

KARYA AKHIR

**NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN PCR (*POLYMERASE
CHAIN REACTION*), MIKROSKOPIS *ZIEHL NEELSEN*
DAN PEMERIKSAAN TUBERKULIN PADA ANAK
DENGAN SUSPEK TUBERKULOSIS PARU**

***THE DIAGNOSTIC VALUE OF PCR EXAMINATION
(POLYMERASE CHAIN REACTION), ZIEHL NEELSEN STAIN
AND TUBERCULIN SKIN TEST WITH PULMONARY
TUBERCULOSIS SUSPECT IN CHILDREN***

**NURUL SYLVANA SHORAYA
C110216203**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)
PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN ANAK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN PCR (*POLYMERASE
CHAIN REACTION*), MIKROSKOPIS ZIEHL NEELSEN
DAN PEMERIKSAAN TUBERKULIN PADA ANAK
DENGAN SUSPEK TUBERKULOSIS PARU**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Spesialis Anak

Program Studi Ilmu Kesehatan Anak

Disusun dan diajukan oleh

NURUL SYLVANA SHORAYA

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1 (Sp.1)
PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN ANAK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

**NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN PCR (POLYMERASE
CHAIN REACTION), MIKROSKOPIS ZIEHL NEELSEN
DAN PEMERIKSAAN TUBERKULIN PADA ANAK
DENGAN SUSPEK TUBERKULOSIS PARU**

Disusun dan diajukan oleh:

NURUL SYLVANA SHORAYA
NIM: C110216203

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Anak
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 28 Oktober 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



dr. Amiruddin L, SpA(K)
NIP. 19621230 199703 1 002

Pembimbing Pendamping,



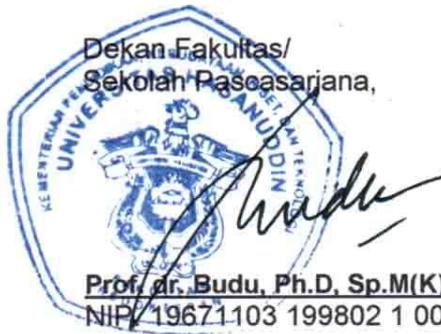
Dr. dr. Idham Jaya Ganda, Sp.A(K)
NIP. 19581005 198502 1 001

Ketua Program Studi,



Dr. dr. St. Aizah Lawang, M. Kes, Sp.A(K)
NIP. 19740321 200812 2 002

Dekan Fakultas/
Sekolah Pascasarjana,



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M. Med.Ed
NIP. 19671103 199802 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Nurul Sylvana Shoraya
Nomor Mahasiswa : C110216203
Program Studi : Biomedik / Ilmu Kesehatan Anak

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya akhir ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Oktober 2021

Yang menyatakan,



Nurul Sylvana Shoraya

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu waTa'ala yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan karya akhir ini.

Penulisan karya akhir ini merupakan salah satu persyaratan dalam rangka penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis di IPDSA (Institusi Pendidikan Dokter Spesialis Anak), pada Konsentrasi Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan karya akhir ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tulus kepada **dr. Amiruddin, Sp.A(K)** sebagai pembimbing materi yang dengan penuh perhatian dan kesabaran senantiasa membimbing dan memberikan dorongan kepada penulis sejak awal penelitian hingga penulisan karya akhir ini.

Ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya penulis sampaikan kepada **Dr. dr. Idham Jaya Ganda, Sp.A(K)** sebagai pembimbing materi dan metodologi yang ditengah kesibukan beliau telah memberikan waktu dan pikiran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan penulisan karya akhir ini. Serta **(Alm) Prof.Dr.dr.H.Dasril Daud,Sp.A (K)** yang sebelumnya menjadi pembimbing materi dan metodologi di akhir hayat beliau selalu memotivasi kami untuk selalu belajar metodologi sehingga penulis dapat menyelesaikan karya akhir ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terimakasih kepada para penguji yang telah banyak memberikan masukan dan perbaikan untuk karya akhir ini , yaitu , **Dr. dr. Ema Alasiry, Sp.A (K), dr.Bahrul Fikri, M.Kes, Sp.A, Ph.D** serta **dr. Urfianty,M.Kes, Sp.A (K).**

Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada :

1. Rektor dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas kesediaannya menerima penulis sebagai peserta pendidikan pada Konsentrasi Pendidikan Dokter Spesialis Terpadu,Program Studi Ilmu Kesehatan Anak,Universitas Hasanuddin.
2. Koordinator Program Pendidikan Dokter Spesialis,Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang senantiasa memantau dan membantu kelancaran pendidikan penulis.
3. Ketua Departemen,Ketua dan Sekretaris Program Studi Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf pengajar (*supervisor*) Departemen Ilmu Kesehatan Anak atas bimbingan,arahan, dan nasehat yang tulus selama penulis menjalani pendidikan.
4. Direktur RSUP dr.Wahidin Sudirohusodo, Direktur RSP Universitas Hasanuddin, dan Direktur RS Jejaring atas ijin dan kerjasamanya untuk memberikan kesempatan kepada penulis untuk menjalani pendidikan dirumah sakit tersebut.
5. Semua staf administrasi di Departemen Ilmu Kesehatan Anak Anak Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan semua paramedis di

RSUPdr.Wahidin dan Rumah Sakit jejaring yang lain atas bantuan dan kerjasamanya selama penulis menjalani pendidikan.

6. Direktur Balai Kesehatan Paru Kota Makassar atas ijin dan kerjasamanya untuk memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengambil data penelitian ditempat tersebut.
7. Orang tua saya ayahanda **Ir. H. Hasbi M. Tawab** serta ibunda saya **Hj.Suryani Madjid, S.Sos** yang senantiasa mendukung dalam doa dan dorongan yang sangat berarti sehingga penulis mampu menjalani proses pendidikan.
8. Suami tercinta saya **Andi Karsapin T** dan anak kesayangan saya **Andi Muhammad Elmar Aksan** dan **Andi Muhammad Ezhar Aksan** yang dengan penuh kesabaran mendoakan dan menjadi sumber inspirasi dan semangat hidup saya selama menjalani proses pendidikan.
9. Saudara kandung saya **Seta Asri Amelia, S.Hut** serta anggota keluarga yang lain atas doa dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan karya akhir ini.
10. Semua teman sejawat peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis I Ilmu Kesehatan Anak terutama *Angkatan Januari 2017*: **dr. Eva, Sp.A, dr. Misjunaling, dr. Sidrah Darma, dr. Ahmad Ihsan, dr. A. Noor Fadli**, atas bantuan dan kerjasamanya yang menyenangkan, berbagai suka dan duka selama penulis menjalani pendidikan.
11. Teman terdekat saya, **dr. Hasmianty, dr. Fadlia Pratiwi Suyuthi, Sp.OG, dr. Nurul Hikmah** atas doa,dukungan, bantuan dan energi

positif yang diberikan saat penulis mencurahkan berbagai suka dan duka selama menjalani pendidikan.

12. Semua pihak yang tidak sempat penulis sebutkan satu persatu yang turut membantu menyelesaikan karya akhir ini.

Dan akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Kesehatan Anak di masa mendatang. Tak lupa penulis mohon maaf untuk hal-hal yang tidak berkenan dalam penulisan ini karena penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan hasil penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan.

Makassar, November 2021

Nurul Sylvana Shoraya

ABSTRAK

Latar Belakang. Tuberkulosis merupakan penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas, baik di negara berkembang maupun di negara maju. Terdapat kesulitan dalam pemeriksaan kultur sputum basil tahan asam (BTA) untuk yang disebabkan oleh dua hal, yaitu sedikitnya jumlah kuman (*paucibacillary*) dan sulitnya pengambilan spesimen sputum sehingga diperlukan pemeriksaan lain untuk mendiagnosis Tuberkulosis paru pada anak

Tujuan. Penelitian ini bertujuan menilai akurasi pemeriksaan polymerase chain reaction (PCR), mikroskopis *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dalam penegakan diagnosis Tuberkulosis paru pada anak.

Metode. Penelitian ini menggunakan desain *cross sectional* yang dilakukan di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo dan RSUD Balai Besar Kesehatan Paru Makassar pada bulan Juli sampai September 2021. Populasi penelitian adalah pasien anak umur 3 bulan sampai dengan 18 tahun yang mengalami suspek tuberkulosis paru yang memenuhi criteria inklusi.

Hasil. Penelitian ini melibatkan 50 anak usia 3 bulan-18 tahun yang terbagi atas 2 kelompok, 20 anak dengan kultur BTA positif dan 30 negatif. Pada penelitian ini didapatkan spesifitas, nilai prediksi positif dan akurasi pemeriksaan tertinggi pada pemeriksaan mikroskopis *Ziehl Neelsen* dengan nilai masing-masing 96,7%, 88,9% dan 74% dengan OR 19,333. Sedangkan pada pemeriksaan PCR didapatkan sensitivitas dan nilai prediksi negative tertinggi dengan nilai masing-masing 95% dan 90% dengan OR 8,143. Uji tuberkulin tidak didapatkan hubungan bermakna dengan kultur BTA ($p > 0,05$).

Kesimpulan. Pemeriksaan mikroskopis *Ziehl Neelsen* mempunyai keunggulan pada spesifitas, nilai prediksi positif, *odd ratio* dan akurasi, sedangkan pemeriksaan PCR mempunyai keunggulan pada sensitivitas dan nilai prediksi negative jika dibandingkan dengan pemeriksaan kultur sputum BTA.

Katakunci: Tuberkulosis, Uji tuberkulin, PCR, mikroskopis *Ziehl Neelsen*

ABSTRACT

Background. Tuberculosis is a cause of high morbidity and mortality, both in developing and also developed countries. There are difficulties in examination of acid-fast bacilli (AFB) sputum cultures, which caused by two things, namely the small number of bacteria (*paucibacillary*) and the difficulty of taking sputum specimens. Therefore other examinations are needed to diagnose pulmonary Tuberculosis in children.

Purpose. This study aims to assess the accuracy of polymerase chain reaction (PCR), *Ziehl Neelsen* microscopic and tuberculin test examination in establishing the diagnosis of pulmonary Tuberculosis in children.

Method. This study used a cross sectional design conducted at Dr. RSUP. Wahidin Sudirohusodo and the Makassar Lung Health Center Hospital from July until September 2021. The study population was pediatric patients aged 3 months to 18 years who had suspected pulmonary tuberculosis which met the inclusion criteria.

Results. This study involved 50 children aged 3 months – 18 years which were divided into 2 groups; 20 children with positive and 30 negative smear cultures. In this study, the specificity, positive predictive value and the highest examination accuracy were obtained on *Ziehl Neelsen* microscopic examination with values of 96.7%, 88.9% and 74%, respectively, with OR of 19.333. While the PCR examination obtained the highest sensitivity and negative predictive value with values of 95% and 90%, respectively, with an OR of 8.143. In tuberculin test, no significant relationship is found with AFB culture ($p > 0.05$).

Conclusion. *Ziehl Neelsen* microscopic examination has advantages in specificity, positive predictive value, odd ratio and accuracy, while PCR examination has advantages in sensitivity and negative predictive value when compared to sputum smear culture examination.

Keywords: Tuberculosis, Tuberculin test, PCR, *Ziehl Neelsen* microscopy

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang	1
I.2. Rumusan Masalah	6
I.3. Tujuan Penelitian	7
I.3.1. Tujuan Umum	7
I.3.2. Tujuan Khusus	7
I.4. Hipotesis.....	8
I.5. Manfaat Penelitian	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	10
II.1. Tuberkulosis Paru Anak.....	10
II.1.1. Definisi	10

II.1.2. Epidemiologi	11
II.1.3. Patogenesis	12
II.1.4. Manifestasi Klinik	16
II.1.5. Diagnosis	19
II.1.6. Tatalaksana	25
II.2. Imunologi Infeksi <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	27
II.2.1. Respon humoral terhadap kuman TB	27
II.2.2. Respons Seluler Terhadap kuman TB	31
II.2.3. Pemeriksaan Kultur sebagai <i>Gold Standart</i> <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	36
II.2.4. Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk diagnosis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
II.2.5 Pemeriksaan Mikroskopis <i>Ziehl-Neelsen</i>	55
II.2.6 Pemeriksaan Uji Tuberkulin	63
II.3. Kerangka Teori	68
BAB III. KERANGKA KONSEP	69
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN	70
IV.1. Desain Penelitian	70
IV.2. Tempat dan Waktu Penelitian	70
IV.3. Populasi Penelitian	71
IV.4. Sampel dan Cara Pengambilan Sampel	71
IV.5. Perkiraan Besar Sampel	72
IV.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	72
IV.7. Izin Penelitian dan <i>Ethical Clearance</i>	73

IV.8. Cara Kerja	73
IV.8.1. Alokasi Subyek	73
IV.8.2. Prosedur Penelitian	73
IV.9. Identifikasi dan Klasifikasi Variabel	79
IV.9.1. Identifikasi Variabel	79
IV.9.2. Klasifikasi Variabel	79
IV.10. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif	80
IV.10.1. Definisi Operasional	80
IV.10.2. Kriteria Objektif	83
IV.11. Pengolahan dan Analisis Data	85
IV.11.1. Analisis Univariat	85
IV.11.2. Analisis Bivariat	86
BAB V. HASIL PENELITIAN	90
V.1. Jumlah Sampel	90
V.2. Karakteristik Sampel	91
V.3. Analisis Karakteristik Subjek Penelitian.....	92
V.4. Analisis Pemeriksaan uji Tuberkulin, bilas lambung dan PCR terhadap hasil kultur sputum	99
BAB VI. PEMBAHASAN	105
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	128
VII. 1. Kesimpulan	128
VII. 2. Saran	129
DAFTAR PUSTAKA	131
LAMPIRAN	136

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sistem Skor Diagnosis Tuberkulosis Anak	22
Tabel 2. Obat anti tuberkulosis	26
Tabel 3. Panduan OAT dan lama pengobatan TB pada anak	26
Tabel 4. Interpretasi Hasil Kultur	38
Tabel 5. Hasil pemeriksaan Kultur dibandingkan dengan pemeriksaan PCR	87
Tabel 6. Hasil pemeriksaan Kultur dibandingkan dengan pemeriksaan <i>Ziehl- Neelsen</i>	87
Tabel 7. Hasil pemeriksaan Kultur dibandingkan dengan pemeriksaan tuberkulin	88
Tabel 8. Karakteristik subjek penelitian	91
Tabel 9. Analisis jenis kelamin dan hasil kultur	92
Tabel 10. Analisis usia dan hasil kultur	93
Tabel 11. Analisis status gizi dan hasil kultur	93
Tabel 12. Analisis skor TB dan hasil kultur	94
Tabel 13. Analisis skor TB dan uji Tuberkulin	95
Tabel 14. Analisis skor TB dan pemeriksaan <i>Ziehl Nielsen</i>	96
Tabel 15. Analisis skor TB dan pemeriksaan PCR.....	96
Tabel 16. Analisis riwayat kontak TB dan hasil kultur.....	97
Tabel 17. Analisis riwayat foto thoraks dan hasil kultur	98
Tabel 18. Analisis uji Tuberkulin dan hasil kultur.....	99
Tabel 19. Analisis pemeriksaan <i>Ziehl Neelsen</i> dan hasil kultur	100
Tabel 20. Analisis pemeriksaan PCR dan hasil kultur	101
Tabel 21. Perbandingan diagnosis TB anak berdasarkan pemeriksaan PCR, <i>Ziehl Neelsen</i> dan uji Tuberkulin.....	102
Tabel 22. Perbandingan analisis nilai diagnostik antara pemeriksaan PCR, <i>Ziehl Neelsen</i> dan uji Tuberkulin.....	103

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Patomekanisme infeksi TB.....	13
Gambar 2. Respon imun terhadap infeksi M.TB.	15
Gambar 3. Perjalanan penyakit Tuberkulosis Primer	16
Gambar 4. Alur diagnosis Tb paru anak	24
Gambar 5. Sitokin yang terlibat dalam infeksi M.Tb.	31
Gambar 6. Fagositosis dan pengenalan kuman TB	35
Gambar 7. Media Lowenstein-Jensen positif <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	40
Gambar 8. Proses amplifikasi dalam PCR	46
Gambar 9. Posisi primer PCR untuk deteksi MtbC IS 6110	52
Gambar 10. Gambaran skematis dinding sel <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
Gambar 11. Proses Immunologis pada Uji Tuberkulin	65
Gambar 12. Alur penelitian	78
Gambar 13. Alur Penelitian dengan pemeriksaan PCR, <i>Ziehl Neelsen</i> , dan pemeriksaan tuberkulin pada anak dengan suspek TB paru.....	90
Gambar 14 A. Pemeriksaan Bilas lambung, B. Alat dan Bahan Bilas Lambung	145
Gambar 15 a. Pemeriksaan tuberkulin; b. pengukuran diameter indurasi; c. injeksi antigen PPD secara intrakutan hingga terbentuk gelembung.....	146
Gambar 16. Alat bucket sentrifuge mikro.....	148
Gambar 17. Alat pencampuran primer dan enzim (reagen premix)	149
Gambar 18. Proses pencampuran H ₂ O+ primer T4T5+enzim (reagen premix)	149

Gambar 19. Proses pencampuran bahan DNA sampel dengan reagen premix	150
Gambar 20. Proses sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 1000 rpm	150
Gambar 21. Proses denaturasi, annealing dan extention dengan alat PCR (Thermal Cycle)	151
Gambar 22. Proses pembuatan agarosa	152
Gambar 23. Proses elektroforesis	152
Gambar 24. Proses pembacaan hasil elektroforesis dengan alat Gelldoc	152
Gambar 25. Hasil elektroforesis sampel no. 1-18	153
Gambar 26. Hasil elektroforesis sampel no 4-33	153
Gambar 27. Hasil elektroforesis sampel no 19-38	153
Gambar 28. Hasil elektroforesis sampel no 34-52	154
Gambar 29. Hasil elektroforesis sampel no 39-48	154
Gambar 30. Hasil elektroforesis sampel no 53-59	154
Gambar 32. alat dan bahan pewarnaan BTA dengan <i>Ziehl Nelseen</i>	156
Gambar 33. Mesin inkubator untuk inkubasi LJ (media padat)	157
Gambar 34. Kultur positif M.Tb pada Media padat LJ	157

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Naskah Penjelasan untuk Mendapatkan Persetujuan dari Subjek Penelitian	136
Lampiran 2. Formulir Persetujuan Mengikuti Penelitian Setelah Mendapat Penjelasan	140
Lampiran 3. Prosedur Pengambilan Sampel	142
Lampiran 4. Etik Penelitian	158
Lampiran 5. Analisis Data	160
Lampiran 6. Data dasar	174

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Arti dan Keterangan
μm	: Mikro meter
AG	: Arabinogalaktam
BB	: Berat Badan
BCG	: Bacille Calmette-Guerin
BTA	: Bakteri Tahan Asam
CCR	: <i>Chemokine Cell Receptor</i>
cm	: Centi meter
CMI	: <i>Cell-Mediated Immunity</i>
CT	: <i>Computed Tomography</i>
dATP	: Deoksiadenosin Trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin Trifosfat
dGTP	: Deoksiguanosin Trifosfat
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	: Deoxynucleotide Triphosphates
DTH	: <i>Delayed-Type Hypersensitivity</i>
dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	: Human Leukocyte Antigen

Singkatan	Arti dan Keterangan
IFN- γ	: Interferon γ
IgA	: Immunoglobulin A
IgG	: Immunoglobulin G
IgM	: Immunoglobulin M
IL	: Interleukin
iNOS	: <i>Inducibel Nitric Oxide Synthase</i>
IP	: <i>Interferon Induced Protein</i>
I-TAC	: <i>Interferon Inducible T-Cell Alfa Chemokine</i>
IUAT	: International Union Against Tuberculosis
IUATLD	: International Union Against Tuberculosis Lung Disease
LAM	: Lipoarabinomannan
LJ	: Lowenstein Jensen
M.Tb	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MCP	: <i>Monocyte Chemoattractan Protein</i>
mg	: Milli gram
MgCl ₂	: Magnesium Klorida
MGIT	: Mycobacterial Growth Indicator Tubes
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIG	: <i>Monokine Induced by Interferon Gamma</i>
MIP	: <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MOTT	: <i>Mycobacterium Other Than Tuberculosis</i>

Singkatan	Arti dan Keterangan
MTC	: <i>Mycobacterium Tuberculosis Complek</i>
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	: Peptidoglikan
PPD	: <i>Purified Protein Derivative</i>
RANTES	: <i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
RNi	: <i>Reactive Nitrogen Intermediate</i>
RS	: Rumah Sakit
SLE	: Sistemik Lupus Eritematosus
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solutions</i>
SSP	: Susunan Saraf Pusat
TB	: Tinggi Badan
TB	: Tuberkulosis
TGF- β	: Transforming Growth Factor β
TNF- α	: Tumor Nekrosis Faktor- α
TU	: Tuberculin Unit
WHO	: <i>World Health Organization</i>
ZN	: <i>Ziehl Neelsen</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) paru merupakan penyakit infeksi kronis yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (M.Tb). Terdapat beberapa spesies *Mycobacterium*, antara lain: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. Leprae* yang juga dikenal sebagai Bakteri Tahan Asam (BTA). Kelompok bakteri *Mycobacterium* selain *Mycobacterium tuberculosis* yang bisa menimbulkan gangguan pada saluran nafas dikenal sebagai MOTT (*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*) yang terkadang bisa mengganggu penegakan diagnosis dan pengobatan TBC (Lamb GS, and Starke JR, 2014).

Tuberkulosis merupakan penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas, baik di negara berkembang maupun di negara maju. TB adalah salah satu dari 10 penyebab utama kematian di seluruh dunia. Indonesia menduduki peringkat kedua di dunia. Berdasarkan data *TB statistic 2019*, diperkirakan 1 juta anak (<15 tahun) didiagnosis menderita TB setiap tahunnya dan 205.000 anak meninggal karena TB. (World Health Organization, 2018).

Berdasarkan data WHO *Global Tuberculosis Report 2020* angka kesakitan TB di Indonesia adalah 845.000 jiwa dengan prevalensi dewasa 48% pada laki-laki, 35 % pada perempuan dan 17 % pada anak. Insidens TB paru anak di Sulawesi Selatan berdasarkan data Riskesdas

dalam kurun waktu tahun 2010-2015 menunjukkan angka yang meningkat yaitu tahun 2010 sebanyak 121/100.000 penduduk, tahun 2011 sebanyak 139/100.000 penduduk, tahun 2012 sebanyak 153/100.000 penduduk, tahun 2013 mencapai 159/100.000 penduduk dan di tahun 2014 kasus TB menjadi 152/100.000 penduduk hingga mencapai 154/100.000 penduduk di tahun 2015 (RISKESDAS, 2018).

Secara umum, tantangan dalam program pengendalian TB anak adalah sulitnya menegakkan diagnosis TB pada anak, oleh karena data TB anak yang sangat terbatas akibat kecenderungan diagnosis yang lebih (overdiagnosis) ataupun underdiagnosis dapat terjadi (Marais BJ, and Pai M, 2007).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Singh dan Kashyap (2012) yang bertujuan untuk mendeteksi dan membedakan infeksi M.Tb dengan menggunakan metode PCR. Metode ini memiliki nilai sensitivitas berkisar antara 73,33% hingga 84,61%, dan spesifisitasnya adalah 80%. Metode PCR secara signifikan lebih baik daripada metode smear/apusan dan kultur (Kurniati A *et al.*, 2019).

Pemeriksaan BTA sputum juga memegang peran dalam diagnosis awal dan pemantauan pengobatan TB paru. Pemeriksaan mikroskopis yang digunakan adalah metode pewarnaan *Ziehl Neelsen* (ZN) atau di kenal metode pewarnaan (Smear), dengan mendeteksi basil kuman *Mycobacterium Tuberculosis Complek* (MTC). Pemeriksaan langsung mikroskopis meskipun cepat dan murah, akan tetapi hasilnya kurang

sensitif , hanya 30-70 % penderita yang dapat di diagnosis dengan cara ini sensitif karena hasil baru positif bila terdapat kuman *M. tuberculosis* >10³ organisme/ml sputum (Kivihya-Ndugga L *et al.*, 2004).

Uji tuberkulin merupakan suatu tes sederhana, mudah dilakukan, dan sangat bermanfaat untuk mendiagnosa tuberkulosis meskipun memiliki keterbatasan. Pemeriksaan ini harus selalu dilakukan namun hasilnya dapat saja negatif pada 10 – 25 % pasien dengan penyakit yang aktif. Sensitivitas dan spesifitas yang relatif rendah (*Pediatric Tuberculosis Collaborative Group*, 2004, Laura S. Inselman, 2003).

Pemeriksaan *Ziehl Neelsen* (ZN) untuk melihat basil tahan asam (BTA) yang memiliki sensitivitas kurang memuaskan dibandingkan PCR. Penelitian Munir, dkk (2015), menunjukkan bahwa nilai positifitas, sensitivitas dan spesifisitas pewarnaan *Ziehl Neelsen* (ZN) pada spesimen sputum untuk mendiagnosis TB paru adalah 67,5%, 77,7% dan 91,4%, dibandingkan dengan uji PCR yang memiliki nilai positifitas, sensitivitas dan spesifisitas adalah 77,4%, 90,1% dan 98,3% (Nastiti K dkk., 2010; Kurniawan Eka dkk., 2016).

Berdasarkan data tersebut maka layak untuk dilakukan penelitian tentang akurasi pemeriksaan PCR, pemeriksaan mikroskopi *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dalam menentukan diagnosis tuberkulosis paru anak.

Diagnosis Tuberkulosis paru pada anak sulit sehingga sering terjadi misdiagnosis, baik overdiagnosis maupun underdiagnosis. Pada anak, batuk bukan merupakan gejala utama. Diagnosis pasti Tuberkulosis paru

ditegakkan dengan ditemukannya *M. tuberculosis* pada pemeriksaan sputum atau bilasan lambung, cairan serebrospinal, cairan pleura, atau pada biopsi jaringan. Kesulitan menegakkan diagnosis pasti pada anak disebabkan oleh dua hal, yaitu sedikitnya jumlah kuman (*paucibacillary*) dan sulitnya pengambilan spesimen sputum (Tania A. Thomas, 2017).

Sulitnya menegaakna TB paru pada anak sering menyebabkan misdiagnosis oleh karena batuk bukan gejala utama pada penderita Tb paru anak. Diagnosis pasti TB anak adalah dengan menemukan kuman M.Tb pada biakan kultur. Berdasarkan hal tersebut maka **perlu** untuk mengetahui nilai diagnostik pada pemeriksaan PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dalam menentukan diagnosis tuberkulosis paru pada anak, sehingga mengetahui pemeriksaan mana yang *real* dan sesuai dengan klinis pada TB paru anak. Penelitian ini akan memilih subjek penelitian pada penderita dengan gejala klinis TB dan berdasarkan foto thorax yang mendukung untuk diagnosis TB dan subjek penelitian belum mendapat terapi OAT.

Untuk meningkatkan ketepatan diagnosis TB, maka dikembangkan teknik diagnosis yang cepat dalam mendeteksi dini infeksi awal TB yaitu pemeriksaan PCR. Pemeriksaan PCR merupakan pemeriksaan mikrobiologi yang didasarkan pada amplifikasi regio asam nukleat tertentu yang spesifik pada *Mycobacterium tuberculosis*. PCR merupakan metode yang sangat berguna untuk deteksi cepat DNA mikobakteri dalam spesimen klinis. (Holmberg PJ *et al.*, 2020).

Uji tuberkulin didasarkan dengan adanya pelepasan sitokin inflamasi yang dihasilkan oleh sel limfosit T yang sebelumnya telah tersensitasi antigen *Mycobacterium Tuberculosis*. Pada uji tuberkulin, antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang disuntikkan dibawah lapisan epidermis menyebabkan infiltrasi limfosit dan dilepaskannya sitokin inflamasi. Reaksi inflamasi ini menyebabkan akumulasi sel- sel inflamasi dan menyebabkan terjadinya indurasi pada tempat suntikan. Reaksi uji tuberkulin yang dilakukan secara intradermal akan menghasilkan hipersensitivitas tipe IV atau *delayed type hypersensitivity* (DTH). Masuknya protein TB saat injeksi akan menyebabkan sel T tersensitisasi dan menggerakkan limfosit ke tempat suntikan. Limfosit akan merangsang terbentuknya indurasi dan vasolidilatasi lokal, edema, deposit fibrin dan penarikan sel inflamasi ke tempat suntikan (Andrea M. Cooper, 2009, Tania A. Thomas, 2017, Ines M *et al.*, 2018).

Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* paru pada sputum dapat dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemeriksaan bilas lambung dengan pewarnaan *Ziehl Neelsen*, dan pemeriksaan uji Tuberkulin. Pada pemeriksaan PCR, bahan yang digunakan pada penelitian yaitu sampel sputum dengan menggunakan primer *M. tbc* (T4T5). Primer merupakan oligonukleotida pendek yang mengawali reaksi polimerisasi dan berfungsi untuk menentukan awal serta akhir bagian yang akan diamplifikasi. Primer terdiri dari forward dan reverse. Primer forward (T4-5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 35') merupakan

penyalin DNA templat bagian forward, sedangkan primer reverse (T5-55' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 35') merupakan penyalin DNA templat bagian reverse. (Hause, B. and Fester, T, 2005)

Berdasarkan hal tersebut maka **penting** dilakukan penelitian untuk mengetahui nilai diagnostik pada masing-masing pemeriksaan PCR, Pewarnaan *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dalam menentukan diagnosis tuberkulosis paru pada anak.

Penelitian pada spesimen pasien TB dewasa sudah banyak dilakukan. Namun demikian penelitian yang menghasilkan bukti tentang akurasi pemeriksaan ini pada anak masih belum sebanyak penelitian pada orang dewasa. Penelitian kami bertujuan untuk mengevaluasi akurasi PCR dalam menentukan adanya penyakit TB pada anak dan membandingkan akurasi PCR dengan pemeriksaan *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dalam menentukan diagnosis TB paru pada anak. Penelitian yang menilai akurasi antara tiga pemeriksaan yaitu PCR, pewarnaan *Ziehl Neelsen* dan pemeriksaan uji tuberkulin dalam menentukan diagnosis tuberkulosis paru pada anak **belum pernah** dilakukan di Makassar.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana akurasi spesifisitas dan sensitivitas pemeriksaan PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen*, dan pemeriksaan uji tuberkulin pada anak dengan suspek TB paru?

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Menilai akurasi pemeriksaan PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen* dan pemeriksaan uji tuberkulin dalam penegakan diagnosis TB paru pada anak.

I.3.2 Tujuan Khusus

1. Melakukan pemeriksaan kultur sputum, PCR, *Ziehl Neelsen* dan uji Tuberkulin pada anak dengan suspek Tuberkulosis paru.
2. Membandingkan jumlah anak yang mengalami tuberkulosis paru berdasarkan hasil pemeriksaan kultur sputum dan pemeriksaan PCR.
3. Membandingkan jumlah anak yang mengalami tuberkulosis paru berdasarkan pemeriksaan kultur sputum dan pemeriksaan *Ziehl Neelsen*.
4. Membandingkan jumlah anak yang mengalami tuberkulosis paru berdasarkan hasil pemeriksaan kultur sputum dan pemeriksaan tuberkulin.
5. Membandingkan jumlah anak yang mengalami tuberkulosis paru berdasarkan PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen*, dan pemeriksaan tuberkulin.
6. Menentukan spesifisitas dan sensitivitas pemeriksaan PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen* dan pemeriksaan tuberkulin dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis paru anak.

I.4 Hipotesis

1. Jumlah anak penderita Tb paru dengan hasil PCR positif dan memiliki akurasi lebih tinggi dibandingkan dengan hasil pemeriksaan *Ziehl Neelsen* positif dan tuberkulin positif.
2. Jumlah anak penderita Tb paru dengan hasil pemeriksaan tuberkulin positif lebih tinggi dibandingkan dengan pemeriksaan *Ziehl Neelsen* positif.
3. Pemeriksaan *Ziehl Neelsen* memiliki akurasi lebih tinggi dibandingkan pemeriksaan tuberkulin.

I.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat untuk Pengembangan Ilmu
 - Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi ilmiah mengenai pemeriksaan PCR dalam penegakkan diagnosis tuberkulosis paru anak.
 - Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dan pengembangan yang berarti terhadap penelitian-penelitian tentang pemeriksaan penunjang dalam penegakkan diagnosis tuberkulosis paru anak.
2. Manfaat untuk Aplikasi Klinis
 - Memberi informasi terkait hasil PCR, pemeriksaan *Ziehl Neelsen* dan uji tuberkulin dan membantu klinisi dalam penegakkan diagnosis tuberkulosis paru anak.

- Membantu klinisi dalam alur pelayanan tuberkulosis anak, sehingga dapat tercapai efektivitas dan efisiensi dalam pengobatan penderita.
- Penelitian ini diharapkan dapat membantu menegakkan diagnosis Tuberkulosis paru pada anak lebih tepat sehingga dapat menurunkan angka mortalitas dan morbiditas Tuberkulosis paru anak.

3. Manfaat untuk data penelitian selanjutnya

- Sebagai tambahan data untuk penelitian selanjutnya untuk mengetahui bagaimana spesifisitas dan sensitivitas pemeriksaan penunjang lainnya pada tuberkulosis paru anak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Tuberkulosis Paru Anak

II.1.1. Definisi

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Kuman tersebut masuk ke dalam tubuh melalui udara pernafasan ke dalam paru. Kemudian kuman tersebut dapat menyebar dari paru ke bagian tubuh lain melalui sistem peredaran darah, sistem saluran limfe, saluran pernafasan (bronkus) atau penyebaran langsung ke organ tubuh lainnya seperti otak, ginjal, usus, tulang, dan kulit. Tuberkulosis telah dikenali sebagai keadaan klinis pada awal abad ke-19 tetapi belum digolongkan sebagai suatu penyakit infeksi sampai tahun 1882 ketika Koch mengidentifikasi *Mycobacterium tuberculosis*. (Notopuro PB dkk., 2008)

Paru merupakan *port d'entrée* lebih dari 98% kasus infeksi TB. Karena ukurannya yang sangat kecil (<5 µm), bersifat sangat infeksius dan dapat bertahan sampai 4 jam. Kuman TB dalam percik renik (*droplet nuclei*) yang terhirup dapat mencapai alveolus. Satu batuk dapat mengeluarkan hingga 3000 percik renik, sedangkan satu kali bersin dapat mengeluarkan hingga 1 juta percik renik. (Erkens CGM *et al.*, 2010).

Faktor risiko terjadinya infeksi TB antara lain adalah anak yang terpajan dengan orang dewasa dengan TB aktif (kontak TB positif), daerah endemis, kemiskinan, lingkungan yang tidak sehat (higiene dan

sanitasi tidak baik), dan tempat penampungan umum yang banyak terdapat pasien TB dewasa aktif. Sumber infeksi TB pada anak yang terpenting adalah pajanan terhadap orang dewasa yang infeksius, terutama dengan BTA positif. Bayi dari seorang ibu dengan BTA sputum positif memiliki risiko tinggi terinfeksi TB. Semakin erat bayi tersebut dengan ibunya, semakin besar pula kemungkinan bayi tersebut terpajan percik relik (*droplet nuclei*) yang infeksius (Erkens CGM *et al.*, 2010).

Untuk menilai faktor risiko harus dibedakan antara infeksi TB dan sakit TB. Risiko infeksi TB tergantung pada lamanya terpajan, kedekatan dengan kasus TB, dan beban kuman pada kasus sumber. Risiko tinggi untuk sakit TB antara lain umur kurang dari 5 tahun (balita), malnutritisi, infeksi TB baru, dan imunosupresi terutama karena HIV. Kurang lebih 10% individu yang terkena infeksi TB akan menjadi sakit. Pada keadaan tertentu (balita dan usia pubertas, daya tahan tubuh menurun), kemungkinan menjadi sakit lebih besar. Sakit tuberkulosis adalah keadaan pada anak didapatkan gejala klinis TB, uji tuberkulin yang positif serta didapatkan radiologis dan pemeriksaan mikrobiologi yang mendukung. (Holmberg PJ *et al.*, 2020; Notopuro PB dkk., 2008).

II.1.2. Epidemiologi

Berdasarkan laporan World Health Organization (WHO), di Indonesia pada tahun 2016 terdapat 10,4 juta kasus TB (CI 8,8 juta – 12, juta) yang setara dengan 120 kasus per 100.000 penduduk. Pada tahun 2017 tercatat 10 juta kasus TB dan 1,6 juta meninggal karena penyakit ini.

Pada tahun 2018, kasus TB di Indonesia menurun sebesar 842.000 kasus, namun kasus MDR-TB diperkirakan sebanyak 23.000 kasus. Kasus TB Anak dikelompokkan dalam kelompok umur 0-4 tahun dan 5-14 tahun, dengan jumlah kasus pada kelompok umur 5-14 tahun yang lebih tinggi dari kelompok umur 0-4 tahun (*World Health Organization, 2018*).

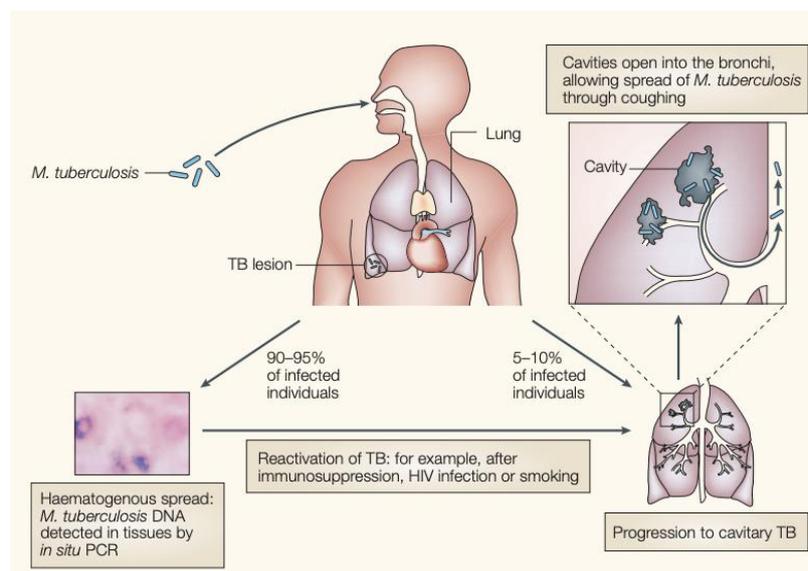
II.1.3. Patogenesis

Pada sebagian kasus, kuman TB dapat dihancurkan seluruhnya oleh mekanisme imunologis non spesifik, sehingga tidak terjadi respon imun imunologis spesifik. Akan tetapi, pada sebagian kasus lainnya, tidak seluruhnya dapat dihancurkan. Pada individu yang tidak dapat menghancurkan seluruh kuman, makrofag alveolus akan memfagosit kuman TB yang sebagian besar dihancurkan. Akan tetapi, sebagian kecil kuman TB yang tidak dihancurkan akan terus berkembang biak dalam makrofag, dan akhirnya menyebabkan lisis makrofag (*Pediatric Tuberculosis Collaborative Group, 2004; Tania A. Thomas, 2017*).

Basil kuman akan tumbuh perlahan membelah setiap 23 hingga 32 jam di dalam makrofag. *M. tuberculosis* tidak memiliki endtoksin dan eksotoksin, sehingga tidak terjadi respon yang segera pada host yang terinfeksi. Tuberkel kuman terus tumbuh dalam 2-12 minggu sehingga mencapai 10^3 - 10^4 . jumlah ini cukup untuk menimbulkan respon imun seluler yang dapat dideteksi dengan uji tuberkulin. Kuman selanjutnya akan merusak makrofag dan yang akan mengeluarkan produk tuberkel basilus dan kemokin yang menstimulasi respon imun. Selanjutnya kuman

TB akan membentuk lesi di tempat tersebut yang dinamakan fokus primer Ghon.

Mekanisme pertahanan spesifik terjadi 4-8 minggu setelah infeksi berupa sensitasi sel T terhadap antigen spesifik. Mekanisme tersebut pada tuberkulosis ditandai dengan dimulainya respon imun *Cell-Mediated Immunity* (CMI) dan *Delayed-Type Hypersensitivity* (DTH) yang akan meningkatkan kemampuan pejamu untuk menghambat atau mengeliminasi kuman. Respon DTH ditandai dengan nekrosis perkijuan akibat lisisnya sel makrofag alveoli yang belum teraktivasi, sedang respon CMI timbul setelah makrofag alveoli teraktivasi sehingga sel epiteloid menjadi matur (Andrea M. Cooper, 2009).

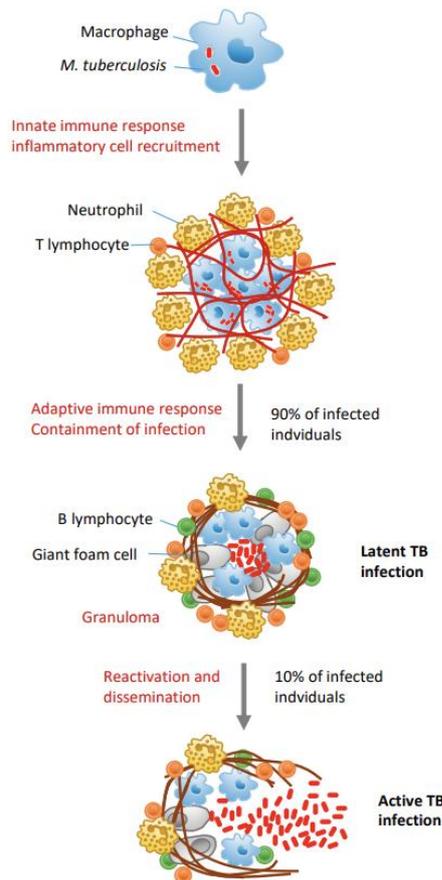


Gambar 1. Patomekanisme infeksi TB.
Dikutip dari kepustakaan Rook et al, 2005.

Pada manusia, terdapat fase penyebaran melalui darah sekitar 3 minggu setelah infeksi terjadi pada individu yang tidak terimunisasi. Sel T-helper 1 dengan cepat merespons hal ini. Pada 90-95% individu, infeksi dapat bersifat laten, dan DNA *M.Tb* dapat dideteksi menggunakan PCR *in situ*. Pada sebagian kecil individu, ada perkembangan penyakit yang progresif, biasanya pada apeks paru dan menimbulkan kavitas, dimana rasio dari ventilasi terhadap perfusi darah paling tinggi.

Dari fokus primer Ghon, kuman TB menyebar melalui saluran limfe menuju kelenjar limfe regional, yaitu kelenjar limfe yang mempunyai saluran limfe ke lokasi fokus primer. Penyebaran ini menyebabkan terjadinya inflamasi di saluran limfe (limfangitis) dan kelenjar limfe (limfadenitis) yang terkena. Jika fokus primer terletak di lobus bawah atau lobus tengah, kelenjar limfe yang akan terlibat adalah kelenjar limfe parahilus (parahiler), sedangkan jika fokus primer terletak di apeks paru, yang akan terlibat adalah kelenjar paratrakeal. Gabungan antara fokus primer, limfangitis, dan limfadenitis dinamakan kompleks primer (Notopuro PB dkk., 2008).

Pada saat terbentuknya kompleks primer, infeksi TB primer dinyatakan telah terjadi. Setelah terjadi kompleks primer, imunitas seluler tubuh terhadap TB terbentuk, yang dapat diketahui dengan adanya hipersensitivitas terhadap tuberkulo protein, yaitu uji tuberkulin positif. Selama masa inkubasi uji tuberkulin masih negatif. Pada sebagian besar individu dengan sistem imun yang berfungsi baik, pada saat sistem imun seluler spesifik berkembang, proliferasi kuman TB terhenti. Akan tetapi, sejumlah kecil kuman TB dapat tetap hidup dalam granuloma. Bila imunitas seluler telah terbentuk, kuman TB baru yang masuk ke dalam alveoli akan segera dimusnahkan oleh CMI (Hemingway C *et al.*, 2017).



Gambar 2. Respon imun terhadap infeksi M.TB.
Dikutip dari kepustakaan Hemingway *Cet al.*, 2017

Respon imun bawaan menandakan fase awal infeksi, dengan perekrutan sel-sel inflamasi pada paru. Diseminasi bakteri disalurkan menuju limfonodus dan menyebabkan persiapan aktivasi sel T. Perekrutan makrofag, neutrofil, sel T, dan sel B pada paru menyebabkan pembentukan granuloma, yang mengandung *M.tuberculosis* pada kasus laten. Tetapi, pada sekitar 10% individu yang terinfeksi, *M.tuberculosis* keluar dari granuloma dan menjadi tb aktif

Penyebaran hematogen umumnya terjadi secara sporadik (*occult hematogenic spread*). Kuman TB membuat fokus koloni di berbagai organ dengan vaskularisasi yang baik kemudian reaktivasi dikemudian hari. Sedang kompleks primer terdiri dari fokus primer (limfangitis dan limfadenitis regional). Sakit TB primer dapat terjadi kapan saja pada tahap

ini dan merupakan proses masuknya kuman TB, terjadinya penyebaran hematogen, terbentuknya kompleks primer dan imunitas seluler spesifik, sehingga pasien mengalami infeksi TB dan dapat menjadi sakit TB primer. Tuberkulosis miliar, TB pleura dan meningitis TB dapat terjadi setiap saat, tetapi biasanya berlangsung dalam 3-6 bulan pertama setelah infeksi TB (Erkens CGM *et al.*, 2010; Kasambira TS,*et al.*, 2017).



Gambar 3 Perjalanan penyakit Tuberkulosis Primer
Dikutip dari kepustakaan Kasambira TS,*et al.*,2017

Infeksi TB dimulai dengan kompleks primer sekitar 3-24 bulan setelah paparan. Waktu paparan sampai 1 tahun merupakan risiko tertinggi untuk komplikasi dan penyebaran serta pada saat itu tes tuberkulin memberikan hasil positif. Komplikasi seperti efusi pleura saat 3-6bulan, meningitis tb biasanya dalam 12 bulan , tb tulang dan ginjal lebih dari 3 tahun.

II.1.4. Manifestasi Klinik

Patogenesis TB sangat kompleks, sehingga manifestasi klinis TB sangat bervariasi tergantung pada beberapa faktor. Faktor yang berperan adalah kuman TB, pejamu, serta interaksi antara keduanya. Faktor kuman bergantung pada jumlah dan virulensi dari kuman, sedangkan faktor

pejamu bergantung pada usia, dan kompetensi imun serta kerentanan pejamu pada awal terjadinya infeksi. Anak seringkali tidak menunjukkan gejala walaupun sudah tampak pembesaran kelenjar hilus pada foto toraks. Manifestasi klinis TB terbagi dua, yaitu manifestasi sistemik dan manifestasi spesifik organ/lokal.(Hemingway *Cet al.*, 2017).

Manifestasi sistemik adalah gejala yang bersifat umum dan tidak spesifik karena dapat disebabkan oleh berbagai penyakit atau keadaan lain. Manifestasi klinis spesifik organ bergantung pada organ yang terkena, misalnya kelenjar limfe, susunan saraf pusat, tulang, dan kulit. Rangkuman dari gejala umum pada TB anak adalah sebagai berikut:

1. Demam lama (≥ 2 minggu) dan/atau berulang tanpa sebab yang jelas (bukan demam tifoid, infeksi saluran kemih, malaria dan lain-lain). Demam umumnya tidak tinggi. Keringat malam saja bukan merupakan gejala spesifik TB pada anak apabila tidak disertai dengan gejala sistemik/ umum lain.
2. Nafsu makan tidak ada (anoreksia) dengan gagal tumbuh dan berat badan tidak naik dengan adekuat (*failure to thrive*).
3. Berat badan turun tanpa sebab yang jelas, atau tidak naik dalam 2 bulan dengan penanganan gizi yang adekuat.
4. Batuk lama > 2 minggu, dan sebab lain telah disingkirkan.
5. Lesu, malaise, anak kurang aktif bermain.

(Petunjuk Teknis Manajemen dan Tatalaksana TB anak, 2016)

Gejala klinis pada organ yang terkena TB, tergantung jenis organ yang terkena, misalnya kelenjar limfe, susunan saraf pusat (SSP), tulang, dan kulit. Rangkuman dari gejala spesifik sesuai organ yang terkena adalah sebagai berikut :

1. Tuberkulosis kelenjar (terbanyak di daerah leher atau region *collii*):
Pembesaran KGB multipel (>1 KGB), diameter 2x2 cm, konsistensi kenyal, tidak nyeri, dan kadang saling melekat atau *konfluens*.
2. Tuberkulosis otak dan selaput otak:
 - Meningitis TB: Gejala-gejala meningitis dengan seringkali disertai gejala akibat keterlibatan saraf-saraf otak yang terkena
 - Tuberkuloma otak: Gejala-gejala adanya lesi desak ruang.
3. Tuberkulosis sistem skeletal:
 - Tulang belakang (spondilitis): Penonjolan tulang belakang (gibbus).
 - Tulang panggul (koksitis): Pincang, gangguan berjalan, atau tanda peradangan di daerah panggul.
 - Tulang lutut (gonitis): Pincang dan/atau bengkak pada lutut tanpa sebab yang jelas.
 - Tulang kaki dan tangan (spina ventosa/daktilitis).
4. Skrofuloderma:
5. Tuberkulosis mata:
 - Konjungtivitis fliktenularis (*conjunctivitis phlyctenularis*).
 - Tuberkelkoroid (hanya terlihat dengan funduskopi).

6. Tuberkulosis organ-organ lainnya, misalnya peritonitis TB, TB ginjal (Setyanto D.B, 2015).

II.1.5. Diagnosis

Tuberkulosis paru merupakan tipe tersering dan paling utama penyakit TB ditinjau dari sudut pandang kesehatan masyarakat. Diagnosis ditegakkan melalui gejala klinis, foto paru, menemukan kuman secara mikroskopis melalui pengecatan sputum, dan biakan kuman TB. Standar emas (*the gold standard*) diagnosis TB adalah kultur kuman TB. Diagnosis TB pada anak sangat sukar karena gambaran klinis TB tidak spesifik dan foto paru sulit diinterpretasi. Ditemukannya kuman merupakan standar baku emas sebagai diagnosis pasti TB, tetapi pada anak cara ini sulit dilakukan oleh karena TB pada anak mempunyai jumlah kuman sangat sedikit. Diagnosis TB pada anak seringkali didasarkan atas keluhan dan gejala yang timbul, foto paru, uji tuberkulin, dan adanya kontak dengan kasus dewasa (Nelson LJ, Wells CD, 2004).

Pendekatan diagnosis yang direkomendasikan oleh WHO (2006) untuk mendiagnosis TB pada anak meliputi:

1. Anamnesis

Riwayat kontak dengan sumber penularan TB (penderita TB paru yang basil tahan asam/BTA positif maupun BTA negatif disertai hasil kultur MTB positif) dan gejala yang konsisten dengan TB, meliputi berat badan menurun yang tidak diketahui sebabnya atau gagal tumbuh normal, demam tanpa sebab yang jelas dan berlangsung lebih dari 2 minggu, batuk kronik (lebih dari 21 hari).

2. Pemeriksaan fisik

Penurunan berat badan atau gagal tumbuh, khususnya setelah diterapi dengan program perbaikan gizi, merupakan indikator penting untuk penyakit kronik pada anak (salah satunya disebabkan oleh TB). Gejala fisik penting lainnya meliputi:

- a. Gejala fisik sangat sugestif TB di luar paru:
 - i. Gibus (berasal dari TB tulang belakang).
 - ii. Limfadenopati servikal yang tidak nyeri disertai pembentukan fistula.
- b. Gejala fisik yang membutuhkan investigasi untuk menyingkirkan TB di luar paru:
 - i. Meningitis yang tidak berespons terhadap terapi antibiotik, dengan onset subakut atau peningkatan tekanan intrakranial.
 - ii. Efusi pleura.
 - iii. Efusi perikardium.
 - iv. Distensi abdomen disertai asites.
 - v. Pembesaran kelenjar limfe tanpa nyeri dan tanpa fistula.
 - vi. Pembesaran sendi tanpa nyeri.
 - vii. Tanda-tanda hipersensitif tuberkulin (konjungtivitis fliktenularis, eritema nodosum).

3. Uji tuberkulin

4. Konfirmasi bakteriologis kapanpun jika memungkinkan.

Konfirmasi bakteriologis penting dilakukan khususnya pada anak yang dicurigai menderita TB yang resisten obat anti tuberkulosis (OAT), infeksi *Human Immunodeficiency Virus*/HIV, penyakit TB berat atau disertai komplikasi dan pada diagnosis yang meragukan. Spesimen pemeriksaan bakteriologis dapat berasal dari sputum, cairan lambung dan spesimen khusus lainnya (misalnya biopsi kelenjar limfe). Pemeriksaan bakteriologis yang dilakukan meliputi pemeriksaan mikroskopis apusan langsung untuk menemukan BTA, pemeriksaan biakan kuman MTB, dan *Polymerase Chain Reaction*/PCR

5. Pemeriksaan penunjang yang sesuai, misalnya:

- a. Foto toraks pada TB paru.
- b. Biopsi eksisi atau aspirasi jarum halus pada TB kelenjar limfe (khususnya servikal).
- c. Foto toraks dan pungsi lumbal pada TB miliar.
- d. Pungsi lumbal dan *Computed Tomography (CT) scan* pada meningitis TB.

6. Tes HIV (pada area yang tinggi prevalensi HIV).

(Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015).

Karena sulitnya menegakkan diagnosis TB pada anak, banyak usaha membuat pedoman diagnosis dengan sistem skor dan alur diagnostik sebagai berikut ini:

Tabel 1. Sistem Skor Diagnosis Tuberkulosis Anak

Parameter	0	1	2	3
Kontak TB	Tidak jelas	-	Laporan keluarga (BTA negatif atau tidak jelas)	BTA (+)
Uji Tuberkulin	Negatif	-	-	Positif
Status gizi	-	BB/TB<90% atau BB/U<80%	Klinis gizi buruk atau BB/TB<70% atau BB/U<60%	-
Demam tanpa sebab jelas	-	≥ 2 minggu	-	-
Batuk kronik	-	≥ 3 minggu	-	-
Pembesaran kelenjar limfe kolli, aksila, inguinal	-	≥ 1 cm, jumlah >1, tidak nyeri	-	-
Pembengkakan tulang/sendi panggul, lutut, falang	-	Ada pembengkakan	-	-
Foto toraks	Normal/kelainan tidak jelas	Gambaran sugestif TB	-	-

Catatan:

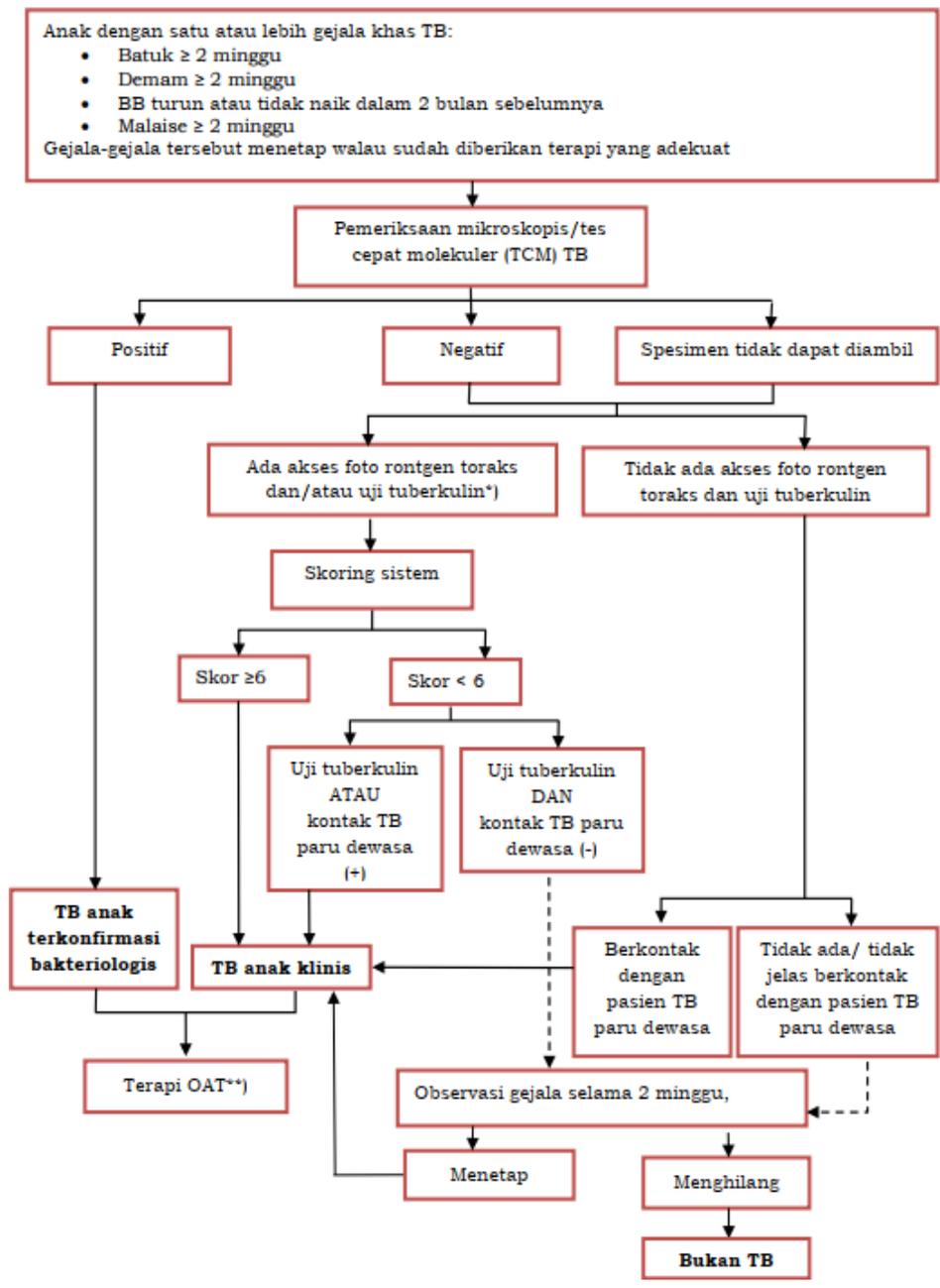
- Diagnosis dengan sistem skor ditegakkan oleh dokter.
- Jika dijumpai gambaran milier atau skrofuloderma, langsung didiagnosis TB.
- Berat badan dinilai saat pasien datang.
- Demam dan batuk tidak memiliki respons terhadap terapi baku.
- Foto toraks bukan merupakan alat diagnostik utama pada TB anak.
- Gambaran sugestif TB, berupa: pembesaran kelenjar hilus atau paratrakeal dengan/tanpa infiltrat; konsolidasi segmental/lobar; kalsifikasi dengan infiltrat; atelektasis; tuberkuloma. Gambaran milier tidak dihitung dalam skor karena diperlakukan secara khusus.
- Mengingat pentingnya peran uji tuberkulin dalam mendiagnosis TB anak, maka sebaiknya disediakan tuberkulin di tempat pelayanan kesehatan.
- Pada anak yang diberi imunisasi BCG, bila terjadi reaksi cepat BCG (≤ 7 hari) harus dievaluasi dengan sistem skoring TB anak, BCG bukan merupakan alat diagnostik.
- Diagnosis TB anak ditegakkan bila jumlah skor ≥ 6 (skor maksimal 13).

Alur diagnosis TB pada anak

Alur diagnosis TB ini digunakan untuk penegakkan diagnosis Tb pada anak yang bergejala TB, baik dengan maupun tanpa kontak TB.

Pada anak yang tidak bergejala tetapi kontak dengan pasien TB dewasa, pendekatan tatalaksananya alur investigasi kontak. Jadi pintu masuk alur ini, adalah anak dengan gejala TB. Langkah awal pada alur diagnosis adalah pengambilan dan pemeriksaan sputum :

1. Jika hasil pemeriksaan mikrobiologi (BTA/uji tuberkulin) positif , anak di diagnosis TB dan diberikan OAT.
2. Jika hasil pemeriksaan mikrobiologi (BTA/uji Tuberkulin) negatif atau spesimen tidak dapat diambil, lakukan pemeriksaan foto thoraks ;
 - a. Jika tidak ada fasilitas atau tidak ada akses untuk foto thoraks ;
 - 1) Jika anak ada riwayat kontak erat dengan pasien TB menular, anak dapat didiagnosis TB dan diberikan OAT.
 - 2) Jika tidak ada riwayat kontak, lakukan observasi klinik selama 2-4 minggu. Bila ada follow-up gejala menetap, anak dirujuk untuk pemeriksaan tuberkulin dan foto thoraks.
 - b. Jika tersedia fasilitas untuk uji tuberkulin dan foto thoraks, hitung skor total menggunakan sistem skoring;
 - 1) Jika skor total ≥ 6 ; diagnosis TB dan terapi OAT.
 - 2) Jika skor total < 6 , dengan uji tuberkulin positif atau ada kontak erat : diagnosis TB dan terapi OAT.
 - 3) Jika skor total < 6 , dan uji tuberkulin negatif atau tidak ada kontak erat : observasi gejala selama 2-4 minggu, jika menetap, evaluasi ulang kemungkinan diagnosis TB (Andrea TC, dan Jeffrey RS, 2007).



Keterangan :

*)dapat dilakukan bersamaan dengan pemeriksaan sputum

**)kontak TB paru dewasa dan kontak Tb paru anak terkonfirmasi bakteriologis

***)evaluasi respon pengobatan. Jika tidak ada respon dengan pengobatan adekuat, evaluasi ulang diagnosis Tb dan adanya komorbid atau rujuk.

Gambar 4. Alur diagnosis Tb paru anak

Dikutip dari kepustakaan Petunjuk Teknis Manajemen dan Tatalaksana TB anak, 2016

II.1.6. Tatalaksana

Tatalaksana TB pada anak merupakan suatu kesatuan yang tidak terpisahkan antara pemberian medikamentosa, penanganan gizi, dan pengobatan penyakit penyerta. Selain itu penting untuk dilakukan pelacakan sumber infeksi, dan bila ditemukan sumber infeksi juga harus mendapatkan pengobatan. Pemberian medikamentosa tidak terlepas dari penyuluhan kesehatan kepada masyarakat atau kepada orang tua pasien mengenai pentingnya menelan obat secara teratur dalam jangka waktu yang cukup lama, pengawasan terhadap jadwal pemberian obat, keyakinan bahwa obat diminum dan sebagainya (Nelson LJ, Wells CD, 2004).

Prinsip dasar OAT adalah harus dapat menembus berbagai jaringan termasuk selaput otak. Farmakokinetik OAT pada anak berbeda dengan orang dewasa. Toleransi anak terhadap dosis OAT lebih tinggi. Secara ringkas, dosis dan efek samping OAT dapat dilihat pada tabel 3 (Hemingway C *et al.*, 2017).

Tabel 2. Obat anti tuberkulosis

Namaobat	Dosis harian (mg/kgBB/hari)	Dosis maksimal (mg/hari)	EfekSamping
Isoniazid	5-15*	300	Hepatitis, neuritis perifer, hipersensitivitas
Rifampisin**	10-20	600	Gastrointestinal, reaksikulit, hepatitis, trombositopenia, peningkatan enzim hati, cairan tubuh berwarna oranye kemerahan
Pirazinamid	15-30	2000	Toksitas hati, artralgia, gastrointestinal
Etambutol	15-20	1250	Neuritis optik, ketajaman mata berkurang, butawarna merah hijau, penyempitan lapang pandang, hipersensitivitas, gastrointestinal
Streptomisin	15-40	1000	Ototoksik, nefrotoksik

* Bila isoniazid dikombinasikan dengan rifampisin, dosisnya tidak boleh melebihi 10 mg/kgBB/hari.

** Rifampisin tidak boleh diracik dalam satu puyer dengan OAT lain karena dapat mengganggu bioavailabilitas rifampisin. Rifampisin diabsorpsi dengan baik melalui sistem gastrointestinal pada saat perut kosong (satu jam sebelum makan).

Dikutip dari kepustakaan Petunjuk Teknis Manajemen dan Tatalaksana TB anak, 2016

Tabel 3. Panduan OAT dan lama pengobatan TB pada anak

Kategori diagnostik	Fase intensif	Fase lanjutan
TB Klinis	2 HRZ	4HR
TB Kelenjar		
Efusi pleura TB		
TB Terkonfirmasi Bakteriologis	2 HRZE	4HR
TB paru dengan kerusakan luas		
TB ekstaparu (selain TB meningitis dan TB tulang/sendi)		
TB tulang/sendi	2HRZE	10HR
Tb Milier		
Tb meningitis		

Dikutip dari kepustakaan Petunjuk Teknis Manajemen dan Tatalaksana TB anak, 2016

II.2. Immunologi Infeksi *Mycobacterium Tuberculosis*

Penyakit TB dapat terjadi di bagian tubuh manapun, tetapi pada umumnya terjadi di paru, mulai infiltrasi yang paling ringan hingga bentuk kronik, kavitas, dan kerusakan paru yang berat. Manifestasi klinis yang berbeda-beda ini merupakan refleksi keseimbangan antara kuman dan pejamu. Kualitas mekanisme pertahanan tubuh yang ada sangat menentukan hasil keseimbangan tersebut (Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015).

II.2.1 Respon humoral terhadap kuman TB

Respon humoral yang diperantarai oleh sel limfosit B kurang berperan penting dalam proteksi terhadap infeksi, tetapi dapat berperan sebagai alat serodiagnosis. Meskipun demikian, antibodi IgG melalui reseptor FC mampu melakukan opsonisasi, sehingga bersama dengan reseptor lainnya ada di permukaan sel makrofag dapat membantu sel fagosit untuk memfagosit kuman TB (Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015).

Pemeriksaan serologis yang sensitif dan spesifik tidak mudah ditemukan. Hal ini dikarenakan sel kuman TB terdiri dari bermacam-macam protein, karbohidrat, lemak yang berdiri sendiri, serta lipopolisakarida, glikolipid, peptidoglikan, dan glikoprotein yang saling berhubungan erat, sehingga jumlah antigen dan epitop menjadi sangat banyak dan rumit. Sistem yang ada pada pejamu harus memberi respons terhadap antigen dan epitop yang sangat banyak tersebut, sehingga

pejamu akan memproduksi sangat banyak antibodi terhadap berbagai macam antigen. Akibatnya, respon humoral yang terbentuk mempunyai spektrum yang luas (Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015).

Beberapa penelitian menemukan bahwa antibodi yang termasuk pada pasien TB sangat aktif, bermacam-macam, sangat tergantung pada jenis antigen kuman dan masing-masing individu. Respon pengenalan terhadap antigen kuman TB bagi setiap orang sangat bervariasi dan hal ini merupakan kunci dari imunitas humoral tersebut. Hal tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor berikut:

1. Imunogenetik pejamu yang terinfeksi

Telah dibuktikan bahwa individu dengan HLA tertentu lebih mudah terkena infeksi.

2. Produksi antigen yang berbeda pada setiap stadium TB.

Seperti yang telah diketahui, setiap stadium penyakit TB pada setiap individu dapat sangat bervariasi.

3. Ekspresi gen

Setiap Galur (*strain*) kuman TB dapat menimbulkan respons yang berbeda pada setiap orang.

4. Jumlah kuman dalam sputum

Pada banyak penelitian, pada pasien TB dan BTA positif (sputum smear positive) yang menunjukkan jumlah kuman yang banyak, beberapa antigen kuman TB lebih sering bereaksi positif.

5. Pengobatan tuberkulostatika

Beberapa penelitian membuktikan bahwa terjadi perubahan aviditas dan afinitas antibodi selama pengobatan. Perubahan tersebut dapat digunakan untuk memprediksi keberhasilan pengobatan (De Martino M *et al.*, 2019).

Hanya sekitar seperempat dari ratusan protein yang ada pada filtrat kultur dapat bereaksi kuat dengan antibodi serum pasien TB. Hal ini menunjukkan bahwa sangat banyak protein yang diekspresikan selama proses pertumbuhan kuman dalam media kultur yang tidak terekspresikan dengan baik selama infeksi aktif (*in vivo*), atau protein-protein tersebut memang tidak imunogenik. Terbukti pula bahwa profil antigen yang dikenal dengan antibodi sangat dipengaruhi oleh progresivitas penyakit (Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015; De Martino M *et al.*, 2019).

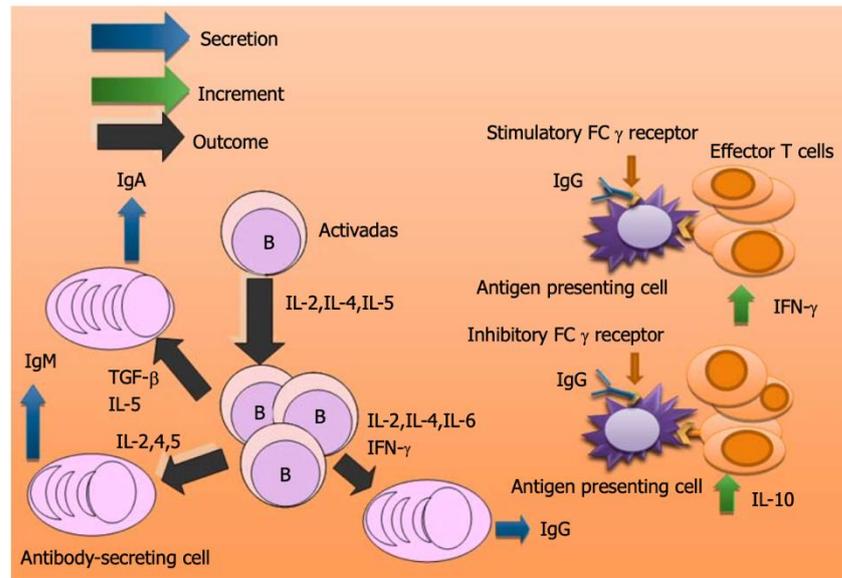
Ditemukannya antibodi, terutama pada kasus TB dengan kavitas, menunjukkan bahwa ekspresi antigen terutama terjadi pada proses replikasi kuman ekstraseluler di dalam materi perkijuan yang mengalami perlunakan (*liquefaction*). Dengan kata lain, antigen-antigen tersebut baru menimbulkan respons imun pada stadium perlunakan (De Martino M *et al.*, 2019).

Tuberkulosis paru pada saat yang sama dapat menimbulkan lesi dengan stadium yang berbeda-beda, seperti terbentuknya kavitas, terjadinya perlunakan, fibrosis, bahkan kalsifikasi. Jumlah kuman dan

bahan metabolit yang dihasilkan kuman dapat berbeda pada setiap kavitas yang terbentuk (De Martino M *et al.*, 2019).

Antibodi sebagai hasil respons imun humoral yang sering digunakan pada serodiagnostik TB adalah IgM, IgA, dan IgG. Immunoglobulin G merupakan antibodi yang paling sering digunakan untuk menentukan adanya TB aktif karena IgG mempunyai sensitifitas terbaik di antara imunoglobulin lainnya. Immunoglobulin A merupakan antibodi humoral yang mempunyai spesifisitas paling kuat untuk menegakkan diagnosis secara serologik. Immunoglobulin M memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang paling lemah, tetapi dapat mendeteksi adanya proses reaktivasi penyakit TB (TB pasca-primer). Kombinasi titer antibodi IgA dan IgG dapat meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas terhadap adanya infeksi TB aktif hingga 90% (Mayer-Barber KD, dan Barber DL, 2015; De Martino M *et al.*, 2019).

II.2.2. Respons Seluler Terhadap kuman TB



Gambar 5. Sitokin yang terlibat dalam infeksi M.Tb.

Dikutip dari kepustakaan Romero, 2015

Peran sel B pada infeksi tb yakni dengan memproduksi sitokin proinflamasi dan membentuk antibody immunoglobulin G dan A. kemudian immunoglobulin G dengan APC dan sel T efektor memicu IL-10 dan IFN- γ mengatasi infeksi tb.

Sebagian besar manusia mampu mengatasi infeksi kuman TB secara sempurna dan efisien. Hal ini terutama disebabkan oleh koordinasi respons imun yang efisien melalui jaringan sitokin (*Cytokine network*). Sitokin proinflamasi, berperan dalam terjadinya migrasi sel-sel leukosit ke tempat kuman TB berada. Sel makrofag dan sel dendrit yang terinfeksi akan memproduksi IL-12 dan IL-18. Interleukin 12 meregulasi sistem imun mengarah ke respons Th₁, sehingga mampu memproduksi IFN- γ yang akan menekan produksi IL-10 dan IL-4. Pasien yang mempunyai sifat genetik di IL-12, reseptor IL-12, atau IFN- γ , lebih rentan terhadap infeksi TB, bahkan dapat mengalami diseminasi BCG dan infeksi *Mycobacterium avium* (De Martino Met al., 2019).

Sel T memproduksi tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) yang juga diproduksi oleh makrofag. Pembentukan granuloma terutama dipengaruhi oleh TNF- α , IFN- γ (interferon γ), TGF- β (transforming growth factor β), dan limforoksin $\alpha 3$, *Tumor necrosis factor-a dan IFN- γ* merupakan sitokin utama yang bertanggung jawab dalam aktivasi makrofag. Sitokin-sitokin tersebut mengaktifasi makrofag agar mampu memproduksi *Inducibel Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan mempertahankan jalur *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) dan terbentuknya molekul efektor oksidatif (Shrivastava R, 2018).

Meskipun molekul oksidatif dan molekul nitrostatif dapat menekan pertumbuhan kuman, namun molekul tersebut tidak mampu mengeliminasi kuman dari dalam sel. Kuman TB mampu bertahan terhadap mekanisme efektor pejamu karena peranan peroksidase dan fosfonitrit reductase yang dihasilkan pada metabolisme kuman TB (Vila NCY *et al.*, 2012).

Interferon γ dan iNOS sangat diperlukan untuk menunjang keseimbangan antara persistensi kuman dengan pertahanan imun. Pemberian inhibitor iNOS seperti aminogramidin menimbulkan reaktivasi penyakit TB dan kematian pada tikus percobaan (De Martino *Met al.*, 2019; Vila NCY *et al.*, 2012).

Tumor Necrosis Factor-a mempunyai peran yang sinergis dengan IFN- γ dalam proses aktivasi makrofag. *Tumor necrosis factor-a* berperan penting dalam menjaga persistensi kuman namun mencegah

penyebarannya ke bagian lain paru atau ke organ lain. *Tumor necrosis factor- α* berperan dalam pembentukan dinding fibrinosa dan enkapsulasi granuloma bersama-sama dengan TGF- β . Selain itu, TNF- α mampu mencegah penyebaran elemen kuman melalui modulasi kadar sitokin yang akan membatasi proses histopatologis. Limfotoksin- $\alpha 3$ (salah satu famili TNF), bersama-sama dengan TNF- α , pembantu pembentukan granuloma dan mempertahankannya (De Martino *Met al.*, 2019; Vila NCY *et al.*, 2012).

Penurunan kadar TNF- α akan merusak keseimbangan antara kuman TB dan pejamu. TNF- α mengatur ekspresi reseptor kemokin dan sekresi kemokin seperti MIP-1 α dan MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein 1*), MCP-1 (*monocyte chemoattractan protein 1*), serta RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*). *Tumor necrosis factor- α* berperan pada imunitas infeksi TB melalui rekrutmen sel-sel imun seperti monosit, limfosit dan neutrofil. Reseptor kemokin CCR 5 (*chemokine cell receptor 5*) merupakan receptor MIP-1 α , MIP-1 β , dan RANTES, yang regulasinya meningkat pada makrofag alveolus pasien TB. Receptor CCR 2 adalah receptor MCP-1, MCP-3, dan MCP-5, yang berperan dalam proteksi dan pembentukan granuloma seperti reseptor CXCR 3 yang merupakan reseptor bagi MIG (*monokine induced by interferon gamma*), IP-10 (*interferon induced protein*), dan I-TAC (*interferon inducible T-cell alfa chemokine*)(De Martino *Met al.*, 2019; Shrivastava R , 2018; Vila NCY *et al.*, 2012).

Secara keseluruhan, kelompok sitokin yang produksinya distimulasi oleh kuman TB, yaitu:

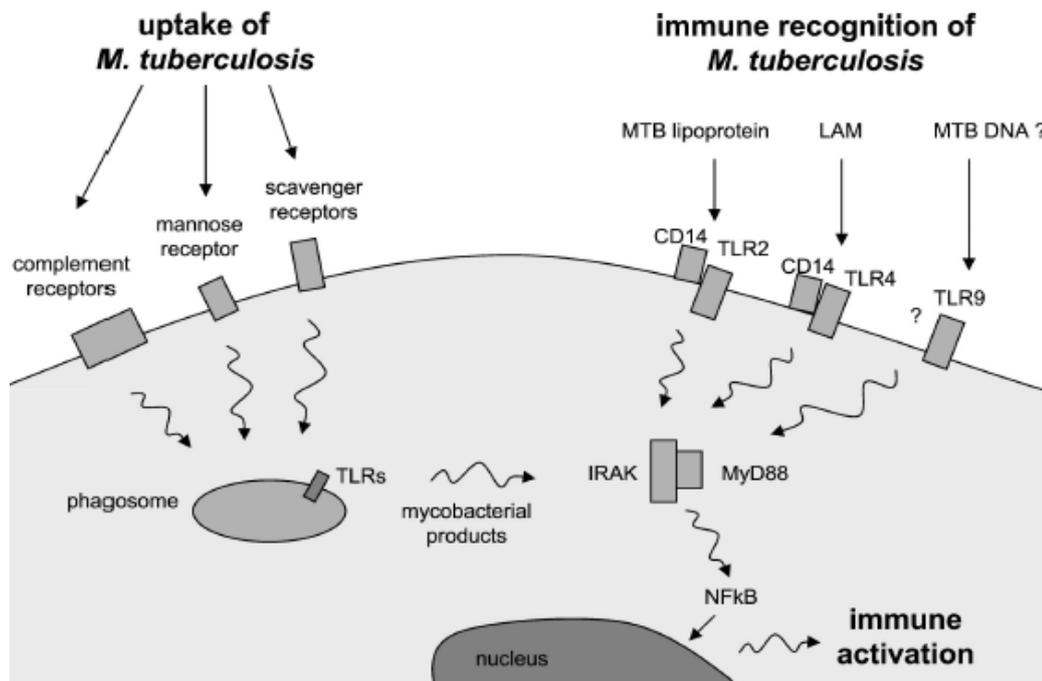
1. Sitokin proinflamasi, terdiri dari TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8, IL-15, dan IFN γ
2. Sitokin anti inflamasi, terdiri dari IL-4, IL-10, dan TGF- β

Respons pro inflamasi yang dipicu kuman TB akan dihambat oleh mekanisme anti inflamasi. Tiga sitokin anti inflamasi yaitu IL-4, IL-10, dan TGF- β mampu menghambat produksi dan efek sitokin pro inflamasi yang terjadi pada penyakit TB. Interleukin-10 diproduksi oleh sel makrofag setelah memfagosit kuman TB dan setelah mengikat lipoarabinomannan (LAM) kuman TB. IL-10 yang juga diproduksi oleh sel T, mempunyai efek antagonis terhadap respon sitokin proinflamasi, yaitu menekan produksi IFN- γ , TNF- β , dan IL-12 yang ketiganya merupakan sikap in esensial didalam imun protektif terhadap TB. Dengan kata lain, kuman TB menginduksi produksi IL-10 untuk menekan respon imun yang efektif (Shrivastava R , 2018).

Transforming Growth Factor- β mensupresi respons imun selular, yaitu: terhadap sel T menghambat proliferasi dan respon sel T, juga menghambat produksi IFN- γ oleh sel T, terhadap makrofag merupakan antagonis presentasi antigen, menghambat produksi sitokin proinflamasi dan memakan aktivasi seluler. TGF- β juga terlibat dalam perusakan jaringan dan pembentukan fibrosis oleh karena kemampuannya dalam memproduksi dan mendeposit kolagenase makrofag dan matriks kolagen.

Bersama IL-4 (yang produksinya juga dipicu oleh TGF- β), TGF- β akan menekan produksi IFN- γ karena keduanya memiliki efek sinergisme dan TGF- β juga berinteraksi dengan IL-4 (Vila NCY *et al.*, 2012).

Pengaruh buruk IL-4 terhadap infeksi oleh kuman TB adalah dalam kemampuannya menekan produksi IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. dibuktikan pada binatang percobaan bahwa ekspresi berlebihan dari IL-4 dapat menimbulkan atau berhubungan dengan reaktivasi fase laten, progresifitas penyakit, kerusakan jaringan, dan pembentukan kavitas. Paradoksnya, bila berada bersama TGF- β sel-sel T akan bergerak ke arah profil TH₁ yang mempunyai efek protektif (Vila NCY *et al.*, 2012).



Gambar 6. Fagositosis dan pengenalan kuman TB.

Dikutip dari kepustakaan De Martino *Met al.*, 2019

Fagositosis dan pengenalan kuman TB dimulai dengan reseptor-reseptor yang berada dipermukaan sel fagosit. Kemudian terjadi fagositosis yang melibatkan fagosome dan produk TB akhirnya mengaktifkan imunitas.

Makrofag yang telah terinfeksi oleh MTB akan menghasilkan IL-12. IL-12 kemudian menginduksi diferensiasi sel T ke sel Th-1. Makrofag juga melakukan presentasi antigen kuman TB ke sel Th1 melalui *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II. Sel Th1 selanjutnya akan mensekresi IFN- γ yang akan mengaktifkan makrofag sehingga dapat menghancurkan kuman yang telah difagosit. IL-12 dapat meningkatkan jumlah IFN- γ yang dihasilkan oleh sel Th1. Sebaliknya, IFN- γ dapat meningkatkan produksi IL-12 dari makrofag sehingga akan menguatkan reaksi inflamasi yang terjadi. Jika kuman tetap hidup dan melepas antigennya ke sitoplasma maka akan merangsang sel CTL melalui MHC kelas I. Sel CTL yang bersifat sitolitik selanjutnya akan melisis makrofag yang terinfeksi (De Martino *Met al.*, 2019; Vila NCY *et al.*, 2012).

II.2.3 Pemeriksaan Kultur sebagai *gold standart Mycobacterium Tuberculosis*

Diagnosis laboratorium tuberkulosis (TB) paru yang rutin dilaksanakan adalah tehnik mikroskopis BTA, dan untuk konfirmasi dilakukan kultur. Pemeriksaan biakan sputum atau kultur ini secara langsung merupakan *gold standart* pemeriksaan TB yang diakui WHO. Rangkaian pemeriksaan identifikasi *M tuberculosis* dalam sekret atau jaringan merupakan hal utama dalam menegakkan diagnosis tuberkulosis namun mempunyai keterbatasan (Nasrum M, 2012).

Hasil sediaan apus BTA negatif dari sputum tidak cukup untuk menyatakan seseorang pasien tersebut tidak terinfeksi TB, oleh karena itu

diagnosis TB harus di konfirmasi dengan biakan *Mycobacterium tuberculosis*. Biakan lebih sensitif dibandingkan sediaan apusan mikroskopis yaitu 80-85% dibandingkan 30-60% karena biakan dapat mendeteksi hingga 50 bakteri per ml sputum, sedangkan apusan BTA secara mikroskopis dapat mendeteksi kurang lebih 5000 bakteri per ml sputum. Kultur memiliki nilai spesifisitas cukup tinggi yaitu 98% dan sensitifitas 80 %. Ada beberapa tujuan utama dalam melakukan kultur dan identifikasi terhadap *M.tuberculosis*, yaitu :

1. Meningkatkan jumlah kasus yang ditemukan
2. Mendeteksi kasus diantara apusan negatif pasien
3. Membedakan antara spesies *mycobacteria*
4. Membantu dalam penentuan uji *drug susceptibility test*,
5. Membantu mendiagnosis kasus yang gagal

Medium Lowenstein Jensen (LJ) adalah salah satu medium yang paling dikenal dan paling sering digunakan untuk kultur bakteri tuberkulosis. Medium ini mengandung telur yang dapat merangsang pertumbuhan *mycobacterium sp*. Terutama bila cukup CO₂. Selain telur, unsur utama lainnya dalam medium ini adalah asparagin dan gliserol yang digunakan sebagai sumber nitrogen dan karbon bagi pertumbuhan *mycobacterium,sp* Malachite Green dimasukkan untuk menghambat bakteri lain. (Nasrum M, 2012)

Tabel 4. Interpretasi Hasil Kultur

Jumlah kuman	Interpretasi
> 500 koloni	+4
200-500 koloni	+3
20-100 koloni	+2
1-19 koloni	+1
Tidak ada pertumbuhan	Negative

Dikutip dari kepustakaan Nasrum M, 2012

Pada umumnya biakan sputum akan meningkatkan penemuan kasus sekitar 20 – 30% dari jumlah keseluruhan TB paru BTA positif. Oleh sebab itu, pemeriksaan kultur sangat sangat bermanfaat untuk kasus *paucibasile* seperti pada kasus TB ekstra paru, TB anak, dan TB sistemik. Pemeriksaan sputum secara mikroskopis merupakan pemeriksaan yang efisien, mudah dan murah. Pemeriksaan standar baku emas untuk mendiagnosis tuberkulosis adalah melalui kultur, tetapi membutuhkan waktu yang lama. Sifat *Mycobacterium tuberculosis* yang lambat pada waktu pembelahan sekitar 20 jam, sehingga pada kultur pertumbuhan baru tampak setelah 4-8 minggu (Nasrum M, 2012)

Media Lowenstein-Jensen digunakan pula untuk uji kerentanan antibiotik terhadap isolate, membedakan perbedaan spesies *Mycobacterium* (berupa morfologi koloni, kecepatan pertumbuhan, karakteristik biokimia, dan mikroskopis). Media LJ lebih dikenal untuk kultur *Mycobacterium*, seperti direkomendasikan oleh International Union Against Tuberculosis (IUAT). (Lindsay Mc Kenna, 2019; Shrivastava R, 2018)

Identifikasi *Mycobacterium* dimulai dengan menilai waktu pertumbuhan, warna pigmen, morfologi koloni dan hasil pewarnaan BTA. Identifikasi yang lebih rinci dilakukan dengan berbagai uji biokimia yaitu antara lain uji niasin, uji reduksi nitrat, dan uji katalase. Medium LJ terdiri dari substansi organik kompleks (telur, tepung, kentang dan bahan-bahan lain dengan komposisi yang bervariasi), garam-garam mineral (potassium dihidrogen fosfat, magnesium sulfat, sodium citrate), asparginase gliserol, dan malachite green. Walaupun banyak jenis kultur yang dapat digunakan untuk mengkultur kuman *M.tuberculosis*, namun media LJ secara rutin lebih disukai dan lebih sering dilaksanakan (Nasrum M, 2012, Shrivastava R, 2018).

Kuman *M.tuberculosis* yang sering kontak dengan OAT dapat berubah bentuk (fragmented), sehingga sulit atau bahkan tidak dapat diamati secara mikroskopis sehingga dilaporkan sebagai TB negatif. TB secara mikroskopis negatif bukan berarti kuman *M.tuberculosis* sudah mati. Hal ini dapat dikonfirmasi dengan metode lain, misalnya dengan metode PCR. Media LJ dapat juga digunakan untuk menguji kerentanan pertumbuhan kuman *M.tuberculosis* terhadap OAT. Metode kultur adalah metode yang paling murah setelah mikroskopis namun memerlukan waktu lama. Sedangkan metode lain (ELISA, PCR) lebih efisien dari sisi waktu namun biaya pemeriksaan tinggi (Nasrum M, 2012, Shrivastava R, 2018).



Gambar 7. Media Lowenstein-Jensen positif *Mycobacterium Tuberculosis*

Dikutip dari kepustakaan Shrivastava R, 2018

Medium Lowenstein Jensen pembiakan disiapkan dengan menimbang 18.65 gram medium dasar LJ dan dilarutkan ke dalam 300 ml aquadest kemudian ditambahkan 6 ml glycerol dan 10 ml larutan malachite green 2%. Larutan disterilkan dalam autoclaved pada 121°C selama 30 menit dan didinginkan. Ditambahkan telur yang telah dihomogenkan 500 ml dan dicampurkan. Medium dibagikan ke dalam tabung bertutup alur sebanyak 6-8 ml. Tabung biakan ini dipanaskan pada 85°C selama 50 menit. Untuk mengecek sterilitas, disiapkan media pembiakan dengan menginkubasi pada 37°C selama 48 jam dan disimpan dalam refrigerator bila tidak ada kontaminan yang terdeteksi. Semua

tabung ditutup dengan ketat untuk mencegah penguapan selama penyimpanan dan mencegah keringnya media LJ tersebut. (Shrivastava R, 2018)

II.2.4 Pemeriksaan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk diagnosis *Mycobacterium tuberculosis*

Diagnosis awal infeksi *M. tuberculosis* sering didasarkan pada data klinis, tetapi untuk menegakkan diagnosis pasti (definitif) diperlukan pengasingan (isolasi) dan mengenali (identifikasi) *M. tuberculosis* di laboratorium. Prosedur laboratorium untuk spesimen klinis pada umumnya meliputi proses dekontaminasi, persiapan spesimen, pemeriksaan mikroskopik untuk melihat bakteri tahan asam, isolasi mikroorganisme dengan teknik pembiakan, dan identifikasi kepekaan antibiotika. Sejak perkembangan teknik pengecatan tahan asam pada 1882 oleh Robert Koch, prinsip diagnosis tuberkulosis secara mikroskopis mengalami perubahan, dan teknik pengecatan ini merupakan metode tercepat untuk deteksi adanya *M. tuberculosis*. Daya lacak teknik ini hanya 5×10^3 kuman per ml dan teknik ini perlu digabung dengan pemeriksaan kultur (Carniel Fet al., 2014).

Pemeriksaan kultur meskipun lebih sensitif tetapi membutuhkan waktu yang lama, yaitu 4–6 minggu untuk memperoleh hasil positif pada media padat Lowenstein Jensen. Perkembangan sistem kultur media cair otomatis seperti Mycobacterial Growth Indicator Tubes (MGIT Bactec 960) dan MB BacT Alert system (Organon Technika) meningkatkan waktu

deteksi menjadi 12–18 hari. Teknologi molekuler memberi pengembangan metode pemeriksaan yang cepat dan sensitif untuk menemukan (deteksi) dan identifikasi Mycobacteria. Teknik molekuler ini digunakan untuk deteksi Mycobacteria, deteksi khas (spesifik) *M. tuberculosis*, membedakan *M. tuberculosis complex* dan Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT), dan deteksi adanya resistensi obat (Weinstock DM, and Sepkowitz KA, 2000).

Penelitian mengenai akurasi PCR pada anak jauh lebih sedikit dibandingkan pada dewasa. Sebuah studi di Teheran, Iran menunjukkan bahwa dari 126 anak yang telah didiagnosis TB, dilaporkan mempunyai persentase PCR, BTA dan biakan positif berturut-turut 53,2%, 55,6% dan 58,7%. Penelitian lain di India sebelumnya mendapatkan bahwa dari 31 pasien anak dengan TB aktif, 12 diantaranya menunjukkan hasil PCR positif, dan jika merujuk biakan sebagai baku emas maka sensitivitas PCR 100%. Dari beberapa spesimen dengan PCR positif, ternyata pada biakan kuman yang tumbuh adalah MOTT (*mycobacterium other than tuberculosis*), hal ini disebabkan karena molekul IS6110 yang digunakan tidak mampu membedakannya. Didapatkan spesimen dengan BTA positif tetapi pada biakan tidak didapatkan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* atau MOTT. Kemungkinan besar disebabkan oleh ketidaksempurnaan dalam rangkaian proses perlakuan terhadap spesimen, antara lain teknik pengiriman spesimen, waktu tunggu

spesimen sampai dilakukan pemeriksaan serta teknik pembiakan. (Weinstock DM, and Sepkowitz KA, 2000).

Spesimen terbanyak yang diperiksa berasal dari bilasan lambung. Sulitnya pengambilan specimen sputum atau bilasan lambung pada anak menyebabkan perlu ditelusuri alternatif spesimen lain untuk pemeriksaan PCR TB. *Khan* melakukan penelitian akurasi PCR darah tepi pada pasien TB paru dewasa dan mendapatkan sensitivitas yang rendah yaitu 14.5% sehingga tidak membantu meningkatkan sensitivitas PCR. Masalah yang harus dicermati dalam pemeriksaan PCR adalah tinggi nilai risiko positif palsu akibat kontaminasi spesimen atau turut terdeteksinya kuman yang telah mati. (Katoch, 2004)

Berbagai metode PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi M.Tb dan mikobakteria lainnya. Tes PCR ini menargetkan DNA atau rRNA dan dapat berupa PCR konvensional berbasis DNA, *nested* PCR dan RT-PCR. Perkembangan dalam bidang ini telah berlangsung pesat dan uji PCR telah dilakukan untuk mendeteksi rangkaian gen M.Tb yang berbeda-beda. Tes PCR untuk tuberculosi tersedia secara komersial dan telah dilaporkan sebagai suatu uji yang cukup sensitif dan spesifik. Strategi PCR dapat digunakan untuk mengkonfirmasi diagnosis dan juga sebagai monitoring penyakit. (Katoch, 2004)

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel sputum dari pasien suspek TB sebanyak 3-5 ml, aquades, H₂O, proteinase K, *buffer*, ethanol, *Ethidium Bromida* (EtBr), tissue, Primer *M. tbc* (T4T5). Komponen

yang terdapat pada master mix memiliki fungsi yang berbeda. Kappa master mix berguna untuk mengamplifikasi fragmen DNA target. MgCl₂ sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polymerase. Dengan adanya MgCl₂ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan template yang membentuk kompleks larut dengan dNTP. Primer merupakan oligonukleotida pendek yang mengawali reaksi polimerisasi dan berfungsi untuk menentukan awal serta akhir bagian yang akan diamplifikasi (Vanfleteren and Vierstraete, 1999). Primer yang dipergunakan untuk sampel DNA sputum suspek TB adalah *M. tbc* T4T5. Primer terdiri dari forward dan reverse. Primer forward (T4-5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 35') merupakan penyalin DNA templat bagian forward, sedangkan primer reverse (T5-55' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 35') merupakan penyalin DNA templat bagian reverse. (Hause, B. and Fester, T, 2005)

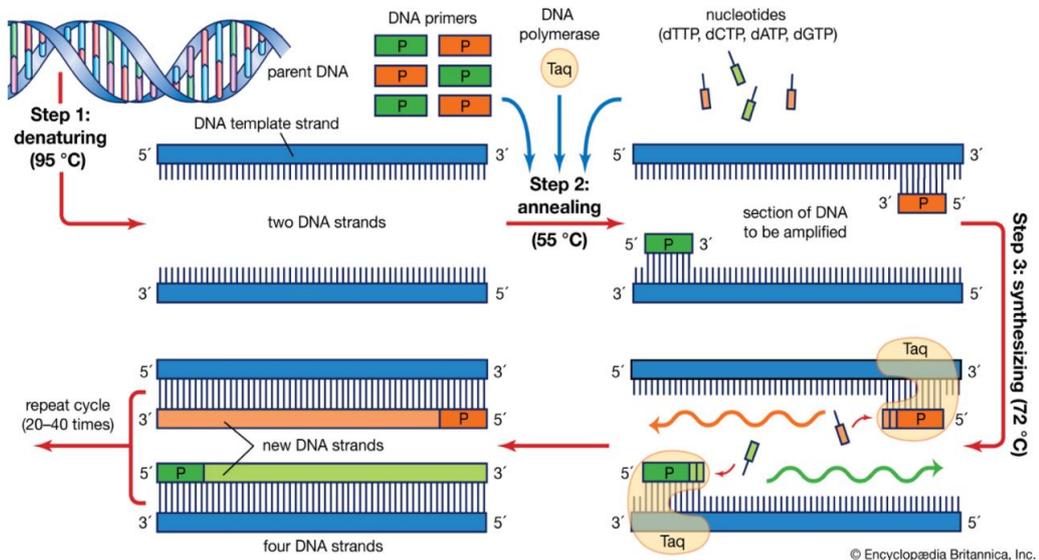
Sampel DNA dipergunakan sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru. ddH₂O digunakan sebagai pelarut DNA dan sebagai media terjadinya reaksi yang tidak mengandung ion ataupun DNA/RNA. Hal ini penting untuk mendukung terjadinya reaksi PCR terkait dengan sensitivitas PCR. Setiap perlakuan pemindahan larutan atau reagen dilakukan pipetting dan mix gentle-finger agar setiap komponen homogen. Pencampuran yang tidak merata akan mengakibatkan terjadinya kegagalan pada reaksi. Thawing dilakukan pada tiap komponen yang ingin dimasukkan. (Pourazar, A. and Shanehsazzadeh, 2011)

A.Prinsip- prinsip umum PCR

Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida ($MgCl_2$) dan enzim polimerase DNA. Proses PCR melibatkan beberapa tahap yaitu: tahap (1) pra-denaturasi DNA templat; (2) denaturasi DNA templat; (3) penempelan primer pada templat (annealing); (4) pemanjangan primer (extension) dan (5) pemantapan (postextension). Tahap (2) sampai dengan (4) merupakan tahapan berulang (siklus), di mana pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah DNA (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20-40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus

keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada gambar dibawah ini (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019)



Gambar 8. Proses amplifikasi dalam PCR.
Dikutip dari kepustakaan Britannica, 2019

Proses amplifikasi dalam PCR dimulai dengan untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Kemudian dilakukan sintesis DNA dan pada akhirnya menghasilkan rantai DNA baru. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*)

B. Jenis PCR

Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP); metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA.

2. *Inverse-PCR*, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen.
3. *Nested-PCR*, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut *primer inner* disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai *outer primer*. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan *outer primer*, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan *inner primer* atau *nested primer* menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. *Nested primer* akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.
4. *Quantitative-PCR*; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk

mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel

5. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*; metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.
6. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and Mc Clelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer – primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom. (Vinuesa V *et al.*, 2018)

C. Cara kerja PCR

Untuk melakukan proses PCR diperlukan komponen-komponen seperti yang telah disebutkan sebelumnya. Fungsi template DNA di dalam proses PCR adalah sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA baru yang sama. Templat DNA ini dapat berupa DNA kromosom, DNA plasmid ataupun fragmen DNA apapun asal di dalam DNA templat tersebut mengandung fragmen DNA target yang dituju. Penyiapan DNA templat untuk proses PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode lisis sel ataupun dengan cara melakukan isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid dengan menggunakan metode standar yang ada. Pemilihan metode yang digunakan di dalam penyiapan DNA templat tergantung dari

tujuan eksperimen. Pembuatan DNA templat dengan menggunakan metode lisis dapat digunakan secara umum, dan metode ini merupakan cara yang cepat dan sederhana untuk pendedahan DNA kromosom ataupun DNA plasmid (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019).

Prinsip metode lisis adalah merusak dinding sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan. Oleh karena itu merusak dinding sel umumnya dilakukan dengan cara memecahkan dinding sel menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan tergantung dari jenis sampel. Beberapa contoh buffer lisis yang biasa digunakan mempunyai komposisi sebagai berikut: 5 mM Tris-Cl pH8,5; 0,1 mM EDTA pH 8,5; 0,5% Tween-20 dan 100 ug/mL Proteinase-K (ditambahkan dalam keadaan segar). Buffer lisis ini umumnya digunakan untuk jenis sampel yang berasal dari biakan, sel-sel epitel dan sel akar rambut (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019).

Untuk melakukan proses PCR diperlukan buffer PCR. Buffer PCR dan MgCl₂ hanya akan berlangsung pada kondisi pH tertentu. Fungsi buffer di sini adalah untuk menjamin pH medium. Selain buffer PCR diperlukan juga adanya ion Mg²⁺, ion tersebut berasal dari berasal MgCl₂. MgCl₂ bertindak sebagai kofaktor yang berfungsi menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Dengan adanya MgCl₂ ini akan meningkatkan interaksi primer dengan templat yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (senyawa antara). Dalam proses PCR konsentrasi MgCl₂ berpengaruh pada spesifisitas dan perolehan proses. Umumnya buffer PCR sudah

mengandung senyawa $MgCl_2$ yang diperlukan. Tetapi disarankan sebaiknya antara $MgCl_2$ dan buffer PCR dipisahkan supaya dapat dengan mudah dilakukan variasi konsentrasi $MgCl_2$ sesuai yang diperlukan (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A *et al.*, 2019).

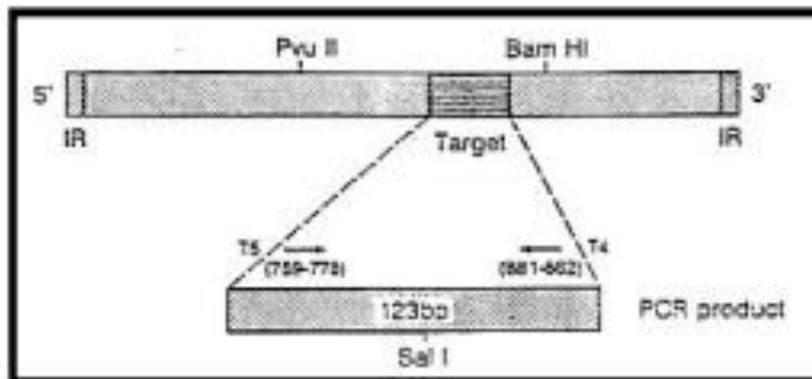
Selain dengan cara lisis, penyiapan DNA templat dapat dilakukan dengan cara mengisolasi DNA kromosom ataupun DNA plasmid menurut metode standar yang tergantung dari jenis sampel asal DNA tersebut diisolasi. Metode isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan dengan penyiapan DNA dengan menggunakan metode lisis. Prinsip isolasi DNA kromosom atau DNA plasmid adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan pemisahan DNA kromosom / DNA plasmid dari komponen-komponen lain. Dengan demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019).

Keberhasilan suatu proses PCR sangat tergantung dari primer yang digunakan. Di dalam proses PCR, primer berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA. Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari database GenBank. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi

dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A, 2019).

Pemilihan primer yang digunakan dalam proses amplifikasi ini dilakukan dengan mempertimbangkan tujuan tersebut. Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi dapat berupa primer yang species specific atau pun genus specific. Pemilihan primer menentukan kekhasan (spesifisitas) reaksi amplifikasi yang terjadi. Primer yang dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis tuberkulosis yaitu primer yang mendeteksi urutan nukleotidainsersi yang repetitif seperti primer yang terdapat pada regio IS6110. Primer pada regio IS6110 tersebut merupakan primer yang species specific. Secara umum regio IS6110 terdapat dalam jumlah salinan yang banyak (10-20 salinan) pada sebagian besar strain *M. tuberculosis*, dan terdapat dalam jumlah salinan kecil pada strain *M. bovis* (Notopuro PB dkk., 2008).

Spesifisitas dan sifat repetitif yang dimilikinya membuat regio IS6110 merupakan sasaran (target) cocok (ideal) untuk amplifikasi. IS6110 merupakan suatu regio pada kromosom *M. tuberculosis* (termasuk Complex) sepanjang 1361-bp, merupakan suatu conserved region yang dimiliki oleh semua species dari *M. tuberculosis complex*. Eisenach dkk., pada tahun 1995 menggunakan primer pada daerah IS6110 dengan urutan nukleotida no 759 sampai dengan 882 yang terletak antara daerah Pvu II dan daerah Bam HI. Hasil amplifikasi berupa basa nukleotida sepanjang 123-bp (Gambar 4) (Notopuro PB dkk., 2008).



Gambar 9. Posisi primer PCR untuk deteksi MtbC IS 6110
Dikutip dari kepustakaan Notopuro PB dkk., 2008

Pemeriksaan PCR dengan primer regio IS6110 dilakukan pada dahak penderita yang diduga menderita tuberkulosis paru. Hasil PCR pada dapat ditemukan (deteksi) satu pita DNA spesifik dengan ukuran molekul 123-bp yang disesuaikan dengan standar ukuran molekul marka 100-bp DNA ladder Promega Catalog# G2101, pada elektroforesis gel agarosa. Batas deteksi DNA murni oleh teknik PCR dilaporkan sebesar 1 fg (sama dengan 1/5 organisme), tetapi dalam spesimen klinik seperti dahak (sputum), batas deteksi bervariasi dari 10 sampai 1000 mikroorganisme. Kepekaan (sensitivitas) pemeriksaan PCR tergantung pada prosedur ekstraksi DNA, parameter siklus PCR, dan metode yang digunakan untuk mendeteksi dan identifikasi produk DNA yang sudah teramplifikasi. *M. tuberculosis* memiliki lapisan lemak pada dinding sel yang tebal, hal ini membuatnya lebih menyulitkan (resisten) dalam proses ekstraksi DNA.

Sensitivitas PCR dapat ditingkatkan dengan menggunakan prosedur ekstraksi DNA yang melibatkan proses digesti protease, ekstraksi kloroformfenol, dan presipitasi dengan etanol dari DNA yang diekstraksi. Suatu metode yang lebih sederhana yaitu penggunaan lysis buffer yang mengandung non-ionic detergent dapat dilakukan pada pemeriksaan rutin, tetapi metode tersebut kurang sensitif dibandingkan metode terdahulu. Sensitivitas juga dipengaruhi oleh metode yang digunakan untuk mendeteksi dan identifikasi produk amplifikasi DNA (Notopuro PB dkk., 2008).

Spesifisitas pemeriksaan PCR ditentukan oleh pemilihan primer yang digunakan. Primer T4T5 merupakan primer yang species specific yaitu spesifik terhadap *M. tuberculosis* complex. Kelebihan teknik PCR untuk deteksi *M. tuberculosis* pada dahak adalah pada tingginya sensitivitas dan spesifisitasnya. Teknik ini juga sangat efisien karena dapat memberikan hasil dalam waktu 24–48 jam. Teknik PCR ini juga dapat digunakan untuk deteksi *M. tuberculosis* pada kasus tuberkulosis *pausibasiler* yang pada pemeriksaan pengecatan tahan asam dan kultur hasilnya negatif, karena teknik PCR dengan kemampuan amplifikasi DNA memiliki daya lacak yang sangat tinggi meskipun pada kultur mikroorganisme masih tumbuh minimal (Carniel Fet *al.*, 2014; Cheng VCCet *al.*, 2000).

Dalam proses PCR, dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan dNTPs (deoxynucleotide triphosphates). dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosintrifosfat), dTTP (deoksitimidintrifosfat), dCTP (deoksisitidintrifosfat) dan dGTP (deoksiguanosintrifosfat) (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati Aet *al.*, 2019).

Pada proses PCR, Enzim polimerase DNA diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim ini berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi

polimerisasi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini bersifat termostabil sampai temperatur 95 °C (Vinuesa V *et al.*, 2018; Kurniati A *et al.*, 2019).

Prosedur kerja PCR juga aman terhadap masalah penularan karena penggunaan ekstrak DNA yang merupakan partikel dari kuman secara utuh. Kekurangan teknik PCR adalah karena metode deteksi secara genetik bukan merupakan metode definitif untuk diagnosis infeksi *M. tuberculosis*, hal ini disebabkan karena PCR bukan hanya mendeteksi kuman yang hidup saja, tetapi PCR juga mendeteksi fragmen kuman yang telah mati. Teknik PCR juga memiliki sensitivitas yang sangat tinggi, sehingga dapat memberikan hasil positif palsu. Oleh sebab itu, diperlukan prosedur kerja yang teliti dan tepat untuk mencegah adanya cemaran (kontaminasi) yang memberikan hasil positif palsu (Cheng VCC *et al.*, 2000).

Berdasarkan kelebihan dan kekurangan teknik PCR tersebut, maka teknik PCR ini sebaiknya digunakan untuk uji penapisan yang dapat membantu klinisi sebelum menegakkan diagnosis, selama menunggu hasil teknik kultur metode standar yang merupakan baku emas diagnosis tuberkulosis. Teknik ini sebaiknya digunakan bersama cara serologis, teknik kultur untuk memastikan diagnosis tuberkulosis, untuk membedakan adanya *M. tuberculosis* yang hidup pada penderita tuberkulosis paru aktif dan *M. tuberculosis* yang mati pada penderita yang

telah sembuh tetapi masih mengeluarkan sisa kuman mati dalam dahaknya. Hasil PCR positif pada kasus kemungkinan tuberkulosis pausibasiler perlu dilanjutkan dengan pemberian OAT minimal 3 bulan, apabila didapat adanya perbaikan dalam kondisi klinis dan radiologis maka dapat dipastikan penderita tersebut adalah penderita tuberkulosis pausibasiler (Carniel *et al.*, 2014; Weinstock DM, and Sepkowitz KA, 2000; Cheng VCC *et al.*, 2000).

II.2.5 Pemeriksaan Mikroskopis Ziehl-Neelsen

Mycobacterium tuberculosis termasuk gram positif, berbentuk batang panjang atau pendek, tidak berspora, tidak berkapsul, pertumbuhan sangat lambat (2-8 minggu), suhu optimal 37-38⁰C yang merupakan suhu normal manusia. Pertumbuhannya membutuhkan tambahan makanan seperti darah, *egg yolk*, serum, dan bahan kimia tertentu. Dalam jaringan, basil tuberkel adalah bakteri batang lurus dengan ukuran sekitar 0,4-3 µm. Pada media buatan, bentuk kokoid dan filamentous tampak bervariasi dari satu spesies ke spesies lain. Disebut BTA (Basil Tahan Asam) karena pada beberapa jenis bakteri sukar dilakukan pengecatan namun setelah mendapat pengecatan/pewarnaan, dinding bakteri tahan terhadap pencucian dengan asam tidak mudah untuk dilunturkan dengan menggunakan zat peluntur (decolorizing agent) seperti asam alcohol. (Holani AG *et al.*, 2014, Ines M *et al.*, 2018).

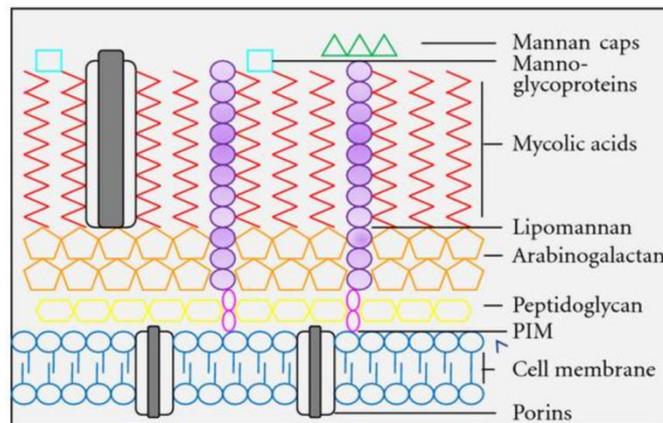
Basil tuberkel secara umum dapat diwarnai dengan pewarnaan *Ziehl-Neelsen*. Media untuk membiakan mikobakteria adalah media non

selektif dan media selektif. Media selektif berisi antibiotik untuk mencegah pertumbuhan kontaminan bakteri dan fungi yang berlebihan (Holani AG *et al.*, 2014).

Kuman *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai dinding sel dengan sifat-sifat fisik dan kimiawi tertentu yang memungkinkannya untuk dapat bertahan hidup dan bermultiplikasi di dalam makrofag. Kuman dilapisi oleh membran sitoplasma yang khas berupa 2 lapisan lemak yang terdapat dibawah lapisan peptidoglikan (PG). Diantara lapisan membran sitoplasma dan PG didapatkan sejumlah protein yang beberapa diantaranya mungkin bersifat imunogenik. Kearah luar PG berikatan secara kovalen dengan arabinogalaktam (AG) melalui ikatan fosfodiester. Selanjutnya bagian distal AG akan berikatan dengan asam mikolat yang merupakan asam lemak rantai cabang. Asam mikolat yang berikatan dengan disakaridatrehalosa (*cord factor*) dapat merangsang pembentukan granuloma dan mengaktifkan komplemen (Andrew C Whitelaw and Willem A Sturm, 2016).

Komponen dinding sel lainnya yaitu *acylated trehalosa sulfates* berperan penting dalam virulensi kuman. Trehalosasulfat bersifat lisosomotropik dan akan menghambat fusi antara lisosom dan fagosom. Trehalosasulfat juga dapat meningkatkan toksisitas *cord factor*. Dinding sel kuman juga mengandung lipoarabinomannan (LAM) yang dapat mempengaruhi sistem imun karena dapat menghambat proses blastogenesis limfosit T, meningkatkan sekresi TNF oleh makrofag dan

menghambat kerja IFN- γ dalam mengaktifkan makrofag (Andrew C Whitelaw and Willem A Sturm,2016).



Gambar 10. Gambaran skematis dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*

Dikutip dari kepustakaan Andrew C Whitelaw and Willem A Sturm,2016

Lapisan dinding sel pada M.TB terdiri dari lapisan asam mycolic, lipoarabinomannan, peptidoglikan dan sel membran. Lapisan dinding sel tersebut dapat mempengaruhi sistem imun karena dapat menghambat proses blastogenesis limfosit T, meningkatkan sekresi TNF oleh makrofag dan menghambat kerja IFN- γ dalam mengaktifkan makrofag

Bakteri tahan asam merupakan bakteri yang kandungan lemaknya sangat tebal sehingga tidak bisa diwarnai dengan reaksi pewarnaan biasa, tetapi harus dengan pewarnaan tahan asam. Golongan bakteri ini biasanya bersifat patogen pada manusia. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang diisolasi dari sputum penderita TBC dapat memberikan reaksi hasil pewarnaan jika positif terdapat bakteri TBC berwarna merah. (Andrew C Whitelaw and Willem A Sturm, 2016).

Bakteri tahan asam adalah jenis bakteri yang tidak dapat diwarnai dengan pewarnaan anilin biasa kecuali dengan menggunakan fenol dan

dengan pemanasan. Bakteri ini memiliki dinding sel berlilin karena mengandung sejumlah besar materi lipoidal oleh karena itu bakteri ini hanya dapat diwarnai dengan pewarnaan BTA (Acid-Fast Stain). Dinding sel hidrofobik dan impermeabel terhadap pewarnaan dan bahan kimia lain pada cairan atau larutan encer. Ketika proses pewarnaan, bakteri tahan asam ini melawan dekolorisasi dengan asam (Andrew C Whitelaw and Willem A Sturm, 2016; Turner J and Torrelles JB, 2018).

Pada dinding sel *mycobacteria*, lemak berhubungan dengan arabinogalaktan dan peptidoglikan di bawahnya. Struktur ini menurunkan permeabilitas dinding sel, sehingga mengurangi efektivitas dari antibiotik. Lipoarabinomannan adalah suatu molekul lain dalam dinding sel *mycobacteria*, berperan dalam interaksi antara inang dan patogen, menjadikan *M. tuberculosis* dapat bertahan hidup di dalam makrofag. Mikobakteria dapat tumbuh lebih cepat pada pH 6 dan 8 dengan pH optimum sekitar 6.5 - 6.8 untuk tipe patogen. Sel mikobakteria terdiri dari tiga lapisan penting yaitu lipid, protein, dan polisakarida (Turner J and Torrelles JB, 2018).

Mikobakteria merupakan aerobikobligat yang memperoleh energi dari oksidasi beberapa senyawa sederhana. Penambahan CO₂ meningkatkan pertumbuhan. Tidak ada aktivitas biokimia yang menandai. Dan kecepatan pertumbuhan lebih rendah dari pada sebagian besar bakteri. Waktu untuk mengandakan basil tuberkel sekitar 18 jam, bentuk saprofit cenderung tumbuh lebih cepat, poliferasi terjadi pada temperatur

22-23°C, untuk menghasilkan pigmen yang lebih banyak dan mengurangi bentuk "cepat asam" daripada bentuk patogenik. Mikobakteria cenderung lebih resisten terhadap agen kimia daripada bakteri lain karena sifat hidrofobik permukaan sel dan pertumbuhannya. Basil tuberkel resisten terhadap kekeringan dan bertahan hidup selama periode waktu yang lama dalam sputum kering. Variasi dapat terjadi dalam koloni, pigmentasi, virulensi, temperatur pertumbuhan yang optimal dan beberapa tanda pertumbuhan atau seluler lainnya (Holani AG *et al.*, 2014).

Bakteri tahan asam dapat diamati dengan teknik pewarnaan *Ziehl-Neelsen*, Kinyoun Gabber, dan Fluorochrom. Pengambilan sputum (secret paru-paru atau ludah) untuk analisis tuberkulosis dapat dilakukan setiap saat dikenal ada 3 jenis sputum:

Sputum pagi : sputum yang dikeluarkan oleh penderita pada saat bangun pagi.

Spot sputum : sputum yang dikeluarkan pada saat itu.

Collection sputum : sputum yang keluar dan ditampung selama 24 jam

Sputum yang telah diperoleh dapat disimpan dalam lemari es selama satu minggu.

Teknik pewarnaan *Ziehl-Neelsen*, yaitu dengan menggunakan zat warna carbol fuchsin 0,3 %, asam alkohol 3 %, dan methylen blue 0,3%. Pada pemberian warna pertama, yaitu carbol fuchsin, BTA bersifat mempertahankannya. Carbol fuchsin merupakan fuksin basa yang dilarutkan dalam larutan fenol 5 %. Larutan ini memberikan warna merah pada sediaan sputum. Fenol digunakan sebagai pelarut untuk membantu

pemasukan zat warna ke dalam sel bakteri sewaktu proses pemanasan (Pamadja GV *et al.*, 2020).

Fungsi pemanasan untuk melebarkan pori-pori lemak BTA sehingga carbol fuchsin dapat masuk sewaktu BTA dicuci dengan larutan pemucat, yaitu asam alkohol, maka zat warna pertama tidak mudah dilunturkan. Bakteri kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menutup pori-pori dan menghentikan pemucatan. BTA akan terlihat berwarna merah, sedangkan bakteri yang tidak tahan asam akan melarutkan carbol fuchsin dengan cepat sehingga sel bakteri tidak berwarna. Setelah penambahan zat warna kedua yaitu methylen blue, bakteri tidak tahan asam akan berwarna biru (Pamadja GV *et al.*, 2020).

Menurut Entjang (2003), pada pewarnaan bakteri dengan metode *Ziehl-Neelsen* dapat menggolongkan bakteri menjadi dua, yaitu :

1. Bakteri yang berwarna merah dengan pewarnaan *Ziehl-Neelsen* disebut bakteri tahan asam (*acid fast*).
2. Bakteri yang berwarna biru dengan pewarnaan *Ziehl-Neelsen* disebut bakteri tidak tahan asam (*non acid fast*) (Pamadja GV *et al.*, 2020).

Metode *Ziehl-Nelseen* digunakan karena cukup sederhana dan mempunyai sensitivitas serta spesifitas yang cukup tinggi. Spesifitas dan sensitivitas yang tinggi sebenarnya dimiliki oleh metode fluorokrom. Bakteri yang terwarnai menunjukkan warna yang kontras dengan lingkungannya dan tidak membutuhkan perbesaran sampai 1000x sehingga bisa mempercepat waktu. Akan tetapi, alat yang digunakan tidak

ada yaitu mikroskop fluorescens (Kurniati Aet al., 2019; Pamadja GV et al., 2020).

Fungsi masing-masing larutan pada pewarnaan *Ziehl Neelsen* antara lain adalah asam alkohol digunakan sebagai peluntur, carbol fuchsin mempunyai fungsi membuka lapisan lilin agar menjadi lunak sehingga cat dapat menembus masuk ke dalam sel bakteri *M. tuberculosis*. Methylen blue berfungsi sebagai cat lawan dan pada pemberian methylen blue pada bakteri akan tetap berwarna merah dengan latar belakang biru atau hijau (Pamadja GV et al., 2020).

Standar yang terdapat dalam IUATLD (International Union Against Tuberculosis Lung Disease) seperti berikut :

- Negatif : Tidak dijumpai adanya BTA
- Scanty : Ditemukan 1-9 BTA/100 LP
- Positif 1 : Ditemukan 10-99 BTA/100 LP
- Positif 2 : Ditemukan 1-10 BTA/1 LP
- Positif 3 : Ditemukan lebih dari 10 BTA/1 LP

II.2.5.1 Teknik Bilasan Lambung untuk pengambilan sputum

Bahan pemeriksaan bilasan lambung biasanya dikumpulkan dari penderita yang tidak dapat mengeluarkan sputumnya atau mereka yang sering menelan sputumnya misalnya penderita anak-anak, penurunan kesadaran, dan orang yang tidak dapat diajak kerja sama untuk mengeluarkan sputumnya. (Nasrum M, 2012).

Untuk melakukan bilasan lambung penderita harus dipersiapkan minimal 8 jam sebelumnya atau 8 jam setelah pasien makan atau minum obat atau direkomendasikan pada pagi hari sebelum makan. Orang yang melakukan pengambilan bilasan lambung ini adalah orang yang sudah terlatih dan harus dilakukan di rumah sakit. (Nasrum M, 2012).

Cara pengambilannya adalah basahi pipa lambung dengan air suling steril masukkan ke dalam lambung melalui hidung atau mulut. Untuk memperlancar masuknya pipa lambung penderita diminta minum sedikit air suling steril. Setelah pipa sampai dalam lambung hisap cairan lambung dengan alat suntik steril 20 ml melalui pipa lambung steril. Selanjutnya masukkan air suling steril 20 ml melalui pipa lambung untuk membilas lambung kemudian cairan ini dihisap kembali serta ditampung pada tabung yang sama. Dalam waktu 4 jam bahan tersebut harus segera dikirim ke laboratorium agar diproses. Bilaman tidka bias dilakukan dalam masa tersebut, bahan pemeriksaan harus ditambhakna 10 % natrium karbonat sampai mencapai pH 7(dengan fenol merah sebagai indicator). Hal ini dimaksudkan agar kuman tahan asam yang ada tidak mati karena asam lambung. Selain itu dapat pula digunakan 10 % trinitrium fosfat sebagai pengawet. Seperti halnya sputum , maka sebaiknya bilas lambung diambil 2-3 hari berturut- turut. (Nasrum M, 2012).

II.2.6 Pemeriksaan Uji Tuberkulin

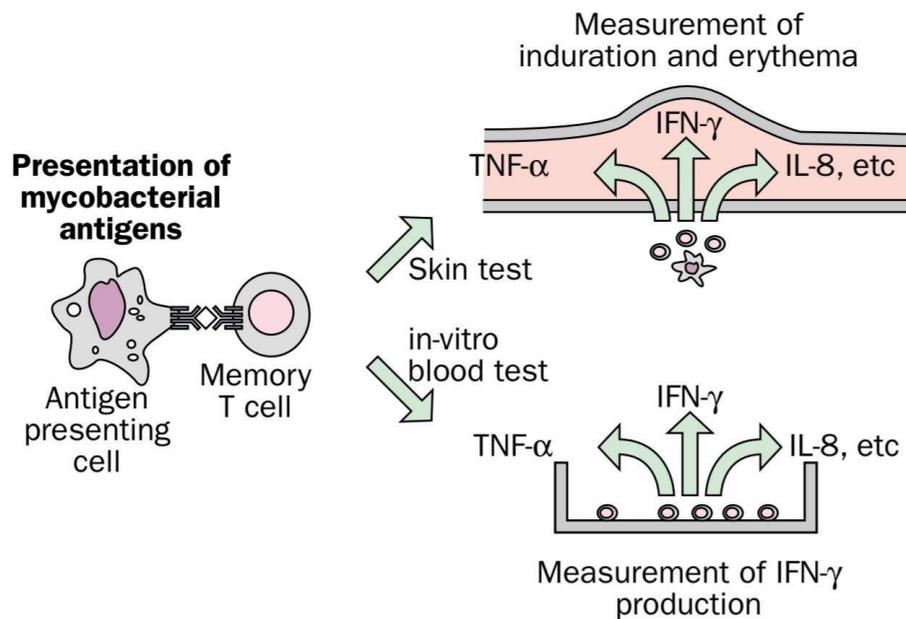
Uji *tuberculin* telah digunakan selama lebih dari 100 tahun merupakan pengukuran imunitas seluler *delayed type hypersensitivity* (DTH) terhadap *purified protein derivative* (PPD) tuberkulin yang merupakan antigen berbagai mikroba termasuk *M. Tb*, BCG *M. Tb*, BCG *M Bovis* dan berbagai mikro bakteri di lingkungan. Hal ini menyebabkan uji tuberkulin lebih rendah spesifitasnya didaerah vaksinasi BCG nya tinggi dan infeksi mikobakterium selain *M. Tb*. Reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) ini terjadi 28 minggu setelah seseorang terinfeksi bakteri tuberkulosis. Pengukuran reaksi tuberkulin pada manusia dilakukan dengan mengukur diameter indurasi yang terjadi pada kulit 48-72 jam setelah penyuntikan antigen (Ines M *et al.*, 2018).

Uji tuberkulin juga bermanfaat untuk membantu menegakkan diagnosis pada anak dengan Tuberkulosis paru, khususnya jika riwayat kontak dengan pasien TB tidak jelas. Namun demikian, uji tuberkulin memiliki kelemahan, yaitu akan menjadi negatif untuk sementara pada penderita TB (anergi) dengan malnutrisi energi protein, morbili, varisela, pertusis, difteria, tifus abdominalis, pemberian kortikosteroid yang lama (Vila NCY *et al.*, 2012).

Pada anak-anak yang sebelumnya telah divaksin *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) atau terinfeksi mikrobakteri aktifik sering kali memberikan hasil positif palsu pada pemeriksaan tuberkulin. Selain itu, anak-anak dengan kurang gizi atau memiliki HIV atau penyakit lain yang

menyebabkan penurunan sistem imun memberikan hasil negatif palsu pada pemeriksaan ini. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi reaktivitas dari tes tuberkulin yaitu jumlah Tuberculin Unit (TU) yang disuntikkan dan jenis tuberkulin yang bervariasi (Vila NCY *et al.*, 2012).

Reaksi terhadap tuberkulin dimulai sejak beberapa jam penyuntikan berupa reaksi hipersensitivitas tipe I sampai III dan puncaknya yaitu DTH (*delayed type hipersensitivitas*) pada 48-72 jam dan bertahan hingga 1 bulan bergantung kualitas dan kuantitas reaksi awal. Reaksi yang hebat dapat menimbulkan nekrosis pada kulit. Secara histopatologi pada awal reaksi yaitu 4-6 jam pertama infiltrasi utama adalah neutrophil sehingga tidak spesifik setelah 12 jam sel T berada disekitar kapiler kulit, dan pada 24 jam merupakan puncak infiltrasi makrofag teraktivasi dan pada 48 jam mayoritas infiltrasi adalah sel T terakumulasi perivascular. Mekanisme infiltrasi sel imun seluler belum jelas, tetapi tampaknya pada awal injeksi antigen, sitokin pro inflamasi seperti IFN Gamma, TNF alfa dan TNF Beta menstimulus ekspresi adhesion molekul pada endothelium (E-selectin) dan meningkatkan permeabilitas pembuluh darah lokal. Ukuran indurasi dipengaruhi oleh frekuensi sirkulasi CD4+, CD25+, Fox P3+, regulator sel T.



Gambar 11. Proses Immunologis pada Uji Tuberkulin
 Dikutip dari kepustakaan Center for disease control.2018

Proses imunologis pada uji tuberculin di perankan oleh APC dan sel T memori yang memicu produksi dari sitokon proinflamasi. Interferon γ yang terproduksi memicu indurasi bersama dengan TNF α dan IL-8.

II.2.6.1 Vaksinasi BCG (Bacillus of Calmette and Guerin)

Vaksinasi BCG adalah satu-satunya vaksin yang digunakan untuk melindungi seseorang, terutama bayi dan anak terhindar dari bentuk berat dari penyakit TB seperti meningitis TB dan TB milier yang memiliki angka kesakitan dan angka kematian yang tinggi. *World Health Organization* memasukkan vaksinasi BCG dalam *Expanded Programme on Immunization* untuk memperkuat program pemberantasan penyakit infeksius pada anak di negara berkembang. Di Indonesia sendiri vaksinasi ini dimasukkan ke dalam vaksinasi wajib Program Pengembangan Imunisasi (PPI) Kementerian Kesehatan RI.

Vaksinasi BCG memberikan perlindungan terhadap penyakit tuberkulosis. Basil BCG menyebar melalui sistem limfatik dari lokasi penyuntikan menuju kelenjar limfe lokal dan menimbulkan suatu respon imun yang mirip dengan respon imun yang dicetuskan oleh infeksi alamiah *M.tb*, sehingga terjadi pembentukan kompleks primer (selama < 12 minggu). Vaksin BCG sebagai model dari *M.tb* mengandung *M.bovis* yang memiliki struktur dinding sel yang hampir sama dengan dinding sel *M.tb*. Struktur dinding sel inilah yang mencetuskan respon imunitas pada manusia untuk melawan *M.tb* begitu juga pada *M.bovis* respon imunitas keduanya merangsang pembentukan granuloma, sebuah respon yang berperan penting untuk menghilangkan agen infeksius dari tubuh. (Vila NCY *et al.*, 2012).

Karakteristik respon imun terhadap vaksin BCG adalah ditandai dengan diaktifkannya respon imun tipe Th1. Saat vaksin disuntikkan, *M.bovis* yang telah dilemahkan tersebut bermultiplikasi pada kulit di lokasi penyuntikan dan dimakan oleh makrofag kulit. Makrofag mempresentasikan mikobakteria tersebut ke sel-sel T (sel CD4) melalui MHC-II dan sel CD8 melalui MHC I. Sel T CD4 mempunyai peranan lebih penting dibandingkan sel CD8 karena merupakan penghasil utama IFN- γ . (Vila NCY *et al.*, 2012).

IFN- γ mengaktifasi makrofag untuk membunuh *M.bovis*, kemudian terbentuk granuloma yang diperantarai oleh IFN- γ dan TNF- α . Dalam granuloma terkandung makrofag dan sel-sel imun lainnya untuk

mengontrol multiplikasi dan penyebaran *M.bovis* melalui produksi *Nitrogen Oxide* (NO) dan *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) yang bersifat toksik. Makrofag yang teraktivasi oleh IFN- γ juga mensekresi sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor-a* (TNF-a), IL-1, IL-6, IL-12 yang merangsang respon inflamasi granuloma, mengaktivasi sel T dan imunitas adaptif serta menarik monosit dan limfosit dari darah menuju lokasi infeksi. (Vila NCY *et al.*, 2012).

Sebagian kecil sel-sel Th1 berubah menjadi sel Th memori melalui rangsangan dari IL-2 terhadap sel Th1. Sel Th memori akan menghasilkan sitokin- sitokin IL-2, IFN- γ dan TNF-a. Jumlah produksi IL-2 akan semakin tinggi sehingga efek protektif terhadap *M.tb* semakin kuat akibat semakin banyak sel Th memori yang diproduksi termasuk IFN- γ . Respon spesifik sel Th memori terhadap vaksin BCG ini mencapai puncak pada 6-10 minggu setelah vaksinasi. Apabila seorang anak yang sudah mendapat vaksinasi BCG terinfeksi oleh *M.tb*. maka sel Th memori akan teraktivasi, berproliferasi, berdiferensiasi, memproduksi sitokin dan mengaktifkan makrofag untuk membunuh *M.tb*. (Vila NCY *et al.*, 2012).

II.3 Kerangka Teori

