklasifikasikan menjadi TB paru primer dan TB paru sekunder.

1. Tuberkulosis Paru Primer

Tuberkulosis primer terjadi pada saat seseorang pertama kali terpapar terhadap basil TB. Basil TB ini masuk ke paru dengan cara inhalasi droplet, sampai di paru basil TB ini akan difagosit oleh makrofag dan akan mengalami dua kemungkinan. Pertama, basil TB akan mati difagosit oleh makrofag. Kedua, basil TB akan dapat bertahan hidup dan bermultiplikasi dalam makrofag sehingga basil TB akan dapat menyebar secara limfogen, perkontinuitatum, bronkogen, bahkan hematogen. Penyebaran basil TB ini pertama sekali secara limfogen menuju kelenjar limfe regional di hilus,

dimana penyebaran basil TB tersebut akan menimbulkan reaksi inflamasi di sepanjang saluran limfe (limfangitis) dan kelenjar limfe regional (limfadenitis). Pada orang yang mempunyai imunitas baik, 3 – 4 minggu setelah infeksi akan terbentuk imunitas seluler. Imunitas seluler ini akan membatasi penyebaran basil TB dengan cara menginaktivasi basil TB dalam makrofag membentuk suatu sarang primer yang disebut juga dengan fokus *ghon*. Fokus *ghon* bersama-sama dengan limfangitis dan limfadenitis regional disebut dengan kompleks *ghon*. Terbentuknya fokus *ghon* mengimplikasikan dua hal penting. Pertama, fokus *ghon* berarti dalam tubuh seseorang sudah terdapat imunitas seluler yang spesifik terhadap basil TB. Kedua, fokus *ghon* merupakan suatu lesi penyembuhan yang didalamnya berisi basil TB dalam keadaan laten yang dapat bertahan hidup dalam beberapa tahun dan bisa tereaktivasi kembali menimbulkan penyakit (Delogu et al., 2013; Raghavan et al., 2008). Adapun patogenesis TB pulmoner primer dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Patogenesis TB Paru Primer (Kumar et al., 2008).

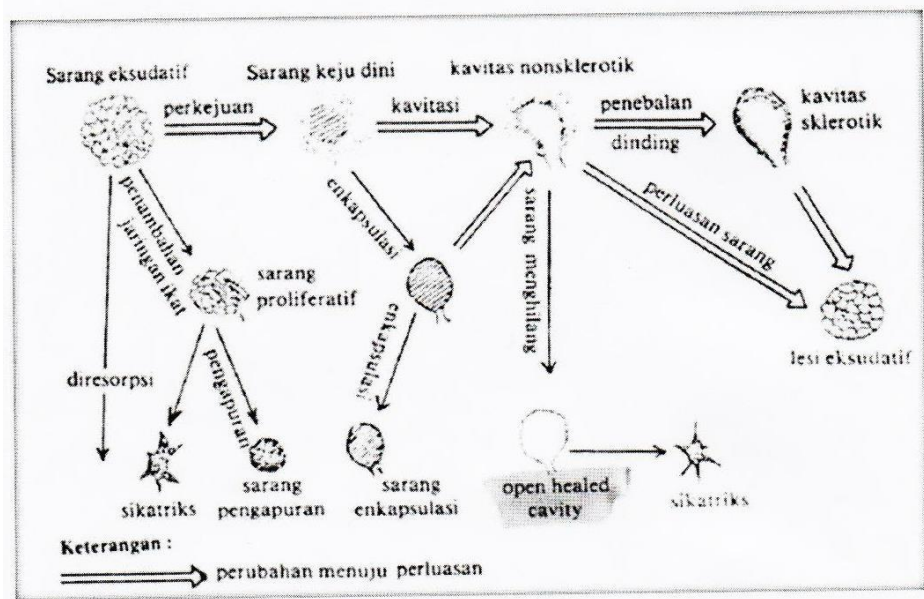
2. Tuberkulosis Paru Sekunder

Terjadinya reaktivasi atau reinfeksi basil TB pada orang yang sudah memiliki imunitas seluler, hal ini disebut dengan TB post-primer. Adanya imunitas seluler akan membatasi penyebaran basil TB lebih cepat daripada TB primer disertai dengan pembentukan jaringan keju (kaseosa). Sama seperti pada TB primer, basil TB pada TB post-primer dapat menyebar terutama melalui aliran limfe menuju kelenjar limfe lalu ke semua organ. Kelenjar limfe hilus, mediastinal dan paratrakeal merupakan tempat penyebaran pertama dari infeksi TB pada parenkim paru. Bentuk TB post-primer menjadi masalah kesehatan masyarakat yang utama karena dapat menjadi sumber penularan. Tuberkulosis post-primer dimulai dengan sarang dini yang umumnya terletak di

segmen apikal dari lobus superior maupun lobus inferior. Sarang dini ini awalnya berbentuk suatu sarang pneumonik kecil. Sarang pneumonik ini akan berkembang menjadi beberapa bentuk sebagai berikut (Delogu et al., 2013; Raghavan et al., 2008):

1. Diresopsi kembali dan sembuh kembali dengan tidak meninggalkan cacat.
2. Sarang tadi mula-mula meluas, tetapi segera terjadi proses penyembuhan dengan penyebukan jaringan fibrosis. Selanjutnya akan membungkus diri menjadi lebih keras, terjadi perkapuran dan akan sembuh dalam bentuk perkapuran. Sebaliknya dapat juga sarang tersebut menjadi aktif kembali membentuk jaringan keju (jaringan kaseosa) dan menimbulkan kaviti bila jaringan keju dibatukkan keluar.
3. Sarang pneumonik meluas membentuk jaringan keju (jaringan kaseosa). Kaviti akan muncul dengan dibatukkannya jaringan keju keluar. Kaviti awalnya berdinding tipis, kemudian dindingnya akan menjadi tebal (kaviti sklerotik). Kaviti akan berkembang menjadi beberapa bentuk diantaranya :
 - Meluas kembali dan menimbulkan sarang pneumonik baru;
 - Dapat pula memadat dan membungkus diri (*encapsulated*) disebut tuberkuloma. Tuberkuloma dapat mengapur dan sembuh, tetapi mungkin pula aktif kembali mencair dan menjadi kaviti lagi ;

- Kaviti bisa pula menjadi bersih dan sembuh yang disebut *open healed cavity* atau kaviti menyembuh dengan membungkus diri, akhirnya mengecil. Kemungkinan berakhir sebagai kaviti yang terbungkus dan mengkerut sehingga kelihatan seperti bintang (*stellate shaped*).



Gambar 2. Skema perkembangan sarang tuberkulosis post primer dan perjalanan penyembuhannya

Basil TB juga dapat menginfeksi kelenjar limfe tanpa terlebih dahulu menginfeksi paru. Basil TB ini akan berdiam di mukosa orofaring setelah basil TB masuk melalui inhalasi droplet. Basil TB di mukosa orofaring akan difagosit oleh makrofag dan dibawa ke tonsil, selanjutnya akan dibawa ke kelenjar limfe di leher.

D. Imunopatogenesis Tuberkulosis

Respon imun manusia terhadap TB merupakan suatu reaksi kompleks terhadap infeksi patogen yang kuat. Interaksi antara sistem imun seluler yang berada dalam lingkungan yang mengandung berbagai macam mediator inflamasi dan berbagai faktor, memiliki dampak besar terhadap kemampuan tubuh untuk menjadi infeksi.

Dari data yang diperoleh mengatakan bahwa pertahanan host melawan MBT membutuhkan respon imun seluler melalui aktivasi Th1/Th7 (Holland et al., 2016). Selama ini menunjukkan bahwa respon imun sel T ditunjukkan oleh Th1/Th2 yang memberikan pengertian bagaimana sistem imun langsung berespon terhadap berbagai patogen dan stimuli (Holland et al., 2016).

Dua bagian utama dari sel Th-CD4, Th1 dan Th2 memiliki pola produksi mediator-mediator yang berbeda, memiliki peran berbeda dalam respon imun.

Sel Th1 ditandai oleh produksi TNF- α , IL-2, INF- γ dan sel Th2 ditandai oleh pelepasan IL-4, IL-5 dan IL-13. Sitokin Th1 merangsang makrofag dan *cell mediated reactions* (CMR) penting dalam pertahanan terhadap infeksi patogen intraseluler dan sitotoksik serta reaksi hipersensitivitas tertunda (DTH) (Mortaz et al., 2012).

Sel Th2 melepaskan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13, sitokin Th2 merangsang produksi antibodi yang berbeda, umumnya ditemukan

bersama respon antibodi yang penting dalam melawan infeksi organisme ekstraseluler (Ahmad, 2011; Mortaz et al., 2012).

Sel Th1 dan Th2 saling bergantian menghambat satu sama lain, IL-10 suatu produk sel Th2, menghambat perkembangan sel Th1 melalui kerja pada *antigen presenting cells* (APC), sedangkan IFN- γ , suatu produk sel dari sel Th1, efektor IFN- γ mengakibatkan kerentanan terhadap infeksi TB. *Mycobacterium tuberculosis* awalnya menginfeksi sel-sel inflamasi terutama makrofag dan sel-sel dendritik. *Mycobacterium tuberculosis* dikelilingi oleh molekul bagian luar yang kaya lipid sebagai kapsul yang melindungi bakteri ini dari radikal toksik dan enzim hidrolitik yang diproduksi sebagai pertahanan oleh makrofag dan sel-sel inflamasi. *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyebar ke makrofag sekitarnya yang sedang istirahat dan sel-sel lain untuk kemudian bereplikasi (Ahmad, 2011).

Makrofag yang diaktivasi oleh pajanan partikel inhalasi, memiliki aktifitas mikrobisidal kuat yang dapat membunuh basil dan mencegah infeksi TB, tetapi biasanya tidak dapat mengeliminasi infeksi seluruhnya. Mekanisme imunitas antimikrobakteri lain yang penting termasuk destruksi dari sel terinfeksi oleh limfosit sitolitik.

Walaupun sel T CD4⁺ diketahui sangat penting, kontribusi dari bagian lain sel T termasuk sel T- γ / delta (Y & T), sel Th17 dan bahkan sel T-CD4⁺ telah dijelaskan oleh banyak peneliti.

Infeksi awal dari MTB menyebabkan respon hipersensitifitas tertunda (DTH) yang ditandai oleh pembentukan lesi nekrotik kecil dengan perkejuan padat pada daerah tengah infeksi multiplikasi MTB terbatas pada lesi granulomatosa yang berkapsul (Nunes-Alves et al., 2014). Lesi granuloma terdiri dari limfosit T dan fagosit mononuklear dengan berbagai tingkat maturasi dan stimulasi. Setelah memulai reaksi hipersensitivitas tertunda dan pembentukan tuberkel, stimulasi makrofag oleh sel TCD4⁺ memungkinkan makrofag untuk membunuh basil di dalam lesi tuberkel. Aktivasi makrofag tampaknya merupakan langkah utama dari pertahanan yang didapat melawan MTB. Aktivasi makrofag oleh limfosit T merupakan mediator utama dan respon imun *cell mediated* melawan MTB. Sel TCD4⁺ adalah sel *T-helper* utama yang mensekresi tipe berbeda dari interleukin dalam aktivasi makrofag (Ahmad, 2011).

Sel *T-helper* dibutuhkan untuk menerima dan mengaktivasi makrofag dan monosit yang baru. Seperti telah ditunjukkan sebelumnya, sel Th1 memproduksi sitokin INF- γ dan IL-2 yang penting untuk aktivasi dari kerja antimikroba dan penting untuk respon DTH. INF- γ secara spesifik mengaktivasi dan merangsang makrofag untuk menelan dan membunuh mikobakterium lebih efektif (Nunes-Alves et al., 2014)

Limfosit T CD8⁺ menambah aktivasi makrofag dengan memproduksi INF- γ . Sel T CD8⁺ juga berfungsi sebagai sitolitik yang

memungkinkan untuk mengenali antigen mikobakterium yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas 1 pada permukaan makrofag yang terinfeksi. Limfosit T sitotoksik CD8⁺ (CTLs) juga dibutuhkan untuk melepaskan MTB intraseluler yang berdiam dalam makrofag terinfeksi (Nunes-Alves et al., 2014). Disamping itu, MTB juga mampu bertahan dalam makrofag, memberikan antigen metabolik untuk proses dalam presentasi dengan molekul kelas 1 pada permukaan makrofag (Alves CN et al., 2014).

Saat ini diketahui bahwa sel T CD4⁺ juga berperan dalam pertahanan *host* melawan infeksi MTB melalui aktivitas sitolitik. Sel T CD4⁺ juga dapat menyebabkan lisis baik makrofag yang terinfeksi dan tidak terinfeksi dan kemudian mengaktifkan makrofag yang dapat menghancurkan mikobakterium (Holland et al., 2016).

Sel T gamma/delta (γ/δ) berperan penting dalam pertahanan *host* melawan MTB. Sel-sel ini dapat menyebabkan lisis makrofag yang mengandung mikobakterium dan merupakan sumber IFN- γ yang merupakan trigger penting pada stadium awal respon imun terhadap TB (Holland et al., 2016).

Sel *natural killer* (NK) juga berperan penting dalam respon imun *host* terhadap MTB. Sel-sel ini dapat menyebabkan lisis sel *host* yang terinfeksi patogen MTB, ini menunjukkan kesamaan fungsi dengan limfosit T sitolitik spesifik (Holland et al., 2016).

Selanjutnya peranan dari sel Th17 dan IL-17. Data-data ini menunjukkan bahwa IL-23 penting untuk ekspresi respon sel Th17 dan IL-17 terhadap infeksi TB. Peranan spesifik IL-23 dibutuhkan untuk respon Th17 terhadap infeksi mikobakterium pada manusia. Tampaknya IL-17 dikenali sebagai sitokin inflamasi yang sanggup menginduksi kemokin dan memulai inflamasi, terutama dalam paru-paru, IL-17 dan IL-23 menginduksi influx neutrofil dan hemostasis dalam paru-paru yang terinfeksi MTB. Tampak jelas bahwa IL23 dan IL-17 bekerja dalam cara kompleks mengontrol inflamasi yang diinduksi oleh TB. Tidak mengherankan IL-17 dapat bekerja sebagai mediator dalam akumulasi makrofag dan memperantarai induksi kemokin CXCL yang berisi IL-17 (Ahmad, 2011; Nunes-Alves et al., 2014).

1. Imunitas Seluler *Mycobacterium tuberculosis*

1. Makrofag dan monosit

Makrofag merupakan sel efektor penting dalam imunitas terhadap bakteri intraseluler tetapi pada saat bersamaan dimanfaatkan sebagai sel host oleh sejumlah mikroorganisme seperti MTB. Kematian sel makrofag berperan penting dalam patogenesis TB. Agar MTB dapat menimbulkan infeksi, kuman tersebut harus masuk dalam makrofag alveoli setelah inhalasi aerosol. Makrofag dapat menelan bakteri tersebut melalui

berbagai reseptor fagositik. Sejumlah reseptor fagositik lain terlibat dalam masuknya MTB ke makrofag *complement toll-like* dan reseptor *mannose* (Kumar et al., 2008; Nunes-Alves et al., 2014).

Telah dilaporkan bahwa infeksi MTB yang disertai dengan respon inflamasi non spesifik diatur oleh mediator inflamasi yang diproduksi oleh makrofag yang diaktivasi dari berbagai signal diikuti penghantaran bakteri ke fagolisosom sebagai mekanisme untuk menghilangkan patogen intraseluler (Kumar et al., 2008).

Setelah fagositosis, MTB non patogenik di degradasi dengan keasaman fagosomal yang mengandung hidrolase yang aktif pada pH rendah. Kunci dari virulensi MTB adalah kemampuannya untuk mencegah penggabungan ATP/pompa proton ke dalam membran fagosom dan membatasi perlekatan vakuola dengan lisosom dalam makrofag yang istirahat, MTB menghalangi pematangan fagosom untuk menjamin replikasi dan kelangsungan hidup intraseluler (Ahmad, 2011).

Pada makrofag yang diaktifkan oleh IFN- γ , pematangan fagosom dihambat, kemungkinan melalui induksi dan penyilangan jalur autofagik.

Dalam fagolisosom, MTB kehilangan nutrisi penting seperti zat besi dan terpapar efektor mikrobisidal yang

disebabkan oleh makrofag yang teraktivasi IFN- γ seperti *antimicrobial peptides* (AMPs) dan oksigen atau nitrogen reaktif, produk dari NADPH oksidase dan *nitric oxide synthase* (NOS2) (Ahmad, 2011).

Disamping itu, makrofag juga bertanggung jawab dalam terjadi apoptosis yang diperantarai TNF- α dan melalui jalur kematian sel yang lain (Holland et al., 2016).

Apoptosis berperan terhadap pertahanan *host* dengan menghentikan pertumbuhan MTB melalui efek antimikroba langsung dan melalui basil MTB dan antigen yang terbungkus dalam badan apoptotik. Penelanan selanjutnya dari badan apoptotik melalui perekrutan makrofag baru dan DCs yang menyebabkan eradikasi infeksi dan induksi respon imun adaptif (Holland et al., 2016).

2. *Polymorphonuclear Cells* (PMN)

Neutrofil adalah sel yang dengan cepat direkrut pada infeksi MTB, dimana basil di fagosit dengan efektif. Neutrofil merupakan sel fagosit profesional yang berperan penting dalam banyak infeksi dan peningkatan neutrofil diobservasi dalam cairan BAL pasien MTB paru (Eum et al., 2010).

3. Respon Sel Dendritik / *Dendritic Cell Response* (DCs)

Peranan penting DCs dalam patogenesis MTB telah dijelaskan secara luas. *Dendritic cells response* subset lain merupakan APCs dari sistim imun bawaan paling poten yang memiliki kemampuan untuk merangsang limfosit T memori atau *naive*. *Dendritic cell response* terdapat dalam berbagai tingkat perkembangan, aktivasi dan maturasi yang ditentukan oleh modalitas fungsional dan fenotip berbeda. Setelah inhalasi, MTB difagositosis oleh makrofag alveola dan DCs yang terdapat dalam ruang alveoli paru-paru, DCs mampu melewati limfonodus lokal dan berhasil mempresentasikan antigen terhadap sel T yang menyebabkan CMI menjadi efektif (Ahmad, 2011; Mortaz et al., 2012).

Translokasi MTB ke limfonodus melalui DCs yang terinfeksi merupakan prekursor penting untuk aktivasi sel T. Setelah paparan DCs terhadap MTB IL-12 p70 dan IL-23 yang diinduksi berperan penting dalam patogenesis TB, selain itu DCs mengalami kematian sel setelah infeksi MTB diperlihatkan *in vitro*, seperti halnya makrofag, ini merupakan cara proteksi *host* melawan TB (Ahmad, 2011).

2. **Imunitas Humoral *Mycobacterium tuberculosis***

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, IFN- γ suatu sitokin inflamasi merangsang aktivitas mikroba makrofag dan mengatur

presentasi antigennya melalui molekul MHC kelas II dengan up-regulasi ekspresi protein dan mRNA-nya. IFN- γ juga dapat menginduksi autofag yaitu suatu mekanisme yang berperan penting dalam imunitas bawaan melawan mikroorganisme intraseluler. Sel TCD4⁺ - MHC tipe II, sel TCD8⁺ MHC kelas I dan makrofag penting dalam proteksi imun terhadap MTB dimana berkurangnya jumlah atau fungsi dari sel-sel ini menyebabkan reaktivasi infeksi dan sel T γ/α berperan penting dalam melindungi respon imun terhadap TB (Nunes-Alves et al., 2014).

Mycobacterium tuberculosis merupakan patogen intraseluler, obligat aerobik, predileksi pada jaringan paru yang kaya suplai oksigen. *Mycobacterium tuberculosis* masuk ke tubuh melalui sistem pernapasan. Basil menyebar dari tempat awal infeksi di paru dan kelenjar limfe regional (Nunes-Alves et al., 2014).

Tuberkulosis ekstra paru di pleura, limfatik, tulang, sistem genitourinaria, meninges, peritoneum atau kulit terjadi kira-kira 15% pada pasien TB. Imunitas MTB dihubungkan dengan aktivitas Th1 yang melibatkan pelepasan TNF- α , IFN- γ dan IL-12. Netralisasi TNF- α menyebabkan reaktivasi penyakit dan defek genetik dari reseptor untuk IFN- γ atau IL-12 yang berakibat meningkatnya kerentanan terhadap MTB (Holland et al., 2016).

Permulaan respon imun bawaan dimulai dengan pengenalan pola struktur yang disebut *pathogen associated molecular patterns*

(PAMPs). Pengenalan PAMPs dilakukan oleh reseptor yang mengkode kuman pada sel imun dinamakan *patterns recognition receptor* (PRRS) dectin dan TLR4 berperan dalam induksi IL-17 oleh TB, sitokin IL-10 yang disekresi oleh sel Th2 mempengaruhi makrofag dengan menekan produksi sitokin dan menurunkan aktifitas dan proliferasi sel Th1 dan ada penelitian memperkirakan bahwa IL-10 berperan penting dalam meningkatkan ketahanan hidup MTB dalam makrofag (Ahmad, 2011).

Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa limfosit T sitolitik dan IFN- γ yang mengaktifasi makrofag diperlukan untuk memberikan perlindungan imun terhadap MTB. IFN- γ adalah sitokin penting untuk proteksi imun tetapi kalau berlebihan merupakan juga mediator utama imunopatologi. Aktivasi masif makrofag dalam tuberkel oleh IFN- γ menyebabkan pelepasan konsentrasi enzim litik. Enzim ini menghancurkan sel-sel sekitarnya yang sehat dan membentuk bagian sirkular dari jaringan nekrotik (Nunes-Alves et al., 2014).

E. Klasifikasi Tuberkulosis

Terduga (*presumptive*) pasien TB adalah seseorang yang mempunyai keluhan atau gejala klinis mendukung TB (sebelumnya dikenal sebagai terduga TB) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a).

Pasien TB yang terkonfirmasi bakteriologis adalah pasien TB yang terbukti positif bakteriologi pada hasil pemeriksaan (contoh uji

bakteriologi adalah sputum, cairan tubuh dan jaringan) melalui pemeriksaan mikroskopis langsung, TCM TB, atau biakan. Termasuk dalam kelompok pasien ini adalah (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a):

1. Pasien TB paru BTA positif
2. Pasien TB paru hasil biakan MTB positif
3. Pasien TB paru hasil tes cepat MTB positif
4. Pasien TB ekstra paru terkonfirmasi secara bakteriologis, baik dengan BTA, biakan maupun tes cepat dari contoh uji jaringan yang terkena.
5. TB anak yang terdiagnosis dengan pemeriksaan bakteriologis.

Pasien TB terdiagnosis secara klinis adalah pasien yang tidak memenuhi kriteria terdiagnosis secara bakteriologis tetapi didiagnosis sebagai pasien TB aktif oleh dokter, dan diputuskan untuk diberikan pengobatan TB. Termasuk dalam kelompok pasien ini adalah:

1. Pasien TB paru BTA negatif dengan hasil pemeriksaan foto toraks mendukung TB.
2. Pasien TB paru BTA negatif dengan tidak ada perbaikan klinis setelah diberikan antibiotika non OAT, dan mempunyai faktor risiko TB
3. Pasien TB ekstra paru yang terdiagnosis secara klinis maupun laboratoris dan histopatologis tanpa konfirmasi bakteriologis.
4. TB anak yang terdiagnosis dengan sistim skoring

1. Berdasar hasil pemeriksaan dahak (basil tahan asam/BTA)

Tuberkulosis paru dibagi dalam (Indonesia, 2011; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a):

a. Tuberkulosis Paru BTA (+) :

- Sekurang-kurangnya 2 dari 3 spesimen dahak menunjukkan hasil BTA positif.
- Hasil pemeriksaan satu spesimen dahak menunjukkan BTA positif dan kelainan radiologik menunjukkan gambaran TB aktif.
- Hasil pemeriksaan satu spesimen dahak menunjukkan BTA positif dan biakan positif.

b. Tuberkulosis Paru BTA (-) :

- Hasil pemeriksaan dahak 3 kali menunjukkan BTA negatif, gambaran klinik dan kelainan radiologik menunjukkan TB aktif serta tidak respons dengan pemberian antibiotik spektrum luas.
- Hasil pemeriksaan dahak 3 kali menunjukkan BTA negatif dan biakan MTB positif.
- Jika belum ada hasil pemeriksaan dahak, tulis BTA belum diperiksa

Diagnosis TB dengan konfirmasi bakteriologis atau klinis dapat diklasifikasikan berdasarkan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a) :

1. Klasifikasi berdasarkan lokasi anatomis:

- a. TB paru adalah kasus TB yang melibatkan parenkim paru atau trakeobronkial. TB milier diklasifikasikan sebagai TB paru karena terdapat lesi di paru. Pasien yang mengalami TB paru dan ekstra paru harus diklasifikasikan sebagai kasus TB paru.
- b. TB ekstra paru adalah kasus TB yang melibatkan organ di luar parenkim paru seperti pleura, kelenjar getah bening, abdomen, saluran genitorurinary, kulit, sendi dan tulang, selaput otak. Kasus TB ekstra paru dapat ditegakkan secara klinis atau histologis setelah diupayakan semaksimal mungkin dengan konfirmasi bakteriologis.

2. Berdasarkan Tipe Penderita

Tipe penderita ditentukan berdasarkan riwayat pengobatan sebelumnya yaitu:

- a. Kasus baru : penderita yang belum pernah mendapat pengobatan dengan OAT atau sudah pernah menelan OAT kurang dari satu bulan (< dari 28 dosis bila memakai obat program)

Kasus dengan riwayat pengobatan adalah pasien yang pernah mendapatkan OAT 1 bulan atau lebih (>28 dosis bila memakai obat program). Kasus ini diklasifikasikan lebih lanjut berdasarkan hasil pengobatan terakhir sebagai berikut :

- b. Kasus kambuh adalah pasien yang sebelumnya pernah mendapatkan OAT dan dinyatakan sembuh atau pengobatan lengkap pada akhir pengobatan dan saat ini ditegakkan diagnosis TB episode kembali (karena reaktivasi atau episode baru yang disebabkan reinfeksi).
- c. Kasus pengobatan setelah gagal adalah pasien yang sebelumnya pernah mendapatkan OAT dan dinyatakan gagal pada akhir pengobatan.
- d. Kasus setelah *loss to follow up* adalah pasien yang pernah menelan OAT 1 bulan atau lebih dan tidak meneruskannya selama lebih dari 2 bulan berturut-turut dan dinyatakan *loss to follow up* sebagai hasil pengobatan.
- e. Kasus lain-lain adalah pasien sebelumnya pernah mendapatkan OAT dan hasil akhir pengobatannya tidak diketahui atau tidak didokumentasikan

3. Berdasarkan hasil pemeriksaan uji kepekaan obat

Berdasarkan hasil uji kepekaan, klasifikasi TB terdiri dari:

- a. Monoresisten: resistensi terhadap salah satu jenis OAT lini pertama.
- b. Poliresisten: resistensi terhadap lebih dari satu jenis OAT lini pertama selain isoniazid (H) dan rifampisin (R) secara bersamaan.

- c. *Multidrug resistant* (TB MDR) : minimal resistan terhadap isoniazid (H) dan rifampisin (R) secara bersamaan.
- d. *Extensive drug resistant* (TB XDR) : TB-MDR yang juga resistan terhadap salah satu OAT golongan fluorokuinolon dan salah satu dari OAT lini kedua jenis suntikan (kanamisin, kapreomisin, dan amikasin).
- e. *Rifampicin resistant* (TB RR) : terbukti resistan terhadap Rifampisin baik menggunakan metode genotip (tes cepat) atau metode fenotip (konvensional), dengan atau tanpa resistensi terhadap OAT lain yang terdeteksi. Termasuk dalam kelompok TB RR adalah semua bentuk TB MR, TB PR, TB MDR dan TB XDR yang terbukti resistan terhadap rifampisin.

4. Klasifikasi berdasarkan status HIV

- a. Kasus TB dengan HIV positif adalah kasus TB terkonfirmasi bakteriologis atau terdiagnosis klinis pada pasien yang memiliki hasil tes HIV-positif, baik yang dilakukan pada saat penegakan diagnosis TB atau ada bukti bahwa pasien telah terdaftar di register HIV (register pra ART atau register ART).
- b. Kasus TB dengan HIV negatif adalah kasus TB terkonfirmasi bakteriologis atau terdiagnosis klinis pada pasien yang memiliki hasil negatif untuk tes HIV yang dilakukan pada saat ditegakkan diagnosis TB. Bila pasien ini diketahui HIV positif di kemudian hari harus kembali disesuaikan klasifikasinya.

c. Kasus TB dengan status HIV tidak diketahui adalah kasus TB terkonfirmasi bakteriologis atau terdiagnosis klinis yang tidak memiliki hasil tes HIV dan tidak memiliki bukti dokumentasi telah terdaftar dalam register HIV. Bila pasien ini diketahui HIV positif dikemudian hari harus kembali disesuaikan klasifikasinya.

F. Diagnosis Tuberkulosis

Diagnosis tuberkulosis dapat ditegakkan berdasarkan gejala klinik, pemeriksaan fisik/jasmani, pemeriksaan bakteriologik, radiologik dan pemeriksaan penunjang lainnya (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

1. Gejala klinik

Gejala klinik TB dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu gejala respiratorik (atau gejala organ yang terlibat) dan gejala sistemik (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

1. Gejala respiratorik

- batuk \geq 3 minggu
- batuk darah
- sesak napas
- nyeri dada.

Gejala respiratorik ini sangat bervariasi, dari mulai tidak ada gejala sampai gejala yang cukup berat tergantung dari luas lesi. Kadang penderita terdiagnosis pada saat *medical check-up*. Bila bronkus belum terlibat dalam proses penyakit, maka penderita mungkin tidak ada gejala batuk. Batuk yang pertama terjadi karena iritasi bronkus, dan selanjutnya batuk diperlukan untuk membuang dahak ke luar.

Gejala TB ekstra paru tergantung dari organ yang terlibat, misalnya pada limfadenitis tuberkulosa akan terjadi pembesaran yang lambat dan tidak nyeri dari kelenjar getah bening, pada meningitis tuberkulosa akan terlihat gejala meningitis, sementara pada pleuritis tuberkulosa terdapat gejala sesak napas dan kadang nyeri dada pada sisi yang rongga pleuranya terdapat cairan (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

2. Gejala sistemik

- demam
- gejala sistemik lain : malaise, keringat malam, anoreksia, berat badan menurun (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

2. Pemeriksaan Fisik

Pada pemeriksaan jasmani, kelainan yang akan dijumpai tergantung dari organ yang terlibat.

Pada TB paru, kelainan yang didapat tergantung luas kelainan struktur paru. Pada permulaan (awal) perkembangan penyakit umumnya tidak (atau sulit sekali) menemukan kelainan. Kelainan paru pada umumnya terletak di daerah lobus superior terutama daerah apex dan segmen posterior, serta daerah apex lobus inferior. Pada pemeriksaan jasmani dapat ditemukan antara lain suara napas bronkial, amforik, suara napas melemah, ronki basah, tanda-tanda penarikan paru, diafragma & mediastinum.

Pada pleuritis tuberkulosa, kelainan pemeriksaan fisik tergantung dari banyaknya cairan di rongga pleura. Pada perkusi ditemukan pekak, pada auskultasi suara napas yang melemah sampai tidak terdengar pada sisi yang terdapat cairan.

Pada limfadenitis tuberkulosa, terlihat pembesaran kelenjar getah bening, tersering di daerah leher (pikirkan kemungkinan metastasis tumor), kadang-kadang di daerah ketiak. Pembesaran kelenjar tersebut dapat menjadi *cold abscess* (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

3. Pemeriksaan Bakteriologik

1. Bahan pemeriksaan.

Pemeriksaan bakteriologik untuk menemukan kuman TB mempunyai arti yang sangat penting dalam menegakkan diagnosis. Bahan untuk pemeriksaan bakteriologik ini dapat berasal dari dahak, cairan pleura, liquor cerebrospinal, bilasan bronkus, bilasan

lambung, kurasan bronkoalveolar (*bronchoalveolar lavage*/BAL), urin, faeces dan jaringan biopsi (termasuk biopsi jarum halus/BJH)

2. Cara pengumpulan dan pengiriman bahan

Cara pengambilan dahak 3 kali, setiap pagi 3 hari berturut-turut atau dengan cara :

- sewaktu/spot (dahak sewaktu saat kunjungan)
- dahak pagi (keesokan harinya)
- sewaktu/spot (pada saat mengantarkan dahak pagi).

Bahan pemeriksaan / spesimen yang berbentuk cairan dikumpulkan / ditampung dalam pot yang bermulut lebar, berpenampang 6 cm atau lebih dengan tutup berulir, tidak mudah pecah dan tidak bocor. Apabila ada fasiliti, spesimen tersebut dapat dibuat sediaan apus pada gelas objek (difiksasi) sebelum dikirim ke laboratorium.

Bahan pemeriksaan hasil BJH, dapat dibuat sediaan apus kering di gelas objek atau untuk kepentingan biakan dan uji resistensi dapat ditambahkan NaCl 0,9% 3 – 5 ml sebelum dikirim ke laboratorium. Spesimen dahak yang ada dalam pot (jika pada gelas objek dimasukkan ke dalam kotak sediaan) yang akan dikirim ke laboratorium, harus dipastikan telah tertulis identitas penderita yang sesuai dengan formulir permohonan pemeriksaan laboratorium. Sebagai catatan, bila terdapat fasilitas radiologik dan gambaran radiologik menunjukkan tuberkulosis aktif, maka hasil

pemeriksaan dahak 1 kali positif, 2 kali negatif tidak perlu diulang (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

4. Pemeriksaan biakan kuman

Pemeriksaan biakan MTB dengan metode konvensional ialah dengan cara :

- *Egg base media* (Lowenstein-Jensen, Ogawa, Kudoh)
- *Agar base media* : Middle brook

Melakukan biakan dimaksudkan untuk mendapatkan diagnosis pasti, dan dapat mendeteksi MTB dan juga *Mycobacterium other than tuberculosis* (MOTT). Untuk mendeteksi MOTT dapat digunakan beberapa cara, baik dengan melihat cepatnya pertumbuhan, menggunakan uji nikotinamid, uji niasin maupun pencampuran dengan cyanogen bromide serta melihat pigmen yang timbul (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

5. Pemeriksaan Radiologik

Pemeriksaan standar ialah foto toraks PA dengan atau tanpa foto lateral. Pemeriksaan lain atas indikasi: foto apiko-lordotik, oblik, CT-Scan. Pada pemeriksaan foto toraks, TB dapat memberi gambaran bermacam-macam bentuk (multiform). Gambaran radiologik yang dicurigai sebagai lesi TB aktif (Gengenbacher and Kaufmann, 2012):

- Bayangan berawan / nodular di segmen apikal dan posterior lobus atas paru dan segmen superior lobus bawah.
- Kaviti, terutama lebih dari satu, dikelilingi oleh bayangan opak berawan atau nodular.
- Bayangan bercak milier.
- Efusi pleura unilateral (umumnya) atau bilateral (jarang).

Gambaran radiologik yang dicurigai lesi TB inaktif (Gengenbacher and Kaufmann, 2012):

- Fibrotik pada segmen apikal dan atau posterior lobus atas.
- Kalsifikasi atau fibrotik.
- Kompleks ranke.
- Fibrotoraks/Fibrosis parenkim paru dan atau penebalan pleura.

Luluh Paru (*Destroyed Lung*) (Gengenbacher and Kaufmann, 2012):

- Gambaran radiologik yang menunjukkan kerusakan jaringan paru yang berat, biasanya secara klinis disebut luluh paru. Gambaran radiologik luluh paru terdiri dari atelektasis, multikaviti dan fibrosis parenkim paru. Sulit untuk menilai aktiviti lesi atau penyakit hanya berdasarkan gambaran radiologik tersebut.
- Perlu dilakukan pemeriksaan bakteriologik untuk memastikan aktiviti proses penyakit.

Luas lesi yang tampak pada foto toraks untuk kepentingan pengobatan dapat dinyatakan sbb (terutama pada kasus BTA dahak negatif) (Gengenbacher and Kaufmann, 2012):

- Lesi minimal, bila proses mengenai sebagian dari satu atau dua paru dengan luas tidak lebih dari volume paru yang terletak di atas *chondrosternal junction* dari iga kedua depan dan prosesus spinosus dari vertebra torakalis 4 atau korpus vertebra torakalis 5 (sela iga 2) dan tidak dijumpai kaviti
- Lesi luas Bila proses lebih luas dari lesi minimal.

6. Pemeriksaan Penunjang Lainnya

Salah satu masalah dalam mendiagnosis pasti TB adalah lamanya waktu yang dibutuhkan untuk pembiakan kuman TB secara konvensional. Dalam perkembangan kini ada beberapa teknik baru yang dapat mengidentifikasi kuman TB secara lebih cepat (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

1. *Polymerase chain reaction (PCR)*

Pemeriksaan PCR adalah teknologi canggih yang dapat mendeteksi DNA, termasuk DNA MTB. Salah satu masalah dalam pelaksanaan teknik ini adalah kemungkinan kontaminasi. Cara pemeriksaan ini telah cukup banyak dipakai, kendati masih memerlukan ketelitian dalam pelaksanaannya.

Hasil pemeriksaan PCR dapat membantu untuk menegakkan diagnosis sepanjang pemeriksaan tersebut dikerjakan dengan cara yang benar dan sesuai standar.

Apabila hasil pemeriksaan PCR positif sedangkan data lain tidak ada yang menunjang kearah diagnosis TB, maka hasil tersebut tidak dapat dipakai sebagai pegangan untuk diagnosis TB.

Pada pemeriksaan deteksi MTB tersebut diatas, bahan / spesimen pemeriksaan dapat berasal dari paru maupun luar paru sesuai dengan organ yang terlibat (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

2. Pemeriksaan serologi

Dengan berbagai metoda antara lain (Gengenbacher and Kaufmann, 2012):

- *Enzym linked immunosorbent assay (ELISA)*

Teknik ini merupakan salah satu uji serologi yang dapat mendeteksi respon humoral berupa proses antigen-antibodi yang terjadi. Beberapa masalah dalam teknik ini antara lain adalah kemungkinan antibodi menetap dalam waktu yang cukup lama.

- Mycodot

Uji ini mendeteksi antibodi antimikobakterial di dalam tubuh manusia. Uji ini menggunakan antigen lipoarabinomannan (LAM) yang direkatkan pada suatu alat yang berbentuk sisir plastik. Sisir plastik ini kemudian dicelupkan ke dalam serum penderita,

dan bila di dalam serum tersebut terdapat antibodi spesifik anti LAM dalam jumlah yang memadai yang sesuai dengan aktivitas penyakit, maka akan timbul perubahan warna pada sisir yang dapat dideteksi dengan mudah

– Uji peroksidase anti peroksidase (PAP)

Uji ini merupakan salah satu jenis uji yang mendeteksi reaksi serologi yang terjadi.

– *Immunochromatographic tuberculosis (ICT)*

Uji ICT TB adalah uji serologik untuk mendeteksi antibodi MTB dalam serum. Uji ICT TB merupakan uji diagnostik TB yang menggunakan 5 antigen spesifik yang berasal dari membran sitoplasma MTB, diantaranya antigen MTB 38 kDa. Kelima antigen tersebut diendapkan dalam bentuk 4 garis melintang pada membran immunokromatografik (2 antigen diantaranya digabung dalam 1 garis) disamping garis kontrol. Serum yang akan diperiksa sebanyak 30 µl diteteskan ke bantalan warna biru, kemudian serum akan berdifusi melewati garis antigen. Apabila serum mengandung antibodi IgG terhadap MTB, maka antibodi akan berikatan dengan antigen dan membentuk garis warna merah muda. Uji dinyatakan positif bila setelah 15 menit terbentuk garis kontrol dan minimal satu dari empat garis antigen pada membran.

Dalam menginterpretasi hasil pemeriksaan serologi yang diperoleh, para klinisi harus hati hati karena banyak variabel yang mempengaruhi kadar antibodi yang terdeteksi.

Saat ini pemeriksaan serologi belum bisa dipakai sebagai pegangan untuk diagnosis.

3. Pemeriksaan BACTEC

Dasar teknik pemeriksaan biakan dengan BACTEC ini adalah metode radiometrik. *Mycobacterium tuberculosis* memetabolisme asam lemak yang kemudian menghasilkan CO₂ yang akan dideteksi *growth index*nya oleh mesin ini. Sistem ini dapat menjadi salah satu alternatif pemeriksaan biakan secara cepat untuk membantu menegakkan diagnosis (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

4. Pemeriksaan Cairan Pleura

Pemeriksaan analisis cairan pleura dan uji Rivalta cairan pleura perlu dilakukan pada penderita efusi pleura untuk membantu menegakkan diagnosis. Interpretasi hasil analisis yang mendukung diagnosis tuberkulosis adalah uji Rivalta positif dan kesan cairan eksudat, serta pada analisis cairan pleura terdapat sel limfosit dominan dan glukosa rendah (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

5. Pemeriksaan histopatologi jaringan

Bahan histopatologi jaringan dapat diperoleh melalui biopsi paru dengan *trans bronchial lung biopsy* (TBLB), *trans thoracal biopsy* (TTB), biopsi paru terbuka, biopsi pleura, biopsi kelenjar getah bening dan biopsi organ lain diluar paru. Dapat pula dilakukan biopsi aspirasi dengan jarum halus (biopsi jarum halus/BJH). Pemeriksaan biopsi dilakukan untuk membantu menegakkan diagnosis, terutama pada tuberkulosis ekstra paru.

Diagnosis pasti infeksi TB didapatkan bila pemeriksaan histopatologi pada jaringan paru atau jaringan diluar paru memberikan hasil berupa granuloma dengan perkejuan (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

6. Pemeriksaan darah

Hasil pemeriksaan darah rutin kurang menunjukkan indikator yang spesifik untuk tuberkulosis. Laju endap darah (LED) jam pertama dan kedua sangat dibutuhkan. Data ini sangat penting sebagai indikator tingkat kestabilan keadaan nilai keseimbangan biologik penderita, sehingga dapat digunakan untuk salah satu respon terhadap pengobatan penderita serta kemungkinan sebagai predeteksi tingkat penyembuhan penderita. Demikian pula kadar limfosit bisa menggambarkan biologik/daya

tahan tubuh penderita, yaitu dalam keadaan supresi/tidak. LED sering meningkat pada proses aktif, tetapi laju endap darah yang normal tidak menyingkirkan TB. Limfositpun kurang spesifik (Gengenbacher and Kaufmann, 2012).

7. Uji tuberkulin

Pemeriksaan ini sangat berarti dalam usaha mendeteksi infeksi TB di daerah dengan prevalensi TB rendah. Di Indonesia dengan prevalensi TB yang tinggi, pemeriksaan uji tuberkulin sebagai alat bantu diagnostik kurang berarti, apalagi pada orang dewasa. Uji ini akan mempunyai makna bila didapatkan konversi dari uji yang dilakukan satu bulan sebelumnya atau apabila kepositifan dari uji yang didapat besar sekali atau bula.

Pada pleuritis tuberkulosa uji tuberkulin kadang negatif, terutama pada malnutrisi dan infeksi HIV. Jika awalnya negatif mungkin dapat menjadi positif jika diulang 1 bulan kemudian.

Sebenarnya secara tidak langsung reaksi yang ditimbulkan hanya menunjukkan gambaran reaksi tubuh yang analog dengan: a) reaksi peradangan dari lesi yang berada pada target organ yang terkena infeksi atau b) status respon imun individu yang tersedia bila menghadapi agent dari basil tahan asam yang bersangkutan (MTB) (Campbell and Bah-Sow, 2006).

G. Penatalaksanaan Tuberkulosis

Pengobatan tuberkulosis terbagi menjadi 2 fase yaitu fase intensif (2 – 3 bulan) dan fase lanjutan 4 atau 7 bulan. Paduan obat yang digunakan terdiri dari paduan obat utama dan tambahan.

1. Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

Obat yang dipakai (Indonesia, 2011; Istiantoro and Setiabuddy, 2007; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a)

1. Jenis obat utama (lini 1) yang digunakan adalah:

- Rifampisin
- INH
- Pirazinamid
- Streptomisin
- Etambutol

2. Kombinasi dosis tetap (*fixed dose combination*) terdiri dari :

- Empat obat antituberkulosis dalam satu tablet, yaitu rifampisin 150 mg, isoniazid 75 mg, pirazinamid 400 mg dan etambutol 275 mg.
- Tiga obat antituberkulosis dalam satu tablet, yaitu rifampisin 150 mg, isoniazid 75 mg dan pirazinamid. 400 mg.

3. Jenis obat tambahan lainnya (lini 2) :

- Kanamisin

- Kuinolon
- Obat lain masih dalam penelitian; makrolid, amoksisilin + asam klavulanat
- Derivat rifampisin dan INH

Dosis OAT (Indonesia, 2011; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020a):

- Rifampisin : 10 mg/ kg BB, maksimal 600mg 2-3X/ minggu ;
atau BB > 60 kg : 600 mg ; BB 40-60 kg : 450 mg ; BB <40 kg :
300 mg Dosis intermiten 600 mg / kali
- INH : 5 mg/kg BB, maksimal 300mg ; 10 mg/kg BB 3x/minggu ;
15 mg/kg BB 2x/minggu ; atau 300 mg/hari untuk dewasa ;
Intermiten : 600 mg/kali.
- Pirazinamid : fase intensif 25 mg/kg BB, 35 mg/kg BB
3x/minggu, 50 mg/kg BB 2x/minggu ; atau BB >60 kg : 1500
mg BB 40 – 60 kg : 1 000 mg BB < 40 kg : 750 mg.
- Etambutol : fase intensif 20 mg/kg BB, fase lanjutan 15 mg/kg
BB, 30mg/kg BB 3x/minggu, 45 mg/kg BB 2x/minggu ; atau BB
>60kg : 1500 mg BB 40 – 60 kg : 1000 mg BB <40 kg : 750 mg
; Dosis intermiten 40 mg/kgBB/kali.
- Streptomisin : 15mg/kgBB atau BB >60kg : 1000mg BB 40 - 60
kg : 750 mg BB < 40 kg : sesuai BB.
- Kombinasi dosis tetap : rekomendasi WHO 1999 untuk
kombinasi dosis tetap, penderita hanya minum obat 3 – 4 tablet

sehari selama fase intensif, sedangkan fase lanjutan dapat menggunakan kombinasi dosis 2 obat antituberkulosis seperti yang selama ini telah digunakan sesuai dengan pedoman pengobatan.

Pada kasus yang mendapat obat kombinasi dosis tetap tersebut, bila mengalami efek samping serius harus dirujuk ke rumah sakit / fasilitas yang mampu menanganinya.

Sebagian besar penderita TB dapat menyelesaikan pengobatan tanpa efek samping. Namun sebagian kecil dapat mengalami efek samping, oleh karena itu pemantauan kemungkinan terjadinya efek samping sangat penting dilakukan selama pengobatan. Efek samping yang terjadi dapat ringan atau berat, bila efek samping ringan dan dapat diatasi dengan obat simtomatik maka pemberian OAT dapat dilanjutkan (Indonesia, 2011; Smith, 2003)

a. Isoniazid (INH)

Efek samping ringan dapat berupa tanda-tanda keracunan pada syaraf tepi, kesemutan, rasa terbakar di kaki dan nyeri otot. Efek ini dapat dikurangi dengan pemberian piridoksin dengan dosis 100 mg/hari atau dengan vitamin B kompleks. Pada keadaan tersebut pengobatan dapat diteruskan. Kelainan lain ialah menyerupai defisiensi piridoksin (sindrom pellagra).

Efek samping berat dapat berupa hepatitis yang dapat timbul pada kurang lebih 0,5% penderita. Bila terjadi hepatitis imbas obat atau ikterik, hentikan OAT dan pengobatan sesuai dengan pedoman TB pada keadaan khusus.

b. Rifampisin

- Efek samping ringan yang dapat terjadi dan hanya memerlukan pengobatan simtomatik ialah :
 - Sindrom flu berupa demam, menggigil dan nyeri tulang.
 - Sindrom perut berupa sakit perut, mual, tidak nafsu makan, muntah kadang-kadang diare.
 - Sindrom kulit seperti gatal-gatal kemerahan.
- Efek samping yang berat tapi jarang terjadi ialah :
 - Hepatitis imbas obat atau ikterik, bila terjadi hal tersebut OAT harus distop dulu dan penatalaksanaan sesuai pedoman TB pada keadaan khusus.
 - Purpura, anemia hemolitik yang akut, syok dan gagal ginjal. Bila salah satu dari gejala ini terjadi, rifampisin harus segera dihentikan dan jangan diberikan lagi walaupun gejalanya telah menghilang

- Sindrom respirasi yang ditandai dengan sesak napas

Rifampisin dapat menyebabkan warna merah pada air seni, keringat, air mata, air liur. Warna merah tersebut terjadi karena roses metabolisme obat dan tidak berbahaya. Hal ini harus diberitahukan kepada penderita agar dimengerti dan tidak perlu khawatir.

c. Pirazinamid

Efek samping utama ialah hepatitis imbas obat (penatalaksanaan sesuai pedoman TB pada keadaan khusus). Nyeri sendi juga dapat terjadi (beri aspirin) dan kadang-kadang dapat menyebabkan serangan *arthritis Gout*, hal ini kemungkinan disebabkan berkurangnya ekskresi dan penimbunan asam urat. Kadang-kadang terjadi reaksi demam, mual, kemerahan dan reaksi kulit yang lain.

d. Etambutol

Etambutol dapat menyebabkan gangguan penglihatan berupa berkurangnya ketajaman, buta warna untuk warna merah dan hijau. Meskipun demikian keracunan okuler tersebut tergantung pada dosis yang dipakai, jarang sekali

terjadi bila dosisnya 15 – 25 mg/kg BB perhari atau 30 mg/kg BB yang diberikan 3x/minggu. Gangguan penglihatan akan kembali normal dalam beberapa minggu setelah obat dihentikan. Sebaiknya etambutol tidak diberikan pada anak karena risiko kerusakan okuler sulit untuk dideteksi

e. Streptomisin

Efek samping utama adalah kerusakan syaraf kedelapan yang berkaitan dengan keseimbangan dan pendengaran. Risiko efek samping tersebut akan meningkat seiring dengan peningkatan dosis yang digunakan dan umur penderita.

H. **Gen *Mannose Binding Lectin***

Mannose-binding lectin (MBL) adalah molekul pengenalan pola yang berasal dari sistem imun bawaan. *Mannose-binding lectin* termasuk dalam kelompok protein kolektin dimana lektin (pengenalan karbohidrat) ditemukan dalam kumpulan struktur kolagen. Pada tubuh manusia, protein-protein ini termasuk MBL serum, lung surfactan protein A (SP-A), lung surfactan protein D (SP-D). *Mannose-binding lectin* berikatan dengan sejumlah gula termasuk N-acetyl-D-glucosamine, mannose, N-acetyl-mannosamine, fucose dan glukosa.

Hal ini memungkinkan protein untuk berinteraksi dengan berbagai pilihan virus, bakteri, yeast, jamur/fungi dan protozoa yang memiliki komponen gula-gula tersebut (Turner, 2003).

Tidak seperti jenis kolektin lainnya, MBL terikat pada permukaan mikroba mampu mengaktifkan sistem komplemen pada antibodi C1 *independent manner* (modul penargetan membran). Aktivasi ini dimediasi oleh kompleks MBL dengan serine protease yang disebut MBL-related serine protease 2 (MASP-2), yang secara khusus memotong C4 dan C2 untuk membuat enzim pengubah C3. *Mannose-binding lectin* juga dapat berinteraksi langsung dengan reseptor permukaan sel sehingga memicu terjadinya *opsonophagocytosis* oleh jalur komplemen bebas (Turner, 2003).

Hal ini mengartikan bahwa MBL memainkan peranan penting dalam tahap awal respon imun primer terhadap patogen yang mengandung gula. Hal ini memberikan host dilengkapi pertahanan lini pertama sebelum sistem imun adaptif diaktifkan dan pada anak mungkin diperlukan antara umur 6 dan 18 bulan ketika sistim adaptif masih belum matang (Turner, 2003).

Kekurangan MBL yang paling umum terjadi pada pasien dengan imunodefisiensi dan timbul terutama berasal dari tiga mutasi titik tunggal pada ekson 1 gen *MBL2*. Mutasi menyebabkan kegagalan untuk mengumpulkan protein multimerik yang berfungsi penuh (Eisen, 2010).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa kekurangan MBL dapat meningkatkan kerentanan seseorang terkena penyakit menular. Salah satu contohnya hubungan infeksi saluran pernapasan akut dengan defisiensi MBL pada anak usia dini (Koch et al., 2001). Sebaliknya, ada bukti bahwa pada beberapa parasit intraseluler, defisiensi MBL mungkin bersifat protektif dan mungkin menjelaskan tingginya frekuensi mutasi MBL di Afrika Sub-Sahara dan Amerika Selatan.

Fakta menunjukkan bahwa hubungan antara tingkat MBL dan penyakit cukup rumit. Sebagai contoh, kadar protein tampak mempengaruhi tingkat keparahan beberapa penyakit. Mekanisme dimana MBL memberikan tersebut tidak jelas tetapi kemungkinan berpengaruh pada modulasi sitokin proinflamasi (Eisen, 2010).

Mannose-binding lectin / mannan-binding lectin / mannose-binding protein adalah komponen penting dari sistem imun bawaan dan merupakan 1 dari 30 atau lebih protein dari sistem komponen. Penelitian selama dekade terakhir menunjukkan bahwa MBL menyediakan jalur ketiga yang berbeda dari aktivasi komplemen dan studi filogenetik menunjukkan bahwa mungkin telah ada jalur pertama yang berkembang. Secara biologis jalur ini juga menunjukkan tanda-tanda klinis dari keadaan defisiensi. Dalam banyak populasi manusia, defisiensi MBL relatif umum dan telah banyak penelitian yang mencoba menghubungkan keadaan defisiensi dengan presentasi klinis

tertentu. Beberapa karakteristik struktural dan fungsional MBL ditinjau secara singkat bersama dengan kumpulan tanda klinis ini (Denholm et al., 2010; Eisen, 2010)

1. Struktur *Mannose-Binding Lectin*

Berdasarkan strukturnya, MBL termasuk dalam sub-famili protein yang disebut kolektin karena memiliki 2 bagian yakni kolagen dan lektin. Pada tubuh manusia, ada 2 komponen utama lainnya, yaitu protein surfaktan paru (SP-A) dan protein surfaktan paru D (SP-D). Ketiga protein tersebut merupakan makromolekul besar dimana MBL dan SP-A memiliki struktur seperti *bouquet* yang mirip dengan C1q (Garred et al., 2006).

Namun dalam kasus MBL ditemukan berbagai struktur oligomer mulai dari dimer hingga hexamer. Oligamer didasarkan pada sub-unit yang terdiri dari 3 rantai peptide identik 32 kDa. Setiap rantai ditandai oleh domain lektin (atau pengenal karbohidrat), daerah leher yang hidrofobik, daerah kolagen dan daerah terminal-N yang kaya sistein. Bagian kolagen dari 3 rantai tersebut berinteraksi untuk menghasilkan triple helix. Di daerah leher, setiap rantai menggunakan struktur kumparan melingkar dan pada ujung terminal karboksi, domain lektin menunjukkan karakteristik dari protein globular. Setiap domain mengikat ion kalsium yang kemudian dapat membuat ikatan koordinasi dengan gugus 3 dan 4-hidroksil dari gula

yang sesuai seperti N-asetil-D-glukosamin, N-asetil-mannnosamin, fukosa dan glukosa (Turner, 2003).

Pola berulang kelompok gula yang mendekorasi permukaan mikroba dianggap setiap target ideal untuk interaksi MBL karena 3 domain lektin yang dikelompokkan ke dalam setiap susunan sub-unit memberikan pelat pengikat yang relatif datar dengan jarak pemisah 45 Å yang konstan antara 3 lokasi pada MBL yang dimiliki manusia. Meskipun afinitas dari masing-masing interaksi lektin dan gula hanya 10^{-3} M, di beberapa situs, fakta bahwa protein mampu mengikat, secara bersamaan memastikan adanya aviditas fungsional yang tinggi untuk pengikatan tersebut (Turner, 2003).

2. Fungsi *Mannose-Binding Lectin* Dalam Mengikat Mikroorganisme

Mannose-Binding Lectin telah terbukti mengikat berbagai mikroorganisme dan dalam beberapa kasus ada korelasi yang baik dengan fitur struktural yang ada. Namun demikian, tidak mungkin untuk mengeksplorasi biokimia yang ada dan membuat prediksi tentang interaksi dengan masing-masing mikroorganisme.

Dalam upaya menggambarkan adanya hubungan dari fitur struktural yang berbeda dari mikroorganisme penentuan ikatan MBL, maka kelompok kami telah melakukan percobaan yang meluas mengenai patogen *Neisseria*. Ketersediaan berbagai mutan isogenik dari *Neisseria meningitidis* telah memungkinkan untuk mengatasi

masalah-masalah seperti peranan kapsul dan terminal asam *sialic*. Dari penelitian ini, kami menyimpulkan bahwa organisme dengan asam *sialic* tahan terhadap serangan MBL, sedangkan organisme tanpa asam *sialic* rentan. Sebaliknya ada atau tidaknya kapsul tidak berpengaruh pada struktur lipooligosakarida (Turner, 2003).

3. Fungsi *Mannose-Binding Lectin* Dalam Mekanisme Efektor

Penelitian selama dekade terakhir telah menunjukkan bahwa MBL adalah komponen utama dari sistem kekebalan tubuh bawaan. Ada bukti bahwa protein memiliki setidaknya 4 fungsi beda ; 1) aktivasi komplemen ; 2) promosi opsonofagositosis (komplementer) ; 3) modulasi peradangan ; dan 4) penyebab apoptosis. Dari jumlah tersebut, aktivasi komplemen telah diteliti, sedangkan mekanisme yang mendasari opsonofagositosis dan inflamasi yang di mediasi MBL tidak dapat dijelaskan. Berbagai fungsi ini diilustrasikan secara skematis (gambar 3) (Eddie Ip et al., 2009).

Aktivasi komplemen yang di mediasi MBL mewakili jalur ketiga yang berbeda dari jalur utama dan alternatif. Salah satu dariki kumpulan *serine protease* terkait MBL (MASPs) yang dikenal sebagai MASP-1, MASP-2 dan MASP-3 bersama dengan versi terpotong MASP-2 yang disebut Map19 telah terbukti berhubungan

MBL, tetapi bukti yang tersedia menunjukkan bahwa MASP-2 lebih berperan penting dalam aktivasi komplemen (Eddie Ip et al., 2009).

Komplemen MBL-MASP-2 menjadi aktif ketika terikat pada permukaan mikroba yang menunjukkan larik gula yang sesuai. MASP-2 kemudian mengekspresikan aktivitas enzim identik dengan C1 esterase yang menghasilkan pembelahan sekuensial C4 dan C2. Fragmen C4b yang dihasilkan mengikat secara kovalen ke permukaan mikroba dan kemudian berinteraksi dengan komponen C2 yang juga di belah oleh MASP-2. Kompleks C4b2a yang dibuat menggambarkan aktivitas perubahan C3 yang tidak dapat dibedakan dari perubahan C3 pada jalur utama dan alternatif. Oleh karena itu, C4b2a dapat menghasilkan fragmen C3b opsonik dan merekrut proses amplifikasi dari sistem komplemen. Aktivitas fungsional yang penting ini menjelaskan mengapa defisiensi MBL pertama kali diidentifikasi dalam hubungannya dengan disfungsi opsonik pada anak-anak dengan infeksi berulang (Garred et al., 2006).

Pemicu opsonofagositosis oleh MBL telah dikaitkan dengan berbagai reseptor atau protein pengikat MBL termasuk cC1qR/*calreticulin* dan CR1. Namun, kesepakatan mengenai MBL yang dapat bertindak sebagai opsonin langsung atau hanya meningkatkan jalur lain dari komplemen dan / atau fagositosis yang di mediasi-antibodi. Data terbaru kami menunjukkan bahwa MBL

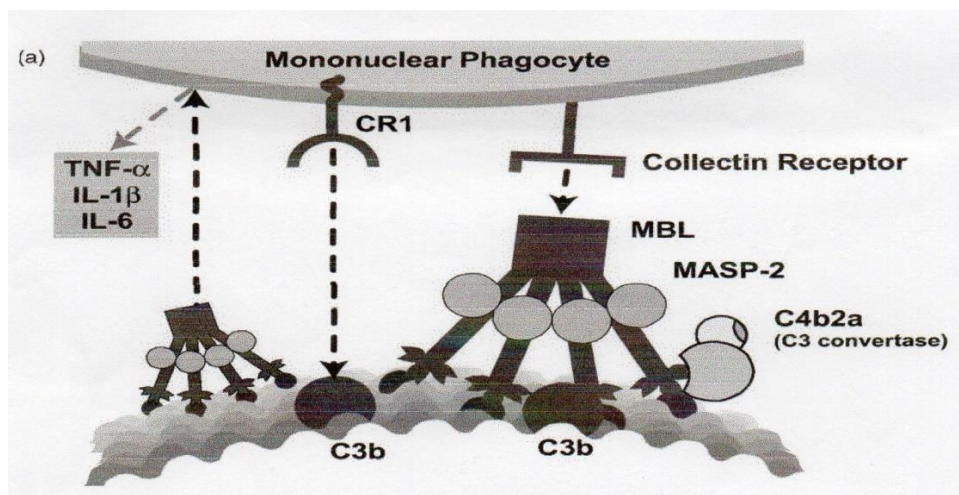
bertindak dengan cara merangsang penyerapan organisme melalui pengaturan sitoskeletal aktin dalam kehadiran *RhoGTPases* yang aktif (Turner, 2003).

Selain itu, aktivitas fungsional ini membutuhkan interaksi MBL yang mempengaruhi antara organisme dan fagosit. Ada semakin banyak bukti dari studi hubungan MBL-penyakit yang menunjukkan protein memiliki peran utama dalam modulasi peradangan. Mekanisme tersebut belum jelas tetapi beberapa penelitian terbaru kami menunjukkan bahwa protein memberikan efek kompleks pada pelepasan sitokin oleh monosit (Turner, 2003).

Ketika organisme *N.meningitidis* di inkubasi dengan peningkatan konsentrasi MBL dan kemudian ditambahkan ke seluruh darah yang kekurangan MBL, pelepasan sitokin TNF- α , IL1 β dan IL-6 dari monosit ditingkatkan pada konsentrasi MBL dibawah 4 μ l/ml tetapi dikurangi pada konsentrasi yang lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa baik genotipe MBL dan keberadaan atau respon fase akut yang sedang berlangsung akan membantu menentukan sifat respon sitokin tersebut pada individu tertentu (Turner, 2003).

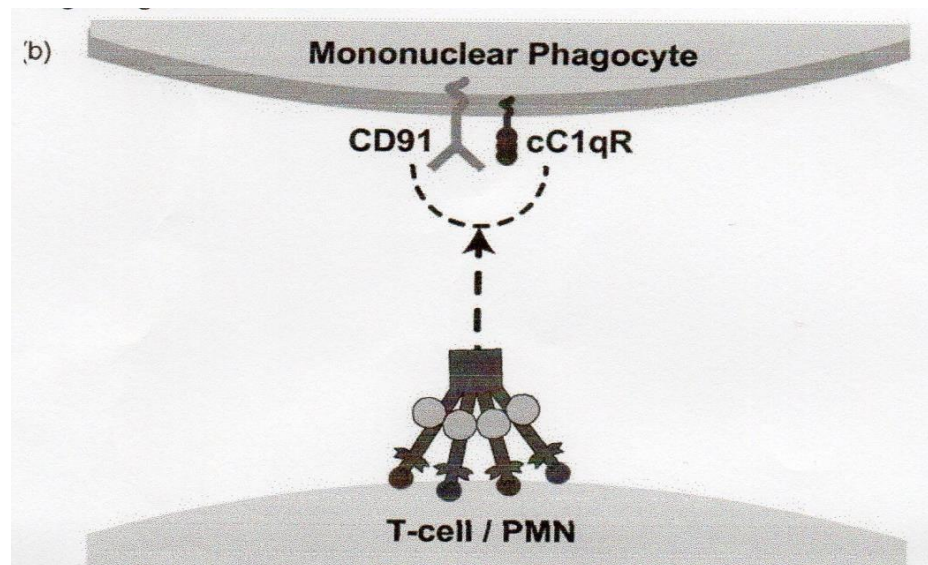
Sebuah laporan baru-baru ini menunjukkan bahwa MBL (C1q) dapat mengikat sel-sel apoptosis dan memulai proses pengambilan oleh makrofag. Proses ini tampak membutuhkan *calreticulin* pada permukaan sel (cC1qqR) yang berikatan dengan

daerah kolagen MBL. Meskipun cC1qR tidak memiliki domain transmembran, cC1qR tampak berkaitan dengan CD91 (α -2 mikroglobulin reseptor) pada permukaan makrofag dan dengan demikian memulai proses apoptosis sel melalui makropinositosis (gambar 3b) (Turner, 2003).



Gambar 3. Fungsi MBL dalam memicu opsonofagositosis MBL yang terikat pada permukaan mikroba mampu memicu opsonofagositosis melalui 2 mekanisme. Yang paling penting yakni aktivasi sistem komplemen oleh jalur lektin,. Aktivasi ini di mediasi oleh protease serine MASP-2 dan mengarah pada produksi C3 *convertase* C4b2a. Dimana C3 *convertase* C4b2a bertanggung jawab terhadap pembelahan C3 dan turunan beberapa fragmen C3b yang mengikat secara kovalen ke permukaan organisme (Turner, 2003).

Fragmen-fragmen tersebut dikenali oleh reseptor CR1 (CD35) dari fagosit. Beberapa C3b di konversi ke iC3b dan dikenali oleh reseptor CR3. Penyerapan langsung MBL oleh fagosit telah diusulkan dalam sejumlah penelitian tetapi reseptor kolektin yang diduga belum dapat diidentifikasi. *Mannose-binding lectin* juga dapat meningkatkan inflamasi dengan modulasi pelepasan sitokin yang bergantung kadar dari monosit (Turner, 2003).



Gambar 4. Fungsi MBL dalam apoptosis
 Peran untuk MBL dalam apoptosis juga telah diusulkan. Kolektin telah terbukti mengikat sel T apoptosis dan neutrofil polimorfonuklear melalui daerah CDR globular. Selanjutnya serapan oleh fagosit mononuklear perlu mendapat pengenalan bagian kolagen oleh cC1qR (*calreticulin*) dalam hubungannya dengan CD91 α_2 -macroglobulin reseptor (Turner, 2003).

4. Genetik *Mannose-Binding Lectin*

Gen-gen kolektin manusia secara keseluruhan terletak di sebuah cluster pada kromosom 10 (q21-24). Ada 2 jenis gen MBL manusia, tetapi MBL-1 adalah pseudogen dan hanya *MBL2* yang mengkode produk protein. *MBL2* terdiri dari 4 ekson dengan ekson 1 yang mengkode sinyal peptida, daerah kaya sistein dan bagian dari daerah kolagen yang kaya glisin. Ekson 2 mengkode sisa wilayah kolagen dan ekson 3 mengkode kumparan heliks struktur alfa yang dikenal sebagai wilayah 'leher'. Ekson keempat mengkode daerah pengenalan karbohidrat yang menggunakan konfigurasi globular. Wilayah promoter gen MBL mengandung berbagai elemen yang

diharapkan dapat meningkatkan transkripsi MBL dan telah diperlihatkan bahwa MBL merupakan protein fase akut yang menunjukkan sedikit peningkatan dalam serum level setelah terjadinya infeksi dan trauma (Garred et al., 2006).

Kekurangan MBL telah dilaporkan pada banyak populasi yang berbeda dan sebagian besar dijelaskan oleh 3 mutasi titik tunggal dalam kodon 52, 54, dan 57 dari ekson 1 pada gen MBL. Mutasi ini sering disebut sebagai varian D, B dan C, masing-masing menunjukkan ketidakaturan. Mutasi varian B terjadi pada 22 – 28% dari populasi Eurasia, sedangkan mutasi varian C adalah karakteristik populasi Afrika sub-Sahara dimana mencapai frekuensi 50 – 60%. Mutasi D mencapai frekuensi 4% dalam populasi Eropa tetapi bisa jauh lebih rendah di tempat lain (Garred et al., 2006).

Mutasi ekson 1 pada gen MBL diyakini merusak oligomerisasi dan menyebabkan defisiensi fungsional. Dalam kasus mutasi B dan c, glisin aksial akut dari 3 kolagen heliks digantikan oleh asam dicarboxylic yang diharapkan akan mengubah heliks. Dalam kasus varian D, efek mutasi adalah mengganti residu arginin dengan sistein dan telah di klaim oleh Wallis & Cheng (1999) bahwa keberadaan residu sistein ekstra ini menyebabkan terbentuknya ikatan disulfida adventif, secara dramatis mengurangi pembentukan oligomer tingkat tinggi. Selain mutasi gen struktural diatas, beberapa polimorfisme telag dijelaskan di daerah promotor gen MBL. Yakni

lokus H/L, X/Y dan P/Q pada posisi -550. -221 dan +4 dari gen MBL. Tiga lokus terkait erat dan 4 haplotipe yang tepat (LXP, LYP, LYQ dan HYP) umumnya ditemukan. Dari jumlah tersebut, haplotipe HYP dikaitkan dengan MBL tingkat normal/tinggi, sedangkan haplotipe LXP sering dikaitkan dengan kadar kolektin yang rendah. Ada penurunan yang signifikan dalam kadar MBL pada individu dengan mutasi ekson 1 pada satu kromosom dan polimorfisme promotor LXP pada kromosom lainnya. Sebanyak 12% dari populasi Kaukasia diharapkan masuk dalam kategori ini yang menunjukkan bahwa penentuan polimorfisme X/Y adalah penting jika diperlukan pembacaan fungsional penuh dari genotipe MBL (Turner, 2003).

5. Distribusi Jaringan MBL di Paru-Paru

Mannose-Binding Lectin adalah protein serum yang diproduksi di hati tetapi juga dapat ditemukan ditempat peradangan, meskipun jumlahnya masih kurang dibanding MBL dalam darah. Tidak banyak transkripsi MBL yang ditemukan saat terjadinya proses PCR pada jaringan paru-paru, sehingga MBL yang hadir dalam proses pernapasan kemungkinan menunjukkan terjadinya 'kebocoran' dari serum. Sejumlah kasus yang telah diteliti mengenai kadar MBL di paru-paru menunjukkan bahwa kebocoran serum dalam cairan *bronchoalveolar lavage* (BAL) pada pasien penderita pneumonia tetapi hanya terjadi pada bagian yang

mengalami proses inflamasi atau peradangan. Kadar MBL paru adalah sekitar 0,015-0,019 pg / ml dengan kadar maksimal MBL paru pada kasus pneumonia *Pneumocystisjiroveci* adalah 0,078 µg / ml yang dibandingkan dengan kadar serum yang berkisar dari 0 hingga 7,9 µg (Eisen, 2010).

6. Terjadinya Defisiensi MBL Sebagai Bentuk Pertahanan Terhadap Tuberkulosis

Sejumlah penelitian menggunakan genotipe *MBL2* yang ditujukan untuk membagi pasien berdasarkan tinggi rendahnya produksi MBL menunjukkan bahwa kekurangan MBL terjadi sebagai mekanisme perlindungan terhadap penyakit yang disebabkan oleh MTB. Pengangkutan varian tunggal alel struktural *MBL2* pada orang dewasa di Afrika Selatan dan anak-anak di Gambia, atau haplotip promotor yang menunjukkan produksi MBL rendah pada pasien di Denmark ternyata protektif terhadap tuberkulosis. Namun tidak semua penelitian sesuai dengan temuan ini, berdasarkan penelitian yang dilakukan di India selatan ditemukan bahwa pasien dengan TB paru lebih cenderung memiliki varian alel homozigot dan karena itu tidak memiliki MBL yang bersirkulasi. Penelitian lebih lanjut yang dilakukan pada pasien di Tanzania menunjukkan tidak ada hubungan antara alel *MBL2* terhadap kerentanan tuberkulosis. Tidak ada perbedaan yang jelas terhadap jumlah keseluruhan alel MBL

pada masing-masing populasi penelitian yang beragam atau perbedaan metodologis untuk menjelaskan hal ini (Eisen, 2010).

I. Interferon-Gamma Release Assay (IGRA)

Interferon-Gamma Release Assay merupakan uji *in vitro* berbasis darah yang mengukur produksi interferon-gamma (IFN- γ) oleh sel imun sebagai respon terhadap stimulasi antigen MTB (Kiazyk and Ball, 2017). Sel T akan melepaskan IFN- γ bila ada stimulasi ulang oleh antigen MTB.

Interferon-Gamma Release Assay dikembangkan sebagai pendekatan imunodiagnostik alternatif *Tuberculin Skin Test* (TST) untuk mendeteksi MTB.

Pengembangan IGRA diawali dari kemajuan pada bidang genomik mikrobakterial yang telah mengidentifikasi segmen genomik yang tidak ditemukan pada semua strain BCG dan kebanyakan mikobakterium lingkungan (kecuali *M. kansasii*, *M. szulqai*, *M. marinum*, *M. flavescens* dan *M. gastrii*) (Lalvani and Pareek, 2010).

Dua antigen yang dikode oleh segmen ini yaitu *Early Secretory Antigen Target-6* (ESAT-6) dan *Culture Filtrate Protein-10* (CFP-10) merupakan target kuat dari sel Th-1 pada infeksi MTB (Lalvani and Pareek, 2010).

Kemampuan ESAT-6 dan CFP-10 untuk memicu respon sel T yang kuat dan spesifik menurunkan frekuensi terjadinya hasil TST positif palsu pada individu yang sebelumnya telah menerima vaksin BCG (Kim et al., 2018; Lalvani and Pareek, 2010).

Saat ini terdapat 2 uji IGRA yang disetujui oleh FDA yaitu *Quanti Feron-TB Gold in Tube Test* (QFT-GIT) dan *T-Spot TB Test* (Lalvani and Pareek, 2010; Qiagen, 2019).

Untuk menghindari reaksi silang, uji ini menggunakan antigen yang di kode pada *Region of Difference 1* (RD-1) yang merupakan bagian genom MTB yang tidak terdapat pada genom BCG atau mikobakterium non tuberkulosis (Kim et al., 2018; Trajman et al., 2013)

Uji QFT-GIT menggunakan *whole blood* dan dilakukan pengukuran IFN- γ sebagai respon terhadap antigen MTB (ESAT-6, CFP-10) dengan metode ELISA (Trajman et al., 2013; Zellweger et al., 2020)

Quanti Feron-TB Plus (QFT-Plus) merupakan versi baru QFT-GIT (Barcellini et al., 2016; Zellweger et al., 2020). Dibandingkan QFT-GIT yang antigen dioptimalkan untuk merangsang sel T CD4+, QFT-Plus mengandung antigen baru yang doptimalkan untuk merangsang keduanya, baik sel T CD4+ dan CD8+ (Barcellini et al., 2016; Trajman et al., 2013; Zellweger et al., 2020). QFT-Plus memiliki kemampuan untuk menunjukkan aktivitas penyakit dan infeksi paru (Abubakar et al., 2018; Zellweger et al., 2020).

Suatu meta analisis terbaru menunjukkan bahwa QFT-Plus lebih sensitif daripada QFT-GIT untuk mendeteksi infeksi MTB (Barcellini et al., 2016; Zellweger et al., 2020).

Pemeriksaan T-SOT TB dilakukan berdasarkan *enzyme-linked immunospot assay* (ELISPOT) dari jumlah mononuklear darah perifer

termasuk limfosit dan monosit yang menggunakan ESAT-6 dan peptide CFP-10 (Kiazyk and Ball, 2017; Zellweger et al., 2020).

Interpretasi hasil pemeriksaan QFT didasarkan pada jumlah IFN- γ yang dilepaskan, sedangkan pada T-SPOT TB didasarkan pada jumlah sel yang melepaskan IFN- γ (Kiazyk and Ball, 2017; Zellweger et al., 2020).

Tabel 1. Perbandingan uji diagnostik yang tersedia untuk infeksi TB laten, diadaptasi dari Pai M, Sotgiu G

Karakteristik	<i>Purified Proteine Derivate-based tuberculin skin test</i>	New spesific skin test (dalam pengembangan atau validasi)	IFN- γ release assays
Testing format	<i>Intradermal skin test</i>	<i>Intradermal skin test (in vivo)</i>	<i>Ex vivo assay (ELISA atau ELISPOT)</i>
Antigen yang digunakan	<i>Purifide protein derivate</i>	ESAT-6 , CFP-10	ESAT-6 , CFP-10
Sasaran penggunaan	Skrining TB laten	Skrining TB laten	Skrining TB laten
Sensitifitas	Tinggi	Sedang	Sedang
Sensitifitas pada populasi immunocompromised	Berkurang	Berkurang	Berkurang
Spesifisitas	Sedang	Tinggi	Tinggi
Efek BCG terhadap spesifisitas	Tinggi (ketika BCG diberikan setelah periode <i>infancy</i> atau beberapa kali)	Tidak ada	Tidak ada
Kemampuan untuk memprediksi perkembangan menjadi TB aktif	Sedang	Tidak diketahui (tetapi kemungkinan sedang pada bukti tidak langsung dari IGRA)	Sedang
Kemampuan untuk mengatasi berbagai tahap spektrum infeksi M. tuberculosis	Rendah	Rendah	Rendah

Pada umumnya hasil pemeriksaan IGRA terdiri dari positif, negatif dan indeterminate. Hasil IGRA positif menunjukkan respon IFN- γ terhadap

satu atau lebih antigen spesifik MTB diatas batas yang direkomendasikan. Hasil IGRA negatif menunjukkan respon IFN- γ dibawah batas untuk semua protein spesifik MTB dengan respon terhadap kontrol mitogen diatas batas. Hasil IGRA indeterminate menunjukkan respon IFN- γ dibawah batas untuk kedua protein spesifik MTB dan kontrol mitogen atau respon IFN- γ diatas batas dalam kontrol nihil (Banfield et al., 2012; Zellweger et al., 2020).

Uji IGRA digunakan untuk menyaring serta mendiagnosis TB laten, namun IGRA bukan satu-satunya metode yang digunakan untuk mengidentifikasi TB laten (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020b; Trajman et al., 2013).

Metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi TB laten dapat juga dengan pemeriksaan TST yang mengevaluasi imunitas seluler dan terdiri dari injeksi intradermal sejumlah kecil protein bakteri MTB yang dimurnikan (Kiazyk and Ball, 2017; Trajman et al., 2013).

Pada dasarnya uji IGRA memiliki prinsip yang sama dengan TST yaitu pelepasan sitokin oleh limfosit yang tersensitasi (Trajman et al., 2013; Zellweger et al., 2020).

Kelebihan dari IGRA adalah spesifitas yang lebih superior dari TST dimana hanya terdapat 2 antigen MTB (ESAT-6 dan CFP-10) yang tidak ditemukan pada *M. bovis*, BCG dan kebanyakan mikobakterium pada lingkungan yang berperan dalam stimulasi limfosit sehingga hasil positif palsu dapat dihindarkan (Kiazyk and Ball, 2017; Zellweger et al., 2020).

Kelebihan lain dari IGRA adalah tes yang terstandarisasi dan prosedur yang objektif tanpa ada bias subyektif oleh karena teknik injeksi dan pembacaan reaksi kulit.

Selain itu pemeriksaan IGRA cukup dilakukan dengan satu kali kunjungan pasien, sedangkan TST memerlukan dua kali kunjungan pasien yaitu kunjungan pertama untuk injeksi tuberkulin dan kunjungan kedua untuk interpretasi hasil setelah 48 – 72 jam injeksi tuberkulin (Kiazyk and Ball, 2017).

Namun uji IGRA lebih mahal dibandingkan dengan TST karena membutuhkan kapasitas teknikal dan infrastruktur laboratorium yang lebih besar (Kiazyk and Ball, 2017).

Intensitas reaksi pada IGRA dan TST nampaknya berkorelasi dengan risiko terjadinya TB di kemudian hari, tetapi kedua uji ini memiliki nilai prediktif positif yang rendah. Nilai prediktif negatif tinggi untuk kedua uji ini tetapi lebih tinggi pada IGRA dibandingkan TST (Zellweger et al., 2020).

Spesifitas yang tinggi dari IGRA dibandingkan TST terlihat dengan risiko perkembangan TB yang amat rendah pada subyek dengan IGRA negatif terlepas dari hasil TST (Zellweger et al., 2020).

Interferon-Gamma Release Assay merupakan alat diagnostik penting yang potensial untuk menggantikan TST dan penegakan diagnosis tuberkulosis laten (Lalvani and Pareek, 2010).

J. Polymerase Chain Reaction

1. Prinsip Kerja

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode untuk amplifikasi (perbanyak) primer oligonukleotida diarahkan secara enzimatik urutan DNA spesifik. Teknik ini mampu memperbanyak sebuah urutan $10^5 - 10^6$ kali lipat dari jumlah nanogram DNA *template* dalam latar belakang besar pada sequence yang tidak relevan (misalnya dari total DNA genomik). Sebuah prasyarat untuk memperbanyak urutan menggunakan PCR adalah memiliki pengetahuan, urutan segmen unik yang mengapit DNA yang akan diamplifikasi, sehingga *oligonucleotides* tertentu dapat diperoleh. Hal ini tidak perlu tahu apa-apa tentang urutan *intervening* antara primer. Produk PCR diamplifikasi dari template DNA menggunakan DNA polimerase stabil-panas dari *Thermus aquaticus* (Taq DNA *polimerase*) dan menggunakan pengatur siklus termal otomatis (Perkin-Elmer/Cetus) untuk menempatkan reaksi sampai 30 atau lebih siklus denaturasi, anil primer, dan polimerisasi. Setelah amplifikasi dengan PCR, produk ini dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamida dan secara langsung divisualisasikan setelah pewarnaan dengan bromida etidium.

Polymerase Chain Reaction merupakan suatu teknik perbanyak (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida.

Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. Proses tersebut mirip dengan proses replikasi DNA secara *in vivo* yang bersifat semi konservatif.

Polymerase Chain Reaction memungkinkan adanya perbanyakan DNA antara dua primer, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Pada proses PCR dibutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (templat) yang mengandung DNA-target (yang akan diamplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida. Pada kondisi tertentu, kedua primer akan mengenali dan berikatan dengan untaian DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, DNA polimerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat. DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polimerase ini berlangsung dengan arah 5'→3' dan disebut reaksi polimerisasi. Enzim DNA

polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA templat.

Polymerase Chain Reaction melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA templat, penempelan (*annealing*) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan (*extension*) primer atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polimerase (Handoyo and Rudiretna, 2000).

2. Kegunaan

Polymerase Chain Reaction dapat digunakan untuk (Handoyo and Rudiretna, 2000):

- a. Amplifikasi urutan nukleotida.
- b. Menentukan kondisi urutan nukleotida suatu DNA yang mengalami mutasi.
- c. Bidang kedokteran forensik.
- d. Melacak asal-usul seseorang dengan membandingkan "*finger print*".

3. Waktu yang Dibutuhkan

- a. 1 – 2 hari.
- b. PCR : 3 – 6 jam atau semalam.

- c. *Polyacrylamide gel electrophoresis using "Mighty-small II" gel apparatus* : 2.5 jam poliakrilamid gel elektroforesis menggunakan "*Mighty-small II*" bahan gel : 2,5 jam.
- d. *Etidium bromide staining* dan fotografi : 45 menit (Handoyo and Rudiretna, 2000).

4. Reagen Khusus

- a. Pasangan primer oligonukleotida sintetik mengapit urutan yang akan diamplifikasi.
- b. Buffer PCR 5X (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 7,5 mM MgCl₂)
- c. Campuran dari 4 dNTP (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) masing-masing sebesar 2,5 mM (ultra murni DNTP set, Pharmacia # 27-2035-01). DNTP campuran dibuat dengan volume 10 mM larutan dari masing-masing 4 dNTP terpisah yang digabung.
- d. Taq DNA Polymerase (AmpliTaqTM, Perkin-Elmer/Cetus)
- e. Minyak mineral ringan
- f. Akrilamida (grade elektroforesis)
- g. N, N'-Methylenebisacrylamide (grade elektroforesis, Ultra-Pure/BRL, # 5516UB)
- h. Amonium persulfat (Ultra-Pure/BRL, # 5523UA)
- i. TEMED (N, N, N'N 'Tetramethylethylenediamine, Ultra-Murni / BRL, # 5524UB) (Handoyo and Rudiretna, 2000).

5. Peralatan Khusus

- a. Mighty-small II SE-250 vertical gel electrophoresis unit (Hoefer)
- b. Perkin-Elmer/Cetus Thermal Cyclor
- c. Sterile Thin-wall 0.5 ml Thermocycler microfuge tubes : (TC-5, Midwest Scientific) (Handoyo and Rudiretna, 2000).

6. Komponen PCR lainnya

- a. Enzim DNA Polymerase

Dalam sejarahnya, PCR dilakukan dengan menggunakan *Klenow fragment* DNA Polimerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzyme ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzim di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp dan hasilnya menjadi kurang spesifik. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim *Taq DNA polymerase* yang memiliki keaktifan pada suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin.

- b. Primer

Primer merupakan oligonukleotida pendek rantai tunggal yang mempunyai urutan komplemen dengan DNA templat yang akan diperbanyak. Panjang primer berkisar antara 20-30 basa.

Untuk merancang urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. Primer oligonukleotida di sintesis menggunakan suatu alat yang disebut *DNA synthesizer*.

c. Reagen lainnya

Selain enzim dan primer, terdapat juga komponen lain yang ikut menentukan keberhasilan reaksi PCR. Komponen tersebut adalah dNTP untuk reaksi polimerisasi, dan buffer yang mengandung $MgCl_2$. Konsentrasi ion Mg^{2+} dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion Mg^{2+} ini sangat mempengaruhi proses primer annealing, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim dan fidelitas reaksi (Handoyo and Rudiretna, 2000).

7. Tahapan *Polymerase Chain Reaction*

a. Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu $90^{\circ}C - 95^{\circ}C$.

b. Penempelan primer

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50°C – 60°C. Selanjutnya, DNA *polymerase* akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C.

c. Reaksi polimerisasi (*extension*)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase.

Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan diamplifikasi secara eksponensial (disebut ampikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah salinan yang dapat dirumuskan dengan $(2^n)x$. Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA. Jadi, seandainya ada 1 salinan DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 salinan, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 salinan dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara

eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim *Taq DNA polimerase* pada akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA yang dihasilkan. Sehingga nantinya produk PCR ini dapat di kloning dengan menggunakan vektor yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut *thermocycler* (Handoyo and Rudiretna, 2000).

8. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Seperti namanya, proses *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) merupakan bagian dari proses PCR biasa. Perbedaanya dengan PCR yang biasa, pada proses ini berlangsung satu siklus tambahan yaitu adanya perubahan RNA menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan menggunakan enzim Reverse Transkriptase. Reverse Transcriptase adalah suatu enzim yang dapat mensintesa molekul DNA secara *in vitro* menggunakan template RNA.

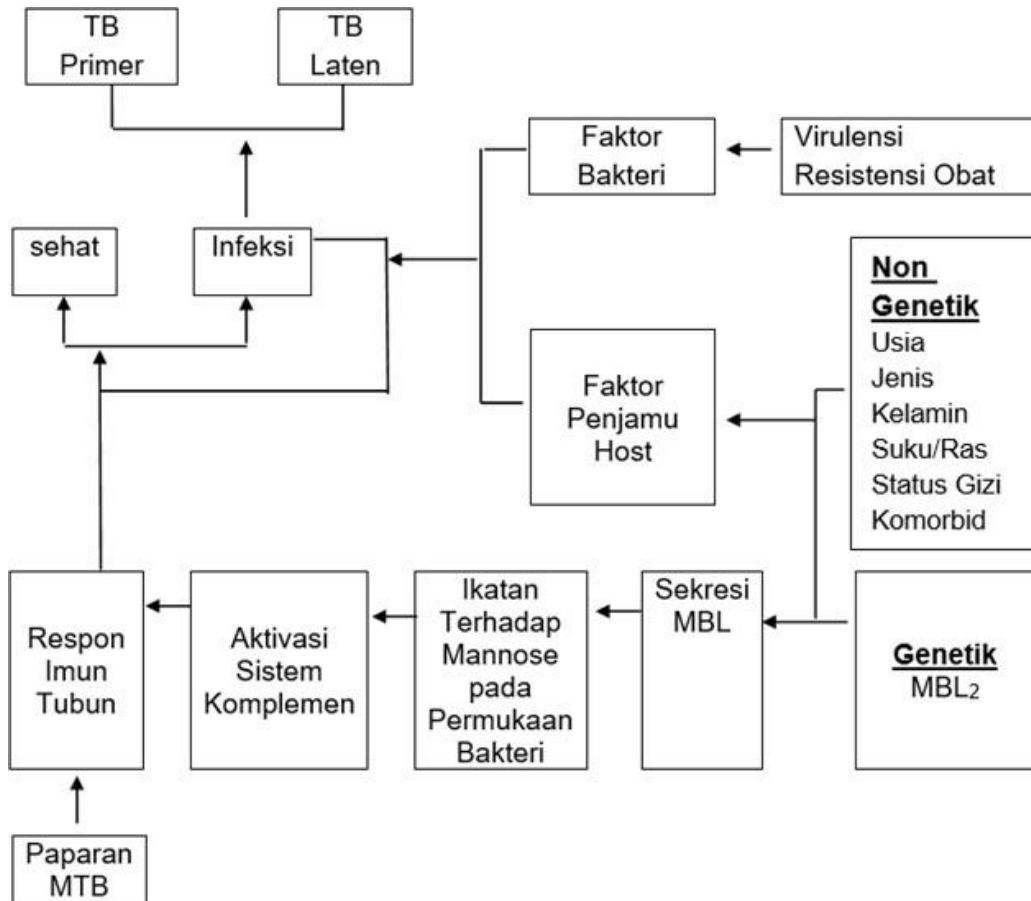
Seperti halnya PCR biasa, pada pengerjaan RT-PCR ini juga diperlukan DNA Polimerase, primer, buffer, dan dNTP. Namun berbeda dengan PCR, templat yang digunakan pada RT-PCR adalah RNA murni. Oleh karena primer juga dapat menempel pada DNA selain pada RNA, maka DNA yang mengkontaminasi proses ini harus dibuang. Untuk proses amplifikasi mRNA yang mempunyai

poly(A) tail pada ujung 3', maka oligo dT, random heksamer, maupun primer spesifik untuk gen tertentu dapat dimanfaatkan untuk memulai sintesa cDNA (Handoyo and Rudiretna, 2000).

9. Metoda Deteksi Produk *Polymerase Chain Reaction*

Produk PCR adalah segmen DNA (amplikon) yang berada dalam jumlah jutaan copy, tetapi tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Oleh karena itu PCR perlu diikuti dengan suatu tahap akhir yang bertujuan untuk memvisualisasikan produk PCR serta sekaligus bertujuan untuk mengetahui ukuran produk PCR dan mengetahui apakah produk yang dihasilkan adalah benar seperti yang diinginkan. Salah satu metoda deteksi yang umum dilakukan adalah elektroforesis gen agarosa (Handoyo and Rudiretna, 2000).

K. Kerangka Teori

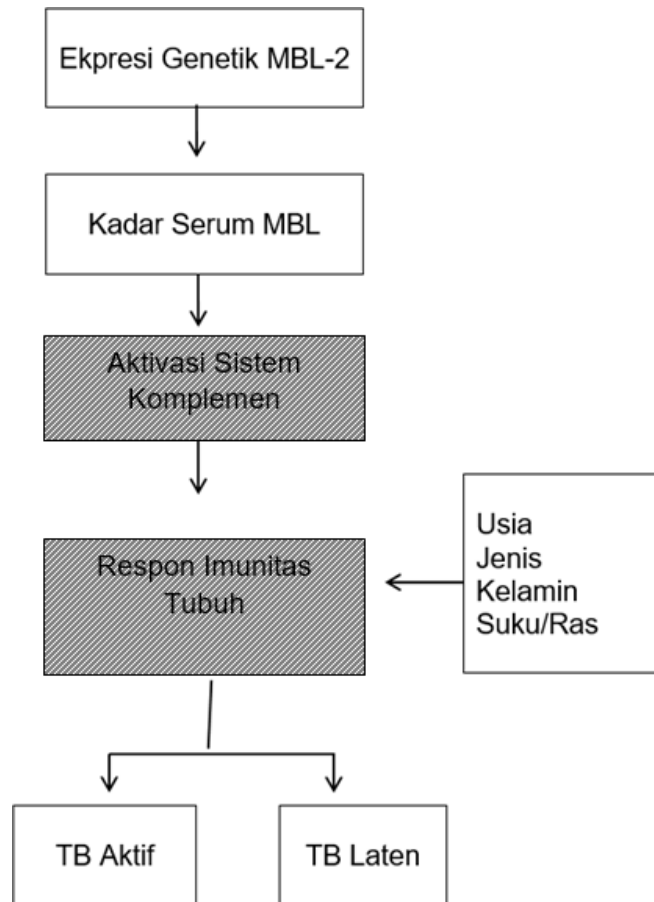


Gambar 5. Kerangka Teori

L. Hipotesis

1. Ada perbedaan ekspresi gen *MBL2* penderita TB aktif dan kontak serumah.
2. Ada perbedaan kadar MBL penderita TB aktif dan kontak serumah.
3. Ada korelasi antara ekspresi *MBL2* dengan kadar protein MBL.

M. Kerangka Konsep



- Variabel bebas : Ekpresi Genetik *MBL2*, Kadar Serum MBL
- Variabel antara : Aktivasi Sel T, Respon Imunitas Tubuh
- Variabel kendali : Usia, Jenis Kelamin, Suku/Ras
- Variabel tergantung : TB Aktif, TB Laten

diteliti

Tidak diteliti

Gambar 6. Kerangka Konsep