

**DISERTASI**

**ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN TLR2 DAN mRNA GEN TLR4  
SERTA KADAR PROTEIN TLR2 DAN TLR4 PADA TB ANAK  
YANG TELAH DIVAKSINASI BCG**

**ANALISIS OF mRNA GENE TLR2 AND TLR4 EXRESSION AND  
SERUM PROTEIN LEVEL OF TLR2 AND TLR4 IN BCG  
VACCINATED CHILDREN WITH TB**



**Rahmini Shabariah  
C013171019**

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

## **PANITIA PENILAI UJIAN DISERTASI**

**Promotor** : Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, Sp.MK(K)  
**Kopromotor** : Dr. dr. Irfan Idris, M Kes  
**Kopromotor** : dr. Arief Santoso, Ph.D, Sp.P(K), PAPSR  
**Penguji Eksternal** : Prof. Dr. dr. Ni Made Mertaniasih, MS, Sp.MK(K)

**Penilai** : Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FISC  
Prof. dr. Rosdiana Natzir, PhD, Sp.Biok  
Dr.dr. Ilhamjaya Patellongi, M. Kes  
Dr. dr. Warsinggih, Sp.B-KBD(K)  
Dr.dr. Bob Wahyudin, Sp.A(K)

**DISERTASI**

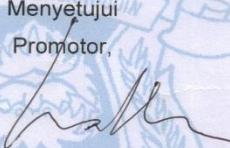
**ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN TLR2 DAN TLR4 SERTA KADAR  
PROTEIN TLR2 DAN TLR4 PADA TB ANAK YANG TELAH DIVAKSINASI**

Disusun dan diajukan oleh

**Rahmini Shabariah**  
**C013171019**

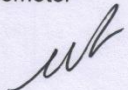
*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran  
Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin  
pada tanggal, 17 September 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*


Menyetujui  
Promotor,

  
**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)**  
Nip. 19570416 198503 1 001

Co. Promotor

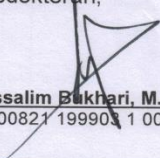
Co. Promotor


  
**Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes**  
Nip. 19671103 199802 1 001

  
**dr. Arif Santoso, Ph.D, Sp.P(K), PAPSR**  
Nip. 19770715 200604 1 012

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,

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

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

## ABSTRAK

**RAHMINI SHABARIAH.** *Perbandingan Kadar TLR2 dan TLR4 Serum pada Anak dengan TB Paru dan TB Ekstraparu setelah Vaksinasi Bacillus Calmette-Guerin (BCG)* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Irfan Idris, dan Arif Santoso).

Penelitian ini bertujuan membandingkan kadar TLR2 dan TLR4 serum pada pasien TB paru dan ekstraparu (TBEP) yang telah divaksinasi BCG. Jaringan yang terbentuk setelah vaksinasi Bacillus Calmette-Guerin (BCG) memengaruhi efektivitas perlindungan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Vaksinasi BCG dapat mencegah anak menderita tuberkulosis (MTB). Vaksinasi BCG dapat mencegah anak menderita anak tuberkulosis (TB), terutama yang parah seperti TB miliar dan TB meningitis. Respon imunitas innate melalui Toll-like receptors (TLR) 2 dan TLR4 adalah reseptor pengenalan mikroba di membran superfisial MTB.

Metode Penelitian digunakan adalah metode potong lintang yang melibatkan anak-anak di bawah usia 18 tahun yang sakit TP tetapi telah divaksinasi dengan BCG, baik rawat jalan maupun rawat inap di Bhakti Medicare dan Rumah Sakit Islam Jakarta, antara November 2018 dan Desember 2019, melalui *consecutive sampling*. Kadar TLR2 dan TLR4 serum diperiksa dengan ELISA dan dibandingkan dengan kelompok anak dengan TB Paru (TBP) dan TB Ekstrapulmoner (TBEP); lokasi infeksi selain paru-paru dengan mempertimbangkan adanya bekas luka BCG. Uji statistik menggunakan program SPSS meliputi uji t independent, uji ANOVA, uji normalitas dengan Kolmogorov-Smirnov.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar TLR2 dan TLR4 serum lebih tinggi pada subjek TBEP dibandingkan dengan TBP tetapi tidak berbeda secara signifikan (TLR2  $p = 0,758$  dan TLR4  $p = 0,646$ , masing-masing). Pasien TBEP dengan bekas luka BCG memiliki tingkat serum TLR2 dan TLR4 yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan pasien TBEP tanpa bekas BCG ( $p = 0,001$  dan  $p = 0,004$ , masing-masing). Pasien TBP dengan bekas luka BCG memiliki kadar TLR2 dan TLR4 serum yang lebih tinggi dibandingkan dengan pasien BP tanpa bekas BCG dengan perbedaan bermakna ( $p = 0,000$  dan  $p = 0,000$ ). Vaksinasi BCG dan infeksi MTB menstimulasi respons imun bawaan yang lebih besar pada mereka yang tidak memiliki bekas BCG.

Kata kunci: TLR2, TLR4, TB ekstrapulmonal, TB paru, BCG scar





## ABSTRACT

**RAHMINI SHABARIAH.** *The Comparison Between TLR2 and TLR4 Serum Levels in Children with Pulmonary Tuberculosis and Pulmonary Extrapulmonary Tuberculosis Post Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Vaccination* (supervised by Mochammad Hatta, Irfan Idris, and Arif Santoso)

The aim of this study is to compare the serum levels of TLR2 and TLR4 in patients with pulmonary tuberculosis and pulmonary extrapulmonary TB who have been vaccinated with BCG. The formation of a scar after Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination affects the effectiveness of protection against Mycobacterium tuberculosis (MTB) infection. vaccination can prevent children developing tuberculosis (TB), especially severe forms such as Miliary TB and meningitis TB. Innate immunity responses through Toll-like receptors (TLR)2 and TLR4 are microbial recognition receptors in superficial membrane of MTB.

This research was a case-control study included children less than 18 years of age who developed TB but they had been vaccinated with BCG both outpatients and inpatients at Bhakti Medicare and Jakarta Islamic Hospital from November 2018 to December 2019. The samples were selected consecutively. Serum TLR2 and TLR4 levels were examined with ELISA and compared in groups of children with pulmonary (TBP) and extrapulmonary TB (TBEP); locations of infection other than the lungs) by considering the presence of BCG scars. Statistical tests used SPSS program and included independent t test, ANOVA test, normality test with Kolmogorov-Smirnov.

The results shows that TLR 2 and TLR4 serum levels are higher in TBEP subjects than in TBP but they did not differ significantly (TLR2  $p = 0.758$  and TLR4  $p = 0.646$  respectively). TBEP patients with BCG scars significantly has a higher serum TLR2 and TLR4 levels than TBEP patients without BCG scars ( $p = 0.001$  and  $p = 0.004$  respectively). TBP patients with BCG scars has a higher TLR2 and TLR4 serum levels than TBP patients without BCG scars in which the difference is significant ( $p = 0.000$  and  $p = 0.000$  respectively). BCG vaccination and MTB infection stimulate an innate immune response that is greater in TbEP than in TBP, and the innate immune response through TLR2 and TLR4 is greater in the people with BCG scars than in the ones without BCG scars.

Keywords: TLR2, TLR4, extrapulmonary TB, pulmonary TB, BCG scar





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

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297  
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rahmini Shabariah  
NIM : C013182001  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

**ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN TLR2 DAN mRNA GEN TLR4 SERTA KADAR PROTEIN TLR2  
DAN TLR4 PADA TB ANAK YANG TELAH DIVAKSINASI BCG**

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

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

Makassar, 14 Oktober 2021

Yang menyatakan,



Rahmini Shabariah

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : **Rahmini Shabariah**

Nomor Pokok : **C013171019**

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

Makassar, 2021

Yang menyatakan

**Rahmini Shabar**

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	8
1.3. Tujuan Penelitian .....	8
1.3.1. Tujuan Umum .....	<b>8</b>
1.3.2. Tujuan Khusus .....	<b>8</b>
1.4. Pertanyaan penelitian.....	8
1.5. Manfaat Penelitian .....	9
1.6. Ruang Lingkup Penelitian .....	9
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	11
2.1. Epidemiologi .....	11
2.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	12
2.3. Patogenesis .....	14
2.3.1. Tuberkulosis Primer .....	<b>14</b>
2.3.2. Tuberkulosis Postprimer .....	<b>17</b>
2.4. Gejala Klinis .....	17
2.5. Komplikasi Penyakit .....	18
2.6. Keparahan Penyakit .....	19
2.7. Kontak TB .....	27
2.8. Status Gizi .....	30
2.9. Penegakan Diagnosis.....	40
2.9.1. Uji Tuberkulin .....	<b>40</b>
2.9.2. Radiologis.....	<b>42</b>
2.9.3. Mikrobiologis.....	<b>43</b>
2.9.4. IGRA ( <i>Interferon-Gamma Release Assays</i> ).....	<b>44</b>



2.9.5.	<b>Sistem Skoring</b> .....	<b>46</b>
2.10.	<b>Tatalaksana Tuberkulosis Anak</b> .....	48
2.10.	<b>Vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG)</b> .....	49
2.10.1.	<b>Efektifitas Vaksin BCG</b> .....	<b>53</b>
2.10.2.	<b>Scar BCG</b> .....	<b>54</b>
2.11.	<b>Respons Imunitas Alamiah terhadap Vaksinasi BCG</b> .....	56
2.11.1.	<b>Makrofag</b> .....	<b>56</b>
2.11.2.	<b>Sel Dendritik (DC)</b> .....	<b>58</b>
2.11.3.	<b>Neutrofil</b> .....	<b>60</b>
2.12.	<b>Respon Imun Adaptif</b> .....	61
2.12.1.	<b>T Limfosit</b> .....	<b>61</b>
2.12.2.	<b>Sel CD4 + dan CD8 +</b> .....	<b>62</b>
2.13.	<b>Toll Like Receptor (TLR)</b> .....	64
2.13.1.	<b>Spesifik Ligan TLR</b> .....	<b>68</b>
2.13.2.	<b>Kaskade Sinyal TLR</b> .....	<b>70</b>
2.13.3.	<b>Jenis-Jenis TLR</b> .....	<b>74</b>
2.13.4.	<b>TLR Signal Regulator/Koreseptor</b> .....	<b>83</b>
2.13.5.	<b>Toll Like Reseptor Signal Molecule</b> .....	<b>87</b>
2.13.6.	<b>Aktivasi Keseimbangan Jalur MYD88- dan TRIF</b> .....	<b>89</b>
2.13.7.	<b>Pengaturan Negatif Transkripsi Sinyal TLR</b> .....	<b>90</b>
2.13.8.	<b>Pengaturan Seluler oleh Nuclear Factor-KB</b> .....	<b>91</b>
<b>BAB III</b>	<b>KERANGKA TEORI</b> .....	<b>95</b>
<b>BAB IV</b>	<b>KERANGKA KONSEP</b> .....	<b>96</b>
1.1.	<b>Kerangka Konsep</b> .....	96
1.2.	<b>Hipotesis</b> .....	96
<b>BAB V</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>97</b>
5.1.	<b>Desain Penelitian</b> .....	97
5.2.	<b>Populasi Target dan Populasi Terjangkau</b> .....	97
5.3.	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	97
5.4.	<b>Sampel Penelitian</b> .....	97
5.4.1.	<b>Tehnik Sampel</b> .....	<b>98</b>
5.4.2.	<b>Besar Sampel</b> .....	<b>98</b>
5.5.	<b>Kriteria Sampel</b> .....	99
5.5.1.	<b>Kriteria Inklusi</b> .....	<b>99</b>

5.5.2.	Kriteria Eksklusi.....	99
5.6.	Tehnik Pengumpulan Data.....	100
5.7.	Persiapan Alat dan Bahan/Reagen .....	101
5.8.	Metoda Pemeriksaan .....	103
5.8.1.	Ekstraksi asam nukleat dengan metode Boom.....	103
5.8.2.	Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 dengan metode RT PCR .....	105
5.8.3.	Pemeriksaan kadar Protein serum, TLR2 dan TLR4 dengan metode (ELISA).....	109
5.9.	Analisa Data .....	114
5.10.	Etika Penelitian.....	114
5.11.	Alur Penelitian .....	116
5.12.	Definisi Operasional.....	116
<b>BAB VI</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>121</b>
<b>BAB VII</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>132</b>
7.1.	Karakteristik berdasarkan usia.....	136
7.2.	Biomarker Berdasarkan Jenis Kelamin.....	140
7.3.	Biomarker Berdasarkan Status Gizi .....	147
7.5.	Biomarker Berdasarkan Scar .....	155
7.6.	Perbedaan nilai biomarker berdasarkan derajat klinis.....	159
7.7.	Perbedaan nilai biomarker berdasarkan Diagnosis TB .....	161
7.8.	Hasil Uji Korelasi antar biomarker .....	164
7.9.	Keterbatasan Penelitian.....	165
<b>BAB VIII</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>166</b>
1.1.	Kesimpulan .....	166
1.2.	Saran.....	166
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....		<b>167</b>

## DAFTAR SINGKATAN

APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ADA	: <i>Adenosin deaminase</i>
ATR	: <i>All trans retinol</i>
BCG	: <i>Bacille Calmette-Guérin</i>
CNR	: <i>Case Notification Rate</i>
CCR	: <i>CC Chemokin Reseptor</i>
CCL	: <i>CC Chemokin Ligand</i>
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
CI	: <i>Confident Interval</i>
CLR	: <i>C-type lectin receptors</i>
CMI	: <i>Celluler mediated immunity (imunitas selulse spesifik)</i>
CR	: <i>Complement Receptor</i>
DAMPs	: <i>Damaged associated molecular patterns</i>
DC	: <i>Dendritic Cell</i>
DC-SIGN	: <i>Specific intercellular adhesion molecule- grabbing nonintegrin</i>
DLN	: <i>Draining Lmph Node</i>
DNA	: <i>Deoxybonucleic acid</i>
EDTA	: <i>Ethylen Diamine Tetra Acetat</i>
EM	: <i>Enviromental microbacterium</i>
EpCAM	: <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
FG	: <i>Functional Genomics</i>
FNAB	: <i>Fine Nedle Aspiration Biopsy</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC	: <i>Immune Complexes</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IKK-1	: <i>Inducible Ikb-kinase</i>
IGRA	: <i>Interferon Gamma Release A</i>
IMT	: <i>Indeks mass tubuh</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IGRA	: <i>Interferon gamma release assays</i>
IRAK	: <i>Interleukin 1 Receptors associated kinase</i>
IRF	: <i>Interferon Regulatory Factor</i>
KPS	: <i>Karnofsky Performance Score</i>
LM	: <i>Lipomannan</i>
LRR	: <i>Leucyn Rich Receptor</i>
LTA	: <i>Lipoteichoic acid</i>
MAPKs.	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDGs	: <i>Millenium Development Goals</i>
ManLam	: <i>Mannosa lipoarabinomannam</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MINCLE	: <i>Macrophage Inducible C-Type Lectin</i>
MTB	: <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
MTP	: <i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>

MUAC	: <i>Mid upper arm circumference</i>
MMR	: <i>Mortality risk ratio</i>
MPI	: <i>Mannosyl-phosphatidyl-myo-inositol</i>
My88	: <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF	: <i>Nuclear Factor</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NOD	: <i>Nucleotide binding and oligomerization domain</i>
NLR	: <i>NOD like Receptors</i>
OR	: <i>Odds Ratio</i>
PAMPs	: <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PILAM	: <i>phosphor myo inositol caps</i>
PPD	: <i>Purified Protein Derivative</i>
PHA.	: <i>Phytohaemagglutinin</i>
PRRs	: <i>Pattern recognition receptors</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIM	: <i>Phosphatidil myositinotoksin</i>
RLRs	: <i>RIG I like receptors</i>
RT PCR	: <i>Real Time Polymerasi Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
ROC	: <i>Receifing operating characteristic</i>
TBK	: <i>TANK-binding kinase 1</i>
TB	: <i>Tuberkulosis</i>
TBP	: <i>Tuberkulosis paru</i>
TBEP	: <i>Tuberkulosis ekstraparu</i>
TCM	: <i>Tes cepat molekuler</i>
TDM	: <i>trehalosa 6,6"-dimycolate</i>
Th	: <i>T helper</i>
TIR	: <i>Trained Immunity and Tolerance</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TLR	: <i>Toll Like Reseptor</i>
TST	: <i>Tuberculin Skin Test</i>
UPEC	: <i>Uropathogenic Escherichia colli</i>
VDR	: <i>Vitamin D receptors</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur dinding sel Mycobacterium tuberculosis .....	14
Gambar 2.2 Tiga kondisi setelah terpapar MTB.....	16
Gambar 2.3 Patogenesis Tuberkulosis .....	26
Gambar 2.4 Faktor yang berhubungan dengan reaktivasi infeksi <i>MTB</i> ..	33
Gambar 2.5 Peranan genetika dalam kerentanan TB.....	35
Gambar 2.6 Dasar Tuberkulin Test dan IGRA. ....	45
Gambar 2.7 Peran TLR pada Imunitas bawaan.....	62
Gambar 2.8 Respon sel imun adaptif terhadap vaksinasi BCG .....	64
Gambar 2.9 Struktur protein Toll-like receptor (TLR) .....	65
Gambar 2.10 Struktur molekul TLR .....	67
Gambar 2.11 Toll-like receptor (TLR) pola ekspresi leukosit dan PAMPs	68
Gambar 2.12 Pensinyalan TLR permukaan sel dalam cDC, makrofag, dan MEF transmembran .....	72
Gambar 2.13 Pensinyalan TLR intraseluler dan perpindahan pDC .....	74
Gambar 2.14 Pensinyalan TLR2.....	78
Gambar 2.15 Presentation of ligand (LPS) to TLR4 through the coordinated actions of serum LBP, membrane bound CD14 and MD2....	84
Gambar 2.16 Mengaktifkan jalur faktor nuklir B (NF- $\kappa$ B).....	93
Gambar 3.1 Kerangka Teori .....	95
Gambar 4.1 Kerangka Konsep.....	96
Gambar 5.1 Grafik amplifikasi real time PCR .....	109
Gambar 5.2 Prinsip ELISA Sandwich .....	110
Gambar 5.3 Alur Penelitian .....	116
Gambar 7.1 Risiko Penyakit Paru dan Penyakit Menular .....	139
Gambar 7.2 Perbedaan respon imunitas pada laki-laki dan perempuan	143
Gambar 7.3 Perbedaan respon imunitas bawaan dan adaptif berdasarkan perbedaan jenis kelamin .....	147



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tuberkulosis Skore .....	20
Tabel 2.2 Skala Penampilan menurut Karnovsky .....	21
Tabel 2.3 Mikronutrien yang penting untuk kekebalan melawan MTB ....	38
Tabel 2.4 Penentuan status gizi menurut kriteria Waterlow, WHO 2006, dan CDC 2000 .....	39
Tabel 2.5 Sistem Skoring Diagnosis Tuberkulosis .....	47
Tabel 2.6 Obat Antituberculosis yang biasa dipakai dan dosisnya .....	48
Tabel 2.7 Macam-macam Strain Vaksin BCG dan Negara Pembuat.....	50
Tabel 2.8 PRRs, Lokalisasi dan Ligandnya .....	70
Tabel 2.9 Berbagai Ligan, Asal Ligan, TLR2 dan TLR4, Pengantar Ligannya .....	83
Tabel 5.1 Primers for real-time RT-PCR .....	105
Tabel 6.1 Karakteristik Subjek Penelitian.....	121
Table 6.2 Nilai Biomarker yang Diperiksa .....	122
Tabel 6.3 Karakteristik Subjek berdasarkan Scar BCG .....	123
Tabel 6.4 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Jenis Kelamin .....	123
Tabel 6.5 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Kelompok Usia .....	124
Tabel 6.6 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Status Gizi .....	125
Tabel 6.7 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Riwayat Kontak TB	125
Tabel 6.8 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Temuan Scar BCG	126
Tabel 6.9 Faktor yang berhubungan dengan Derajat Klinis .....	127
Tabel 6.10 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Derajat Klinis .....	128
Tabel 6.11 Karakteristik Subjek Berdasarkan Diagnosis TB .....	129
Tabel 6.12 Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Diagnosis TB .....	130
Tabel 6.13 Hasil Uji Korelasi antara Biomarker.....	131

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Tuberkulosis (TB) merupakan suatu penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) dan dapat menyerang berbagai organ terutama paru-paru. Hingga saat ini, Tuberkulosis tercatat sebagai salah satu masalah kesehatan dunia, diperkirakan pada tahun 2019 terdapat 10 jutayang mulai menurun pada tahun terakhir. Kematian akibat TB diperkirakan 1,2 juta, dan didapatkan kematian sebesar 208.000 pada penderita TB dengan HIV positif. Delapan negara dengan jumlah penderita TB terbanyak dan menyumbang 2/3 dari total kasus TB dunia India 26% Indonesia 8,5% China 8,4% Philipina 6,0% Pakistan 5,7% Nigeria 4,4%, Bangladesh 3,6% dan South Africa 3,6%. Penderita laki-laki berusia diatas 15 tahun menyumbang 56% dan wanita 32% dengan 12% pada anak dibawah 15 tahun (WHO, 2020).

Case Notification Rate adalah jumlah semua kasus tuberkulosis yang diobati dan dilaporkan di antara 100.000 penduduk yang ada di suatu wilayah tertentu. Angka notifikasi semua kasus tuberkulosis per 100.000 penduduk dari tahun 2009-2019 secara nasional memperlihatkan peningkatan CNR. CNR semua kasus tuberkulosis menurut provinsi tahun 2019 bervariasi, kasus paling tinggi berada di DKI Jakarta 393 kasus dan paling rendah di Bali 97 kasus, sedangkan untuk provinsi Jawa Barat sebanyak 249 kasus per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2020).

Mayoritas anak tertular TB dari pasien TB dewasa, sehingga dalam penanggulangan TB anak, penting untuk mengerti gambaran epidemiologi TB pada dewasa. Infeksi TB pada anak dan pasien TB anak terjadi akibat kontak dengan orang dewasa sakit TB aktif. Sulitnya konfirmasi diagnosis TB pada anak mengakibatkan penanganan TB anak terabaikan (Kartasmita, 2009).

Vaksin *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) telah ada selama 80 tahun, merupakan salah satu vaksin yang paling banyak digunakan saat ini, cakupan imunisasinya sebesar > 80% pada bayi baru lahir dan bayi di negara-negara yang merupakan bagian dari program imunisasi nasional. Vaksin BCG memiliki efek perlindungan terhadap penyakit TB dengan gejala berat seperti TB Milier dan meningitis TB, namun hal ini tidak dapat mencegah infeksi primer maupun mencegah reaktivasi infeksi paru laten, dengan sumber utama penyebaran *Bacillary* di masyarakat. Dengan vaksinasi BCG maka transmisi *Mycobacterium Tuberculosis* dibatasi (WHO, 2020).

Penelitian metanalisis melaporkan efektivitas proteksi vaksin BCG terhadap tuberkulosis paru utamanya terhadap tuberkulosis milier dan tuberkulosis meningeal bervariasi antara 0-80%. Efektivitas ini bergantung dari ada sensitisasi awal oleh mikobakterium lingkungan dan jarak lokasi dari lintang khatulistiwa (Mangtani et al., 2014).

Penelitian retrospektif dari 3 strain vaksin didapatkan efektif proteksi vaksin >70% terhadap meningitis TB namun berbeda presentasi

efektifitasnya untuk tuberkulosis lainnya (Favorov et al., 2012). Irma tahun 2011 dan Rosandali 2016 mendapatkan kasus TB paru lebih sedikit terjadi pada anak dengan scar BCG , dibandingkan pada anak yang tidak memiliki scar BCG (Kusuma, 2011; Rosandali et al., 2016).

Sebuah literatur review melaporkan jaringan parut yang terbentuk paska vaksinasi berkisar antara 52% hingga 93%, timbulnya jaringan parut BCG juga tergantung strain BCG, rute injeksi intradermal, ukuran wheal injeksi, dan vaksin serta zat gizi mikro yang diberikan bersama, rasio tingkat kematian menurun pada yang divaksinasi, efek bekas luka BCG tidak terkait dengan prevalensi bekas luka pada dua tahun pertama dan pada anak yang divaksinasi BCG pada periode neonatal (Benn et al., 2020)

BCG memiliki efek menguntungkan nonspesifik pada kelangsungan hidup anak, yaitu pada anak dengan berat badan lahir rendah (BBLR) yang divaksin BCG saat lahir (BCG dini) pada usia 3 hari dibandingkan yang divaksin hingga usia setelah 4 minggu (BCG ditunda). Kematian neonatus berkurang sebesar 17% secara signifikan, kematian terutama disebabkan oleh kasus sepsis neonatorum, infeksi saluran pernapasan, dan demam (Aaby et al., 2011). Vaksin BCG menurunkan angka kematian anak usia 28 hari hingga 3 tahun , yang terpapar maupun yang tidak terpapar penderita TB dewasa , selain keuntungan terhindar dari infeksi non spesifik lainnya (P. Roy et al., 2019; Thysen et al., 2020).

Penelitian kohort hingga usia 4 tahun terhadap vaksin BCG dan menilai kekebalan seluler T helper1, dengan hasil bahwa BCG terbukti menginduksi

respons tipe Th1 dan Th2 terhadap *Purified Protein Derivative* (PPD) pada usia sekitar 5 bulan setelah vaksinasi, namun sementara respons Th1 dipertahankan, respons Th2 menurun seiring waktu. Dilaporkan bahwa ukuran parut BCG berkorelasi kuat dengan respon Th2 terhadap PPD pada usia 5 bulan. Dilaporkan tidak ada efek dari vaksinasi BCG terhadap produksi IL-10 atau TNF- $\alpha$  awal bagian dari respon imun bawaan, namun ada perubahan dalam respons imun adaptif umum terhadap phytohaemagglutinin (PHA). Pada individu yang belum terpapar *environmental microbacterium* (EM), BCG akan memberikan perlindungan yang signifikan. Dilaporkan juga vaksin dari BCG jika diberikan sebelum infeksi dini tuberkulosis akan memberikan perlindungan yang lebih baik pada penduduk yang dekat dengan ekuator (Djuardi et al., 2010)

Respon imunitas alamiah akan memulai respon bukan hanya terhadap kuman yang masuk namun juga terhadap sel yang rusak, dimulai dengan pengenalan oleh reseptor pola pengenalan kuman (*Patern Recognition Receptors / PRRs*) yang diekspresikan pada sel-sel imun seperti makrofag, neutrofil, sel dendritik, sel Natural Killer (NK) , sel limfosit T, sel limfosit B, sel non imun seperti sel epitel, sel endotel, dan sel fibroblast. Reseptor ini diekspresikan baik di permukaan membrane sel maupun di dalam kompartemen seluler (endosome) (Abbas et al., 2015; Moliva et al., 2017).

Reseptor-pengenalan kuman tidak hanya berikatan dengan ligannya yang membentuk dinding sel kuman yang dikenal dengan PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) namun juga akan berikatan



dengan ligannya yang ada pada sel yang rusak dikenal dengan DAMPs (*damaged associated molecular patterns*) untuk melindungi tubuh melalui reaksi peradangan agar terjadi eliminasi kuman, perbaikan jaringan tubuh dan pematangan sel dendritik melalui ikatan reseptor yang dikenal dengan *Toll Like Receptors* (TLR) untuk selanjutnya memulai respon imunadaptif (Abbas et al., 2015; C. H. Liu et al., 2017; Moliva et al., 2017).

Reseptor seperti Toll-like (TLR) yang terikat membran memicu respons imun bawaan setelah pengenalan berbagai macam senyawa turunan patogen. Reseptor berbagi kerangka struktural umum dalam domain pengikatan ligan ekstraseluler mereka, semua domain ini mengadopsi struktur berbentuk tapal kuda yang dibangun dari motif berulang yang kaya leusin dikenal dengan *leusin-rich repeat* (LRR). Biasanya, pada pengikatan ligan, dua domain ekstraseluler membentuk dimer berbentuk "m" yang mengapit molekul ligan yang membawa domain transmembran dan sitoplasma dalam jarak dekat dan memicu kaskade pensinyalan hilir (Abbas et al., 2015; Kawasaki & Kawai, 2014).

TLR adalah reseptor membran integral tipe I, masing-masing dengan domain pengenalan ligan terminal-N, heliks transmembran tunggal, dan domain sinyal sitoplasma terminal-C. (Botos, 2011) Domain pensinyalan TLR dikenal sebagai domain Toll IL-1 Receptor (TIR) yang bertanggung jawab terhadap transduksi sinyal, berikatan dengan berbagai molekul adaptor salah satunya myeloid differentiation primary response gene (My-88) dan mengaktifasi *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B), *interferon regulatory*

*factors* (IRFs) dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) untuk menginduksi gen sitokin proinflamasi untuk selanjutnya mengaktifkan faktor transkripsi yang merangsang ekspresi gen yang menyandi sitokin, kemokin, enzim serta protein lain yang terlibat dalam fungsi antimikrobal dari fagosit yang teraktivasi dan sel lainnya (Kawasaki & Kawai, 2014; Moliva et al., 2017).

TLR yang terikat dengan ligannya akan menjadi aktif dan akan merekrut protein adaptor yaitu protein yang memediasi interaksi selanjutnya secara berurutan dengan protein -protein berikutnya dalam sitosol dari sel imun dan bertujuan untuk menyebarkan antigen-induced jalur transduksi sinyal. Protein adaptor kemudian bertanggung jawab untuk aktivasi selanjutnya secara berurutan dari protein-protein berikutnya, termasuk protein kinase seperti *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) 1 dan IRAK4, *TANK-binding kinase 1* (TBK1) and *inducible I $\kappa$ B-kinase* (IKK- $\beta$ ) yang selanjutnya memperkuat sinyal dan mengarah upregulasi atau downregulasi gen yang mengatur respon inflamasi dan lainnya seperti transkripsi (C. H. Liu et al., 2017)

*Reseptor Toll Like* (TLR) adalah salah satu dari berbagai reseptor pengenal kuman, yang terlibat dalam pengenalan kuman tuberculosis. Dari 10 TLR yang ditemukan pada manusia TLR2 dan TLR4 yang banyak terlibat dalam pengenalan MTB. TLR-2 akan mengenal ligannya yaitu beberapa glikolipid dan peptidoglikan yang membentuk dinding sel bakteri dan parasite: TLR-4 spesifik untuk LPS bakteri (endotoksin): sedangkan TLR-

3, TLR -7 dan TLR -8 spesifik untuk komponen asam nukleat virus (*single stranded* dan *double stranded* RNA), TLR-5 spesifik untuk protein *flagellar* bakteri yang disebut *unmethylated* CpG DNA, yang lebih banyak pada genom bakteri daripada DNA mamalia (Abbas et al., 2015; Moliva et al., 2017).

Jika ligan adalah bakteri, maka patogen difagositosis dan dicerna, antigennya dipresentasikan ke sel limfosit T (CD4+). Jika ligannya adalah virus, sel yang terinfeksi dapat mematikan sintesis proteinnya kemudian terjadi kematian sel terprogram (apoptosis). Sel imun yang telah mendeteksi virus juga melepaskan faktor antivirus seperti interferon (Kawasaki & Kawai, 2014; C. H. Liu et al., 2017). TLR2 dan TLR4 banyak terlibat dalam pengenalan terhadap mikobakterium tuberkulosis, selain TLR8 dan TLR9. TLR2 sangat penting untuk menginisiasi respon imunitas bawaan dengan mensekresi sitokin dan kemokin khususnya tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 (IL-1 $\beta$  IL- 18 IL12 , nitrit oxide dan IFN $\gamma$ ). TLR2 efektif untuk menginduksi pembentukangranuloma untuk mengontrol infeksi kronik tuberkulosis. Sedangkan TLR4 penting untuk mengaktifasi fusi fagosome lysosome dengan meningkatkan respon Th1. Ligasi TLR2 dan TLR4 dalam makrofag meningkatkan produksi ROS (reaction oxygen specific) mitokondria sebagai bakterisidal dengan merekrut mitokondria ke fagosom (Kawasaki & Kawai, 2014; C. H. Liu et al., 2017).

## **1.2. Rumusan Masalah**

Bagaimana ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 sebagai bagian respon imun bawaan pada TB anak yang telah divaksin BCG?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan Umum**

Mengetahui hubungan respon imun bawaan dengan scar BCG dan derajat klinis pada TB anak yang telah divaksin BCG

### **1.3.2. Tujuan Khusus**

1. Mengetahui adanya perbedaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak dengan Scar BCG dan tanpa scar BCG
2. Mengetahui adanya perbedaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak dengan derajat klinis berat dan tidak berat
3. Menentukan adanya korelasi ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak yang telah divaksin BCG

## **1.4. Pertanyaan penelitian**

1. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak dengan Scar BCG dengan tanpa scar BCG

2. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak dengan derajat klinis berat dan tidak berat
3. Apakah ada korelasi ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 pada TB anak yang telah divaksin BCG

## **1.5. Manfaat Penelitian**

### **1.5.1. Aspek Pengembangan Ilmu**

Memahami peran dan mengidentifikasi biomarker yang terlibat dalam respon imunitas bawaan pada TB anak yang telah divaksin BCG

### **1.5.2. Manfaat Praktis**

Membantu klinisi pada tahap awal dalam menentukan derajat keparahan dengan menggunakan parameter kadar TLR2 dan TLR4 pada TB anak yang telah divaksin BCG

## **1.6. Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian dilakukan dari pasien di Rumah Sakit Bhakti Medicare Sukabumi, Rumah Sakit Islam Jakarta Cempaka Putih Jakarta Pusat, dan Rumah Sakit Islam Jakarta Sukapura Jakarta Utara dilakukan oleh dokter spesialis anak melalui anamnesis, pemeriksaan fisik, diagnosis, pemeriksaan penunjang dan pengambilan sample darah. Untuk pemeriksaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 , kadar protein TLR2 dan TLR4 yang dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin,



Makassar. Penelitian direncanakan dimulai Maret 2019 hingga besar sampel tercukupi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Epidemiologi**

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit menular yang masih menjadi masalah global, penyebab salah satu dari 10 kematian teratas di dunia dan penyebab utama kematian dari agen infeksi tunggal (peringkat di atas HIV/AIDS). Secara global, diperkirakan 10,0 juta (kisaran, 8,9-11,0 juta) orang jatuh sakit dengan TB pada tahun 2019, jumlah yang menurun sangat lambat dalam beberapa tahun terakhir (WHO, Global Tuberculosis Report, 2020) Wilayah Asia Tenggara (South East of Asia) adalah rumah bagi 26% populasi dunia dengan beban kejadian TB sebesar 44%. Pada tahun 2019, diperkirakan 4,3 juta orang jatuh sakit TB dan diperkirakan 632.000 meninggal karena penyakit tersebut yang merupakan lebih dari setengah kematian TB global. Enam dari 30 negara dengan beban TB tinggi (dan TB-MDR) berada di Kawasan SEA: Bangladesh, Republik Rakyat Demokratik Korea, India, Indonesia, Myanmar, dan Thailand (WHO, 2020).

Distribusi global TB anak mencerminkan orang dewasa, salah satu faktor penularan pada anak adalah penderita TB latent, oleh sebab itu WHO mengupayakan meningkatkan skrining untuk menemukan penderita TB latent agar mendapat pengobatan preventif. Kematian akibat TB tertinggi terjadi di usia sangat muda (usia 0–4 tahun) dibandingkan dengan kelompok usia lainnya.(Thomas, 2017).

Pada tahun 2020 dilaporkan kasus tuberkulosis anak 32.930 per

344992 (9.5%) anak dari jumlah estimasi ditemukan kasus tuberkulosis dan pada tahun 2019 dilaporkan sebanyak 70.341 kasus, dengan jumlah kasus tuberkulosis pada balita 27/10.000 anak dan 2/10.000 pada anak usia 5-14 tahun. Kasus terbanyak adalah tuberkulosis di paru 89% dan tuberkulosis ekstraparu sebanyak 11% (Kemenkes RI, 2021).

Peningkatan jumlah kasus TB di berbagai tempat pada saat ini, diduga disebabkan oleh berbagai hal, yaitu (1) diagnosis tidak tepat, (2) pengobatan tidak adekuat, (3) program penanggulangan tidak dilaksanakan dengan tepat, (4) infeksi endemik HIV, (5) migrasi penduduk, (6) mengobati sendiri (*self treatment*), (7) meningkatnya kemiskinan, dan (8) pelayanan kesehatan yang kurang memadai (Kartasasmita, 2009).

Dalam perspektif epidemiologi yang melihat kejadian penyakit sebagai hasil interaksi antar tiga komponen pejamu (*host*), penyebab (*agent*), dan lingkungan (*environment*). Pada sisi pejamu, kerentanan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) sangat dipengaruhi oleh daya tahan tubuh seseorang pada saat itu. Pengidap HIV AIDS atau orang dengan status gizi yang buruk lebih mudah untuk terinfeksi dan terjangkit TBC (Kemenkes RI, 2018).

## **2.2. *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul. Bakteri ini berukuran lebar 0,3-0,6 mm dan panjang 1-4 mm. Dinding *Mycobacterium tuberculosis* sangat kompleks, terdiri dari lapisan lemak cukup tinggi (60%).

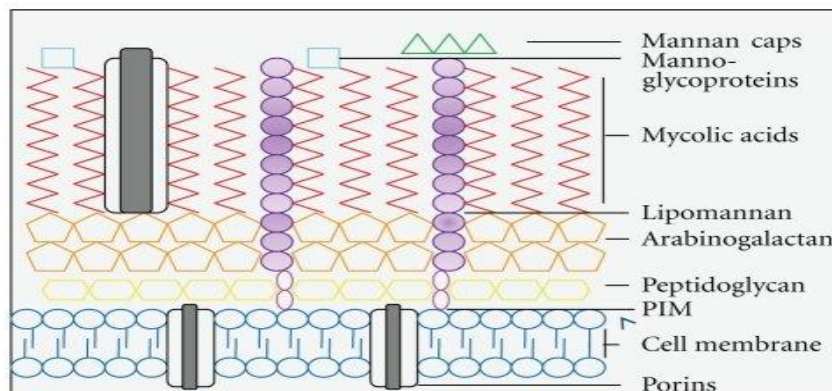
Penyusun utama dinding sel *M. tuberculosis* ialah asam mikolat merupakan asam lemak berantai panjang yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri adalah polisakarida (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2016).

MTB adalah patogen intraseluler yang tumbuh lambat yang dapat bertahan hidup di dalam makrofag inang, bakteri tahan asam karena dinding selnya terutama terdiri dari asam mikolat hidrofobik. Asam mikolat hidrofobik merupakan komponen spesifik dari dinding sel mikobakteri dan membentuk 50% dari berat keringnya, karena lapisan tebal asam mikolat ini, masuknya nutrisi terganggu, yang menyebabkan pertumbuhan lambat mikobakteri, tetapi juga meningkatkan resistensi seluler terhadap degradasi melalui enzim lisosom (Kleinnijenhuis et al., 2011; Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2016).

Asam mikolat adalah lapisan tebal pada sebagian besar di dinding luar sel, sedangkan lapisan dalam sel sebagian besar terdiri dari arabinogalactan, phosphatidyl-myo-inositol mannosides (PIMs), dan peptidoglikan. Komponen dinding sel lain yang mengandung mannose termasuk mannose-capped lipoarabinomannan (Man-LAM), lipomannan (LM), dan manno-glikoprotein, mannan dan arabinomannan terdapat di permukaan dan membentuk kapsul luar bakteri ini. Man-LAM, LM, dan PIM semuanya berbagi domain mannosyl-phosphatidyl-myo-inositol (MPI) yang mungkin mengikat struktur ke dalam membran plasma (Kleinnijenhuis et al.,

2011). Man-LAM, salah satu mannan paling banyak di permukaan sel, merupakan faktor virulensi penting dari MTB. Man-LAM adalah lipoglikan heterogen dengan struktur tripartit karakteristik dari inti karbohidrat, jangkar MPI, dan berbagai motif mannose-capping.

Motif mannose-capped ini adalah karakteristik untuk semua mikobakteri patogen. Strain ini memiliki LM yang tidak tertutup atau memiliki phospho-myo-inositol caps (PILAM), yang diketahui menunjukkan efek imunostimulasi yang lebih kuat. PIM dapat dibagi menjadi dua kelompok tergantung pada kandungan mannose, yang menentukan efek imunogeniknya (Kleinnijenhuis et al., 2011).



**Gambar 2.1** Struktur dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*

Keterangan: Gambar ini menunjukkan representasi skema dari komponen utama dinding sel dan distribusinya. Lapisan dalam tersusun dari peptidoglikan yang terikat secara kovalen dengan lapisan arabinogalaktan. Membran luar mengandung asam mikolat, glikolipid seperti (manose-capped) lipomannan, dan mannoglikoprotei (Kleinnijenhuis et al., 2011).

## 2.3. Patogenesis

### 2.3.1. Tuberkulosis Primer

Timbulnya infeksi MTB pada anak-anak hampir selalu terjadi akibat

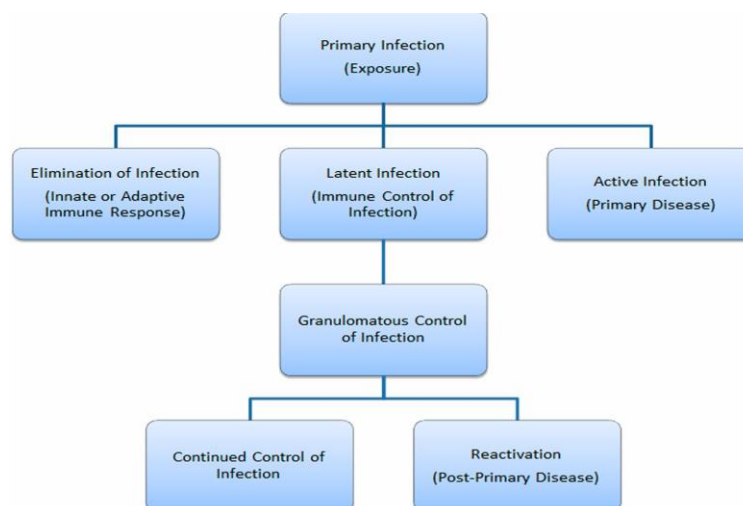
tertular dari orang dewasa, karena anak kecil umumnya memiliki penyakit paucybasiler dan nonkavitas, dan tidak mempunyai kemampuan untuk batuk efektif untuk mengeluarkan dahaknya. MTB akan terikat pada makrofag alveolar dan difagositosis ke dalam vakuola yang rapat. Fagosom intraseluler akan menyatu dengan lisosom membentuk fagolisosom, reaktif nitrogen dan oksigen untuk membatasi dan membunuh MTB (American Thoracic Society & CDC, 2000; Holmberg et al., 2019).

Kuman tuberkulosis yang masuk melalui saluran napas akan bersarang di jaringan paru sehingga akan terbentuk suatu sarang pneumoni, yang disebut sarang primer atau afek primer, selanjutnya terjadi peradangan saluran getah bening menuju hilus (limfangitis lokal). Peradangan tersebut diikuti oleh pembesaran kelenjar getah bening di hilus (limfadenitis regional). Afek primer bersama-sama dengan limfangitis regional dikenal sebagai kompleks primer. Berkembangnya infeksi primer pada bayi utamanya dalam 2 tahun pertama diperkirakan < 1 tahun 30-40%, 1-2 tahun 10-20%, termasuk 10%-20% menjadi penyakit diseminata. Kompleks primer ini akan mengalami salah satu kondisi sebagai berikut (Holmberg et al., 2019; Rahajoe et al., 2018).

1. Sembuh dengan tidak meninggalkan cacat sama sekali (*restitution ad integrum*)
2. Sembuh dengan meninggalkan sedikit bekas (antara lain sarang Ghon, garis fibrotik, sarang perkapuran di hilus)
3. Menyebar sistemik melalui :

- a. Menyebar dengan cara perkontinuitatum, yaitu kuman menyebar ke daerah atau jaringan sekitarnya.
- b. Penyebaran secara bronkogen, baik di paru bersangkutan maupun ke paru sebelahnya atau tertelan
- c. Penyebaran secara hematogen dan limfogen. Penyebaran ini berkaitan dengan daya tahan tubuh, jumlah dan virulensi kuman. Penyebaran ini juga dapat menimbulkan tuberkulosis pada alat tubuh lainnya, misalnya tulang, ginjal, anak ginjal, genitalia dan sebagainya. (American Thoracic Society & CDCP, 2000)

Bagi mereka yang berusia 2 hingga 10 tahun risiko perkembangan penyakit aktif turun menjadi kurang dari 5%. Puncak kedua perkembangan penyakit terjadi pada masa remaja, dimana risiko penyakit akan meningkat 10%-20% (Holmberg et al., 2019; WHO, 2016).



**Gambar 2.2** Tiga kondisi setelah terpapar MTB

### 2.3.2. Tuberkulosis Postprimer

Tuberkulosis postprimer akan muncul bertahun-tahun setelah tuberkulosis primer, biasanya terjadi pada usia 15-40 tahun. Tuberkulosis postprimer dimulai dengan sarang dini, yang umumnya terletak di segmen apikal lobus superior maupun lobus inferior (Holmberg et al., 2019; Rahajoe et al., 2018):

1. Diresopsi kembali dan sembuh tanpa meninggalkan cacat
2. Sarang tersebut akan meluas dan segera terjadi proses penyembuhan dengan penyebukan jaringan fibrosis kemudian pengapuran dan akan sembuh dalam bentuk perkapuran.
3. Sarang pneumoni meluas, membentuk jaringan keju (jaringan kaseosa). Kavitas akan muncul jika jaringan keju keluar saat batuk. Kaviti awalnya berdinding tipis, kemudian dindingnya akan menjadi tebal (kaviti sklerotik). Kaviti tersebut akan menjadi:
  - a. Meluas kembali dan menimbulkan sarang pneumoni baru.
  - b. memadat dan membungkus diri (enkapsulasi), dan disebut tuberkuloma dapat mengapur dan menyembuh atau aktif kembali.
  - c. Bersih dan menyembuh yang disebut *open healed cavity*, i yang menyembuh dengan membungkus diri dan akhirnya mengecil sehingga kelihatan seperti bintang (*stellate shaped*)

### 2.4. Gejala Klinis

Seorang anak harus dicurigai menderita tuberkulosis jika (Rahajoe NN, 2013) ( American Thoracic Society, 1999)



1. Mempunyai riwayat kontak erat dengan TB dewasa BTA positif
2. Terdapat reaksi kemerahan cepat setelah penyuntikan BCG
3. Terdapat gejala umum TBC : berat badan turun tanpa sebab yang jelas nafsu makan tidak ada (anorexia) dengan gagal tumbuh , demam lama >2 minggu dan atau berulang tanpa sebab yang jelas, batuk lama > 3 minggu dan sebab lain telah disingkirkan dan pembesaran kelenjar limfe superfisialis.
4. Gejala TB paru batuk dengan atau tanpa dahak, hemoptysis, sesak, nyeri dada, dengan gambaran kelainan pada paru
5. Gejala TB ekstraparu seperti gejala spesifik tergantung pada bagian tubuh mana yang terserang misalnya:
  - a. TBC usus diare berulang, nyeri perut dll
  - b. TBC Kulit/skrofuloderma
  - c. TBC tulang dan sendi: tulang punggung (spondilitis): gibbus, tulang panggul (koksitis)
  - d. TBC Otak dan Saraf : Meningitis dengan gejala iritabel kaku kuduk muntah-muntah dan kesadaran menurun
  - e. TBC mata : Konjungtivitis fliktenulari, Tuberkel koroid (hanya terlihat dengan funduskopi)

## **2.5. Komplikasi Penyakit**

Tuberkulosis adalah penyakit sistemik yang dapat menimbulkan gejala pada semua organ. Komplikasi dini dengan mekanisme sebagai berikut (Kemenkes RI, 2016; Rahajoe et al., 2018):

1. **Efusi pleura, pleuritis, empyema:** akibat kerusakan pleura atau fokus masuk melalui kelenjar limfe, kemudian cairan melalui sel mesotelial masuk kedalam rongga pleura dan juga dapat masuk ke pembuluh limfe sekitar pleura.
2. **Obstruksi jalan nafas:** Komplikasi lanjut peradangan pada sel-sel otot jalan nafas yang kronis itu menyebabkan paralisis silia sehingga terjadi statis mukus dan adanya infeksi kuman. Erosi epitel, fibrosis, metaplasia sel skamosa serta penebalan lapisan mukosa sehingga terjadi obstruksi jalan nafas yang *irreversible (stenosis)*.

## 2.6. Keparahan Penyakit

Keparahan penyakit TB memiliki definisi beragam, penelitian di Rusia oleh Pantelev 2017 menilai keparahan penyakit dengan skoring yang berisi penilaian oleh klinisi, oleh ahli mikrobiologi dan oleh ahli radiologi dan bentuk TB sesuai pedoman yang ditetapkan. Klinis menetapkan keparahan berdasarkan ada tidak gejala suhu tubuh, batuk, penurunan berat badan, dan keringat malam (Pantelev et al., 2017). Derajat keparahan penyakit pada pasien dapat diukur dengan menggunakan beberapa metode, antara lain skor Bandim TB. Skor Bandim TB adalah skor yang didasarkan pada enam tanda dan lima gejala yang ditunjukkan oleh pasien. Tingkat keparahan penyakit TB sebelumnya telah terbukti berkorelasi dengan jumlah bakteri yang diperoleh dari kultur positif dan respons pasien terhadap pengobatan (Rudolf, 2014).

Skor TB terdiri dari lima gejala (batuk, hemoptisis, dispnea, nyeri dada, dan keringat malam) dan enam tanda (konjungtiva inferior pucat, nadi 90/menit, temuan positif pada auskultasi paru, suhu 37,8<sup>0</sup>C, indeks massa tubuh [IMT]<18/<16,dan lingkar lengan atas [MUAC] <220 mm/< 200 mm. Setiap variabel dinilai satu poin, namun IMT dan MUAC dinilai satu poin jika <16/<200 mm; skor maksimum 13 yang terbagi 3 kelas keparahan adalah severity classification (SC) SC ITBscore 0-5; kategori ringan, SCII, TBscore 6-7, dan SCIII, TBscore > 8 dengan kategori sedang dan berat (Dewi et al., 2020; Rudolf, 2014).

Tabel 2.1 Tuberkulosis Skore

<b>Tuberculosis score</b>		<b>A</b>
Date:		Sex: F or M
Date of diagnosis:		Age:
Name:		
<b>How was the diagnosis set:</b>		
Sputum smear positive (SSP):		yes or no
Rtg thorax:		
Comments: (still SSP, treatment ect.)		
Parameters	Points assigned	Points
<b>Self-reported</b>		
Cough	1	
Haemoptysis	1	
Dyspnoea	1	
Chest pain	1	
Night sweating	1	
<b>Objective</b>		
Anaemic conjunctivae	1	
Tachycardia pulse > 90	1	
Positive finding at lung auscultation	1	
Axillary temperature > 37,0°	1	
BMI* < 18	1	
BMI < 16	1	
MUAC* < 220mm	1	
MUAC < 200 mm	1	
<b>Total score</b>		
* BMI = Body Mass Index, MUAC = Middle Upper Arm Circumference		

Penilaian keparahan yang sering digunakan lainnya adalah Karnofsky Performance Score (KPS), merupakan alat penilaian subjektif berdasarkan gangguan fungsional, yang terdiri dari skala 0 sampai 100% sesuai dengan kemampuan untuk melakukan aktivitas sehari-hari, untuk bekerja, kebutuhan akan bantuan, dan adanya gejala yang berhubungan dengan penyakit. Ini dapat digunakan untuk membandingkan efektivitas terapi yang berbeda dan untuk menilai prognosis pada masing-masing pasien. Semakin rendah skor Karnofsky, semakin buruk kelangsungan hidup untuk sebagian besar penyakit serius (Rudolf, 2014).

Tabel 2.2 Skala Penampilan menurut Karnovsky

Deskripsi	Skala (%)
Normal tidak ada keluhan	100
Dapat mengerjakan aktivitas normal, mempunyai keluhan minor atau tanda dari suatu penyakit	90
Dapat melakukan aktivitas normal dengan effort	80
Dapat melakukan/melayani dirinya sendiri, tidak dapat melakukan aktivitas normal atau kerja aktif	70
Ambulatory membutuhkan bantuan untuk melakukan atau melayani dirinya sendiri pada beberapa keadaan	60
Lebih sering membutuhkan bantuan dan perlu perawatan	50
Membutuhkan bantuan khusus dan disable	40
Severely disable, perlu perawatan RS tetapi tidak mengancam kematian	30
Sakit berat, perlu perawatan RS , memerlukan bantuan terapi aktif	20
Terancam kematian	10
Mati	0

Klasifikasi penyakit TB lainnya berdasarkan lokasi penyakit, yaitu tuberkulosis paru (TBP) dan tuberkulosis ekstraparu (TBEP), kebanyakan keparahan penyakit adalah TBEP. Tuberkulosis ekstrapulmoner (TBEP)

didefinisikan menurut kriteria klasifikasi WHO sebagai infeksi oleh MTB yang mempengaruhi jaringan dan organ di luar parenkim paru. Ini mewakili antara 20 dan 25% dari semua kasus TB (WHO, 2020).

Tuberkulosis ekstraparu (TBEP) hasil dari penyebaran hematogen dan limfatik basil MTB. Sebagai hasil dari penyebaran dan akibat pengembangan mekanisme imunitas yang diperantarai sel spesifik, di antaranya pembentukan anti-TNF alfa, IL12 dan interferon gamma, kekebalan protektif terhadap bakteri dikembangkan, dengan hasil pembentukan granuloma berkapsul yang mengandung basil hidup. Meskipun hal ini dapat terjadi kapan saja setelah infeksi primer, paling sering terjadi bertahun-tahun atau dekade kemudian, karena perubahan mekanisme respons imun yang bertanggung jawab seperti usia yang ekstrem (anak-anak atau orang tua), kondisi medis bersamaan atau perawatan yang memerlukan perubahan sel- kekebalan yang dimediasi. Perubahan kekebalan mekanisme yang terlibat dalam pembentukan granuloma menjadi predisposisi reaktivasi TB laten dan perkembangan infeksi TB aktif. (Rudolf, 2014)

Penentuan Tuberkulosis ekstrapulmoner (TBEP) biasanya terkendala dengan masalah diagnostik daripada tuberkulosis paru. Sebagian hal ini berkaitan dengan gejala yang kurang umum dan kurang dikenal oleh sebagian besar dokter. Selain itu, TBEP melibatkan tempat yang relatif tidak dapat diakses dan, karena sifat tempat yang terlibat, lebih sedikit basil dapat menyebabkan kerusakan yang jauh lebih besar. Kombinasi sejumlah kecil

basil dan situs yang tidak dapat diakses menyebabkan konfirmasi bakteriologis diagnosis menjadi lebih sulit, dan prosedur invasif sering diperlukan untuk menegakkan diagnosis (American Thoracic Society & CDC, 2000; Kaba et al., 2019).

Faktor risiko yang berhubungan dengan TBEP terutama usia, jenis kelamin perempuan, infeksi HIV bersamaan dan komorbiditas seperti penyakit ginjal kronis, diabetes mellitus atau immunosupresi. Rerata usia pasien TBEP lebih tinggi dibandingkan dengan TB paru. Di antara pasien TBEP dengan kelainan di pleura atau meningeal adalah berusia lebih muda daripada mereka dengan kelainan di saluran limfatik, osteoartikuler, genitourinary dan gastrointestinal (American Thoracic Society & CDC, 2000; Ramírez-Lapausa et al., 2015).

Gejala dan tanda dapat relatif kabur dan kadang-kadang terjadi pada rontgen dada normal dan pasien BTA-negatif, sehingga menghambat pertimbangan penyakit pada pendekatan awal. Namun demikian tuberkulosis paru selalu perlu disingkirkan dengan cara rontgen dada dan kultur sputum. Uji kulit tuberkulin (PPD) atau deteksi gamma interferon perlu dilakukan untuk menyingkirkan infeksi TB. Standar emas nya adalah kultur mikrobiologi, namun dibutuhkan waktu 2-6 minggu untuk siap dalam media kultur (American Thoracic Society & CDC, 2000; Ramírez-Lapausa et al., 2015).

Metode tes cepat molekuler memungkinkan diagnosis cepat melalui sampel langsung dan dapat mendeteksi mutasi gen yang bertanggung

jawab atas resistensi antimikroba. Pada TBEP seperti TB pleura, meningeal, kemih, peritoneum dan perikardial, sensitivitas TCM akan berkisar antara 50% dan 70% dengan spesifisitas tinggi antara 90% dan 95%. Dilaporkan sensitivitas sekitar 80% dan spesifisitas 90% pada TB tulang dan kelenjar getah bening. Pedoman saat ini merekomendasikan teknik TCM ini sebagai metode koadjuvant untuk diagnosis TBEP. Hasil perlu ditafsirkan bersama-sama dengan hasil teknik lain dan tingkat kecurigaan klinis (Kaba et al., 2019; Ramírez-Lapausa et al., 2015).

Penentuan enzim adenosin deaminase (ADA) memberikan informasi yang berguna pada TB ekstrapulmoner. Ini diproduksi oleh monosit dan makrofag yang terlibat dalam respon inflamasi membran serosa, dimana sensitivitas tinggi (75-80%) namun spesifisitasnya sangat bervariasi dan tergantung pada kejadian karena menurut usia dan patologi sebelumnya kita dapat memiliki hasil positif palsu (American Thoracic Society & CDCP, 2000; Ramírez-Lapausa et al., 2015).

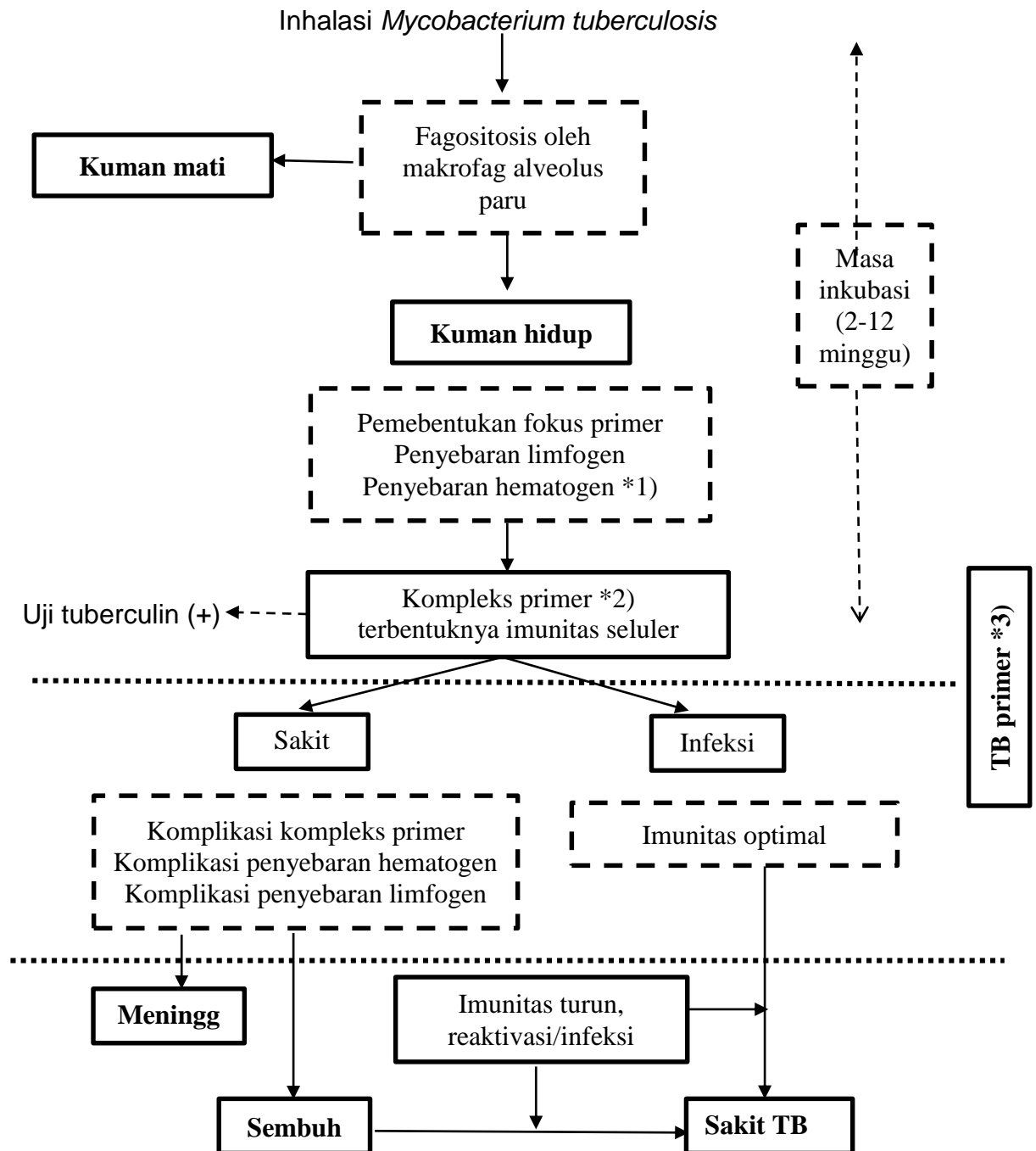
Diagnosis pasti EPTB memerlukan sampel dari cairan dan/atau jaringan melalui fine needle aspiration biopsy (FNAB), untuk pemeriksaan apusan, kultur dan PCR, bahkan memerlukan biopsi terbuka pada jaringan yang terkena jika FNAB negatif. Studi histopatologi dari biopsi menunjukkan granuloma nekrotikans khas yang mengandung makrofag, limfosit dan sel raksasa Langhans. Nekrosis kaseosa kadang-kadang dapat ditemukan di bagian tengah granuloma. Kehadirannya memiliki spesifisitas tinggi dan

dapat membenarkan keputusan untuk memulai terapi antituberkulosis (American Thoracic Society & CDC, 2000; Ramírez-Lapausa et al., 2015).

Penelitian di Spanyol pada anak-anak <18 tahun yang didiagnosis didapatkan dari 526 kasus TB pediatrik menderita EPTB (17,7%). paling umum TB limfatik (34,5%). Kasus sumber tidak teridentifikasi pada sebagian besar kasus ekstrapulmoner berbeda dengan TB paru (28% vs 63,3%;  $P < 0,001$ ). Indurasi TST lebih kecil pada kasus TBEP (<5 mm 22% vs 5%;  $P < 0,001$ ), tetapi sensitivitas uji pelepasan interferon-gamma serupa (76,9% vs 79,4%). Anak-anak dengan TBEP menunjukkan tingkat konfirmasi bakteriologis yang lebih tinggi (66% vs. 49,4%;  $P < 0,01$ ), dan insiden yang lebih tinggi dari TB yang resistan terhadap berbagai obat (8,2% vs. 1,6%;  $P = 0,03$ ). Komplikasi terjadi pada 40,2% kasus ekstrapulmoner. TBEP dikaitkan dengan asal asing anak, gangguan kekebalan dan resistensi obat (García SB, 2016) Penelitian lain 128 kasus dimasukkan 42 kasus terjadi pada anak berusia < 5 tahun; 41 kasus antara 6-10 tahun dan 45 kasus > 10 tahun. PTB hadir di 75,0% kasus, dan EXPTB hadir di 25% kasus. Tidak ada perbedaan bermakna antara EXPTB dan PTB menurut distribusi kelompok umur ( $p=0,201$ ). Tingkat pasien bebas dari gejala konstitusional secara signifikan lebih tinggi di EXPTB dibandingkan dengan PTB ( $p=0,000$ ). TB masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang utama. EXPTB memiliki onset yang berbahaya dan diam tanpa gejala konstitusional, dan konfirmasi mikrobiologis dan sumbernya oleh orang dewasa tidak sering ditemukan. Selain itu, deteksi



sumber orang dewasa adalah wajib untuk mengendalikan penyakit TB pada anak-anak. (Devrim, 2014)



**Gambar 2.3** Patogenesis Tuberkulosis  
**Sumber:** (Kemenkes RI, 2016)

## 2.7. Kontak TB

Ada empat faktor yang menentukan kemungkinan penularan *M. tuberculosis*: (1) jumlah organisme yang dikeluarkan ke udara, (2) konsentrasi organisme di udara ditentukan oleh volume ruang dan ventilasinya, (3) lamanya waktu orang yang terpapar menghirup udara yang terkontaminasi, dan (4) kemungkinan status kekebalan individu yang terpapar. Kontak erat dalam satu rumah memungkinkan risiko penularan TB (American Thoracic Society & CDCP, 2000).

Dari sisi individu seorang anak dapat tertular tuberkulosis selain ditentukan oleh konsentrasi kuman yang terhirup, lama kuman terhirup, virulensi kuman, umur juga dipengaruhi oleh keadaan gen dari orang tersebut. Tidak semua kuman yang masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan sakit, hal ini tergantung dari kerentanan tubuh sebagai akibat interaksi beberapa faktor di dalam tubuh misalnya status gizi, imunisasi, kepadatan hunian dan gen individu tersebut (American Thoracic Society & CDCP, 2000; Holmberg et al., 2019; Kartasasmita, 2009; Rahajoe et al., 2018).

Laporan WHO faktor risiko utama kejadian tuberkulosis pada anak terjadi pada tingkat rumah tangga seperti kontak dengan sumber penularan serta kondisi malnutrisi yang berat. Anak yang terinfeksi kuman tuberkulosis sebagian besar tertular dari anggota keluarga, pengasuh ataupun tetangga. Seorang penderita tuberkulosis dewasa dapat menularkan pada 10-15 orang. Sekali batuk penderita dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan

dahak (*droplet*) dan 90% penularan TB di masyarakat adalah karena sputum smear positif (Gebregers & Alemu, 2015; WHO, 2016).

Sumber penularan tuberkulosis pada anak rata-rata berasal dari batuk orang dewasa dengan sputum BTA positif. Saat orang dewasa batuk maka *droplet* yang dikeluarkan mengandung kuman yang bisa menginfeksi lingkungan sekitar. *Droplet* dengan ukuran yang lebih besar akan jatuh ke tanah, namun yang berukuran lebih kecil akan melayang-layang di udara (Fithriasari & Wahyuni, 2017; Jahiroh & Prihartono, 2017; WHO, 2016).

Anak yang kontak erat dengan penderita TB paru berisiko tinggi terinfeksi TB. Risiko infeksi meningkat dengan adanya kedekatan dan durasi kontak yang lama. Penelitian Asyary 2017 menemukan bahwa rumah sehat, terutama yang kamar tidurnya sehat dan lebih sedikit terpapar penderita TB dewasa, dipengaruhi oleh variabel perancu, melindungi anak dari TB meskipun terpapar TB dewasa di lingkungannya. Waktu hidup bersama yang lebih lama bukan merupakan faktor risiko anak tertular TB bila tinggal bersama pasien TB dewasa di rumah. Namun, risiko ini meningkat dengan seringnya pajanan di antara anak-anak dengan pasien TB dewasa di rumah (Al Asyary, 2017)

Penelitian dilakukan pada anak berusia dibawah 15 tahun yang kontak erat dengan penderita TB paru BTA positif .Dimana ibu atau orang tua sebagai kasus maka tidur sekasur dengan anak adalah faktor risiko infeksi TB pada anak. Tidak ada hubungan bermakna antara kasus dengan faktor jenis kelamin wanita, lama kontak > 9 jam/hari, tidur sekamar pada malam

hari, keintiman aktifitas menyusui, menyuapi, serta makan bersama 3x sehari dengan infeksi TB pada anak yang kontak erat (Bancin, 2014).

Penelitian di Semarang menunjukkan anak yang mempunyai riwayat kontak BTA+ tetapi anak tersebut tidak menderita TB, dikarenakan orang dewasa yang terkena BTA+ menjaga kontak dengan anak seperti tidak tidur sekamar, tidak makan satu piring atau menyuapi anak, dan menggunakan masker saat sakit serta rutin mengkonsumsi OAT sehingga meminimalisir penularan TB (Purnamaningsih et al., 2018).

Secara umum, prevalensi infeksi TB pada kontak anak di bawah usia 15 tahun lebih tinggi (24,4-69,2%) dibandingkan dengan penyakit TB aktif (3,3-5,5%). Penyakit TB lebih banyak ditemukan pada anak berusia kurang dari 5 tahun, sedangkan infeksi TB lebih banyak ditemukan pada anak yang lebih tua. Hasil investigasi kontak rumah tangga di seluruh studi yang memenuhi syarat tidak dapat dibandingkan secara langsung karena heterogenitas, terutama dalam definisi hasil (penyakit TB atau infeksi TB). Infeksi TB dari penelitian yang menggunakan potongan 10 mm hasil TST untuk infeksi TB di antara kasus indeks sputum BTA-positif. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi TB lebih sering terjadi pada anak berusia lebih dari 5 tahun. Prevalensi infeksi pada semua anak berkisar antara 24,4% hingga 38,8%, dengan hasil tertimbang 31% (Triasih et al., 2012).

Kontak Rumah Tangga (Household Contacts) berkontribusi terhadap kasus TB pada anak. Contact Investigation (CI) dan Preventive Therapy (PT) menjadi strategi yang berhasil untuk mencegah penularan TB pada

anak yang diberikan tidak hanya oleh Tenaga Kesehatan (Health Care) tetapi juga masyarakat yang peduli dengan pendekatan berbasis masyarakat dalam rangka mendorong anggota keluarga TB terpengaruh (Rahmawati et al., 2020). Kinerja program dalam skrining kontak di Afghanistan tinggi, sebesar 81%, dan hasil TB juga tinggi-hampir 10 kali lebih tinggi daripada angka kejadian TB nasional. Tingkat inisiasi dan penyelesaian IPT (isoniazid preventive therapy) juga tinggi dibandingkan dengan banyak negara lain tetapi perlu perbaikan lebih lanjut, terutama untuk penyelesaian (Sayedi et al., 2020). Sebuah studi cross-sectional prospektif dilakukan pada pengasuh, dari anak dengan TB aktif yang menerima pengobatan. Dari berbagai faktor yang dinilai usia < 2 tahun, pendapatan minimum, rumah penampungan, kontak TB > 18 jam dengan penderita TB, kepadatan rumah, kontak perokok, air minum tanpa direbus dan analisis multivariat mengungkapkan yang bermakna HHC dengan TB (OR = 15.288, 95% CI: 5.378–43.457), HHC dengan merokok (OR = 7.094, 95% CI: 2.128–23.648), dan kontak > 18 jam dengan individu TB (OR = 4.681 , 95% CI: 1,198–18,294) sebagai faktor risiko TB yang signifikan secara statistik di antara HHC. Dengan sistem skrining kontak TB saat ini, hanya 9,3% dari semua HHC yang diskruining masih rendah (Laghari et al., 2019).

## **2.8. Status Gizi**

Beberapa penelitian di Indonesia pada tuberculosi anak menunjukkan bahwa kejadian tuberculosi lebih sering ditemukan pada

anak-anak dengan gizi kurang (Husnah, 2017; Nasution et al., 2021; Putra & Amelia, 2013; Siregar et al., 2018). Anak yang mengalami malnutrisi lebih rentan dalam menghadapi infeksi tuberkulosis dibandingkan dengan anak sehat. Kejadian TB paru berhubungan dengan status gizi anak, wilayah tempat tinggal, status pekerjaan ayah (Bourke et al., 2016; Jaganath & Mupere, 2012; Widyastuti et al., 2021).

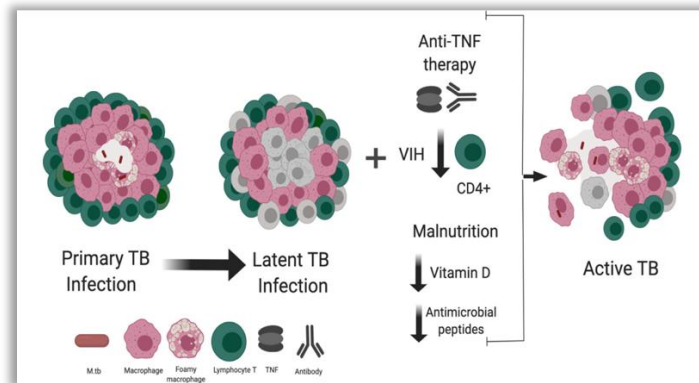
Pada bayi baru lahir penting untuk disadari bahwa imunitas yang diperantarai sel tidak lengkap (fungsi sel penyaji antigen, neutrophil dan TLR serta komplemen darah rendah) sehingga sebagian besar bergantung pada imunitas bawaan dan antibodi ibu. (Jaganath, 2012) Usia balita adalah usia yang berisiko terjadinya masalah gizi, khususnya 1000 tahun pertama kehidupan. Penelitian di Indonesia dan di Kongo ditemukan bahwa angka kejadian TB kebanyakan terjadi pada usia balita, dan masalah gizi kurang dan gizi buruk kebanyakan terjadi pada usia tersebut. (Dieu, 2017) (Apsari PIB, 2016)

Diketahui ada 4 jalur dukungan yang menjadi dasar pemahaman kami tentang interaksi antara tuberkulosis pediatrik dan status gizi, yaitu, (1) polimorfisme gen yang menghubungkan metabolisme vitamin dengan risiko tuberkulosis, (2) studi yang menyelidiki perkembangan kekebalan di antara anak-anak yang kekurangan gizi. (3) hubungan antara malnutrisi dan infeksi saluran pernapasan pada anak-anak, dan (4) hubungan antara status gizi dan tuberkulosis pada hewan model dan anak-anak. Bukti menunjukkan bahwa malnutrisi mempengaruhi ekspresi genetik dan fungsi kekebalan

serta respon inflamasi yang akan memperburuk keadaan gizi karena terjadi katabolisme otot yang disebabkan oleh gejala gastrointestinal yang disebabkan oleh protein fase akut, seperti kadar TNF yang tinggi yang menyebabkan asupan berkurang (Jaganath & Mupere, 2012).

Gejala penyakit menjadi aktif tergantung pada sejumlah faktor seperti infektivitas kasus sumber, kedekatan dan durasi kontak, kerentanan pejamu dan berbagai faktor sosial, perilaku, ekonomi, dan faktor lingkungan seperti kurang gizi, kepadatan penduduk, polusi udara dalam ruangan, merokok, dan kecanduan alkohol (Chandrasekaran et al., 2017; Tellez-Navarrete et al., 2021).

Fagositosis dan kaskade komplemen adalah dua mekanisme utama yang terlibat untuk eliminasi organisme patogen dari tubuh. Sistem komplemen dengan sendirinya dapat menghancurkan mikroorganisme atau reseptor komplemen yang ada pada permukaan fagosit dapat memediasi penangkapan patogen. Pada malnutrisi, kedua fungsi terganggu-faktor pelengkap opsonik C3 serta kemampuan fagositosis untuk menelan dan membunuh patogen juga sangat berkurang. Fungsi berbagai jenis sel penyaji antigen seperti limfosit B, makrofag, sel dendritik (DC), dan sel Kupffer menurun pada malnutrisi (Chandrasekaran et al., 2017). Respon imunitas yang baik akan mempertahankan granuloma sekuat mungkin agar tidak rusak hingga menyebabkan TB latent berubah menjadi TB aktif (Gambar. 2.4)



**Gambar 2.4** Faktor yang berhubungan dengan reaktivasi infeksi *M. Tuberculosis*

(A) Pada infeksi *M.tb* primer, respon imun yang efisien diaktifkan, granuloma dibentuk untuk pengendalian infeksi, dan keadaan TB laten sebagai akibatnya dihasilkan. (B) Adanya faktor-faktor, seperti terapi anti-TNF, infeksi HIV, dan malnutrisi, mempengaruhi respon imun yang membatasi pertumbuhan bakteri. (C) Perubahan respon imun mengganggu granuloma dan mendukung penyebaran basil *M.tb*. Gambar dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak BioRender.

Berbagai sel efektor imun mengekspresikan reseptor vitamin D, dan vitamin D3 mendorong diferensiasi monosit menjadi makrofag dan meningkatkan kapasitas sel-sel ini untuk memfagositosis mikobakteri. Pada sistem imun bawaan, aktivasi Toll-like receptor (TLR) 2/1 oleh presentasi antigen MTB menyebabkan ekspresi VDR dan 1- $\alpha$  vitamin D hidroksilase. Bentuk aktifnya 1,25 (OH) $_2$  vitamin D, yang berikatan dengan VDR. Mereka kemudian membentuk heterodimer dengan reseptor retinoid X (RXR), menciptakan kompleks yang mentranslokasi ke nukleus untuk mengatur transkripsi gen (Gambar 2.5). Protein kunci yang terbentuk adalah LL-37,

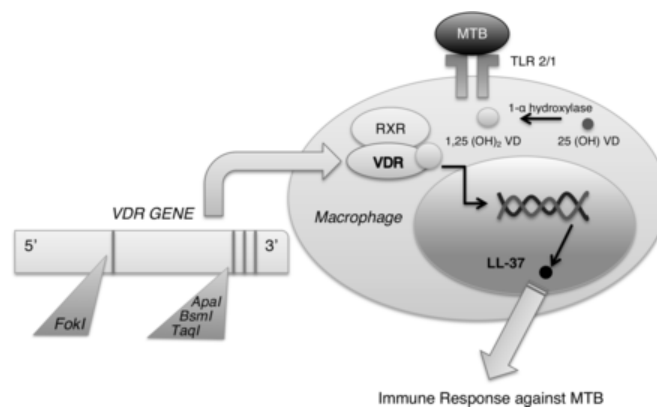


anggota keluarga cathelicidin, yang diketahui memiliki efek antimikroba terhadap MTB dengan merekrut sel imun lain ke tempat infeksi.

Fungsi lain vitamin D dan VDR adalah mengatur presentasi dan pemrosesan antigen, fagositosis, dan produksi interleukin (IL)-1 dan tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) yang penting untuk respon imun (Jaganath & Mupere, 2012). Vitamin D3 berdampak pada imunitas adaptif dengan membatasi respon pro-inflamasi Th1 dan Th17 dan mempromosikan produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10, IL-4 dan transforming growth factor- $\beta$ . Vitamin D3 juga membatasi proliferasi dan diferensiasi sel B untuk mengurangi sekresi imunoglobulin. Untuk membatasi respons adaptif pro-inflamasi yang dapat memperburuk kerusakan jaringan di lokasi penyakit (Gwela et al., 2019). Reseptor vitamin D (VDR) adalah reseptor nuklir larut yang ditemukan di banyak sel imun dan diyakini berperan dalam pola sekresi sitokin, pematangan sel dendritik, dan fungsi sel T efektor dan pengatur.

Beberapa polimorfisme gen VDR telah ditemukan yang dapat memengaruhi risiko dan hasil tuberkulosis, termasuk BsmI, TaqI, dan ApaI pada ujung 3' VDR, dan FokI pada situs ekson 2. Genotipe TaqI Tt dan ApaI AA dikaitkan dengan peningkatan respons terhadap terapi dan waktu yang lebih cepat untuk konversi sputum pada pasien tuberkulosis genotipe FokI ff paling signifikan pada populasi Asia, sedangkan tidak ada efek pada orang Afrika atau Amerika Selatan (Jaganath & Mupere, 2012; Tellez-Navarrete et al., 2021).

Vitamin A dalam bentuk All trans retinol (ATR) diesterifikasi dan disimpan di hati, dan retinol dan -karoten dioksidasi menjadi semua-trans-retina di jaringan oleh aksi alkohol dehidrogenase. Kemudian, retinal dioksidasi menjadi all-trans-retinoic acid (RA) oleh retinal dehydrogenases, yang merupakan metabolit aktif vitamin A. Vitamin A meningkatkan fungsi kekebalan tubuh, meningkatkan sekresi IL-2, dan akibatnya, proliferasi sel T, dan tergantung pada kondisi lingkungan mikro, dan dapat meningkatkan atau menekan proliferasi limfosit B . Selain itu, rangsangan inflamasi, seperti TNF, telah terbukti mendorong RA untuk meningkatkan pematangan sel dendritik dan kapasitas presentasi antigen, dibutuhkan monosit atau makrofag yang terinfeksi untuk memediasi mekanisme antimikroba melalui jalur yang bergantung pada NPC2, dan dalam kondisi ini, kolesterol seluler menurun dan meningkatkan aktivitas antimikroba (Tellez-Navarrete et al., 2021).



**Gambar 2.5** Peranan genetika dalam kerentanan TB

Peran genetika dalam kerentanan tuberkulosis. Reseptor vitamin D (VDR) memiliki peran integral dalam respon imun tuberkulosis melalui

pengikatannya dengan vitamin D untuk menginduksi fungsi antimikroba melalui LL-37. Beberapa polimorfisme pada gen VDR juga telah terlibat dalam kerentanan tuberkulosis. Singkatan: MTB, Mycobacterium tuberculosis; RXR, reseptor retinoid X; TLR, Reseptor seperti pulsa; VD, vitamin D.

Pada studi hewan menunjukkan bahwa hiperkolesterolemia meningkatkan kerentanan terhadap infeksi MTB, karena menginduksi respons proliferasi yang lemah dan aktivasi respons adaptif yang tertunda. Kemampuan yang lebih tinggi untuk menghasilkan oksida nitrat untuk menghindari kelangsungan hidup intraseluler M.tb ditunjukkan dalam studi in vitro menggunakan makrofag manusia (garis sel U937) yang distimulasi dengan RA sebelum infeksi MTB. Dalam model in vivo, penggunaan RA sebagai agen terapeutik disarankan; Tikus yang terinfeksi MTB yang menerima RA menunjukkan lebih sedikit keparahan histopatologi TB dan penurunan jumlah unit pembentuk koloni, dan makrofag alveolar mereka mensekresi TNF dan IL-1 $\beta$  tingkat tinggi.

Selain vitamin D, vitamin A maka Zinc juga memainkan peran penting dalam struktur dan fungsi protein; sekitar 10% protein mengikat seng, termasuk sitokin, faktor transkripsi, dan enzim. Pada model hewan, defisiensi seng telah terbukti menyebabkan atrofi timus dan limfopenia dengan peningkatan risiko infeksi, menurunkan aktivitas fagositosis makrofag, serta kemampuannya untuk mendaur ulang nutrisi dan bertahan melawan patogen intraseluler, bahwa akumulasi seng dalam fagosom

diperlukan untuk memperpendek masa hidup patogen fagositik. Protein pengangkut seng (Zrt) bertanggung jawab atas biodistribusi seng. Ada beberapa kelompok protein ini, dan protein seperti Zrt-/Irt (ZIP) adalah salah satunya. Selama infeksi in vitro dengan MTB pola ekspresi berbagai ZIP diamati berubah, misalnya, tingkat ekspresi ZIP10 dan ZIP8 menurun dan meningkat (Tellez-Navarrete et al., 2021).

ASI mengandung berbagai faktor imun penting termasuk lisozim, defensin, laktoferin, CD14 terlarut, sitokin, komplemen, dan lipid antivirus. Trigliserida susu, ketika dicerna sebagian dari lipase, menjadi monogliserida dan asam lemak bebas, yang dapat menjadi racun bagi banyak patogen. ASI juga merupakan sumber glycans yang besar, yang berfungsi sebagai substrat untuk fermentasi dan kolonisasi bakteri komensal, dan menghambat pengikatan patogen ke permukaan mukosa. Sebuah studi prospektif di Brazil menunjukkan bahwa neonatus dengan bronkiolitis virus akut dan lama menyusui eksklusif yang lebih pendek memiliki hasil klinis yang lebih buruk, termasuk peningkatan penggunaan oksigen dan tinggal di rumah sakit lebih lama (Jaganath & Mupere, 2012).

Leptin menyebabkan sekresi beberapa sitokin, dan model hewan menunjukkan bahwa peningkatan leptin selama kelaparan mencegah atrofi jaringan limfoid. Sebuah studi ex vivo T-limfosit dari anak-anak kurang gizi di Meksiko menemukan bahwa inkubasi dengan leptin menyebabkan penurunan produksi IL-4 dan IL-10 dan peningkatan IL-2 dan interferon ( $\text{IFN-}\gamma$ ), menunjukkan pergeseran ke Respon Th1 (Rodríguez et al., 2007).

Tabel 2.3 Mikronutrien yang penting untuk kekebalan melawan MTB

Summary of Micronutrients Important for Immunity Against Tuberculosis		
Name	Function	Supplementation for Childhood Tuberculosis
Vitamin D	Macrophage function, proper phagocytosis, lysosomal fusion	Radiological improvement, but no difference in serum levels or weight change [47]
Vitamin A	Regulates innate immunity, T and B lymphocyte function, and maintains mucosal epithelium	No improvement in weight or respiratory symptoms [46]
Vitamin E	Antioxidant properties that may reduce oxidative stress on T lymphocytes	When included in a multivitamin for children, did not improve weight gain [48]
Zinc	Widespread effect on immunity, and deficiency can lead to lymphopenia, poor lymphocyte functioning, thymic atrophy, impaired cell mediated immunity and shift to the Th2 response. Also, essential for metallo-enzyme formation and creation of free radicals	Improves tuberculin response, though no studies on treatment outcomes [44]
Selenium	Cell and humoral immunity, utilized in creation of metallo-enzymes	No known studies in children
Iron	Innate immunity such as neutrophil and natural killer function, T-cell maturation, and deficiency can result in shift toward Th2 response	No known studies in children

Malnutrisi diketahui memiliki efek langsung pada sel T, malnutrisi yang parah memicu atrofi timus serta organ limfoid perifer, yang pada gilirannya mengurangi jumlah sel (leukopenia), menurunkan rasio CD4/CD8, meningkatkan jumlah sel T negatif ganda CD4 dan CD8, dan meningkatkan jumlah sel T imatur di darah tepi. Penurunan besar dalam ekspresi CD25 dan CD27 (molekul yang diperlukan untuk aktivasi dan proliferasi sel T) juga ditunjukkan. Respon imun mukosa usus juga dipengaruhi oleh malnutrisi. Ini menghasilkan mikrovili hipotrofik yang rata, penurunan sekresi IgA, dan jumlah limfosit di patch Peyer. Anak-anak yang kekurangan gizi telah menunjukkan penurunan produksi sitokin tipe 1 (IL-2 dan IFN- $\gamma$ ), yang merupakan mediator utama imunitas. Albumin (<2,7 g/dl) telah terbukti kuat dan independen terkait dengan kematian di rumah sakit akibat TB (aOR 3,38, 95% CI 1,51-7,59; P = 0,001) (Chandrasekaran et al., 2017).

Beberapa faktor risiko dilaporkan berhubungan dengan insidens kasus TB yaitu (1) status gizi balita pendek dan sangat pendek mempunyai risiko masing-masing 3,5 kali dan 9 kali sakit TB dibandingkan yang normal.

(OR = 3.54; P = 0,004 and and OR = 9.06; P = 0.001) (2) Status imunisasi balita yang tidak diimunisasi dibandingkan yang diimunisasi BCG mempunyai risiko 4 kali sakit TB. (3) riwayat kontak TB. Balita yang mempunyai kontak TB dibandingkan tidak mempunyai kontak serumah dengan pasien TB berisiko hampir 12 kali sakit TB (OR = 11.96; P = 0.000). (4) usia balita, jika ditinjau dari usia balita, balita usia < 24 bulan dibandingkan balita usia > 24 bulan mempunyai risiko 2,8 kali sakit TB OR = 2.84; P = 0.011) (Jahiroh & Prihartono, 2017). Kejadian TB anak juga ditemukan berhubungan dengan sputum BTA penderita TB paru dewasa, lama kontak, dan status gizi anak (Fithriasari & Wahyuni, 2017).

Penentuan status gizi berdasarkan BB/TB yang kemudian diplot dengan menggunakan cut off Z score WHO 2006 untuk usia 0-5 tahun dan persentase berat badan ideal sesuai kriteria Waterlow untuk anak di atas 5 tahun, atau kurva CDC NCHS 2000.

Tabel 2.4 Penentuan status gizi menurut kriteria Waterlow, WHO 2006, dan CDC 2000

<b>Status gizi</b>	<b>BB/TB (% median)</b>	<b>BB/TB WHO 2006</b>	<b>IMT CDC 2000</b>
Obesitas	>120	> +3	> P95
<i>Overweight</i>	>110	> +2 hingga +3 SD	P85 – p95
Normal	> 90	+2 SD hingga -2 SD	
Gizi kurang	70-90	< -2 SD hingga -3 SD	
Gizi buruk	< 70	< - 3 SD	

## 2.9. Penegakan Diagnosis

### 2.9.1. Uji Tuberkulin

Tuberkulin adalah komponen protein kuman TB yang mempunyai sifat antigenik yang kuat. Jika disuntikan secara intrakutan kepada seseorang yang telah terinfeksi TB (telah ada kompleks primer dalam tubuhnya dan telah terbentuk imunitas selular TB) maka akan terjadi reaksi berupa indurasi di lokasi suntikan. Indurasi ini terjadi karena vasodilatasi lokal, edema, endapan fibrin dan terakumulasinya sel-sel inflamasi di daerah suntikan. Ukuran indurasi dan bentuk reaksi tuberkulin tidak dapat menentukan angka aktivitas dan beratnya proses penyakit (Rahajoe et al., 2018; Seddon et al., 2016).

Secara umum, hasil uji tuberkulin dengan diameter indurasi >10 mm dinyatakan positif tanpa menghiraukan penyebabnya. Hasil positif ini sebagian besar disebabkan oleh infeksi TB alamiah, tetapi masih mungkin disebabkan oleh imunisasi *Bacille Calmett Guerin* atau infeksi *M. atipik*. Anak jika ukuran indurasi >15 mm, hasil tuberkulin hasil positif ini sangat mungkin karena infeksi alamiah (Nayak & Acharjya, 2012; Rahajoe et al., 2018).

Hasil pembacaan Uji Tuberkulin adalah sebagai berikut (Kemenkes RI, 2016; Rahajoe et al., 2018):

- a. Indurasi 0-5 mm (diameternya): *Mantoux* negatif = golongan *no sensitivity*. Di sini peran antibodi humoral paling menonjol.

- b. Indurasi 6-9 mm: Hasil meragukan = golongan *normal sensitivity*. Di sini peran antibodi humoral masih menonjol.
- c. Indurasi 10-15 mm: Mantoux positif = golongan *low grade sensitivity*. Di sini peran kedua antibodi seimbang.
- d. Indurasi > 15 mm: Mantoux positif kuat = golongan *hypersensitivity*. Di sini peran antibodi seluler paling menonjol.

Jika membaca pada anak berusia lebih dari 5 tahun, faktor BCG dapat diabaikan. apabila diameter indurasi 0-4 mm, dinyatakan uji tuberkulin negatif. Bila mendapatkan hasil yang meragukan, uji tuberkulin dapat diulang. Untuk menghindari efek *booster* tuberkulin, ulangan dilakukan 2 minggu kemudian dan penyuntikan dilakukan di lokasi yang lain, minimal berjarak 2 cm (Kemenkes RI, 2016).

**Uji Tuberkulin positif** dapat dijumpai pada tiga keadaan sebagai berikut:

- Infeksi TB alamiah, Infeksi TB laten, Infeksi TB dan sakit TB, TB yang telah sembuh, Imunisasi BCG (infeksi TB buatan), Infeksi mikobakterium atipik

**Uji Tuberkulin negatif**

- Tidak ada infeksi TB, dalam masa inkubasi TB, Anergik

**Reaksi Cepat BCG**

Bila dalam penyuntikan BCG terjadi reaksi cepat (dalam 3-7 hari) berupa kemerahan dan indurasi > 5 mm, maka anak tersebut dicurigai telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*.



### **2.9.2. Radiologis**

Gambaran foto toraks pada TB tidak khas, kelainan-kelainan pada TB dapat dijumpai pada penyakit lain. Sebaliknya, foto toraks dengan gambaran normal (tidak terdeteksi secara radiologis) tidak dapat menyingkirkan diagnosis TB jika klinis dan pemeriksaan penunjang lain mendukung. Dengan demikian, pemeriksaan foto toraks saja tidak dapat digunakan untuk mendiagnosis TB, kecuali gambaran milier (WHO, 2016). Secara umum gambaran radiologis yang sugestif TB adalah sebagai berikut: Pembesaran kelenjar hilus atau paratrakeal dengan atau tanpa infiltrate, Konsolidasi segmental/lobar, Milier, Kalsifikasi dengan infiltrate, dan lain-lain.

Foto toraks tidak cukup hanya dibuat secara antero-posterior (AP), tetapi harus disertai dengan foto lateral, mengingat bahwa pembesaran KGB di daerah hilus biasanya lebih jelas pada foto lateral. Pada keadaan foto toraks tidak jelas, bila perlu dilakukan pemeriksaan pencitraan lain seperti CT Scan toraks. Gambaran abnormalitas parenkim, konsolidasi ditemukan pada 70% kasus, utamanya paru kanan. Anak-anak usia 0-3 tahun memiliki prevalensi limfadenopati hilus yang lebih tinggi. dan prevalensi kelainan parenkim yang lebih rendah dibandingkan anak yang lebih tua. (García-Basteiro et al., 2015).

### 2.9.3. Mikrobiologis

#### a. Sputum BTA

Diagnosis kerja TB biasanya dibuat berdasarkan gambaran klinis, uji tuberkulin dan gambaran radiologis paru diagnosis pasti ditegakkan bila ditemukan kuman TB pada pemeriksaan mikrobiologis. Pemeriksaan mikrobiologis yang dilakukan terdiri dari dua yaitu pemeriksaan mikrobiologis apusan langsung untuk menemukan BTA dan pemeriksaa biakan kuman MTB. Pemeriksaan ini sulit dilakukan pada anak karena sulitnya mendapatkan spesimen berupa sputum. Sebagai gantinya, dilakukan pemeriksaan bilas lambung 3 hari berturut-turut, minimal 2 hari (Aaby et al., 2011; Kemenkes RI, 2016; Rahajoe et al., 2018).

Hasil pemeriksaan mikroskopis langsung pada anak sebagian besar negatif, sedangkan hasil biakan MTB memerlukan waktu yang lama yaitu 1-3 minggu atau 6-8 minggu. Contoh sediaan Bactec, (Kemenkes RI, 2016).

#### b. Gen Expert

*GeneXpert* MTB/RIF merupakan pemeriksaan molekuler secara otomatis untuk mendeteksi *MTB* dan sekaligus mendeteksi resistensi *M. tuberculosis* terhadap rifampisin. Pemeriksaan ini menggunakan metode *heminested real-time polymerase chain reaction* (PCR) assay untuk mendeteksi mutasi pada regio *hot spot rpoB*, kemudian diperiksa dengan *beacon molecular* sebagai *probe*.<sup>1,11-13</sup> Pengujian dilakukan pada platform *GeneXpert* MTB/RIF, mengintegrasikan sampel yang akan diolah dalam *cartridge* plastic sekali pakai. *Cartridge* ini berisi semua reagen yang

diperlukan untuk dapat melisiskan bakteri, ekstraksi asam nukleat, amplifikasi, dan deteksi gen yang sudah diamplifikasi. Hasil pemeriksaan dapat diperoleh dalam waktu 2 jam. Pemeriksaan ini bersifat otomatis dan tidak perlu tenaga ahli khusus (Kemenkes RI, 2016).

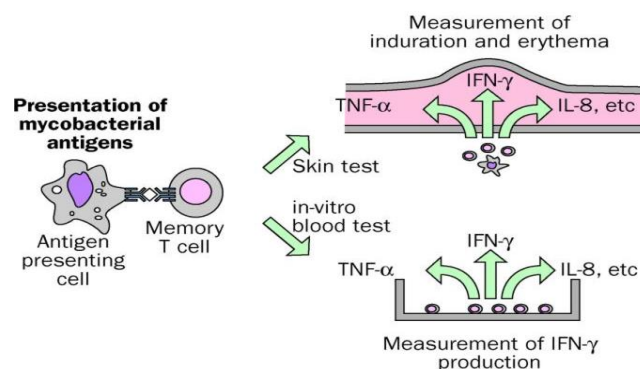
Kurniawan melakukan penelitian menilai kinerja tes sputum GeneXpert MTB / RIF untuk mendiagnosis tuberkulosis paru (TB) di antara pasien dahak basil asam-cepat (BTA) hasil smear negatif di Thailand, negara dengan prevalensi tinggi tuberkulosis paru-paru. Nilai sensitivitas 83,33%, spesifisitas 95,46%, nilai prediksi positif 93,75%, nilai prediksi negatif 87,5%, akurasi 90% dan nilai uji kappa 0,796. Akurasi pemeriksaan dengan metode RT-PCR GeneXpert yaitu 90% dengan tingkat kesesuaian atau konsistensi pemeriksaan antara metode RT-PCR GeneXpert dengan kultur Lowenstein Jensen (uji kappa) mendekati sempurna (excellent agreement) yaitu 0,796 (Kurniawan et al., 2016).

#### **2.9.4. IGRA ( *Interferon-Gamma Release Assays* )**

Interferon-gamma release assays (IGRAs) diperkenalkan untuk diagnosis tuberkulosis laten. IGRA adalah tes berbasis darah yang pada dasarnya mengukur keberadaan sel T reaktif M. tuberculosis spesifik yang disensitisasi oleh infeksi sebelumnya dengan MTB. Dua IGRA komersial tersedia, QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay (QFT-GIT) (Cellestis Ltd., Australia) dan T-SPOT-TB (Oxford Immunotec, UK). Dibandingkan dengan TST, IGRA tidak dipengaruhi oleh vaksinasi Bacille Calmette-Guérin (BCG) sebelumnya dan kecil kemungkinannya dipengaruhi oleh paparan

sebelumnya terhadap sebagian besar mikobakteri nontuberkulosis (NTM) karena antigen target yang dipilih untuk merangsang respons imun seluler (ECDC, 2011). Meskipun IGRA dan TST tidak dapat memprediksi perkembangan penyakit dengan baik, IGRA tidak kalah prediktif daripada TST dan mempunyai spesifisitas tinggi dan nilai prediktif negatif. Penelitian ini menunjukkan penggunaan IGRA baik untuk anak-anak yang tidak lahir di Amerika Serikat (Ahmed et al., 2020).

IGRA mengukur keberadaan respon imun adaptif terhadap antigen *Mycobacterium Tuberculosis* secara tidak langsung namun belum banyak bukti untuk menentukan apakah itu respon imun tersebut sesuai dengan infeksi yang sebenarnya. IGRA telah dikembangkan untuk identifikasi respon imun seseorang spesifik untuk *Mycobacterium Tuberculosis*, sehingga dianggap sebagai berkorelasi dengan infeksi TB, dan disarankan untuk digunakan pada spesimen darah.



**Gambar 2.6** Dasar Tuberkulin Test dan IGRA. Sumber: (Ravn, 2016)

*Tuberculin Skin Test (TST)* maupun *IGRA (interferon-gamma release assays)* memiliki mekanisme yang sama, yaitu stimulasi pelepasan sitokin oleh sel T setelah pemberian antigen tertentu. Sel T dari individu yang pernah tersensitisasi oleh antigen TB akan mensekresi sitokin (IFN-G) apabila dipaparkan kembali dengan antigen TB. Pada TST reaksi Immunologi terjadi *in vivo*, sedangkan pada IGRA reaksi immunologi terjadi *in vitro*. Selain itu perbedaan antara TST dan IGRA juga terletak pada antigen yang digunakan serta parameter yang diukur. Pada TST, digunakan PPD untuk menstimulasi sel T sedangkan pada IGRA digunakan antigen spesifik TB, seperti ESAT6, CFP10, TB7.7. dari segi parameter yang diukur pada TST diukur besarnya diameter indurasi kulit. Sedangkan pada IGRA diukur kadar IFNG yang disekresi oleh sel T (Gambar 2.6) (Ravn, 2016; Rutherford et al., 2012)

#### **2.9.5. Sistem Skoring**

Sistem ini dikembangkan diuji coba melalui tiga tahap penelitian oleh para ahli yang berasal dari IDAI, Kemenkes dan didukung oleh WHO dan disepakati sebagai salah satu cara untuk mempermudah penegakan diagnosis TB pada anak terutama di fasilitas kesehatan dasar. Sistem skoring ini membantu tenaga kesehatan agar tidak terlewat dalam mengumpulkan data klinis maupun pemeriksaan penunjang sederhana sehingga diharapkan dapat mengurangi terjadinya underdiagnosis maupun overdiagnosis TB (Kemenkes RI, 2016).

Tabel 2.5 Sistem Skoring Diagnosis Tuberkulosis

Parameter	0	1	2	3
Kontak TB	Tidak Jelas	-	Laporan Keluarga (BTA negatif atau tidak jelas)	BTA (+)
Uji Tuberkulin	Negatif	-	-	Positif ( $\geq 10\text{mm}/\geq 5\text{mm}$ pada keadaan immunosupresi)
Berat Badan / Keadaan Gizi	-	BB/TB < 90% atau BB/U < 80%	Klinis Gizi Buruk atau BB/TB < 70% atau BB/U < 60%	-
Demam yang Tidak Diketahui Penyebabnya	-	$\geq 2$ minggu	-	-
Batuk Kronik	-	$\geq 3$ Minggu	-	-
Pembesaran Kelenjar Limfe Kolli, Aksila, Inguinal	-	$\geq 1$ cm, jumlah > 1, tidak nyeri	-	-
Pembengkakan Tulang/Sendi Panggul, Lutut, Falang	-	Ada Pembengkakan	-	-
Foto Toraks	Normal/Kelainan Tidak Jelas	Gambaran Sugestif TB*	-	-

## Catatan:

Diagnosis tuberkulosis pada anak bergantung pada penilaian menyeluruh dengan nilai  $\geq 6$ , dan pasien diberikan terapi Obat Anti tuberkulosis. Meskipun kebanyakan anak dengan tuberkulosis memiliki keterlibatan paru

tanpa kavitas paru namun sering dengan keterlibatan kelenjar getah bening *intrathoracic*. Akibatnya, dibandingkan dengan orang dewasa, dahak paparan dari anak-anak lebih cenderung negatif.

## 2.10. Tatalaksana Tuberkulosis Anak

Penatalaksanaan penyakit TB hendaknya secara komprehensif, selain penatalaksanaan farmakoterapi dilaksanakan juga terapi non farmakologi. Obat TB utama (first line) saat ini adalah rifampisin (R), Isoniazid (H), Pirazinamid (Z), Etambutol (E) dan Streptomisin (S). Rifampisin dan isoniazid merupakan obat pilihan utama dan ditambah dengan pirazinamid, etambutol, dan streptomisin (Kemenkes RI, 2016; Rahajoe et al., 2018).

Tabel 2.6 Obat Antituberculosis yang biasa dipakai dan dosisnya

Nama Obat	Dosis harian (mg/kgBB perhari)	Dosis maksimal (mg/kgBB perhari)	Efek Samping
Isoniazid	5 – 15*	300	Hepatitis, neuritis perifer, hipersensitivitas
Rifampisin**	10 – 20	600	Gastrointestinal, reaksi kulit, hepatitis, trombositopenia, peningkatan enzim hati, cairan tubuh berwarna oranye kemerahan
Pirazinamid	15 – 30	2000	Toksisitas hati, artralgia, gastrointestinal
Etambutol	15 – 20	1250	Neuritis optic, ketajaman mata berkurang, buta warna merah-hijau, penyempitan lapang pandang hipersensitivitas, gastrointestinal
Streptomisin	15 – 40	1000	Ototoksik, nefrotoksik

Panduan obat TB Pengobatan TB dibagi menjadi dua fase, yaitu fase intensif (2 bulan pertama) dan sisanya sebagai fase lanjutan. Prinsip dasar pengobatan TB adalah minimal tiga macam obat pada fase intensif (2 bulan pertama) dan dilanjutkan dengan dua macam obat pada fase lanjutan (4 bulan atau lebih). Untuk kasus TB tertentu yaitu meningitis TB, TB milier, efusi pleura TB, perikarditis TB TB endobronkial, dan peritonitis TB, diberikan kortikosteroid (prednison) dengan dosis 1-2 mg/KgBB/hari, dibagi dalam 3 dosis, maksimal 60 mg dalam 1 hari. Lama pemberian kortikosteroid adalah 2-4 minggu dengan dosis penuh, dilanjutkan tapering off selama 1-2 minggu. Panduan OAT ini sebagai berikut: (Rahajoe et al., 2018)

#### **2.10. Vaksin Bacille Calmette-Guérin (BCG)**

Vaksin Bacille Calmette-Guérin adalah vaksin digunakan pertama pada manusia tahun 1921 di Prancis. Setelah vaksin didistribusikan ke berbagai laboratorium di seluruh dunia di mana subkultur BCG yang diulang lebih lanjut menyebabkan munculnya strain vaksin yang berbeda secara fenotipik, strain yang berbeda telah berevolusi disimpan di setiap negara sebagai lot benih untuk produksi vaksin masa depan. Beberapa strain vaksin BCG yang ada di dunia yaitu BCG Brazil, BCG Bulgaria, BCG Denmark, BCG Connaught, BCG Japan, BCG Pasteur, BCG Russia. BCG yang digunakan di Indonesia adalah buatan pabrik PT Bio Farma, asal strain BCG yang diturunkan dari Pasteur 1173, dibawah ini daftar negara dengan strain BCG vaksin yang digunakan (Ritz & Curtis, 2009; Trunz et al., 2006).



Vaksin BCG yang dilarutkan tidak mengandung bahan pengawet, semua vial multi-dosis yang dibuka harus dibuang di akhir sesi imunisasi, atau dalam waktu 6 jam, mana saja yang lebih dulu. Dosis standar vaksin BCG adalah 0,05 mL vaksin yang dilarutkan untuk bayi berusia kurang dari 1 tahun, dan 0,1 mL untuk mereka yang berusia satu tahun ke atas. Vaksin BCG harus diberikan melalui injeksi intradermal. Pemberian intradermal yang benar dapat diverifikasi dengan pembentukan scar.

Tabel 2.7 Macam-macam Strain Vaksin BCG dan Negara Pembuat (Ritz & Curtis, 2009).

Country	Manufacturer	Original BCG strain from which local strain derived
China	Chengdu biomanufacture Shanghai biomanufacture	D2PD302*
Guyana	No information available	No information available
India	BCG vaccine laboratory Guindy	BCG Madras
Indonesia	PT. Bio Farma	Pasteur 1173
Iran	Razi Institute	No information available
Poland	Lubelska Wytownia Surowici Szczepionek, Lublin	BCG Brazil
Republic of Korea	Korean Institute of Tuberculosis	BCG Pasteur 1173P2 <sup>†</sup>
Romania	Romanian National Institute for Research and Development in Microbiology and Immunology "Ion Cantacuzino"	Pasteur (192) obtained in 1925
Serbia	Torlak Institute	Pasteur 1173P2
Thailand	Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross	BCG Japan
Uzbekistan	Uzbiopharma	No information available
Vietnam	IVAC Institute Pasteur HCM City	No information available

\* Personal communication from Dr Liang Xiaofeng, Director National Immunisation Program China (no further information about the BCG vaccine strain available).

<sup>†</sup> Personal communication from Hyejon Lee, Chief of The International Cooperation Department, Korean Institute of Tuberculosis.

Vaksin BCG harus disuntikkan di area kulit yang bersih dan sehat. Vaksin sebaiknya diberikan pada aspek lateral lengan atas. Tidak ada data yang dipublikasikan tentang kemanjuran/efektivitas dan keamanan terkait lokasi suntikan lainnya. Status vaksinasi BCG di antara kasus TB harus dicatat, sebaiknya dengan informasi tentang produk/batch yang digunakan (Kemenkes RI, 2016; WHO, 2018).

Sejak publikasi genom *M. tuberculosis*, studi genomik komparatif telah mendokumentasikan bahwa strain vaksin BCG telah berevolusi dan berbeda satu sama lain dan dari BCG asli yang pertama kali digunakan pada tahun 1921. Karena perbedaan genetik ini mempengaruhi protein antigenik, perubahan ini dapat diterjemahkan ke dalam perbedaan kemanjuran dan efek pada tes kulit tuberkulin (TST). Ritz dan Curtis melihat variasi strain BCG global menunjukkan keragaman strain yang digunakan oleh negara yang berbeda dan bahkan dalam negara yang sama. Mereka menemukan bahwa 44% (83/188) negara melaporkan menggunakan lebih dari satu jenis strain BCG selama selang waktu hanya 5 tahun. Dokumentasikan praktik vaksinasi BCG untuk tujuan klinis dan penelitian (Ritz & Curtis, 2009). Lebih dari 14 formulasi vaksin BCG berlisensi berbeda yang terdiri dari turunan turunan berbeda dari *M. bovis* yang dilemahkan digunakan secara global dengan UNICEF sebagai pemasok terbesar. (Angelido A, 2020)

Vaksin dapat memiliki efek di luar target dan imunogenisitas vaksin dapat bervariasi secara substansial dengan faktor demografis seperti usia dan jenis kelamin. Vaksin BCG diproduksi di bawah kondisi yang berbeda di seluruh dunia menghasilkan formulasi yang berbeda. Studi epidemiologis telah mengaitkan imunisasi awal kehidupan dengan formulasi BCG tertentu dengan penurunan yang tidak terduga (~50%) pada semua penyebab kematian, terutama pada laki-laki dengan berat badan lahir rendah, jauh melebihi yang disebabkan oleh pencegahan TB. Kematian dikaitkan

dengan sepsis dan infeksi pernapasan yang menunjukkan bahwa BCG menginduksi perlindungan "heterolog" terhadap patogen yang tidak terkait. Mekanisme yang diusulkan untuk perlindungan heterolog termasuk pergeseran imunometabolik yang diinduksi vaksin, pemrograman ulang epigenetik populasi sel bawaan, dan modulasi progenitor sel induk hematopoietik yang menghasilkan respons yang berubah terhadap rangsangan berikutnya, sebuah fenomena yang disebut "kekebalan terlatih." Selain perbedaan genetik, formulasi BCG berlisensi sangat berbeda dalam kandungan kunci mikobakteri yang layak untuk aktivasi kekebalan bawaan, yang berpotensi berkontribusi pada perbedaan dalam kemampuan formulasi beragam ini untuk menginduksi perlindungan spesifik TB dan heterolog (Angelidou et al., 2020).

Penelitian double blind RCT pemberian booster vaksin BCG prime-MVA85A yang menginduksi Ag85 spesifik jauh lebih tinggi ekspresi sel T CD4 tidak dapat memberikan perlindungan tambahan (A. Roy et al., 2014).

BCG menghindari pematangan fagosom, autophagy, dan mengurangi ekspresi MHC-II dari antigen-presenting cells (APCs) yang mempengaruhi aktivasi sel-T. Suatu penelitian vaksin BCG baru dengan menambahkan Ag85B, BCG85C5 diberikan pada tikus yang tidak memiliki My88 dan TLR2, namun dengan penambahan tersebut menginduksi autophagy yang bergantung pada LC3 dalam makrofag yang meningkatkan presentasi antigen. Konsisten dengan efek in vitro, BCG85C5 secara nyata

memperluas sel T efektor dan memori pusat pada tikus C57Bl / 6 yang melindungi mereka dari infeksi aerosol primer dengan Mtb (Khan et al., 2019).

### **2.10.1. Efektifitas Vaksin BCG**

Vaksin BCG telah menjadi subyek berbagai uji coba kemanjuran dan studi epidemiologi yang dilakukan selama beberapa dekade. Uji coba ini menunjukkan bahwa BCG memiliki efikasi protektif 60-80% terhadap bentuk TB yang parah pada anak-anak, terutama meningitis dan khasiatnya terhadap penyakit paru bervariasi secara geografis (Rodrigues et al., 2011). Vaksin BCG kurang melindungi terhadap penyakit bila diberikan pada individu yang sudah terpapar mikobakteri lingkungan, sesuai lokasi geografisnya. Efek perlindungan vaksinasi BCG terhadap penyakit berasal dari tindakannya dalam mencegah perolehan infeksi atau terbatas pada pencegahan perkembangan dari infeksi ke penyakit klinis (Storgaard et al., 2015; Trunz et al., 2006; WHO, 2016).

Penelitian metanalisis oleh A Roy dkk dengan subyek anak yang divaksinasi dan tidak divaksinasi berusia di bawah 16 tahun dan terpapar pasien Tuberkulosis dengan menggunakan interferon  $\gamma$  sebagai indikator infeksi. Didapatkan 27 % anak yang divaksinasi terlindungi dari infeksi TB , anak yang terinfeksi TB 58% (23%-77%) terhindar dari sakit TB dan 71% (42%-85%) anak yang divaksin terlindungi dari sakit TB dibandingkan dengan anak-anak yang tidak divaksinasi (Kemenkes RI, 2014; A. Roy et

al., 2014). Penelitian RCT di UK melaporkan bahwa setelah divaksin maka lama melindungi dari infeksi TB hingga 10 tahun, dengan efektivitas sekitar 50% di Indian Amerika Utara, di Brazil dapat terlindungi 15 hingga 20 tahun setelah vaksin BCG saat baru lahir, dengan efektivitas 48%, utamanya di daerah yang jauh dari khatulistiwa (Rodrigues et al., 2011).

### **2.10.2. Scar BCG**

Vaksinasi BCG sering menyebabkan pembentukan bisul kecil dalam 2-6 minggu, yang akan membesar dan dapat terjadi ulkus yang akan tertutup krusta selama 2-4 bulan, kemudian menyembuh tanpa harus diobati dan menimbulkan jaringan parut berdiameter 4-8 mm yang biasa disebut scar BCG (Benn et al., 2020; Schaltz-Buchholzer et al., 2020). Pembentukan bekas luka di lokasi inokulasi diambil sebagai penanda imunogenisitas terhadap imunisasi BCG. Reaksi klasik digambarkan sebagai papula 2-3 minggu setelah imunisasi BCG, yang berkembang menjadi vesikel dan kemudian menjadi pustule. Pustula kemudian menjadi ulkus dan mengarah ke pembentukan scar, ukuran 5-7 mm dalam 6-12 minggu. Pada beberapa anak reaksi abortif bisa terjadi dimana papula / pustule lenyap tanpa pembentukan bekas luka (Kemenkes RI, 2014; WHO, 2020).

Beberapa studi kohort prospektif yang dilakukan pada bayi dengan berat > 2 kg dan berat normal yang divaksin sebagian besar pada usia 7 hari, kemudian berturut-turut diukur ukuran scar yang terbentuk pada usia 2, 6, and 12 bulan didapatkan terbentuk pada 91,4%-97% bayi, pada usia

8 minggu namun kebanyakan pada usia 12 minggu pasca vaksinasi dan gagal terbentuk bekas luka sebesar 2-8,6%. Vaksin yang digunakan adalah BCG -Denmark, Russia, Japan, dan campuran. Terdapat hubungan antara pembentukan bekas luka dengan kelangsungan hidup (Benn et al., 2020; Dhanawade et al., 2015; Schaltz-Buchholzer et al., 2020).

Terdapat korelasi yang signifikan antara ukuran bekas luka dan derajat positif tuberkulin (ukuran) TST. Ukuran bekas luka yang terbentuk antara 3 mm – 7 mm, kebanyakan 32-47% berukuran kecil, dan 25-35% ukuran besar 4.5 mm. Mortaliti risk ratio (MRR) (Dhanawade et al., 2015; Schaltz-Buchholzer et al., 2020).

Memiliki reaksi BCG dini pada usia 2 bulan berhubungan dengan penurunan substansial angka kematian 2-12 bulan. Semakin besar reaksi, semakin jelas efek menguntungkan pada kelangsungan hidup. Hubungan ini konsisten pada lima RCT dan tiga strain BCG dan perlindungan terutama terhadap kematian yang disebabkan oleh penyakit menular. Faktor penentu utama untuk membentuk reaksi BCG berhubungan dengan kualitas vaksinasi BCG dan strain BCG yang digunakan; BCG-Denmark dan BCG-Jepang dikaitkan dengan laju reaksi yang lebih tinggi dan ukuran reaksi yang lebih besar daripada BCG-Rusia. Pada usia 4 minggu, respons sitokin spesifik dan heterolog lebih menonjol pada bayi yang memiliki scar BCG, dan terlebih lagi pada mereka dengan scar yang besar (Schaltz-Buchholzer et al., 2020).

Penelitian telah menunjukkan bukti minimal atau tidak ada manfaat tambahan dari vaksinasi BCG berulang terhadap TB atau kusta. Oleh karena itu, vaksinasi ulang tidak dianjurkan bahkan jika reaksi TST atau hasil IGRA negatif. Tidak adanya bekas luka BCG setelah vaksinasi tidak menunjukkan kurangnya perlindungan dan bukan merupakan indikasi untuk vaksinasi ulang (WHO, 2016).

## **2.11. Respons Imunitas Alamiah terhadap Vaksinasi BCG**

### **2.11.1. Makrofag**

Setelah inokulasi intradermal *Bacille Calmette-Guérin* (BCG), makrofag epidermal berinteraksi dengan BCG melalui beberapa reseptor *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), termasuk reseptor komplemen 3 (CR3) dan RIG-I-like receptors (RLRs), Nod-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs), reseptor *Toll Like Receptors* (TLR) 2 dan 4 . Reseptor lain juga diekspresikan pada makrofag. Bagian lipid perifer dinding sel antara BCG dan *M. Tuberculosis* sangat mirip, diperkirakan kemampuannya untuk menginfeksi makrofag jaringan akan serupa. Namun, kontak pertama BCG terjadi dengan makrofag epidermal, sedangkan kontak *M. Tuberculosis* terjadi dengan makrofag alveolar (Kawasaki & Kawai, 2014; Moliva et al., 2017).

Proses yang terjadi adalah perbedaan mekanisme pengenalan Ag, pengambilan Ag, *Ag processing*, dan Ag antara dua jenis makrofag jaringan tetap tidak jelas. Efek opsonisasi serum selama vaksinasi BCG sering diabaikan, padahal proses ini dianggap penting dalam memulai respon

kekebalan terhadap vaksin BCG. Makrofag yang terinfeksi oleh faktor H opsonized BCG akan mensekresi sitokin pro-inflamasi sehingga meningkat, yang berpotensi menimbulkan respons akut (IL-6/TNF tinggi). Dengan demikian, faktorisasi opsonisasi BCG dapat merugikan sasaran utama vaksinasi BCG (untuk menghasilkan respon memori sel T yang kuat). Ini mungkin karena BCG yang opsonized terbunuh terlalu cepat, mengurangi jumlah waktu Ag untuk presentasi, dan dengan demikian berdampak negatif pada proliferasi sel T menuju ke lokasi infeksi (Moliva et al., 2017).

Stimulasi makrofag BCG *melalui* TLR2 atau TLR4 mendorong perbedaan respons pro-inflamasi, proliferasi sel T, dan sekresi IFN *secara in vitro* dan mengakibatkan perbedaan jumlah bakteri di paru-paru *in vivo*. Stimulasi Ag pada TLR2 yang berkepanjangan akan merendahkan ekspresi kompleks histokompatibilitas mayor (MHC) kelas II dan mempengaruhi pemrosesan silang MHC I -Ag, sehingga mengurangi presentasi Ag ke sel T. Seberapa jauh penekanan MHC I dan II melalui TLR2 yang akan berdampak negatif terhadap respon imun protektif yang dihasilkan oleh vaksinasi BCG dan atau terhadap infeksi *M. Tuberculosis* masih belum jelas (C. H. Liu et al., 2017; Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

Perbedaan dalam respon intraselular dan pengolahan Ag juga bisa menjelaskan kegagalan BCG untuk memberikan kekebalan jangka panjang. Faktanya, BCG, dan juga *M. Tuberculosis*, dapat menghambat pematangan fagosom dengan melibatkan reseptor spesifik, yaitu MR dan meskipun presentasi MHC Ag dan aktivasi sistem kekebalan adaptif tidak



terpengaruh, mungkin kurang optimal. Kekebalan yang disebabkan oleh vaksin BCG menghasilkan respons terhadap *M. Tuberculosis* pada fase awal infeksi yang secara langsung mempengaruhi fungsi makrofag. Interaksi reseptor antara makrofag dan bakteri sangat penting dalam memulai respons, dimana interaksi dengan reseptor makrofag yang berbeda dapat memodulasi jalur trafiking dan pemrosesan dan penyajian Ag secara berbeda (Moliva et al., 2017).

### **2.11.2. Sel Dendritik (DC)**

Sel dendritik diklasifikasikan sebagai salah satu APC yang paling kompeten dan secara klasik digambarkan sebagai modulator cross talk antara kekebalan bawaan dan adaptif. Perbedaan fenotip dan fungsional ada antara DC dan makrofag, DC bermigrasi dari jaringan melalui sistem limfatik dan memasuki kelenjar getah bening, di mana mereka mempresentasikan Ag ke sel T naif yang menginduksi respons sel T efektor saat DC bermigrasi, mereka menjadi matang dengan mengatur molekul-molekul costimulatory MHC II dan CD80, CD86, CD40, CD40, CD86, CDG, CD40, dan CD54, yang semuanya terlibat dalam aktivasi sel kekebalan adaptif. Beberapa reseptor fagositik pada DC mengenali BCG, termasuk CR3 (CD11b / CD18), CR4 (CD11c / CD18). Dari semua reseptor ini, DC-SIGN mungkin salah satu yang paling penting karena netralisasi DC-SIGN dengan antibodi (*Ab*) menghambat interaksi BCG dengan DC sebesar 80%. Reseptor TLR2 dan TLR4 juga terlibat dalam aktivasi DC dan pematangan

oleh interaksinya dengan komponen dinding sel BCG (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

Stimulasi DC manusia dengan BCG dapat meningkatkan ekspresi permukaan MHC-II, CD40, CD44, CD54, CD80, dan CD86, semua penanda yang terlibat dalam aktivasi DC, pematangan, migrasi, dan presentasi Ag ke sel T. DC yang terinfeksi BCG juga mensekresikan TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, dan IL-10, namun tidak IL-12. Jumlah IL-4 disekresikan cukup besar yang menunjukkan peralihan kekebalan dari respons Th1 terhadap respons Th2, yang berpotensi mempengaruhi khasiat BCG. Namun, IFN $\gamma$  terbukti berkorelasi buruk dengan perlindungan terhadap infeksi mikobakteri dan penyakit *MTB* (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

Beberapa kelompok telah meneliti pematangan DC untuk memperbaiki kekebalan BCG, dengan penelitian berpusat pada pemodelan TNF dan IL-10 yang mendominasi lapangan. TNF netralisasi menghambat inokulasi DC pasca-BCG yang menunjukkan peran penting TNF dalam kekebalan yang dihasilkan oleh BCG. Akibatnya, konsentrasi TNF yang cukup diperlukan untuk keaktifan presentasi Aging yang optimal. DC yang terinfeksi BCG juga mensekresikan IL-10 dalam jumlah banyak, tapi bukan IL-12. IL-12, bagaimanapun, sangat dinyatakan dalam IL-10 - / - tikus setelah inokulasi dengan BCG yang menunjukkan adanya keseimbangan penting antara IL-10 dan IL-12, yang dapat mengaktifkan/mempercepat pematangan DC dan melayani sebagai terapi pembawa terarah potensial. Sel utama respon innate/ bawaan adalah monosit, makrofag, neutrophil,

dan sel dendritic. Berbagai tipe reseptor yang ditunjukkan TLR, Toll-like receptors; RIG-I-like receptors (RLRs), Nod-like receptors (NLRs), C-type lectin receptors (CLRs), MR, mannose receptor; FcγR, Fcγ receptor; CR3, complement receptor (Kawasaki & Kawai, 2014; Moliva et al., 2017).

### **2.11.3. Neutrofil**

Neutrofil manusia berikulasi terdiri dari kira-kira 60% sel darah, memiliki waktu paruh pendek 6-10 jam, dan merupakan salah satu sel pertama yang merespons molekul asing. Neutrofil mengeluarkan sejumlah besar kemokin dan sitokin, priming fagosit berumur panjang. Bagaimana perubahan fenotipe neutrofil saat kontak dengan BCG dapat mempengaruhi pembangkitan kekebalan pelindung terhadap MTB masih belum jelas (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

Neutrofil mampu mengarahkan BCG hidup melalui sistem limfatik menjadi DLN dan memasuki sekitar sel DC dan T, komunikasi silang antara neutrophil dan DC yang terinfeksi BCG di lokasi ini memberikan sinyal pematangan ke DC yang belum menghasilkan dan juga membantu DC dalam presentasi BCG Ag ke sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> T.

Selain itu, BCG yang lebih lama tetap berada di dalam neutrofil meningkatkan probabilitas bakteri akan dibunuh oleh mekanisme intraseluler neutrofil, yang mungkin meningkatkan jalur yang terlibat dalam aktivasi kekebalan melalui presentasi Ag (Moliva et al., 2017).

Dengan demikian, neutrofil dapat berperilaku sebagai pedang bermata dua; di satu sisi, mereka tampaknya memfasilitasi presentasi Ag

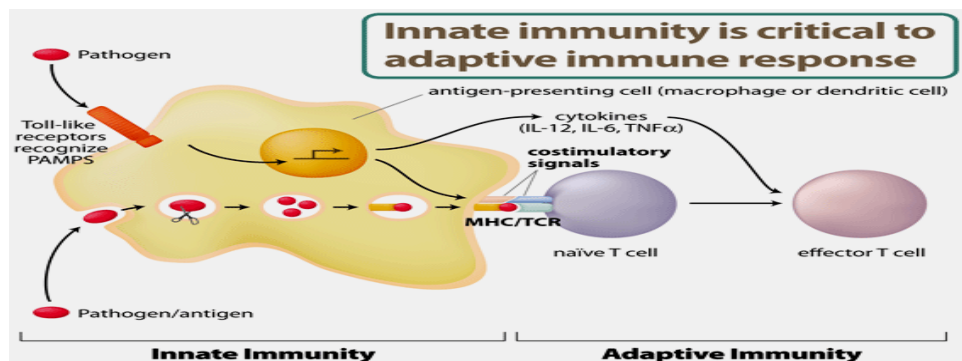
dengan membolak basil hidup ke sekitar DC, namun di sisi lain, mereka mungkin bertanggung jawab untuk mencegah pengembangan imunitas jangka panjang. Keseimbangan antara kelangsungan hidup intraselular BCG dan / atau pencernaan, pengolahan, dan penyajian oleh neutrofil dapat mempengaruhi pematangan DC, respons imun adaptif berikutnya (membatasi ekspansi kloner limfosit efektor Ag spesifik), dan pembentukan negara jangka panjang dari kekebalan (Mayer-Barber & Barber, 2015).

Sebaliknya, neutrofil juga dapat mengarahkan aktivasi sel T ke kelenjar getah bening, dan dengan demikian berpartisipasi dalam respons imun adaptif. Studi terbaru tentang BCG menunjukkan bahwa neutrofil mengatur peradangan melalui sekresi IL-10, yang mengganggu kontrol pertumbuhan MTB selama infeksi kronis. Neutrofil memasuki jaringan lebih cepat dibandingkan sel inang lainnya, mereka bisa menjadi mediator penting dalam pembersihan atau persistensi mikobakteri. Secara keseluruhan, neutrofil dapat memiliki berbagai efek dalam konteks vaksinasi BCG. Di satu sisi, mereka dapat membantu memfasilitasi respons imun adaptif dengan membantu penyajian Ag dan menularkan bakteri hidup ke sekitar APC profesional, namun di sisi lain, kehadiran dan kecenderungan mereka untuk menginduksi respons inflamasi yang kuat dapat merusak jaringan di mana mereka berada (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

## **2.12. Respon Imun Adaptif**

### **2.12.1. T Limfosit**

Respon sel T muncul secara paralel melalui keterlibatan reseptor T dengan Ag asing yang dipresentasikan oleh sel *Ag-presenting*. Dengan sedikit pengecualian, semua vaksin merangsang proliferasi sel CD4<sup>+</sup> helper T (T<sub>h</sub>) dan CD8<sup>+</sup> sel T sitotoksik (T<sub>c</sub>). Dalam konteks kekebalan BCG, sel T pembantu terutama berdiferensiasi menjadi dua kelas sel efektor yang berbeda selama respon imun terhadap vaksinasi: Sel Th1 yang diidentifikasi oleh produksi sel IFN $\gamma$ , dan Th17 yang diidentifikasi oleh produksi IL-17A, meskipun IL-4 menghasilkan sel T<sub>h</sub> 2 juga dapat dihasilkan. Subset sel lainnya seperti sel T regulatory cell (T<sub>reg</sub>) dan CD1-restricted T juga muncul setelah vaksinasi BCG, walaupun pada tingkat yang lebih rendah. BCG juga menginduksi sel T sitotoksik, yang fungsinya berfungsi untuk melindungi sel yang terinfeksi melalui gangguan osmotik (Mayer-Barber & Barber, 2015).



**Gambar 2.7** Peran TLR pada Imunitas bawaan

Keterangan: Pada imunitas alami, patogen dikenali TLR, menimbulkan signaling dalam sel dan mempengaruhi ekspresi sitokin. Patogen juga dapat diekspresikan makrofag dalam MHC dan menimbulkan imunitas adaptif.

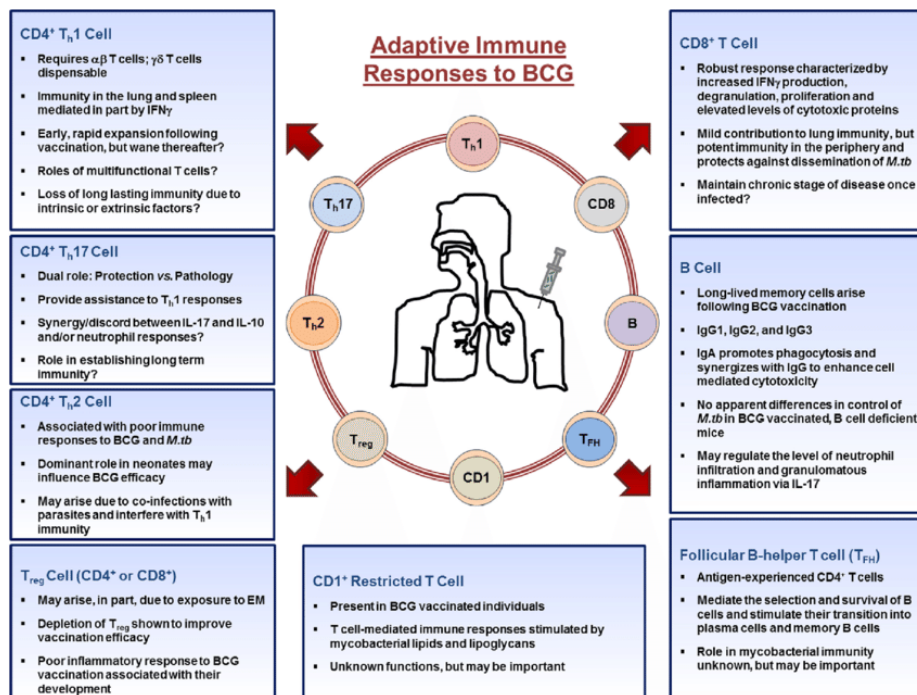
### 2.12.2. Sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>

Penelitian pada tikus yang menunjukkan reseptor sel T  $\alpha / \beta$  yang ditunjukkan oleh sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> T dan, MHC I dan II diperlukan untuk mengendalikan infeksi mikobakteri, yang menyoroti respons sel T yang dominan terhadap BCG. Kekebalan sel T mediator protektif dihasilkan oleh BCG. Pengalihan sel CD4<sup>+</sup> atau CD8<sup>+</sup> T dari tikus yang divaksinasi BCG ke dalam tikus model *in vivo* yang kekurangan sel B dan T, menunjukkan bahwa sel CD4<sup>+</sup> T diperlukan untuk mengurangi beban bakteri di paru-paru dan limpa, sedangkan sel CD8<sup>+</sup> T mengendalikan beban bakteri hanya di limpa. Hasil ini melibatkan sel CD4<sup>+</sup> T sebagai sel efektor utama yang dihasilkan oleh BCG di paru-paru, dan juga menunjukkan pentingnya sel CD8<sup>+</sup> T dalam mencegah diseminasi, yang berpotensi menjadikannya sel efektor utama yang bertanggung jawab untuk mencegah TB milier dan meningitis TB (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

Data ini menunjukkan bahwa BCG dapat merangsang sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> T yang protektif dan juga menyarankan agar sel CD4<sup>+</sup> tidak seefisien sel CD8<sup>+</sup> sel T ketika harus membersihkan infeksi mikobakteri spesifik jaringan, atau patogen itu sendiri karena MTB memiliki banyak faktor virulensi yang tidak ada pada BCG yang dapat digunakan untuk menghambat CD4<sup>+</sup>, namun bukan tanggapan sel T CD8<sup>+</sup> (Moliva et al., 2017).

Salah satu mekanisme lain adalah kemampuan sel CD8<sup>+</sup> T untuk menginduksi apoptosis sel *melalui* jalur FasL-Fas, dimana sel CD8<sup>+</sup> T melumasi sel target yang mengekspresikan Fas. Dengan menginduksi

apoptosis sel yang terinfeksi, sel kekebalan bawaan sehat lainnya dapat melakukan fagositosis pada tubuh apoptosis yang dihasilkan dan selanjutnya merangsang sel dari sistem kekebalan adaptif. Kemampuan CD8+ T untuk menginduksi jalur FasL-Fas di dalam limpa atau hati, sedangkan apoptosis sel di paru sangat terbatas untuk mencegah kerusakan jaringan yang berlebihan dapat menyebabkan kegagalan paru (Mayer-Barber & Barber, 2015; Moliva et al., 2017).

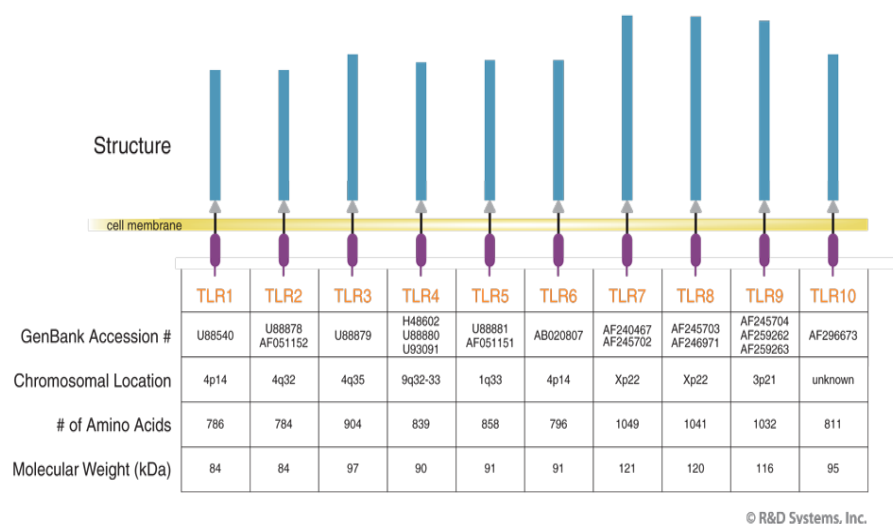


**Gambar 2.8** Respon sel imun adaptif terhadap vaksinasi BCG

### 2.13. Toll Like Receptor (TLR)

Mamalia memiliki beberapa kelas PRR yang berbeda ada 10 TLR, 23 Node Like Receptors (NLR) , dan 3 RLR telah diidentifikasi pada manusia hingga saat ini, dengan hanya sebagian dari anggota keluarga

NLR (NOD1, NOD2, NALP1, NALP3, IPAF) dan rig like receptors (RLR) RLR (RIG-1, MDA5). Reseptor lain seperti AIM2 (ALR), reseptor lektin tipe-C (CLR), dan sensor DNA intraseluler seperti cGAS. TLR adalah yang pertama diidentifikasi, terdiri dari 10 anggota (TLR1–TLR10) pada manusia dan 12 (TLR1–TLR9, TLR11–TLR13) pada tikus. TLR sebagian besar diklasifikasikan menjadi dua subfamili berdasarkan lokalisasinya, TLR permukaan sel dan TLR intraseluler. TLR permukaan sel termasuk TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, dan TLR10, sedangkan TLR intraseluler terlokalisasi di endosom dan termasuk TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12, dan TLR13 diekspresikan dalam membran sel. kompartemen endolisosomal dan mengenali asam nukleat asing (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016; R&D Systems, 2021).



### Gambar 2.9 Struktur protein Toll-like reseptor (TLR)

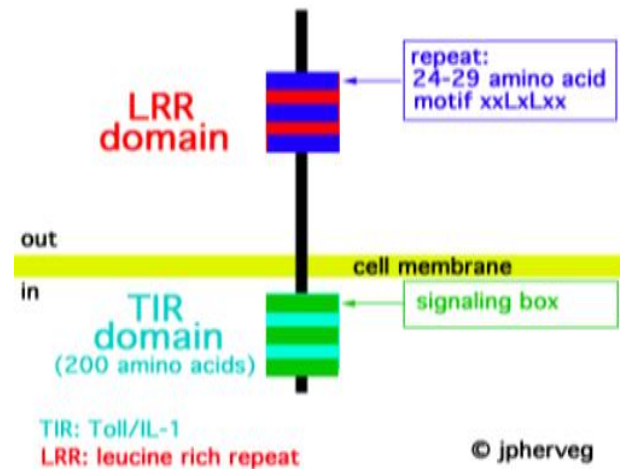
Keretangan: Semua TLR adalah protein transmembran Tipe I yang memiliki sejumlah variabel N-terminal leucine rich repeats (LRRs) diikuti oleh domain kaya sistein, domain transmembran (TM), dan domain reseptor Toll/IL-1 (TIR) intraseluler. Variasi jumlah asam amino dan berat molekul dari TLR



yang berbeda paling signifikan disumbangkan oleh perbedaan jumlah LRR. Nomor Akses Bank Gen dan lokasi kromosom untuk masing-masing TLR juga diberikan (R&D Systems, 2021).

Semua TLR disintesis di RE, lalu lintas ke Golgi, dan direkrut ke permukaan sel atau ke kompartemen intraseluler seperti endosom. Lokalisasi intraseluler TLR dianggap penting untuk pengenalan ligan serta untuk mencegah TLR bersentuhan dengan asam nukleat sendiri, yang dapat menyebabkan autoimunitas. Struktur TLR dan variasi jumlah asam amino menentukan jenisnya. (Gambar 2.5)

TLR melokalisasi ke permukaan sel atau ke kompartemen intraseluler seperti ER, endosom, lisosom, atau endolisosom, dan mereka mengenali PAMP yang berbeda atau tumpang tindih seperti lipid, lipoprotein, protein, dan asam nukleat. Setiap TLR terdiri dari ektodomain dengan Leusin rich repeat (LRR) yang memediasi pengenalan PAMP, domain transmembran, dan domain reseptor Toll/IL-1 sitoplasma (TIR) yang memulai pensinyalan hilir. Ektodomain menampilkan struktur seperti tapal kuda, dan TLR berinteraksi dengan PAMP atau DAMP masing-masing sebagai homo atau heterodimer bersama dengan ko-reseptor atau molekul aksesori (Gambar 2.6) (Akira et al., 2000; R&D Systems, 2021).



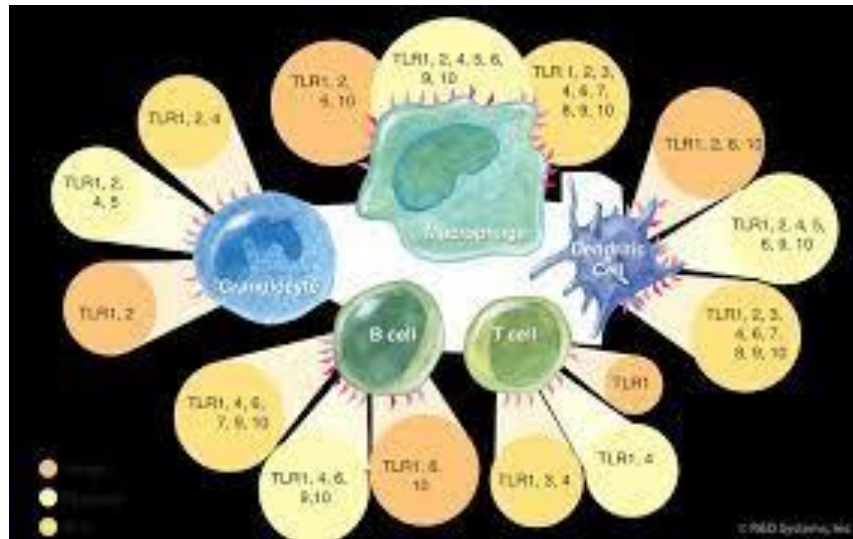
**Gambar 2.10** Struktur molekul TLR

Keterangan: Struktur molekul TLR terdiri dari region ekstraseluler (LRR) yang kaya leucine terdiri 24-29 asam amino dan region intraseluler yang disebut TIR terdiri 200 asam amino (Akira et al., 2000).

Molekul yang mengandung PAMP akan bertindak sebagai ligan untuk memicu jalur pensinyalan intraseluler yang bergantung pada PRR yang pada akhirnya menginduksi ekspresi sitokin pro-inflamasi dan antivirus.

Sekresi sitokin ini di tempat infeksi mendorong perekrutan neutrofil dan sel pembunuh alami (NK), yang menghilangkan mikroba patogen dan sel yang terinfeksi. Reseptor seperti tol (TLR) adalah keluarga reseptor pengenalan pola transmembran tipe I (PRR) yang diekspresikan oleh sejumlah tipe sel imun dan non-imun yang berbeda termasuk monosit, makrofag, sel dendritik, neutrofil, sel B, sel T dan sel non imun seperti keratinosit, fibroblas, sel endotel, dan sel epitel. (Gambar 2.6) TLR mengenali pola molekuler terkait patogen (patogen-associated molecular pattern/PAMPs) yang dilestarikan dalam bakteri, jamur, protozoa, atau protein virus, asam nukleat, lipid, atau karbohidrat dan memulai respons

imun bawaan dan adaptif (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; R&D Systems, 2021).



**Gambar 2.11** Toll-like receptor (TLR) pola ekspresi leukosit dan kekhususan PAMP

Keterangan: Setiap TLR diekspresikan pada subset leukosit yang berbeda dan masing-masing TLR mendeteksi subset patogen yang berbeda Mini Review Toll Like Receptors (R&D Systems, 2021).

### 2.13.1. Spesifik Ligan TLR

TLR permukaan sel terutama mengenali komponen membran mikroba seperti lipid, lipoprotein, dan protein. (Tabel 2.1) TLR3 mengenali RNA untai ganda virus (dsRNA), dan RNA diri yang berasal dari sel yang rusak. TLR4 mengenali lipopolisakarida bakteri (LPS). TLR5 dan flagellin, TLR2 bersama dengan TLR1 atau TLR6 mengenali berbagai macam PAMP termasuk lipoprotein, peptidoglikan, asam lipoteichoic, zymosan, mannan, dan tGPI-musin. TLR5 mengenali flagelin bakteri. TLR7 sebagian besar diekspresikan dalam plasmacytoid DCs (pDCs) dan mengenali RNA rantai tunggal (ss) dari virus. Ia juga mengenali RNA dari bakteri streptokokus B

di DC konvensional (cDC). TLR8 manusia merespons RNA virus dan bakteri. TLR9 dan asam nukleat tertentu. TLR13 mengenali bakteri 23S rRNA dan komponen yang tidak diketahui dari virus stomatitis vesikular. TLR9 mengenali DNA bakteri dan virus yang kaya akan motif CpG-DNA yang tidak termetilasi; ia juga mengenali hemozoin, produk sampingan kristal yang tidak larut yang dihasilkan oleh *Plasmodium falciparum* selama proses detoksifikasi setelah hemoglobin inang dicerna. TLR10 adalah pseudogen pada tikus karena penyisipan kodon stop, tetapi TLR10 manusia bekerja sama dengan TLR2 untuk mengenali ligan dari listeria, TLR10 juga dapat merasakan infeksi virus influenza A. TLR11 terlokalisasi dalam endolisosom dan mengenali flagelin, atau komponen protein yang tidak diketahui dari uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) serta molekul mirip profilin yang diturunkan dari *Toxoplasma gondii*. TLR12 sebagian besar diekspresikan dalam sel myeloid dan sangat mirip dengan TLR11 dan mengenali profilin dari *T. gondii*. TLR12 berfungsi baik sebagai homodimer atau heterodimer dengan TLR11. Protein transmembran multi-pass UNC93B1 mengontrol perdagangan TLR intraseluler dari ER ke endosom. mengatur aktivasi TLR7 yang berlebihan dengan menggunakan TLR9 untuk melawan TLR7. Dengan demikian, mengoptimalkan keseimbangan antara TLR7 dan TLR9 adalah mekanisme potensial untuk mengatur autoimunitas (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

Tabel 2.8 PRRs, Lokalisasi dan Ligandnya (Yumoto et al., 2018)

PRRs	Localization	Ligand	Origin of the ligand	
TLR	TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
	TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein HMGB1	Bacteria, viruses, parasites, self (DAMPs)
	TLR3	Endolysosome	dsRNA, PolyI:C	Virus
	TLR4	Plasma membrane	LPS, Lipid A HMGB1	Bacteria, viruses, self (DAMPs)
	TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
	TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
	TLR7/8	Endolysosome	ssRNA, imiquimod, imidazoquinoline, loxoribine, R-848	Bacteria, viruses, self (DAMPs)
	TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Bacteria, virus, protozoa, self (DAMPs)
	TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
	TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
	NLR	NOD1	Cytoplasm	iE-DAP
NOD2		Cytoplasm	MDP	Bacteria
NLRC3				
NLRC4		Cytoplasm	Flagellin	
NLRC5		Cytoplasm		
CLR	Dectin-1	Plasma membrane	$\beta$ -Glucan	Fungi
	Dectin-2	Plasma membrane	$\alpha$ -Mannan	Fungi
	MINCLE	Plasma membrane	TDM, SAP130	Fungi, self (DAMPs)
RLR	RIG-I	Cytoplasm	Short dsRNA, 5' triphosphate dsRNA	RNA, Viruses, DNA virus
	MDA5	Cytoplasm	Long dsRNA	RNA viruses
	LGP2	Cytoplasm	Unknown	RNA viruses
NLRP	NLRP1-14 NLRP3	Cytoplasm	Silica, asbestos, ATP, uric acid, beta-amyloid, cholesterol crystal	

### 2.13.2. Kaskade Sinyal TLR

Setelah pengenalan PAMP dan DAMP, TLR di permukaan sel atau di intraseluler akan merekrut protein adaptor yang mengandung domain TIR untuk memulai jalur transduksi sinyal yang berujung pada ekspresi sitokin, kemokin, pro-inflamasi yang bergantung pada NF-kappa B dan AP-1, dan ekspresi interferon tipe I dan tipe III yang bergantung pada IRF3-/IRF7 pada akhirnya melindungi inang dari infeksi mikroba. Aktifasi TLR yang terikat ligannya diatur oleh molekul regulator TLR (MD2 dan CD14) dilanjutkan

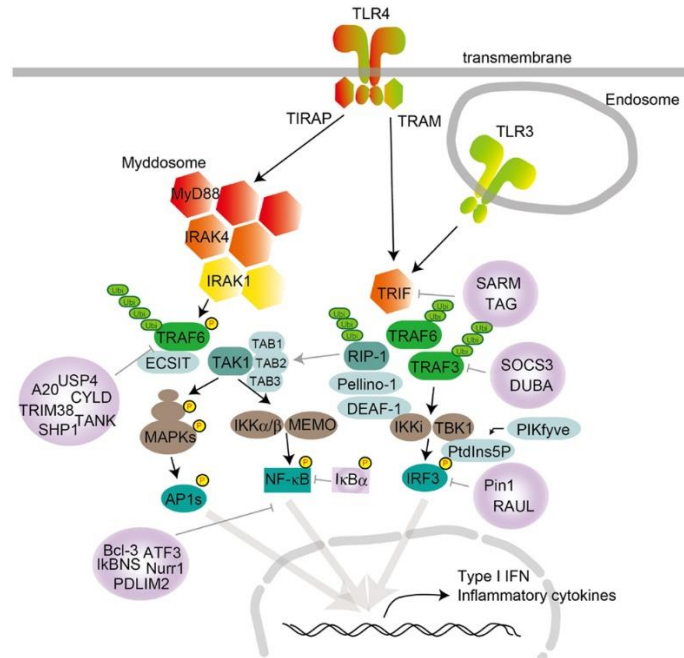
dengan molekul sinyal TLR, sebagai molekul adaptor hingga terjadi kaskade pensinyalan dan berlanjut transkripsi sinyal.

#### **2.13.2.1. Pensinyalan TLR Permukaan Sel**

Jalur pensinyalan di hilir diaktifkan dengan pembentukan kompleks misalnya kompleks TLR4-MD2-LPS yang akan menginisiasi transduksi kaskade sinyal mulai dengan merekrut molekul adaptor intraseluler yang berikatan dengan domain TIR. (Gambar 2.8) Ada 5 molekul adaptor seperti faktor diferensiasi Myeloid 88 (MyD88), protein adaptor inducing interferon (TRIF) terkait TIR, adaptor terkait TRIF molekul (TRAM), domain TIR yang mengandung protein adaptor (TIRAP) atau adaptor seperti MyD88 (MAL), dan Protein yang mengandung motif alfa dan Armadillo (SARM) (Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

MyD88 digunakan oleh semua TLR dan mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan MAPK untuk menginduksi gen sitokin inflamasi. TIRAP adalah adaptor yang merekrut MyD88 ke TLR permukaan seperti TLR2 dan TLR4. Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa TIRAP juga berpartisipasi dalam pensinyalan melalui TLR endosom seperti TLR9. Domain pengikat lipid TIRAP mengikat PI, P2 pada membran plasma dan PIP pada endosom, yang memediasi pembentukan kompleks pensinyalan TLR4 dan TLR9 fungsional di lokasi masing-masing. Dengan demikian, TIRAP berasosiasi dengan permukaan sel dan TLR endosom dengan mengikat lipid yang berbeda. Secara umum terkait penggunaan adaptor, pensinyalan TLR sebagian besar dibagi menjadi dua jalur: jalur yang bergantung pada

MyD88 dan jalur yang bergantung pada TRIF, baik TLR permukaan sel maupun TLR intrasel (Kawasaki & Kawai, 2014):



**Gambar 2.12** Pensinyalan TLR permukaan sel dalam cDC, makrofag, dan MEF transmembran

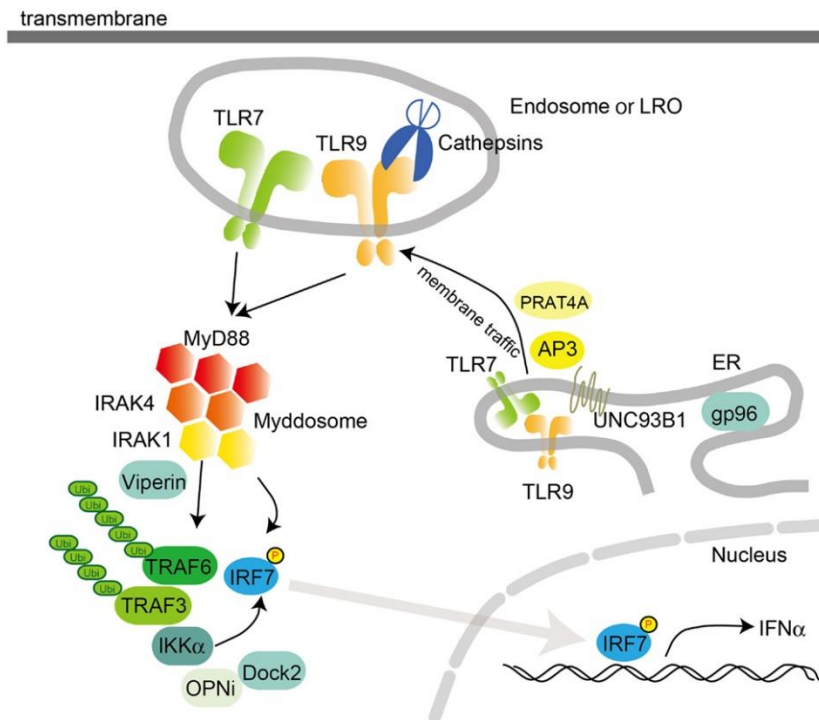
Keterangan: TLR4 melokalisasi ke permukaan sel, dan TLR3 melokalisasi di kompartemen endosom. Pembentukan homo atau heterodimer memulai pensinyalan ke dua protein adaptor hilir utama, MyD88 dan TRIF. TIRAP menghantarkan sinyal dari TLR4 ke MyD88, dan TRAM memediasi sinyal dari TLR4 ke TRIF. Keterlibatan TLR menginduksi pembentukan Myddosome, yang didasarkan pada MyD88 dan juga mengandung IRAK1 dan IRAK4. Aktivasi IRAK1 menginduksi aktivasi TRAF6 setelah poliubiquitinasi terkait K63 pada TRAF6 itu sendiri dan TAK1. Aktivasi TAK1 mengarah pada aktivasi kompleks IKK-NF- $\kappa$ B dan MAPK. Aktivasi MAPK mengarah ke aktivasi faktor transkripsi AP1s. TRAF6 mempromosikan ubiquitinasi ECSIT, menghasilkan peningkatan generasi ROS mitokondria dan seluler. Keterlibatan TLR juga menginduksi aktivasi TRIF setelah perekrutan TRAF6 dan TRAF3. TRAF6 merekrut RIP-1, yang mengaktifkan kompleks TAK1 setelah aktivasi MAPK. Aktivasi RIP-1 mengatur ubiquitinasi oleh Pellino-1. Pellino-1 mengatur aktivasi IRF3 dengan mengikat DEAF-1. TRAF3 merekrut TBK1 dan IKKi untuk fosforilasi IRF3. PtdIns5P dari PIKfyve memfasilitasi pembentukan kompleks antara TBK1 dan IRF3. Beberapa regulator negatif memodulasi pensinyalan TLR, dengan menghambat pembentukan kompleks pensinyalan atau ubiquitinasi. MyD88 ditekan oleh ST2825, NRDP-1, SOCS1, dan Cbl-b; TRIF ditekan oleh SARM dan TAG; TRAF3 ditekan oleh SOCS3 dan DUBA;

dan TRAF6 ditekan oleh A20, USP4, CYLD, TANK, TRIM38, dan SHP. NF- $\kappa$ B ditekan oleh Bcl-3, I $\kappa$ BNS, Nurr1, ATF3, dan PDLIM2, sedangkan aktivasi IRF3 diatur secara negatif oleh Pin1 dan RAUL.

#### **2.13.2.2. Pensinyalan TLR Intrasel**

Plasmacytoid DC (pDC) adalah subset dari DC dengan kapasitas untuk mensekresi IFN tipe I dalam jumlah besar sebagai respons terhadap infeksi virus (Gambar 2.5) Dalam pDC, TLR7 dan TLR9 masing-masing berfungsi sebagai sensor utama untuk virus RNA dan DNA. Produksi IFN tipe I oleh pDC bergantung pada kompleks yang mengandung MyD88 dan IRF7. Kompleks ini juga berisi TRAF3, TRAF6, IRAK4, IRAK1, IKK $\alpha$ , OPN $\beta$ , dan Dock2. Di dalam kompleks ini, IRF7 difosforilasi oleh IRAK1 dan/atau IKK $\alpha$  dan ditranslokasikan ke dalam nukleus untuk mengatur ekspresi IFN tipe I. Selain itu, kompleks MyD88-IRAK4-TRAF6 mendorong induksi sitokin inflamasi yang bergantung pada NF- $\kappa$ B. Sinyal TLR9 melalui kompartemen seluler berbeda yang menginduksi baik MyD88-IRF7-dependent type I IFN atau MyD88-NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory cytokines. AP3 telah terbukti mengikat TLR9 dan mengontrol perpindahan TLR9 ke LRO, dan diperlukan untuk induksi IFN tipe I. Kompartemen intraseluler yang memulai induksi IFN tipe I oleh IC DNA-antibodi diatur oleh jalur autophagy (Kawasaki & Kawai, 2014).





**Gambar 2.13** Pensinyalan TLR intraseluler dan perpindahan pDC

Keterangan: Aktivasi TLR7 atau TLR9 di pDC merekrut MyD88 setelah perekrutan IRAK4. Kompleks MyD88 juga berisi TRAF3, TRAF6, IRAK4, IRAK1, IKK $\alpha$ , OPNi, dan Dock2. MyD88 secara langsung atau tidak langsung merekrut IRF7 untuk difosforilasi oleh IKK $\alpha$  dan/atau IRAK1. Lokalisasi TLR7 dan 9 dikendalikan oleh UNC93B1, PRAT4A, dan AP3, perpindahan TLR dari ER ke endosom atau organel terkait lisosom (LRO). Dalam endosom, TLR diubah menjadi bentuk matangnya oleh cathepsin, yang membelah LRR di ektodomain. pDC menggunakan jalur pensinyalan yang berbeda dari yang ada di cDC atau makrofag untuk menginduksi sintesis sejumlah besar IFN tipe I. gp96 bagian dari heat shock protein 90 family berfungsi secara umum

### 2.13.3. Jenis-Jenis TLR

#### 2.13.3.1. Toll Like Receptor (TLR)1

TLR1 memetakan ke kromosom 4p14 dan urutannya mengkodekan protein asam amino (aa) 786 diduga dengan 18 N-terminal LRR dan berat molekul terhitung 84 kDa. TLR1 paling dekat hubungannya dengan TLR6 dan TLR10 dengan 68% dan 48% keseluruhan identitas urutan aa, masing-masing. (Gambar 2.5) (R&D Systems, 2021)

In vivo, dua transkrip berukuran berbeda untuk TLR1 diamati menunjukkan bahwa mRNA secara alternatif disambung untuk menghasilkan dua bentuk protein yang berbeda. TLR1 mRNA diekspresikan di mana-mana dan ditemukan pada tingkat yang lebih tinggi daripada TLR lainnya. Dari populasi leukosit utama, TLR1 paling banyak diekspresikan oleh monosit, tetapi juga diekspresikan oleh makrofag, sel dendritik (DC), leukosit polimorfonuklear, B, T, dan sel NK (Gambar 2.6). Ex vivo, ekspresi TLR1 monosit dan granulosit diturunkan regulasinya setelah terpapar bakteri Gram-negatif (R&D Systems, 2021).

TLR1 membentuk heterodimer dengan TLR2 (seperti yang lain TLR, lihat di bawah). Sementara signifikansi heterodimerisasi TLR tidak dipahami dengan jelas, diperkirakan bahwa beberapa TLR, seperti TLR1, berfungsi untuk menentukan atau meningkatkan sensitivitas PAMP dari TLR2. Namun, ada bukti bahwa TLR2 mungkin tidak memberi sinyal sebagai homodimer dan bahwa TLR1 dalam hal ini diperlukan untuk fungsionalitas hilir. TLR1 juga mengalami heterodimerisasi dengan TLR4, bukan untuk meningkatkan fungsinya, melainkan untuk menghambat aktivitas TLR4 (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014).

#### **2.13.3.2. Toll Like Receptor (TLR)6**

TLR6 memetakan ke kromosom 4p14.12 Urutan TLR6 mengkodekan protein 796 aa yang mengandung 20 motif LRR terminal-N dengan berat molekul terhitung 91 kDa . TLR6 paling dekat hubungannya dengan TLR1,

TLR10, dan TLR2 dengan 68%, 46%, dan 31% keseluruhan identitas urutan aa, masing-masing (Gambar 2.5) (R&D Systems, 2021).

In vivo, transkrip TLR6 diamati di timus, limpa, dan paru-paru. Ekspresi mRNA TLR6 paling tinggi pada sel B dan monosit. (Gambar 2.6) Ex vivo, monosit dan, khususnya, ekspresi TLR6 granulosit diturunkan regulasinya saat terpapar bakteri Gram-negatif (R&D Systems, 2021). TLR6 membentuk heterodimer dengan TLR2. Seperti TLR1, TLR6 diperkirakan menentukan atau meningkatkan sensitivitas PAMP dari TLR2 dan berkontribusi pada kemampuan pensinyalannya melalui heterodimerisasi (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

### **2.13.3.3. Toll Like Receptor (TLR)2**

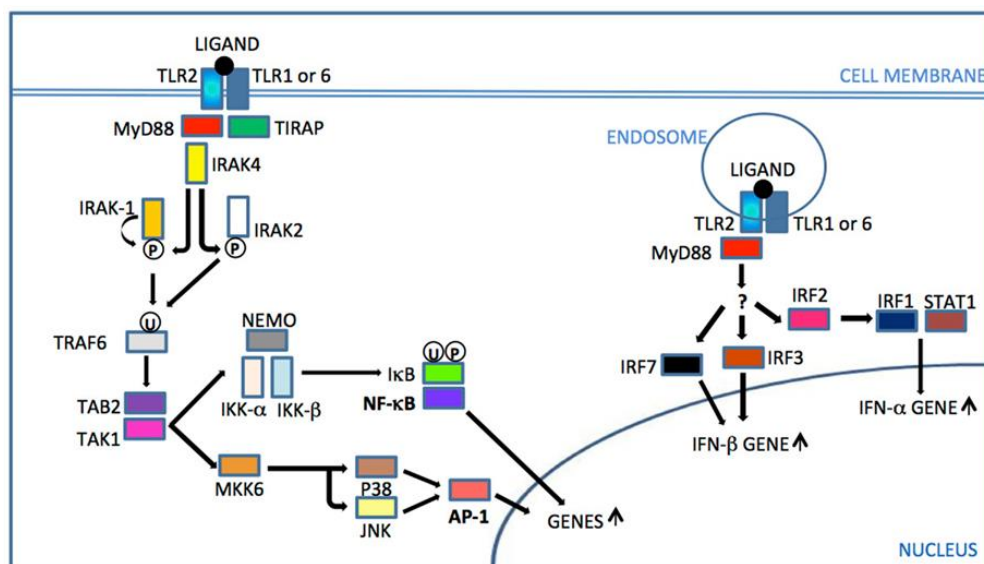
TLR2 memetakan ke kromosom 4q31-32 dan mengkodekan protein 784 aa diduga dengan 19 LLR terminal-N dan berat molekul terhitung 84kDa. TLR2 paling dekat hubungannya dengan TLR6 dengan 31% keseluruhan identitas urutan aa (Gambar 2.5). In vivo, dua transkrip berukuran berbeda untuk TLR2 diamati menunjukkan bahwa mRNA disambung secara alternatif. Ekspresi mRNA TLR2 diamati di jaringan otak, jantung, paru-paru, dan limpa dan tertinggi pada PBL, khususnya yang berasal dari myelomonocytic. Ex vivo, peningkatan ekspresi TLR2 dalam monosit dan granulosit pada paparan bakteri Gram-negatif hanya sangat sedikit. (Gambar 2.6) (R&D Systems, 2021)

TLR2 membentuk heterodimer dengan koreseptornya, yang meningkatkan keragaman molekul yang dikenali oleh reseptor. Kompleks ligan baru baru saja diusulkan untuk aktivasi oleh ligan diasilgliserol, termasuk lipopeptida: CD36 dapat mengikat ligan dan mentransfernya ke molekul aksesori CD14, yang, pada gilirannya, memuat ligan ke heterodimer TLR2/TLR6 (FSL-1, MALP-2, dan LTA) atau pada heterodimer TLR2/TLR1 (lipomannan) Ektodomain CD14 dan CD36 adalah bagian reseptor aktif untuk pengiriman ligan peran molekul ini adalah untuk meningkatkan respons, menurunkan ambang batas konsentrasi diperlukan untuk pengenalan dan pensinyalan reseptor (de Oliviera Nascimento et al., 2012).

TLR2 membentuk heterodimer dengan TLR1, TLR6, dan mungkin TLR10, di mana setiap kompleks sangat sensitif terhadap himpunan bagian dari PAMP terkait TLR2. Kompleks TLR2 mengenali berbagai PAMP, kebanyakan dari bakteri. Ini termasuk lipoarabinomannan (LAM), lipopolisakarida (LPS), asam lipoteichoic (LTA), peptidoglikan (PGN), dan glikolipid, glikoprotein, dan lipoprotein lainnya. Kompleks TLR2 juga mampu mendeteksi virus, termasuk virus campak (MV), human cytomegalovirus (HCMV), dan virus hepatitis C (HCV) dan PAMP jamur, termasuk zymosan. Studi terbaru menunjukkan bahwa, seperti TLR4, kompleks TLR2 memerlukan CD14 untuk mendeteksi PAMP dan/atau pensinyalan (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014).

Selain deteksi pola non-diri, kompleks TLR2 juga mampu mendeteksi pola diri yang berubah, seperti yang ditampilkan oleh sel nekrotik. Lebih lanjut, bukti terbaru menunjukkan bahwa TLR2 direkrut ke fagosom dan mungkin terlibat langsung dalam internalisasi produk mikroba oleh sel (Mukherjee et al., 2016).

TLR2 membentuk heterodimer berbentuk m dengan TLR1 atau TLR6 untuk mengenali lipopeptida tri- atau di-asilasi masing-masing dari patogen (bakteri Gram-negatif, mikoplasma, dll.). Dari tiga rantai lipid ligan triterasilasi (lipopeptida misalnya Pam3CSK4), dua berinteraksi dengan TLR2 dalam heterodimer TLR2-TLR1 sedangkan rantai ketiga menempati bagian yang hidrofobik TLR1. Tidak adanya bagian hidrofobik di TLR6, heterodimer TLR2-TLR6 tidak dapat mengenali lipopeptida triasilasi.



**Gambar 2.14** Pensinyalan TLR2 (de Oliveira Nascimento et al., 2012)  
Keterangan: Setelah pengenalan ligan dan penataan ulang dimer TLR2 konsekuen, domain TIR dari TIRAP mengikat domain TIR dari TLR2 dan merekrut protein adaptor MyD88. IRAK kemudian direkrut dan IRAK 4 memfosforilasi (P) IRAK1, yang kemudian memulai auto-fosforilasi. IRAK1 terfosforilasi terdisosiasi dari kompleks dan mengaktifkan TRAF6. Karena

IRAK1 terdegradasi dengan cepat, IRAK2 juga mengaktifkan TRAF 6 dalam respons terakhir. Ubiquitinated (U) TRAF6 memicu urutan aktivasi kompleks TAB2 – TAK1 – IKK. Fosforilasi I $\kappa$ B dan ubiquitinasi oleh kompleks IKK menyebabkan degradasi dan pelepasan translokasi NF- $\kappa$ B ke nukleus untuk peningkatan regulasi gen. TAK1 juga mengaktifkan MKK6 untuk aktivasi JNK dan p38 berikutnya, yang mengarah ke aktivasi AP-1 yang memicu transkripsi gen sitokin dan molekul aksesori. Kompleks reseptor yang terinternalisasi yang dipicu oleh ligan virus dapat diaktifkan oleh jalur yang tidak diketahui IRF7/3 ke up-regulation gen IFN- $\beta$  atau IRF2/IRF1/STAT1 untuk up-regulation gen IFN- $\alpha$  MyD88, gen respons primer diferensiasi myeloid 88; TIRAP, protein adaptor TIR; IRAK, kinase terkait reseptor interleukin-1; TRAF, faktor terkait reseptor TNF; TAK, mengubah faktor pertumbuhan beta-activated kinase 1; TAB, protein pengikat TAK1; MKK/JNK/P38, MAP kinase, NEMO/IKKs, kompleks kinase; NF- $\kappa$ B, faktor nuklir- $\kappa$ B; I $\kappa$ B, kompleks kinase; AP, protein penggerak; IRF, faktor pengatur interferon, STAT, transduser sinyal dan aktivator transkripsi 1.

Nemo: nuklear factor kappa b essential modulator IRAK interleukin 1 reseptor associated kinase

Jadi TLR2 terlibat dalam pengenalan suatu berbagai PAMP berasal dari bakteri, jamur, parasit dan juga virus. TLR2, bersama dengan koreseptornya, TLR1 dan TLR6, memerlukan internalisasi untuk memicu aktivasi NF- $\kappa$ B sebagai respons terhadap asam Lipoteichoic (LTA) dan Pam3CSK4 yang menyediakan mekanisme penerimaan baru tentang bagaimana TLR mengoordinasikan pengenalan ligan dan pemicu berikutnya dari sinyal tertentu. Meskipun ekspresi TLR2 pada permukaan sel, ligan TLR2 bakteri yaitu Pam3CSK4 dan LTA dapat menginduksi pensinyalan yang bergantung pada NF- $\kappa$ B dari kompartemen endosom yang dilaporkan untuk monosit manusia dan untuk garis sel reporter yang sensitif terhadap NF- $\kappa$ B (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

#### **2.13.3.4. Toll Like Receptor (TLR)4**

TLR4 memetakan ke kromosom 9q32-33. Ini menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi dengan dToll di seluruh urutan aa. Urutan TLR4 mengkodekan protein 839 aa dengan 22 wilayah LRR terminal-N dan berat molekul terhitung 90 kDa (Gambar 1) 9, 10, 18 TLR4 paling dekat hubungannya dengan TLR1 dan TLR6 masing-masing dengan 25% identitas urutan aa keseluruhan (Gambar 2.5). In vivo, TLR4 mRNA diekspresikan sebagai transkrip tunggal, dan ditemukan pada tertinggi di limpa dan Perifer Blood Lecocytes, TLR4 diekspresikan oleh sel B, DC, monosit, makrofag, granulosit, dan sel T. Laporan lain menunjukkan bahwa TLR4 hanya diekspresikan dalam sel myelomonocytic dan tertinggi dalam sel mononuklear Ex vivo, ekspresi TLR4 pada monosit diregulasi setelah terpapar bakteri Gram-negatif (Gambar 2.6) (Kawasaki & Kawai, 2014; R&D Systems, 2021).

TLR4 membentuk homodimer dan membutuhkan asosiasi ekstraseluler dari komponen tambahan, MD-2. Meskipun kompleks TLR2 mampu mengenali LPS, TLR4 umumnya dianggap sebagai reseptor LPS. Namun, homodimer TLR4 terkait MD-2 tidak mengikat LPS secara langsung. LPS pertama-tama harus diikat oleh protein pengikat LPS terlarut LPS binding protein (LBP). LBP kemudian diikat oleh CD14 terlarut atau terkait-GPI (glycosylphosphatidylinositols) (Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

Sementara mekanisme pastinya masih belum jelas, diperkirakan bahwa LBP mentransfer LPS ke CD14 sehingga mengaktifkan TLR4. Kompleks TLR4 juga mengenali beberapa bakteri lain. PAMP termasuk LTA, virus termasuk virus pernapasan syncytial (RSV), virus hepatitis C (HCV), dan virus tumor payudara tikus (MMTV). Kompleks TLR4 juga dapat mengenali ligan endogen, misalnya heat shock protein, fibrinogen, fibronektin, surfaktan protein A (SP-A), dan beta-defensins. TLR4 juga membentuk heterodimer baik dengan TLR5 untuk meningkatkan aktivitasnya, dan dengan TLR1, yang menghambat aktivitasnya (Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

Endotoksin, atau lipopolisakarida (LPS), ditemukan di dinding sel bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*. Pengenalan LPS oleh sistem imun bawaan menghasilkan respon inflamasi yang ditandai dengan produksi sitokin seperti TNF, IL-1, IL-6, dan IL-8; serta aktivasi gen ICAM-1 dan E-Selectin, antara lain. Up-regulation yang bergantung pada LPS dari gen-gen ini disebabkan oleh up-regulasi kinase yang, pada gilirannya, mengatur faktor-faktor transkripsi NF-kappa B dan AP-1 (Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

Ligasi TLR2 dan TLR4 dalam makrofag meningkatkan produksi ROS (reactive oxygen species) mitokondria sebagai bakterisidal dan menarik mitokondria ke fagosom. TRAF6 ditranslokasi ke mitokondria setelah infeksi bakteri, di mana ia berinteraksi dengan ECSIT (evolutionarily conserved signalling intermediate in Toll pathways) TRAF6 mempromosikan



ubiquitinasi ECSIT, menghasilkan peningkatan ROS ditingkat mitokondria dan seluler (Kawasaki & Kawai, 2014). TLR2 dan 4 diekspresikan dalam berbagai sel imun termasuk neutrofil, monosit/MΦs, dan DC.. Namun, aktivasi terkoordinasi respons adaptif dimediasi melalui pengikatan ligan spesifik ke monosit atau DC yang juga dimediasi terutama oleh TLR2 dan 4. TLR ini juga diekspresikan pada sel imun adaptif klasik yaitu. Limfosit B dan Limfosit T (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

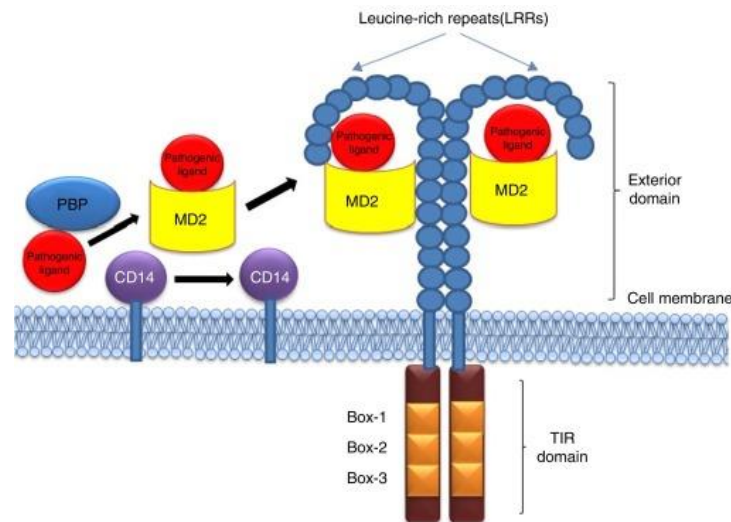
Tabel 2.9 Berbagai Ligan, Asal Ligan, TLR2 dan TLR4, Pengantar Ligannya (de Oliveira Nascimento et al., 2012)

Ligand	Origin	TLRS	Ligand delivery	Reference
<b>Bacterium</b>				
Diacyl lipopeptides (MALP-2/FSL-1)	<i>Mycoplasma</i>	TLR2/TLR6	RP105 (B cells)/ CD14/CD36	Jimenez-Dalmaroni et al. (2009), Blumenthal et al. (2009)
Heat-labile enterotoxins (b subunit)	<i>Escherichia coli, Vibrio cholerae</i>	TLR2/TLR1	CD14/GD1a	Liang et al. (2007b), Connell (2007)
Lipomannan/lipoarabinomannan	<i>Mycobacterium</i>	TLR2/TLR1	CD14/CD36	Jimenez-Dalmaroni et al. (2009), Birch et al. (2010)
Lipoprotein	<i>Mycobacterium</i>	TLR2/?	CD14/CD36/RP105	Jimenez-Dalmaroni et al. (2009)
Lipoteichoic acid (LTA)	Gram-positive bacteria	TLR2/TLR6	CD14/CD36/MBL	Jimenez-Dalmaroni et al. (2009), Ip et al. (2008), Tawaratsumida et al. (2009)
Peptidoglycan (PG)*	<i>Staphylococcus</i>	TLR2/?	CD14	Natsuka et al. (2008), Müller-Anstett et al. (2010)
Porins	<i>Neisseria, Salmonella, Shigella</i>	TLR2/TLR1	Unknown	Massari et al. (2006), Cervantes-Barragan et al. (2009), Biswas et al. (2009)
Triacyl lipopeptides (LPs)	Bacteria	TLR2/TLR1	CD14/vitronectin + integrin $\beta$ 3	Beutler et al. (2006), Gerold et al. (2008)
<b>Fungus</b>				
Glucuronoxylomannan	<i>Cryptococcus neoformans/gaati</i>	TLR2/TLR1–TLR2/TLR6	CD14/not dectin-1	Fonseca et al. (2010)
Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2/TLR6	CD14/dectin-1	Jouault et al. (2003), Netea et al. (2006)
Unknown	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	TLR2/?	Dectin-1	Bonfim et al. (2009)
Unknown	<i>Penicillium marneffei</i>	TLR2/?	Dectin-1	Nakamura et al. (2008)
Unknown	<i>Aspergillus fumigatus</i>	TLR2/?	Dectin-1	
Yeast phase-specific protein (Yps3p)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	TLR2/?	Dectin-1***	Aravalli et al. (2008)
Zymosan**	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2/TLR6	CD14/dectin-1	Ikeda et al. (2008), Beutler et al. (2006), Gantner et al. (2003)
<b>Protozoan/helminth</b>				
Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors	<i>Trypanosoma, plasmodium, toxoplasma</i> (protozoans)	TLR2/TLR1**** and TLR4	CD36(likely) CD14	Jimenez-Dalmaroni et al. (2009), Debierre-Grockiego et al. (2007), Gowda (2007)
Lipopeptidophosphoglycan	<i>Entamoeba histolytica</i> (protozoan)	TLR2/TLR6 and TLR4		Wong-Baeza et al. (2010)
lipophosphoglycan	<i>Leishmania</i> (protozoan)	TLR2/?		Kavooosi et al. (2010)
Lysophosphatidylserine	<i>Schistosoma mansoni, Ascaris lumbricoides</i> (helminth)	TLR2/?		van Riet et al. (2009)
<b>Virus</b>				
EBV-encoded dUTPase	Epstein-Barr	TLR2/?	Not CD14	Ariza et al. (2009)
Glycoprotein B	Cytomegalovirus	TLR2/TLR6	CD14	Barbalat et al. (2009), Klouwenberg et al. (2009), Compton et al. (2003)
Hepatitis B capsid****	Hepatitis B	TLR2/?	CD14	Cooper et al. (2005)
hepatitis C core and NS3 protein	Hepatitis C	TLR2/TLR6	Unknown	Chang et al. (2007)
Unknown	Measles	TLR2/TLR6	Unknown	Klouwenberg et al. (2009), Bieback et al. (2002)
Unknown	Herpes simplex (1/2)	TLR2/TLR6	Unknown	Klouwenberg et al. (2009), Sorensen et al. (2008)
Unknown	Vaccinia	TLR2/?	Unknown	Barbalat et al. (2009)
Unknown	Lymphocytic choriomeningitis	TLR2/?	CD14	Zhou et al. (2005)
Unknown	Yellow fever	TLR2/?	Unknown	Querec et al. (2006)
Unknown	Varicella zoster	TLR2/?	CD14	Wang et al. (2005)
Unknown	Respiratory syncytial	TLR2/TLR6	Unknown	Klouwenberg et al. (2009)
<i>Observation: The question marks “?” presented in the table imply that the co TLR, required for TLR2 ligand recognition, is still undefined.</i>				
<i>*Synthetic PGs does not induce TLR2 signaling, and TLR2 activation promoted by the natural ones was attributed to lipopeptide contamination by some authors (Travassos et al., 2004; Zähringer et al., 2008). Nevertheless, PG extracted from mutant <i>Staphylococcus</i> strain lacking lipopeptides still activated TLR2 and NOD2 (Müller-Anstett et al., 2010).</i>				
<i>**Zymosan activation through TLR2 was also attributed to contamination by other authors (Ikeda et al., 2008).</i>				
<i>***Dectin-1 recognizes <math>\beta</math>-glucans from histoplasma, but these molecules are normally shielded by <math>\alpha</math>-glucans in this pathogen (Rappleye et al., 2007).</i>				
<i>****Intact GPI are recognized mainly by TLR2/TLR1, but exclusion of its sn-2 fatty-acid portion changes the ligand heterodimer to TLR2/TLR6 (Gowda, 2007).</i>				
<i>*****The purity of this preparation is controversial (Vanlandschoot et al., 2005).</i>				

#### 2.13.4. TLR Signal Regulator/Koreseptor

Pathogen associated molecular pattern (PAMPs) akan terikat oleh protein spesifik agar dapat ditransfer ke TLR yang sesuai. Aktivasi TLR4 oleh LPS membutuhkan keterlibatan koreseptor diantaranya Myeloid differentiation (MD)2 dan (Cluster of Differentiation) 14. LPS dikenali dalam serum oleh LPS-binding protein (LBP). Kompleks LPS-LBP selanjutnya

dikenali oleh cluster differentiation -14 (CD14). Yang merupakan pengatur sinyal untuk TLR. Berbagai pengatur sinyal TLR yang terlibat dalam aktivasi TLR yaitu: CD14, CD36/ MD2, MD-1, TRIM38, SR-B3, CD300th,CUL1, CUL1/NEDD8/RBX1 complex, CUL1/RBX1complex dan lain-lain.



**Gambar 2.15** Presentation of ligand (LPS) to TLR4 through the coordinated actions of serum LBP, membrane bound CD14 and MD2 (Mukherjee et al., 2016)

#### 2.13.4.1. Cluster of Differentiation (CD) 14

Beberapa molekul transmembrane yang memodulasi jalur pensinyalan TLR dikenal dengan *Cluster of Differentiation* (CD) D14 yaitu protein glikofosfatidil inositol yang diekspresikan pada permukaan sel, terutama monosit, makrofag, dan neutrofil. (rndsistem) Co-reseptor dengan TLR4 dan MD-2 untuk pengenalan LPS, yang menginduksi endositosis yang bergantung pada Syk dan PLC $\gamma$ 2 yang dimediasi ITAM untuk mempromosikan internalisasi TLR4 ke dalam endosom untuk aktivasi pensinyalan yang bergantung pada TRIF CD14 juga diperlukan untuk induksi sitokin proinflamasi yang bergantung pada TLR7 dan TLR9 .

(rndsistem) CD36, protein dalam scavenger reseptor kelas B, bertindak sebagai ko-reseptor untuk lipoprotein densitas rendah (LDL) teroksidasi dan peptida amiloid- $\beta$ . Pengenalan ligan menginduksi perakitan heterodimer TLR4/TLR6 melalui Src kinase dan akibatnya inflamasi steril, dengan menginduksi sitokin inflamasi dan ROS dan memicu aktivasi inflamasi NLRP3 (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Mukherjee et al., 2016; R&D Systems, 2021).

Bentuk CD14 ini tidak satu pun akan kompeten untuk pensinyalan sel, protein transmembran permukaan sel berfungsi sebagai ko-reseptor untuk kompleks CD14/LPS-LBP (bersama dengan reseptor seperti Toll TLR 4 dan MD-2) untuk mendeteksi lipopolisakarida bakteri. CD14 terlarut (sCD14), glikoprotein 55-kDa yang ditemukan dalam plasma, telah terbukti bertindak sebagai antar-jemput untuk LPS bakteri dan fosfolipid, mengangkut LPS dan monomer fosfolipid dari agregat LPS atau liposom ke partikel lipoprotein densitas tinggi. sCD14 juga telah terbukti memediasi pengangkutan LPS dan phosphatidylinositol ke dalam sel. Aktivasi LPS dari TLR4 memicu aktivasi inflamasi. CD14 juga berkontribusi pada respons terhadap ligan TLR3, fosfoinositida, serta protein surfaktan SP-A dan SP-D (Mollen et al., 2007; Nagai & Takatsu, 2014; R&D Systems, 2021).

#### **2.13.4.2. Myeloid of Differentiation 2 (MD-2)**

TLR membutuhkan antigen limfosit 96 [diferensiasi myeloid 2 (MD-2)] untuk pengenalan LPS oleh bagian ekstraselulernya tanpa MD-2, TLR4 tidak diekspresikan pada permukaan sel. Kompleks TLR4/MD-2 sangat

penting untuk respons LPS, karena tikus dengan defisiensi TLR4 maupun defisiensi MD-2 tidak merespons LPS. Diferensiasi myeloid 2 (MD-2) dan Toll-like receptor 4 (TLR4) adalah sepasang reseptor pengenalan lipopolisakarida dalam respon imun bawaan. Studi terbaru telah menghubungkan TLR4 dalam peradangan dan aterosklerosis. MD2 adalah ko reseptor, molekul ekstraseluler sangat diperlukan untuk pengenalan LPS terhadap TLR4. Aktivasi TLR4 kemudian menyebabkan perekrutan protein adaptor seperti protein respons primer diferensiasi myeloid 88 (MyD88), yang memicu aktivasi beberapa jalur pensinyalan hilir, khususnya faktor nuklir- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) untuk mengatur sejumlah pro- molekul inflamasi. (Choi HG, 2016)

Analisis struktur kristal terbaru mengungkapkan bahwa LPS dapat masuk ke dalam rongga hidrofobik MD-2, dan pengikatan ini mengarah pada homodimerisasi kompleks TLR4/MD-2, yang menghasilkan aktivasi pensinyalan hilir TLR4. MD-2, juga dikenal sebagai ESOP-1, adalah protein yang disekresikan 25 kDa yang diperlukan untuk respons yang dimediasi TLR4 terhadap lipopolisakarida bakteri (LPS). MD-2 berasosiasi dengan TLR4 pada monosit, makrofag, sel dendritik, dan sel B (Gangloff & Gay, 2004). MD-2 juga membentuk homo-oligomer larut disulfida-linked yang dapat berinteraksi dengan TLR4 . Melalui domain yang terpisah dari domain pengikatan TLR4, MD-2 mengekstrak LPS dari kompleks CD14-LPS yang bersirkulasi dan membawa LPS ke dalam kompleks dirner dengan TLR4 (R&D Systems, 2021; Re & Strominger, 2003).

### 2.13.5. Toll Like Reseptor Signal Molecule

Berbagai macam molekul sinyal/ adaptor TLR yang sangat penting dalam proses transduksi intraseluler, salah satunya adalah IKB alpha, IKB beta, epsilon beta, IRAK 1 IRAK2 IRAK3 , IRAK4, TRAF36 , TRAM dan MY88 dal lain-lain . MyD88 adalah adaptor kanonik untuk jalur pensinyalan inflamasi di hilir dari reseptor seperti Toll (TLR) dan interleukin-1 (IL-1). MyD88 menghubungkan reseptor IL-1 (IL-1R) atau TLR family ke kinase family terkait IL-1R (IRAK) melalui interaksi protein-protein homotipik. Aktivasi kinase keluarga IRAK mengarah ke pembentukan zat fungsional, termasuk aktivasi faktor-kappa B nuklir (NFkB), protein kinase yang diaktifkan mitogen, dan protein penggerak 1, menjadikan MyD88 sebagai simpul pusat jalur inflamasi. Karena lebih banyak detail pensinyalan yang bergantung pada MyD88 (de Oliviera Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014).

MyD88 pertama kali dijelaskan pada tahun 1990 sebagai gen yang diregulasi selama diferensiasi myeloid yang diinduksi IL-6, tetapi homologinya dengan domain sitosol MyD88 terlibat dalam pensinyalan hilir IL-1R dan TLR mamalia , Domain C-terminal intraseluler TIR (Toll IL-1R) memediasi interaksi dengan protein lain yang mengandung domain TIR (reseptor atau adaptor); domain kematian N-terminal (DD) berasosiasi dengan IRAK family melalui interaksi DD homotipik. Konsisten dengan peran ini, ekspresi berlebih dari DD MyD88 menyebabkan aktivasi spontan

NFkB dan c-Jun N-terminal kinase (JNK), sedangkan domain TIR dapat bertindak sebagai negatif dominan. Domain perantara (INT) MyD88 menghubungkan TIR dan DD. Meskipun domain ini tampaknya tidak terlibat dalam interaksi langsung yang dijelaskan di atas, domain ini diperlukan untuk aktivasi IRAK4. Faktanya, MyD88s, varian dari MyD88 yang tidak memiliki domain INT, diinduksi saat aktivasi dan bertindak sebagai bentuk negatif dominan dari MyD88 (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016; R&D Systems, 2021).

MyD88 respon imun bawaan yang berperan sebagai jembatan antara reseptor yang mengandung TIR dan kinase yang mengandung DD. Karakterisasi Myddosome menunjukkan mekanisme molekuler yang jelas untuk transduksi sinyal pada pengelompokan reseptor local yang mengandung domain TIR yang menghasilkan keluaran mengarah ke sitokin pro-inflamasi atau produksi IFN tipe I.

Faktor transkripsi faktor nuklir- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) untuk menginduksi sitokin dan kemokin pro-inflamasi serta up-regulasi molekul co-stimulator pada sel penyaji antigen, seperti makrofag (M $\Phi$ s) dan sel dendritik (DC) yang pada gilirannya mensensitisasi aktivasi sel T (de Oliveira Nascimento et al., 2012; Deguine & Barton, 2014; Kawasaki & Kawai, 2014; Mukherjee et al., 2016).

Aktitas TLR juga dikendalikan oleh protein yang ada di ER- PRAT4A, yang mengatur keluarnya TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, dan TLR9 dari ER dan perpindahan ke membran plasma dan endosom. Ditemukan gp96, anggota ER-family heat-shock protein 90, berfungsi sebagai pendamping

umum untuk sebagian besar TLR, termasuk permukaan sel TLR1, TLR2, TLR4, dan TLR5 dan TLR7 dan TLR9 intraseluler. Dalam endosom, TLR mengenal asam nukleat yang mengalami pemecahan proteolitik oleh cathepsin B, S, L, H, dan K dan asparaginil endopeptidase untuk mencapai bentuk fungsional yang memediasi pengenalan ligan dan memulai pensinyalan (Kawasaki & Kawai, 2014).

#### **2.13.6. Aktivasi Keseimbangan Jalur MYD88- dan TRIF**

TLR4 mengaktifkan jalur yang bergantung pada MyD88 dan bergantung pada TRIF. Aktivasi jalur ini dikendalikan oleh beberapa molekul untuk menginduksi respon yang sesuai. Produksi yang seimbang dari sitokin inflamasi dan IFN tipe I mungkin penting untuk mengendalikan pertumbuhan sel tumor dan penyakit autoimun.

TRAF3 terbukti dimasukkan ke dalam kompleks MyD88 serta kompleks TRIF dalam pensinyalan TLR4. TRAF3 dalam kompleks MyD88 kemudian terdegradasi, yang menyebabkan aktivasi TAK1. TRAF3 mempromosikan aktivasi jalur yang bergantung pada TRIF, dan memiliki peran dalam menghambat jalur yang bergantung pada MyD88. NRDP-1, sebuah ligase ubiquitin E3, mengikat dan mengubiquitinas MyD88 dan TBK1, menginduksi degradasi MyD88 dan meningkatkan aktivasi TBK1, yang melemahkan produksi sitokin inflamasi dan menginduksi produksi IFN tipe I preferensial, masing-masing (Kawasaki & Kawai, 2014; Wang et al., 2009).



Molekul MHC kelas II yang terlokalisasi dalam endosom dalam sel penyaji antigen berinteraksi dengan tirosin kinase melalui molekul kostimulatori CD40 dan mempertahankan bentuk aktivasi. Bentuk yang diaktifkan berinteraksi dengan MyD88 dan TRIF untuk menstimulasi aktivasi jalur yang bergantung pada MyD88 dan bergantung pada TRIF dan dengan demikian meningkatkan produksi sitokin inflamasi dan IFN tipe I, berurutan (X. Liu et al., 2011).

#### **2.13.7. Pengaturan Negatif Transkripsi Sinyal TLR**

Sejumlah molekul melalui berbagai mekanisme untuk mencegah atau menghentikan respons imun yang berlebihan yang mengarah pada kondisi merugikan tubuh seperti penyakit autoimunitas dan penyakit inflamasi. Regulator negatif menargetkan setiap molekul kunci dalam pensinyalan TLR (Gambar 2.8). Aktivasi jalur MyD88 independent ditekan oleh ST2825, SOCS1, dan Cbl-b, dan aktivasi jalur yang bergantung pada TRIF ditekan oleh SARM dan TAG. Molekul-molekul ini berasosiasi dengan MyD88 atau TRIF untuk mencegahnya mengikat TLR atau molekul hilir. Aktivasi TRAF3 diatur secara negatif oleh SOCS3 dan DUBA . TRAF6 dihambat oleh A20, USP4, CYLD, TANK, TRIM38, dan SHP. Aktivasi TAK1 dihambat oleh TRIM30 $\alpha$  dan A20 . Selain molekul pensinyalan ini, faktor transkripsi NF- $\kappa$ B ditekan oleh Bcl-3, I $\kappa$ BNS, Nurr1, ATF3, dan PDLIM2, sementara aktivasi IRF3 dihambat oleh Pin1 dan RAUL. Stabilitas pengkodean molekul pensinyalan mRNA diatur oleh miRNA seperti miR-146a, miR-199a, miR-155, miR-126, miR-21, miR-29, miR-148/152, dan miR-466l. Selain

stabilitas mRNA untuk molekul pemberi sinyal, stabilitas mRNA untuk sitokin diatur oleh Regnase-1 dan TTP (Kawasaki & Kawai, 2014).

#### **2.13.8. Pengaturan Seluler oleh Nuclear Factor-KB**

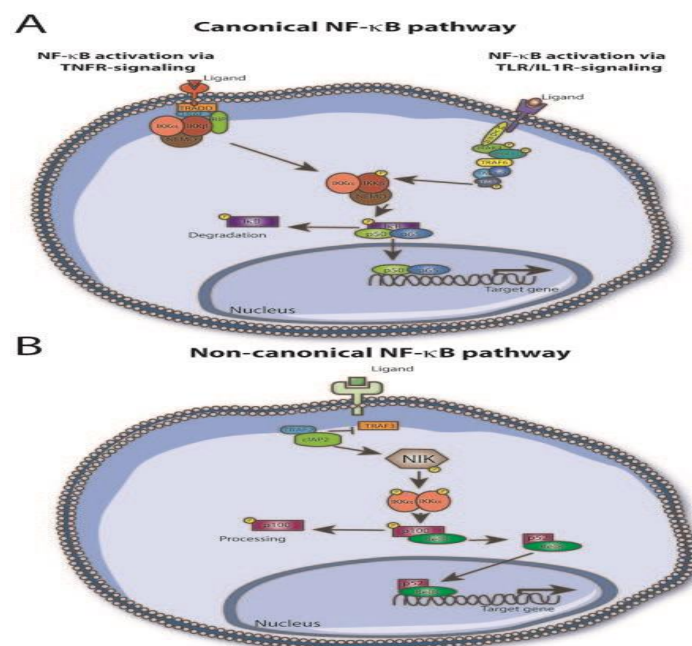
Respon seluler terhadap *M. tuberculosis* dan banyak rangsangan lainnya, adalah difasilitasi oleh Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B mengatur berbagai proses seluler dengan mengatur transkripsi gen, yang diperlukan untuk banyak aktivitas seperti pertumbuhan dan perkembangan sel, serta untuk produksi mediator inflamasi dan kekebalan, baik untuk mengendalikan patogen (IL-12, TNF alfa, INF gamma) dan menekan inflamasi (IL-4, IL-10, TGF-beta) (Gambar 2.10). Berbagai macam sinyal dapat memicu aktivasi kompleks NF- $\kappa$ B, termasuk stress oksidatif, PAMP, hormon, dan sitokin. Dalam sel istirahat, NF- $\kappa$ B ditemukan menghambat sel istirahat, NF- $\kappa$ B ditemukan dihambat dengan mengikat I $\kappa$ B (protein penghambat). Dalam konteks ini, kompleks NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B tetap terletak di kompartemen sitosol, dan tidak ada mengikat DNA inti (Amaral & Andrade, 2017; R&D Systems, 2021).

Pada manusia, famili NF- $\kappa$ B terdiri dari 5 anggota, p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (prekursor p105), dan p52 (prekursor p100),<sup>2,3</sup> yang dikodekan oleh RELA, RELB, REL, NFKB1, dan gen NFKB2, masing-masing. Molekul-molekul ini berbagi domain homologi Rel N-terminal (RHD), yang diperlukan untuk pengikatan DNA dan oligomerisasi. Subunit lain dari NF- $\kappa$ B yang diamati hanya pada p65, c-Rel, dan RelB disebut transkripsi aktivasi domain (TAD) dan diperlukan untuk regulasi positif ekspresi gen. Sebaliknya, p50

dan p52 kekurangan TAD dan untuk alasan ini, mereka tidak dapat mentransduksi sinyal transkripsi asli (Amaral & Andrade, 2017).

Dalam banyak sel, protein NF- $\kappa$ B ditemukan sebagai struktur homodimerik atau heterodimerik di dalam sitoplasma dan, umumnya, terikat pada protein penghambat bernama I $\kappa$ Bs. Pada dasarnya, I $\kappa$ B mengikat ke wilayah RHD NF- $\kappa$ B, mengganggu kontakannya dengan DNA. Tiga protein khas I $\kappa$ B, seperti I $\kappa$ B $\alpha$  (dikodekan oleh NFKBIA), I $\kappa$ B $\beta$  (dikodekan oleh NFKBIB), dan I $\kappa$ B $\epsilon$  (dikodekan oleh NFKBIE), atau protein prekursor, seperti p100 (dikodekan oleh NFKB2) dan p105 (dikodekan oleh NFKB1), ditemukan terikat pada NF- $\kappa$ B dalam tahap tidak aktifnya (Amaral & Andrade, 2017). Faktor nuklir B dapat diaktifkan oleh beberapa jalur di mana ia berubah menjadi kompleks 700 hingga 900 kDa yang mengandung serin-spesifik I $\kappa$ B kinase (IKK), yang disebut kompleks IKK. Kompleks ini terdiri dari 2 subunit katalitik, IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$ , membentuk homodimer atau heterodimer, yang secara stoikiometri terikat pada subunit pengatur bernama NEMO (NF- $\kappa$ B essential modifier) atau IKK $\gamma$ 5 (Gambar 2.12). Baik IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$  menyajikan situs untuk mengikat NEMO bernama NEMO-binding domain (NBD) (Gambar 2.12). Dalam skenario ini, NEMO berinteraksi dengan konformasi dimer IKK dan menstabilkan seluruh struktur. Pengubah esensial faktor nuklir B dikenal sebagai subunit pengatur kompleks IKK dan menampilkan domain penting yang diperlukan untuk mengikat IKK $\beta$  bernama domain pengikatan kinase. Terdapat 2 jalur

aktivasi NF $\kappa$ B dikenal jalur canonic dan jalur noncanonic (Amaral & Andrade, 2017).



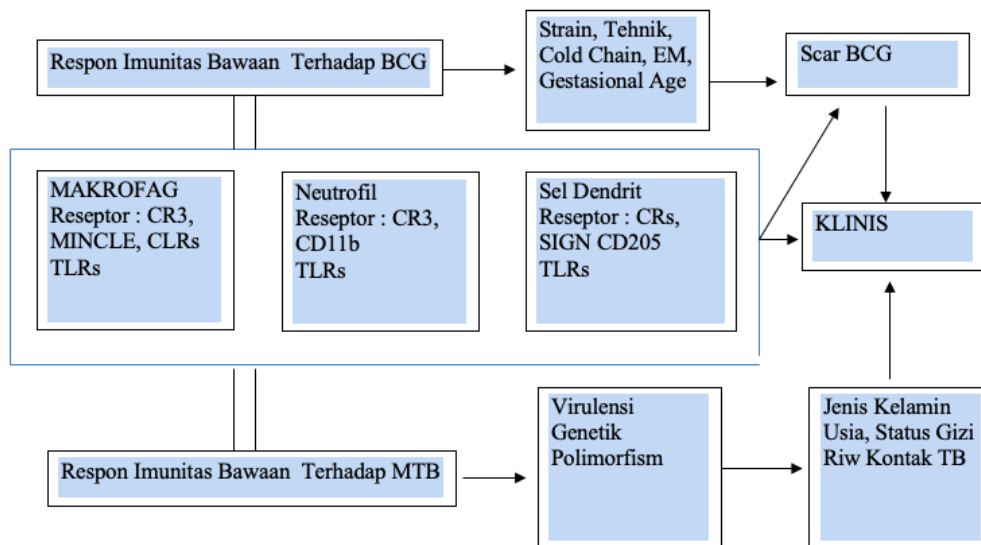
**Gambar 2.16** Mengaktifkan jalur faktor nuklir B (NF- $\kappa$ B)

Keterangan: Ilustrasi skema (A) kanonik dan (B) jalur NF- $\kappa$ B nonkanonik. (A) Tumor necrosis factor (TNF)-dependent (di kiri) dan Toll-like receptor (TLR)/interleukin (IL)-1R-dependent (di kanan) jalur pensinyalan NF- $\kappa$ B diwakili. Setelah dipicu, reseptor faktor nekrosis tumor (TNFR) (kiri) merekrut keluarga faktor terkait TNFR (TRAF) yang mewakili molekul adaptor penting yang diperlukan untuk transduksi sinyal TNF. Sudah berlabuh ke domain kematian terkait TNFR (TRADD), TRAF merekrut kompleks IKK melalui interaksi langsung dengan wilayah ritsleting leusin IKK $\alpha$  atau IKK. TRAF juga berinteraksi dengan reseptor-interacting protein 1 (RIP1) yang dapat secara independen direkrut ke TRADD. Dalam kasus terakhir, RIP bekerja sebagai protein perancah, mengikat langsung ke NEMO, mempromosikan perekrutan kompleks IKK ke TNFR. TLR/IL-1R (di kanan) saat diaktifkan merekrut MyD88 dengan mengikat domain TIR mereka. Setelah terikat ke domain TIR, MyD88 terhubung dengan anggota IRAK, menghasilkan kompleks oligomer besar bernama Myddosome. IRAK4 terfosforilasi menginduksi fosforilasi IRAK1/2, yang pada gilirannya mendorong keterlibatan TRAF6. Saat aktivasi, TRAF6 menginduksi docking dan aktivasi adaptor TAB1, TAB2, dan TAB3, yang mengarah pada perekrutan TAK1. Pada gilirannya, TAK1 mempromosikan autofosforilasi dan kemudian memfosforilasi IKK. Kompleks IKK yang diaktifkan memfosforilasi I $\kappa$ B, yang menyebabkan degradasinya oleh proteasom.

Pada degradasi I $\kappa$ B, subunit NF- $\kappa$ B akan dilepaskan dan kemudian dibiarkan bertranslokasi ke dalam nukleus. (B) Pensinyalan NF- $\kappa$ B nonkanonik memiliki komponen pensinyalan pusat bernama faktor nuklir B-inducing kinase (NIK) yang bertindak bersama dengan IKK $\alpha$  untuk menginduksi fosforilasi dan pemrosesan p100. Untuk aktivasi NIK, TRAF3, regulasi negatif ekspresi NIK, diturunkan regulasinya oleh cIAP2 dan TRAF2, memfasilitasi akumulasi NIK dalam sitosol dan transfosforilasinya. Saat diaktifkan, NIK memfosforilasi IKK $\alpha$ , yang pada gilirannya mendorong pemrosesan p100, memungkinkan translokasi RelB/52 ke dalam nukleus (Amaral & Andrade, 2017).

### BAB III

## KERANGKA TEORI

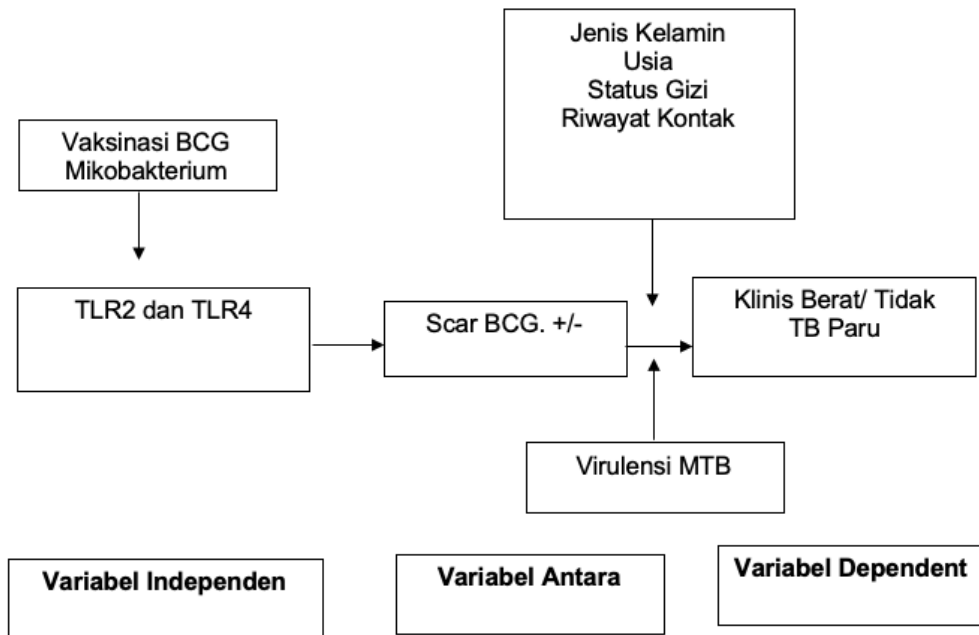


Gambar 3.1 Kerangka Teori

## BAB IV

### KERANGKA KONSEP

#### 1.1. Kerangka Konsep



Gambar 4.1 Kerangka Konsep

#### 1.2. Hipotesis

1. Ekspresi mRNA gen TLR2 , mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 lebih tinggi pada TB anak dengan Scar BCG positif
2. Ekspresi mRNA gen TLR2 , mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4 lebih tinggi pada TB anak derajat berat
3. Ada korelasi ekspresi mRNA gen TLR2 dan ,mRNA gen TLR4 dengan kadar protein TLR2 dan kadar protein TLR4 pada TB anak yang telah divaksin BCG

## **BAB V**

### **METODE PENELITIAN**

#### **5.1. Desain Penelitian**

Rancangan atau disain penelitian diartikan sebagai strategi untuk melaksanakan penelitian. Penelitian ini menggunakan desain analitik dengan rancangan potongan lintang (*cross-sectional*).

#### **5.2. Populasi Target dan Populasi Terjangkau**

Populasi penelitian adalah anak yang didiagnosis Tuberkulosis yang berobat rawat jalan dan atau rawat inap di RS Bhakti Medicare dan RS Islam Jakarta dengan tehnik pengambilan sampel adalah total sampling

#### **5.3. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di poliklinik rawat inap dan rawat jalan Rumah Sakit Bhakti Medicare Kabupaten Sukabumi Jawa Barat dan RS Islam Cempaka Putih dan RS Islam Sukapura Jakarta. Pemilihan lokasi di wilayah ini disesuaikan karena kasus penyakit TB masih tinggi di Kabupaten Sukabumi. Lama penelitian diperkirakan selama satu tahun hingga jumlah sampel terpenuhi dan lama pengobatan sesuai buku tata laksana *tuberculosis* pada anak penerbit IDAI.

#### **5.4. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah anak penderita Tuberkulosis berusia 0 sampai 18 tahun yang berobat di rawat jalan dan atau rawat inap rumah sakit, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.



#### 5.4.1. Teknik Sampel

Teknik pengambilan sampel adalah *quota sampling* dan akan dilakukan stratifikasi saat dilakukan analisis.

#### 5.4.2. Besar Sampel

Penentuan besar sampel yang akan dihitung menggunakan rumus Komparatif Numerik Tidak Berpasangan Dua Kelompok Satu Kali Pengukuran (Dahlan, 2013):

$$n_1 = n_2 = \left[ \frac{2 \{(Z_\alpha + Z_\beta)SD / (x_1 - x_2)\}}{1} \right]^2$$

$$S^2 = \frac{S_1^2 (n_1 - 1) + S_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$n_1 + n_2 - 2$$

$n_1$  = Jumlah subejk kelompok satu

$n_2$  = Jumlah subejk kelompok dua

Dalam penelitian ini digunakan :

Kesalahan tipe I =  $\alpha$  = 5%,  $Z_\alpha$  dua arah = 1,960

Kesalahan tipe II =  $\beta$  = 20%,  $Z_\beta$  = 0,84

Power =  $(1 - \beta)$  = 80%

SD = 10

$x_1 - x_2$  = 10,63

maka

$$n_1 = n_2 = \left[ \frac{\{(1,96 + 0,84)20 / 10,63\}}{1} \right]^2$$

$$10,63$$

$$n_1 = n_2 = 27,75 = 28$$

Bila diasumsikan SD antara 2 kelompok adalah 20 dan perbedaan rerata antara dua kelompok dari kepustakaan adalah 10,63, maka dari perhitungan jumlah sampel, sampel penelitian yang diperlukan pada penelitian ini adalah sebesar 28 orang perkelompok (Dahlan, 2013; Madiyono et al., 2011).

## **5.5. Kriteria Sampel**

### **5.5.1. Kriteria Inklusi**

- Penderita Tuberkulosis intra dan ekstra l pulmonal yang ditentukan oleh dr SpA yang berpengalaman di RS
- Penderita berusia 0 - 18 tahun
- Diagnosis TB pertamakali bukan relaps atau reinfeksi
- Belum minum obat OAT atau maksimal jika sudah minum obat OAT 2 mg
- Bersedia ikut penelitian dan telah menandatangani *informed consent* atau persetujuan setelah penjelasan

### **5.5.2. Kriteria Eksklusi**

- Tidak menderita kelainan bawaan atau menderita penyakit kronis
- Bukan anak dengan immunokompromise (dalam terapi steroid/ kemoterapi)
- Menderita drug induced hepatitis akibat OAT selama pengobatan
- Hilang kontak / pengobatan pindah ke pelayanan kesehatan lain

**5.5.3. Analisa Data** : Analisis bivariat deskriptif, Uji hipotesis komparatif Independent t tes, bila lebih dari 2 group dengan One Way ANOVA, Uji Korelasi Pearson

## **5.6. Tehnik Pengumpulan Data**

Pemilihan diawali dari pasien yang telah diagnosis Tuberkulosis oleh Sp.A dengan pengalaman lebih dari 5 tahun praktek dr anak berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium, Mantoux tes, dan pemeriksaan radiologi. Dilakukan *informed consent* kemudian dilakukan pengumpulan data primer (no rekam medis, nama, jenis kelamin, tanggal/bulan/tahun kelahiran, nama orangtua, alamat, riwayat imunisasi, kontak penderita tuberkulosis) kemudian dilakukan pengukuran berat badan dan tinggi badan, dan status gizi, diobservasi ada tidaknya scar BCG di lengan kanan atau di paha, setelah itu darah diambil untuk dilakukan pemeriksaan darah, diambil darah vena sebanyak 2 cc, 2 tetes dimasukkan dalam L6 dan sisanya dimasukkan ke dalam tabung EDTA, darah segera diputar 3000 rpm selama 10- 15 menit, untuk memisahkan sel darah dan serum. Serum darah diambil dan dimasukkan kedalam tabung ependorf dan disimpan dalam freezer/kulkas pendingin pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga seluruh sampel terpenuhi. Selain itu, satu tetes darah dimasukkan dalam aliquot 500  $\mu\text{L}$ . Setelah sampel terpenuhi kemudian dibawa ke Makassar dengan wadah untuk pengiriman sampel yang memenuhi syarat untuk dilakukan pemeriksaan di Laboratorium Biologi Molekuler dan imunologi FK UNHAS di Makassar untuk dilakukan pemeriksaan mRNA gen TLR2, mRNA gen

TLR4, kadar protein TLR2, dan kadar protein TLR4. Ekstraksi RNA menggunakan metode Boom. Konsentrasi mRNA diukur dengan *fluorometer* Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, *United States*) sesuai instruksi pabrik, dan sampel RNA kemudian disimpan pada -80° C sampai analisis berikutnya.

### **5.7. Persiapan Alat dan Bahan/Reagen**

Alat dan bahan penelitian dibagi atas: 1) Isolasi asam nukleat, 2) uji kualitas mRNA menggunakan Fluorometer dan kuantifikasi mRNA gen TLR2 dan mRNA TLR4 menggunakan RT-PCR, dan 3) Pemeriksaan kadar protein TLR2 dan TLR4 dengan enzym linked immunosorbent assay (ELISA)

1. Alat dan bahan/reagen untuk ekstraksi asam nukleat mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 (metode Boom). Alat untuk isolasi asam nukleat
  - a. Laminar flow
  - b. Screw cap tube 1,5 mL steril (Sarstedt)
  - c. Tabung 0,5 mL steril (tabung Safelock Eppendorf)
  - d. Pipet pasteur plastik, steril
  - e. Vortex
  - f. Centrifuge untuk tabung 1,5 mL
  - g. Waterbath 96°C, 100°C
  - h. Blok pemanas (heating block) 50°C, 56°C
  - i. Tip filter steril: 10, 30, 100, 200, 1000 µL
  - j. Tip steril 200 µL

- k. Pipet 10, 20, 100, 200, 1000  $\mu\text{L}$
- l. Perangkat Cair
- m. shaker (Rotary)
- n. Pipet steril plastik 10 mL dan 50 mL
- o. Kotak untuk sampel penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$
- p. Lemari es  $-20^{\circ}\text{C}$

Reagen untuk isolasi asam nukleat menggunakan metode Boom:

- a. **L6 Buffer:** Guanidinium isothiocyanate (GuSCN) 120g, 0.1M Tris-HCl pH 6.4 100ml, 0.2M EDTA pH 8.0 22ml, Triton X-100 2,6g
- b. **Silika ( $\text{SiO}_2$ ):** Untuk membuat 60 mL silica, gunakan 60g  $\text{SiO}_2$  (Sigma). Tambahkan 500 mL air suling steril, campurkan dalam larutan, biarkan selama 24 jam kemudian keluarkan supernatan (430 mL) dengan menggunakan pipet plastik steril 50 mL. Tambahkan air suling steril ke volume total 500 mL, campurkan dalam larutan. Biarkan selama 5 jam lalu keluarkan supernatan (440 mL) dengan menggunakan pipet plastik steril 50 mL. Tambahkan 600 mL HCl (32% w/v) ke suspensi silika 60 mL, campurkan dalam larutan. Aliquot di tabung tutup sekrup steril (*screw cap tubes*) 1,5 mL (500  $\mu\text{l}$  di setiap tabung) dan sterilisasi pada  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.
- c. **L2 Buffer:** Guanidinium isothiocyanate (GuSCN) 120g, 0.1M Tris-HCl pH 6.4 100mL
- d. **Etanol 70%:** Ethanol 70mL, distilled H<sub>2</sub>O 300ml

- e. **Tris 1M:** Larutkan 121.1g Tris base dalam 800 mL H<sub>2</sub>O, Sesuaikan pH dengan nilai yang diinginkan dengan menambahkan volume HCl konsentrat yang sesuai.
- f. **EDTA 0.5M pH 8.0:** Tambahkan 186.1g of disodium EDTA dalam 800mL H<sub>2</sub>O, sesuaikan pH to 8.0 dengan NaOH (~ 20g NaOH pellet)
- g. **Acetone** p.a., (Merck)
- h. **Etanol 70%** (v/v) untuk desinfeksi: 700 mL Alkohol Fortior 96,2% (Koninklijke Nedalco B.V). Tambahkan 300 mL air suling steril.
- i. **Sodium hidroksida (NaOH) 4 M:** ambil pellet NaOH 16 g (Sigma) dicampurkan dengan 100 mL air suling.
- j. Bahan yang digunakan **1 kit mRNA TLR2/4, 1 kit primer gen TLR2/4 (Oligo,Macrogen).**

## 5.8. Metoda Pemeriksaan

### 5.8.1. Ekstraksi asam nukleat dengan metode Boom

Metode Boom merupakan metode cepat dan sederhana untuk ekstraksi asam nukleat RNA dan DNA (Boom et al., 1990). Metode ini berdasarkan proses lisis dari sel dan menginaktifkan sifat nuklease dengan agen *chaotropic* yaitu *guanidium thiocyanate* (GuSCN). Selanjutnya asam nukleat akan bergabung dengan partikel silika atau diatom yang terdapat dalam reagen. Diatom merupakan bahan yang mengikat RNA, baik yang berasal dari jaringan, darah atau cairan tubuh lainnya (Boom et al., 1990; Dwiyanti et al., 2017; Hatta et al., 2017; Hatta & Smits, 2007).

Volume sampel sekitar 100 µg/ul darah dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocianate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100. Selanjutnya ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50ml H<sub>2</sub>O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom ini dapat mengikat 10 µg RNA darah, kemudian dilakukan *vortex* dan disentrifugasi di dalam tabung *ependorf* 1.5 ml dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2". Selanjutnya dilakukan *vortex* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCL pH 8.0, kemudian dilakukan *vortex* dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, kemudian diinkubasi dalam *oven* selama 10 menit pada suhu 56°C. Kemudian dilakukan *vortex* dan sentrifugasi ulang selama 30 detik pada

kecepatan 13.000 rpm dan diambil supernatannya. *Supernatan* dari proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  sebelum dilakukan analisis PCR (Boom et al., 1990; Dwiyantri et al., 2017; Farsida et al., 2020; Hatta et al., 2017; Hatta & Smits, 2007).

### 5.8.2. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 dengan *metode real time Polymerase Chain Reaction (RT PCR)*

Proses pemeriksaan gen spesifik oligonukleotida primer untuk gen TLR2/TLR4 dan GAPDH sebagai housekeeping gene (internal control). Mendeteksi gen mRNA TLR2/TLR4 dengan menggunakan primer spesifik forward dan Reverse (Table 5.1)

Tabel 5.1 Primers for real-time RT-PCR

Name	Sequences (5'-3')	Annealing temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Product size (bp)
TLR2	F: ATTGTGCCCATGCTCTTTC R: CTGCCCTTGCAGATACCATT	60	311
TLR4	F: CCGCTTTCACTTCCTCTCAC R: CATCCTGGCATCATCCTCAC	60	167
$\beta$ -actin	F: CAAGATCATTGCTCCTCCTG R: ATCCACATCTGCTGGAAGG		

Kondisi PCR dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  selama 10 detik dan  $57^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik sebanyak 40 siklus. Dan disesuaikan dengan protocol Tomomi Yajima dimana qRT PCR menggunakan sybgreen qRT-PCR master mix kit, satu tahap (Yajima et al., 1998). Protokol ini dioptimalkan untuk instrument realtime PCR machine CFX Connect System (USA) Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna



berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR.

Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam reaksi, diencerkan 1 :500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Mengencerkan 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es. Mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 4°C dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang.

Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini.

Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl termasuk mRNA sampel yang diekstraks sesuai protokol Hatta et al.(2017).

12,5 µl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna referens dari tahap 1 (opsional) serta 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 25 µl total volume reaksi juga dapat digunakan. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan x µl RNA percobaan pada setiap tabung reaksi. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi). Reaksi disentrifuse dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan

menggunakan mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA)

### **Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)**

Untuk kuantifikasi relatif ekspresi gen hTR maka dibuat kalibrasi kurva dimana RNA GAPDH, sebagai housekeeping enzim, digunakan sebagai kontrol endogen. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi.

Dua rumus untuk log ng hTR dan GAPDH adalah sebagai berikut:

KONSENTRASI ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).

Contoh :

Konsentrasi ekspresi mRNA gen TLR2 /TLR4 target =  $-3.26x + 28.63$   
(r=0,999)

Konsentrasi ekspresi mRNA gen GAPDH =  $-3.19x + 26.46$  (r= 0.997).

Biasanya berat sampel awal sekitar 50 ng mRNA (= log50 = 1.698)

Bila nilai Ct sampel adalah dimasukkan kedalam rumus untuk gen TLR2/TLR4 atau GAPDH maka konsentrasi hTR atau GAPDH dapat dihitung.

Untuk menormalkan perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke setiap reaksi, hTBP adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen.

Normalisasi konsentrasi gen target, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen target di berbagai

sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi target oleh konsentrasi hTBP.

Untuk membandingkan 2 sampel gen

Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct).

Kuantisasi relatif ekspresi gen target dievaluasi menggunakan metode perbandingan Ct.

Nilai  $\Delta Ct$  ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari  $\beta$ -actinnya.

Perhitungan  $\Delta\Delta Ct$  ialah nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel ASC sebagai kalibrator dikurangi nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel kelompok normal.

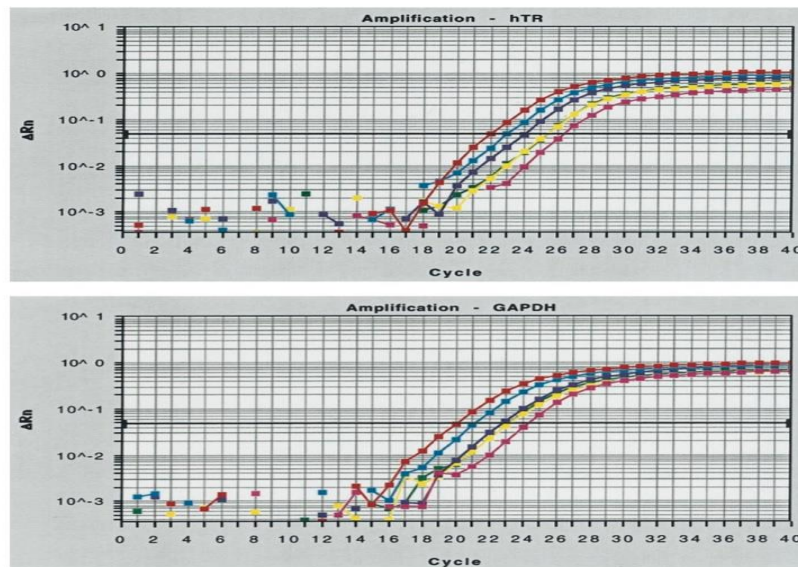
Kelipatan perubahan dari ekspresi dari gen target yang setara dengan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

RUMUS :

Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 =  $[2^{-\Delta\Delta Ct}]$

Dimana :

$\Delta\Delta Ct = \{\text{rata rata (triplicate)Ct } (\Delta Ct_1) \text{ sampel 1}\} - \{\text{rata rata (triplicate)Ct}(\Delta Ct_2) \text{ sampel 2}\}$  (Farsida et al., 2020; Hatta et al., 2017; Peng et al., 2008; C.-L. Tang & Chen, 2009; Yajima et al., 1998).



**Gambar 5.1** Grafik amplifikasi real time PCR (39)

### 5.8.3. Pemeriksaan kadar Protein serum, TLR2 dan TLR4 dengan metode *Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

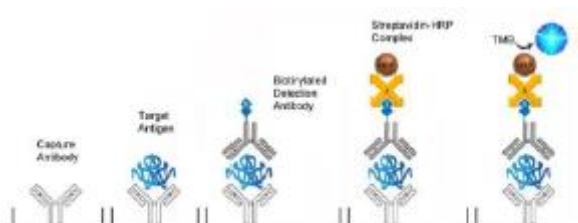
Sampel serum penderita disiapkan bersama seluruh reagen sesuai dengan KIT yang digunakan dan diperlukan dalam suhu kamar sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara rangkap dua (duplo) untuk menjamin kebenaran atau validitas hasil ELISA. Hasil dilaporkan sebagai rata-rata dari kedua serial pengukuran per sampel.

#### a. Prinsip Pengukuran

Pemeriksaan protein serum TLR2 dan Protein TLR4 berdasarkan prinsip ELISA *sandwich*. Setiap plat well mikrotiter yang disediakan telah dilapisi dengan antibodi (Ab) *capture* terhadap target spesifik. Standar atau sampel mengandung antigen (Ag) target ditambahkan ke well dan Ag target selanjutnya berikatan dengan Ab

*capture*. Standar atau sampel yang tidak terikat dicuci dan dibuang. Antibodi deteksi terkonjugasi biotin kemudian ditambahkan untuk dapat mengikat Ag yang tertangkap (Ag-Ab kompleks). Antibodi deteksi yang tidak terikat dicuci dan dibuang. Konyugat *Avidin-Horseradish*.

*Peroxidase* (HRP) kemudian ditambahkan untuk mengikat biotin. Konjugat Avidin-HRP yang tidak terikat dicuci. Substrat TMB ditambahkan kemudian bereaksi dengan enzim HRP pengembangan warna. Larutan *stop solution* asam sulfur ditambahkan untuk menghentikan reaksi pengembangan warna dan densitas optik (OD) *well* kemudian diukur pada panjang gelombang  $450 \pm 2$  nm. Densitas optik dari sampel yang tidak diketahui dibandingkan dengan kurva standar OD yang dihasilkan menggunakan konsentrasi Ag yang telah diketahui untuk menentukan konsentrasi Ag sampel.



**Gambar 5.2** Prinsip ELISA Sandwich

- b. Alat dan Bahan untuk pemeriksaan kadar protein, TLR 2 dan TLR4 dengan ELISA

Pemeriksaan kadar protein serum TLR2 dan TLR4 menggunakan tabung separator gel, cup sampel, sentrifus, Kit Elisa, serum, microplate reader dengan filter panjang gelombang 450nm pipet presisi, tip pipet,

tabung *ependorf*, inkubator 37oC, air deionisasi atau air suling, kertas absorban, ELISA reader (*Reader 270, Biomeriaux*), kit reagent. Human TLR2 ELISA Kit Catalog No: LS-F12773; Human TLR4 ELISA Kit Catalog No: LS-F22086,

- c. Pemeriksaan Sampel dengan ELISA (Wahyuni TD, 2021)  
(Wikanningtyas TA, 2019) (Farsida, 2020)

#### 1. Preparasi Sampel

Nilai densitas optik (OD) yang dihasilkan harus berada dalam nilai OD kurva standar agar konsentrasi antigen yang dihitung akurat. Dalam kasus sampel volume kecil, langkah pertama dalam pemeriksaan ini adalah pengenceran dengan perbandingan 1:10. Kemudian menjalankan pemeriksaan duplikat atau well rangkap dua untuk setiap sampel yang akan diperiksa. Selalu encerkan sampel dalam buffer yang sama dengan Standar yang digunakan untuk menghasilkan Kurva Standar.

#### 2. Preparasi Standar protein TLR 2 dan TLR4

Pengenceran Standar untuk menghasilkan kurva standar. Kurva standar digunakan untuk menentukan konsentrasi antigen target pada sampel yang tidak diketahui (lihat bagian Perhitungan Hasil). Berikut ini persiapan volume yang cukup untuk menjalankan seri pengenceran Standar dalam rangkap dua (duplikat). Standar yang

telah direkonstitusi dan diencerkan harus segera digunakan (sekali pakai) dan tidak disimpan untuk penggunaan selanjutnya.

*Stock Solution* standard TLR2 (4000 pg/mL), TLR 4 (20ng/mL), IL6 (200 pg/mL): Resuspensi 1 tabung Standar dengan 1,0 mL Pengencer Sampel. Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit dengan agitasi yang lembut (hindari busa). Standar negatif hanya berisi pengencer sampel saja.

### 3. Preparasi Reagen TLR2 dan TLR2

Semua reagen ditaruh di suhu kamar sebelum digunakan. Reagen Deteksi A dan B: Gunakan stok Reagen Deteksi A dan B untuk menyiapkan volume Larutan Kerja Reagen Deteksi A dan B yang cukup untuk jumlah well yang akan di jalankan. Encerkan Reagen Deteksi A dan B perbandingan 1: 100 uL menggunakan Diluent A dan B. *Buffer Wash* 1x: ke tiap sumur. Jika terbentuk kristal dalam konsentrat, hangatkan di suhu kamar dan campurkan dengan lembut sampai kristal benar-benar larut. Siapkan 600 mL buffer pencuci kerja dengan mengencerkan 20 mL buffer pencuci konsentrat 30x yang disediakan dalam kit dengan 580 mL air deionisasi atau suling. Buffer pencuci kerja dapat disimpan pada suhu 4°C setelah disiapkan. Larutan Substrat TMB: Dengan menggunakan teknik steril, keluarkan volume larutan Substrat yang berisi cairan 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) yang dibutuhkan

sesuai jumlah well yang akan dijalankan. Buang larutan Substrat TMB yang tidak digunakan.

#### 4. Prosedur Kerja Tes TLR2 dan TLR4

Reagen dan sampel di bawa ke suhu kamar tanpa pemanasan tambahan dan aduk rata dengan lembut memutar sebelum pipetting (hindari busa). Siapkan reagen, standar kerja, dan sampel serum. Tambahkan 100  $\mu$ L cairan standar yang berisi recombinant human protein TLR2/TLR4 dari KIT yang telah ditentukan atau dilusi sampel dari serum penderita ke masing-masing well dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Aspirasi dari setiap sumur dan dicuci dengan cairan Phosphate Buffered Saline (PBS) steril . Proses pencucian ini dilakukan 4 kali secara berturut turut.dan ditambahkan 200  $\mu$ L cairan 'conjugate' yang berisi streptavidin '*horseradish peroxidase*' (HRP) kedalam setiap sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 4 kali dengan menggunakan cairan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 200  $\mu$ L larutan substrat yang berisi cairan 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) kedalam setiap sumur dan inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar yang mana mikroplate disimpan pada keadaan gelap untuk menghindari cahaya. Setelah selesai diinkubasi reaksi dihentikan dengan menambahkan 50  $\mu$ L cairan larutan penghenti yang berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kedalam setiap sumur



dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. menggunakan *ELISA Reader 270*.

#### 5. Penentuan kadar protein serum TLR2 dan TLR4

Kadar protein serum TLR2 dan TLR4 dilaporkan dalam satuan ng/mL.

### 5.9. Analisa Data

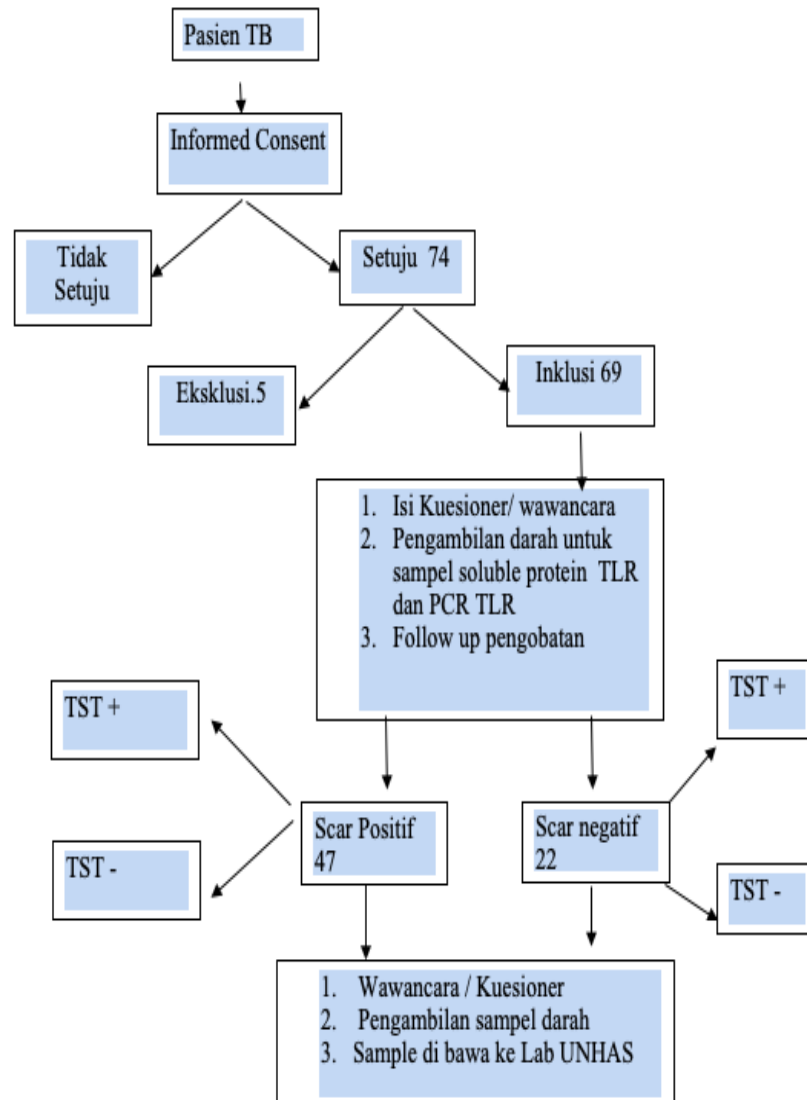
Semua analisis statistik dilakukan dengan SPSS versi 23 untuk Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Uji normalitas data pengukuran dilakukan dengan menggunakan koefisien kurtosis dan skewness serta uji Kolmogorof Smirnov. Data yang terdistribusi secara normal disajikan sebagai mean  $\pm$  standar deviasi, dan perbedaan intragroup diselidiki menggunakan analysis of variance (ANOVA) atau uji t Student bila perlu. Data yang tidak terdistribusi normal disajikan sebagai median (kuartil), dan perbedaan intragroup dibuat menggunakan uji Kruskal-Wallis atau Mann-Whitney jika diperlukan. Variabel kategori dinyatakan sebagai jumlah kasus dan persentase (%). Korelasi variabel untuk masing-masing kelompok ditentukan dengan menggunakan koefisien korelasi Pearson (r) atau korelasi rank Spearman koefisien (rs) bila perlu. Nilai  $P \leq 0,05$  (uji 2 sisi) dianggap signifikan secara statistik.

### 5.10. Etika Penelitian

Semua subyek penelitian akan mendapatkan penjelasan mengenai tujuan, prosedur penelitian, keuntungan dan kerugian penelitian. Setelah

subyek penelitian mendapatkan penjelasan, subyek berhak untuk menyetujui atau menolak menjadi peserta penelitian. Hasil pemeriksaan dan identitas subyek penelitian akan dirahasiakan. Penelitian ini akan diajukan pada Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makasar untuk memperoleh surat lulus kaji etik/*ethical clearance* untuk mendapartkan pengesahan sebelum dimulai.

### 5.11. Alur Penelitian



**Gambar 5.3** Alur Penelitian

### 5.12. Definisi Operasional

- a. **Usia** adalah lama hidup yang dihitung sejak lahir hingga saat penelitian dilakukan dengan satuan tahun, jika  $\geq 6$  bulan akan digenapkan ke tahun di atasnya, namun jika dibawah 6 dibulatkan

ke tahun nya . Data diambil dari rekam medis dengan hasil ukur berupa angka dibagi lagi dalam beberapa kelompok umur yaitu usia 0- 5 tahun , usia 6-12 tahun dan usia 13-18 tahun . Data yang didapat merupakan skala rasio

- b. **Jenis kelamin** adalah gender dimana data didapatkan dari observasi dan dari rekam medis, yang dibagi sebagai kelompok laki-laki dan kelompok perempuan dan merupakan skala nominal.
- a. **Scar BCG** adalah bekas luka pada daerah penyuntikan vaksin BCG yang diawali seperti bisul kemudian pecah dan mengeras menjadi jaringan parut di lokasi lengan atas tangan kanan, atau paha kanan atau paha kiri bekas lokasi suntikan BCG. Anamnesis riwayat vaksin / lihat buku imunisasi. Jika orang tua lupa pernah divaksin BCG atau tidak disimpulkan tidak vaksin .Scar BCG positif bila ditemukan jaringan parut dan scar negatif bila tidak ditemukan jaringan parut dan merupakan skala nominal.
- b. **Status gizi** adalah penampilan keadaan gizi anak berdasarkan BB terhadap TB pada kurva WHO buat anak usia 0 sampai 5 tahun dan pada kurva CDC NCHS untuk anak usia di atas 5 tahun. Penentuan status gizi sesuai kriteria Waterlow WHO 2006 dan CDC 2000 (tabel 2.2) Dikelompokkan menjadi status normal jika gizi baik dan tidak normal jika gizi buruk ,gizi kurang, obesitas dan overweight. merupakan skala ordinal .

- c. **Kontak TB** adalah kondisi jika di dalam rumah tinggal terdapat orang dewasa yang kontak erat dengan pasien dan mendapat pengobatan OAT saat atau sebelum pasien didiagnosis sakit TB, tidak dipengaruhi oleh hasil pemeriksaan BTA positif atau negatif merupakan skala nominal
- d. **TST** adalah Tuberculin Skin Test salah satu test diagnostik untuk mendeteksi apakah seseorang telah terpapar MTB, dengan menyuntikan intradermal 0,1 ml Tuberculin buatan Bio Farma yaitu Tuberculin PPD RT 23-SSI-(Purified Protein Derivative,) RT 23 dengan kekuatan 2 tuberculin units ( T.U dimana 1 T.U =0.02 mcg Tuberkulin PPD RT 23). Penyuntikan di volar lengan bawah, setelah penyuntikan dinilai indurasi yang terjadi setelah 48 – 72 jam. Pengukuran dilakukan terhadap indurasi yang timbul, bukan pada bagian yang hiperemis atau eritemanya. Test Tuberkulin dinyatakan positif bila indurasi  $\geq 10$ , dan negatif bila indurasi  $< 10$ .
- e. **Derajat Klinis** adalah pengamatan klinis untuk membuat keputusan terkait kelainan intraparu saja atau dan keterlibatan organ lain (ekstraparu), yang membutuhkan rawat inap, tindakan medis, pemberian terapi intravena , dan rencana monitoring lanjutan yang diperlukan rutin dalam 2 bulan pertama . Derajat klinis tidak berat jika klinis ringan , intraparu atau ekstraparu, tidak rawat inap, tidak butuh tindakan medis, tidak ada penggunaan terapi intravena, tidak butuh monitoring ketat. Derajat klinis berat jika klinis berat dengan

komplikasi intraparu atau ekstraparu, dirawat inap, butuh tindakan medis, terapi intravena, butuh monitoring ketat, merupakan skala ordinal.

- f. **Diagnosisi TB** adalah penggolongan diagnosis berdasarkan lokasi infeksi tuberkulosis / keterlibatan organ selain Paru. TB paru (TBP) jika hanya kelainan paru saja atau dengan/ tanpa limfadenopati leher, sedangkan TB ekstraparu (TBEP) jika ditemukan kelainan luar paru saja atau dengan tanpa kelainan intra paru, merupakan skala ordinal
- g. ***Toll-like receptors (TLR)*** adalah kelas protein yang memainkan peran kunci dalam sistem kekebalan bawaan dan berperan sebagai reseptor. Reseptor ini mengenali bagian-bagian spesifik mikroba, misalnya LPS, flagela, dan DNA virus. TLR2 dan TLR4 memiliki peran penting dalam mengenal kuman MTB. Kadar proteinnya diukur dengan pemeriksaan serum menggunakan metode ELISA dan dinyatakan dalam satuan masing-masing ng/mL, dan merupakan skala numerik
- h. **Ekspresi mRNA Gen TLR 2 dan mRNA Gen TLR4** adalah gen yang mengkode TLR yang akan diukur dengan pemeriksaan mRNA gen dengan menggunakan kuantitatif RT-PCR dan dinyatakan dalam satuan jumlah kopi/uL atau fold change merupakan skala numerik

- i. **Tuberkulosis pada anak** adalah kondisi yang terjadi jika seorang anak didiagnosis oleh Sp.A dengan Tuberkulosis atas dasar anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan laboratorium, pemeriksaan uji tuberkulin, dan pemeriksaan radiologi dan pemeriksaan lain jika dibutuhkan untuk menentukan diagnosis, di masukkan dalam sistim skoring TB jika skoring lebih atau sama dengan 6 didiagnosis TB merupakan skala nominal
- j. **Vaksinasi BCG** adalah vaksin yang diberikan untuk melindungi diri dari MTB . Vaksin BCG yang digunakan di Indonesia buatan pabrik PT Bio Farma, asal strain BCG yang diturunkan dari Pasteur 1173, data vaksin hanya ditanyakan recall apakah anak mendapat vaksin BCG saat bayi , dimana, ada bukannya atau tidak, merupakan skala nominal.

## BAB VI

### HASIL PENELITIAN

#### 6.1. Karakteristik Subjek

Penelitian telah dilakukan di RS Bhakti Medicare Cicurug dan RS Islam Sukapura Jakarta Utara dan RS Islam Cempaka Putih di Wilayah Jakarta Timur, pada pasien anak yang didiagnosis tuberkulosis oleh dr anak di rumah sakit tersebut. Jumlah subjek penelitian berjumlah 74 orang namun dikeluarkan sebanyak 5 anak karena setelah di wawancara tidak pernah divaksinasi, sehingga hanya 69 dilakukan analisis.

**Tabel 6.1** Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik Responden		Jumlah	Persen
Jenis Kelamin	Laki-laki	36	52,2%
	Perempuan	33	47,8%
Umur	0-5	38	55,1%
	6-12	22	31,9%
	13-16	9	13,0%
Gizi	Tidak normal	39	56,5%
	Normal	30	43,5%
Riw Kontak	Positif	34	49,3%
	Negatif	35	50,7%
Scar BCG	Positif	47	68,1%
	Negatif	22	31,9%
TST	Positif	38	55,1%
	Negatif	31	44,9%

Berdasarkan tabel 6.1 tampak subjek laki-laki 52,2%, kelompok subjek usia 0 sampai 5 tahun sebesar 55,1%, kelompok subjek tidak normal sebanyak 56,5%, tidak ditemukan subjek dengan gizi buruk, obesitas dan overweight semua gizi kurang dan gizi baik. Selanjutnya kelompok tidak normal disebut gizi kurang. Kelompok subjek dengan riwayat kontak positif



sebesar 49.3 %, kelompok subjek dengan uji tuberkulin positif sebanyak 55,1%, dan kelompok subjek dengan scar positif sebesar 68.1%.

**Table 6.2** Nilai Biomarker yang Diperiksa

Biomarker	Mean (SD)	Nilai
Expr mRNA	n	69
	Mean (SD)	9,71 (2,15) fc
TLR2 (fc)	Minimal - maksimal	5,13 – 12,99 fc
Ekspr mRNA	n	69
	Mean (SD)	11,63 (2,17) fc
TLR4 (fc)	Minimal - maksimal	7,09 – 14,92 fc
Kadar TLR2 serum (ng/mL)	n	69
	Mean (SD)	26,22 (12,39) ng/mL
	Minimal - maksimal	2,82 – 48,40 ng/mL
Kadar TLR4 serum (ng/mL)	n	69
	Mean (SD)	13,46 (3,93) ng/mL
	Minimal - maksimal	6,00 – 20,37 ng/mL

Adapun Kadar TLR2 serum berkisar 28,22 – 48,40ng/mL dengan rerata dan simpang baku 26,22 (12,39) ng/mL TLR4 serum antara 6,00 – 20,38 ng/mL dengan rerata dan simpang baku 13,460 (3,94) ng/mL Exp mRNA gen TLR2 antara 5,14 – 12,99 fc dengan rerata dan simpang baku 9,71 (2,16) fc. Exp mRNA gen TLR4 antara 7,09 – 14,92 fc dengan rerata dan simpang baku 11,64 (2,17) fc

**Tabel 6.3** Karakteristik Subjek berdasarkan Scar BCG

Karakteristik		Total (n=69)	BCG scar (+) (n=47)	% 68,1	BCG scar (-) (n=22)	% 31,9	p- value
Jenis	Perempuan	33	25	75,8	8	24,2	0,192
Kelamin	Laki-laki	36	22	33,3	14	66,7	
Usia	< 6 tahun	38	28	73,6	10	26,3	0,768
	6 – 18 tahun	31	19	61,2	12	38,7	
Status Gizi	Kurang	39	26	66,7	13	33,3	0,272
	Normal	30	21	70,0	9	30,0	
Riw Kontak TB	Tidak ada	35	23	65,7	12	34,3	0,664
	Ada	34	24	70,6	10	29,4	
TST	Negatif	31	20	64,5	11	35,5	0,562
	Positif	38	27	71,1	11	28,9	

\*Chi Square

Kelompok umur dibagi lagi menjadi 2 dibawah dan diatas 6 tahun, terkait dengan usia balita yang berisiko terinfeksi, dan tabel 6.2 menunjukkan bahwa berdasarkan ada tidaknya scar BCG, tidak ditemukan perbedaan bermakna antara kelompok subjek berdasarkan jenis kelamin , usia , status gizi, riwayat kontak dan uji tuberkulin. ( $p > 0,05$ )

**Tabel 6.4** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Jenis Kelamin

Biomarker		Jenis Kelamin		Nilai p
		Perempuan (n=33)	Laki-laki (n=36)	
Exp mRNA TLR2 serum (fc)	Mean (SD)	10,20 (1,79)	9,26 (2,38)	0,070
	95%IK	9,57 – 10,84	8,45 – 10,06	
Exp mRNA TLR4 serum (fc)	Mean (SD)	12,09 (2,13)	11,22 (2,15)	0,098
	95%IK	11,33 – 12,84	10,49 – 11,95	
Kadar TLR2 Serum (ng/mL)	Mean (SD)	28,90 (12,27)	23,77 (12,15)	0,086
	95%IK	24,54 – 33,25	19,65 – 27,88	
Kadar TLR4 Serum(ng/mL)	Mean (SD)	14,28 (3,39)	12,70 (4,28)	0,094
	95%IK	13,08 – 15,49	11,25 – 14,14	

\*Independent t test

Ekspresi mRNA gen TLR2 10,20 fc dan ekspresi mRNA gen TLR4 12.09 fc, lebih tinggi pada anak perempuan dibandingkan anak laki-laki.

Kadar serum TLR 2 dan TLR4 pada anak perempuan 28.90 ng/mL dan 14,28 ng/mL lebih tinggi dibandingkan anak laki-laki, namun tidak ada perbedaan bermakna. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya tidak dipengaruhi perbedaan jenis kelamin ( $p>0,05$ )

**Tabel 6.5** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Kelompok Usia

Biomarker	Kelompok Usia	Nilai Statistik		Nilai p*
		Mean (SD)	95% IK	
Exp mRNA TLR2 (fc)	1 – 6 th (n=38)	9,51 (2,08)	8,83 – 10,19	0,393
	6 –18 th (n=31)	9,96 (2,26)	9,13 – 10,79	
Exp mRNA TLR4(fc)	1 – 6 th (n=38)	11,40 (2,14)	10,69 – 12,11	0,319
	6 –18 th (n=31)	11,90 (2,21)	11,11 – 12,74	
Kadar TLR2 (ng/mL)	1 – 6 th (n=38)	25,54(11,84)	21,65 – 29,43	0,615
	6 –18 th (n=31)	27,06(13,18)	22,23 – 31,90	
Kadar TLR4 (ng/mL)	1 – 6 th (n=38)	12,99 (3,66)	11,79 – 14,19	0,278
	6 –18 th (n=31)	14,03 (4,24)	12,48 – 15,59	

\* Independent t test

Hasil yang tertera pada tabel di atas menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen TLR2 pada kelompok usia 6-18 adalah 9.96 fc tidak jauh berbeda dengan kelompok usia dibawahnya 9.51 fc , demikian juga ekspresi mRNA gen TLR4 adalah 11.90 fc VS 11.40 fc , kedua kelompok tidak berbeda bermakna. ( $p>0,05$ ). Kadar serum TLR 2 dan TLR4 pada usia 6-18 tahun lebih tinggi dibandingkan kelompok usia dibawahnya 25.54 ng/mL dan 12.99 ng/mL namun tidak ada perbedaan bermakna . Ekspresi mRNA gen

TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya tidak dipengaruhi kelompok usia. ( $p > 0.05$ )

**Tabel 6.6** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Status Gizi

Biomarker		Status Gizi		Nilai p*
		Kurang (n=39)	Baik (n=30)	
Exp mRNA	Mean (SD)	9,58 (2,15)	9,87 (2,18)	0.585
TLR2 (fc)	95%IK	8,88 – 10,28	9,06 – 10,69	
Exp mRNA	Mean (SD)	11,61 (2,17)	11,67 (2,20)	0.911
TLR4 (fc)	95%IK	10,90 – 12,31	10,84 – 12,49	
Kadar TLR2 (ng/mL)	Mean (SD)	26,27 (12,30)	26,16 (12,72)	0,971
	95%IK	22,28 – 30,26	21,41 – 30,91	
Kadar TLR4 (ng/mL)	Mean (SD)	13,28 (3,92)	13,68 (4,00)	0,677
	95%IK	12,01 – 14,55	12,19 – 15,18	

\*Independent t test

Hasil yang tertera pada tabel di atas menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 pada gizi kurang (9,58 fc dan 11,61 fc) tidak ada perbedaan dengan gizi baik. Kadar protein TLR 2 dan TLR4 pada gizi kurang (26,27 ng/mL dan 13,28 ng/mL) tidak berbeda dengan gizi baik. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya tidak dipengaruhi status gizi ( $p > 0,05$ )

**Tabel 6.7** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Riwayat Kontak TB

Biomarker		Riwayat Kontak		Nilai p*
		Positif (n=35)	Negatif (n=34)	
Exp mRNA	Mean (SD)	9,62 (2,18)	9,80 (2,16)	0.731
TLR2 (fc)	95%IK	8,87 – 10,37	9,05 – 10,55	
Exp mRNA	Mean (SD)	11,55 (2,14)	11,72 (2,22)	0.750
TLR4 (fc)	95%IK	10,81 – 12,29	10,94 – 12,50	
Kadar TLR2 (ng/mL)	Mean (SD)	26,69 (12,66)	25,73 (12,27)	0,750
	95%IK	22,34 – 31,04	21,45 – 30,02	
Kadar TLR4 (ng/mL)	Mean (SD)	13,32 (4,04)	13,60 (3,87)	0,770
	95%IK	11,93 – 14,71	12,25 – 14,95	

\*Independent t test

Hasil yang tertera pada tabel di atas menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang ada kontak TB (9,62 fc dan 11,55 fc) tidak ada perbedaan dengan yang tidak memiliki riwayat kontak TB. Kadar serum TLR 2 dan TLR4 pada kelompok yang memiliki riwayat kontak TB (26,69 ng/mL dan 13,32 ng/mL) tidak berbeda dengan yang tidak ada riwayat kontak TB. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya tidak dipengaruhi riwayat kontak TB ( $p > 0,05$ )

**Tabel 6.8** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Temuan Scar BCG

Biomarker		Temuan Scar		Nilai p*
		Positif (n=47)	Negatif (n=22)	
Exp mRNA	Mean (SD)	10,96 (1,10)	7,03 (1,19)	<0,001
TLR2 (fc)	95%IK	10,64 – 11,29	6,51 – 7,56	
Exp mRNA	Mean (SD)	12,89 (1,08)	8,94 (1,25)	<0,001
TLR4(fc)	95%IK	12,58 – 13,21	8,39 – 9,50	
Kadar TLR2 (ng/mL)	Mean (SD)	32,78 (8,60)	12,21 (5,77)	<0,001
Kadar TLR4 (ng/mL)	95%IK	30,25 – 35,30	9,66 – 14,77	
Kadar TLR4 (ng/mL)	Mean (SD)	15,54 (2,76)	7,03 (1,19)	<0,001
Kadar TLR4 (ng/mL)	95%IK	14,72 – 16,35	8,24 – 9,78	

\*Independent t test

Hasil yang tertera pada tabel di atas menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA TLR4 pada kelompok yang memiliki scar BCG (10,96 fc dan 12,89 fc) lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak memiliki scar BCG. Kadar serum TLR 2 dan TLR4 pada kelompok yang memiliki scar BCG (32,78 ng/mL dan 15,54 ng/mL) berbeda jauh

dengan yang tidak ada scar BCG. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya dipengaruhi adanya scar ( $p < 0,05$ )

**Tabel 6.9** Faktor yang berhubungan dengan Derajat Klinis

Karakteristik	Derajat Klinis		Nilai p	
	Tidak Berat (n=69)	Berat (n=5)		
Jenis	Laki laki	38 (51,4%)	1 (1,4%)	p=0,147
Kelamin	Perempuan	31 (41,9%)	4 (5,3%)	
Kelompok	1 – 5 tahun	41 (55,4%)	0 (0,0%)	p<0,001
Usia	6 – 12 tahun	22 (29,7%)	1 (1,4%)	
	13 – 16 tahun	6 (8,1%)	4 (5,4%)	
Status Gizi	Kurang	39 (52,7%)	3 (4,1%)	p=0,629
	Baik	30 (40,5%)	2 (2,7%)	
Riwayat	Positif	34 (46,9%)	4 (5,4%)	p=0,196
Kontak TB	Negatif	35 (47,3%)	1 (1,4%)	
Scar	Tidak ada	27 (100,0%)	0 (0,0%)	p=0,095
	Ada	42 (89,4%)	5 (19,6%)	

\*Chi-square test; \*\*Fisher's Exact test.

Tabel 6.9 . Pada tabel ini jumlah subjek adalah 74 yaitu ada 5 subjek yang dikeluarkan karena tidak memiliki scar dan tidak imunisasi. Pada, tabel ini diikutkan dianalisa. Dan didapatkan bahwa tidak ditemukan perbedaan karakteristik yang bermakna ( $p > 0,05$ ) antara penderita dengan derajat klinis yang berat dan yang tidak berat; kecuali pada kelompok usia. Penderita dengan derajat klinis yang berat ditemukan pada usia diatas >5 tahun; dan banyak pada kelompok 13-16 tahun

**Tabel 6.10** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Derajat Klinis

Biomarker		Derajat Klinis		Nilai p
		Berat (n=5)	Tidak berat (n=64)	
Eksp mRNA TLR2(fc)	Mean (SD)	11,68 (1,20)	9,55 ( 2,14)	0,033
	95%IK	10,18 –13,17	9,02 –10,09	
Eksp mRNA TLR4(fc)	Mean (SD)	13,58 (1,53)	11,48 (2,14)	0,037
	95%IK	11,66 –15,49	10,95 – 12,02	
Kadar TLR2 (ng/mL)	Mean (SD)	34,49 (6,77)	25,57 (12,53)	0,122
	95%IK	26,08 –42,90	22,44 –28,70	
Kadar TLR4 (ng/mL)	Mean (SD)	16,96 (2,57)	13,18 (3,90)	0,038
	95%IK	13,76 –20,16	12,21 –14,16	

\*Independent t test

Tabel di atas menunjukkan bahwa ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA TLR4 pada kelompok derajat berat (11,68 fc dan 13,58 fc) lebih tinggi dari kelompok derajat tidak berat, dan berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ). Kadar serum TLR 2 dan TLR4 pada kelompok derajat klinis berat (34,49 ng/mL dan 16,96 ng/mL) lebih tinggi dibandingkan kelompok derajat tidak berat dan berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ) **kecuali pada** kadar TLR2. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar protein TLR4 dipengaruhi derajat sakit ( $p < 0,05$ ) namun tidak ada perbedaan bermakna pada kadar TLR2 ( $p > 0,05$ ). Pasien dengan derajat klinis berat adalah 1 anak meningitis TB, 1 anak Spondilitis TB, 2 anak Efusi Pleura masif, dan 1 anak Pleuritis TB, mereka adalah yang dirawat inap, memerlukan obat intravena dengan atau tanpa tindakan medik seperti pungsi pleura atau pemasangan WSD.

**Tabel 6.11** Karakteristik Subjek Berdasarkan Diagnosis TB

Karakteristik		Total (n=69)	%	TBP (n=57) 82,6%	TBEP (n=12) 17,4%	p value
Jenis Kelamin	Perempuan	33	47.8	25	8	0.151
	Laki	36	52.2	32	4	
Umur	< 6 tahun	38	55.1	37	1	0,000
	6–18tahun	31	44.9	20	11	
Status Gizi	Kurang	39	56.5	32	7	0.889
	Baik	30	43.5	25	5	
Riwayat Kontak TB	Negatif	35	50.7	30	5	0.490
	Positif	34	49.3	27	7	
TST	Negatif	31	44.9	27	4	0.374
	Positif	38	55.1	30	8	
BCG Scar	Negatif	22	31.9	18	4	0.906
	Positif	47	68.1	39	8	

\* Chi square-test

Tabel 6.11. Pada tabel ini jumlah subjek adalah 69 subjek yaitu ada 57 (82,6%) subjek dengan diagnosis TBP ( TB paru ) dan 12 (17,4%) subjek TBEP (TB ekstraparu). Pada, tabel ini diikutkan dianalisis didapatkan bahwa ditemukan perbedaan karakteristik yang bermakna berdasarkan usia ( $p < 0,05$ ) namun tidak ada perbedaan bermakna berdasarkan karakteristik lainnya antara penderita dengan TBP dengan penderita TBEP ( $p > 0,05$ )



**Tabel 6.12** Perbedaan Nilai Biomarker berdasarkan Diagnosis TB

<b>Biomarker</b>	<b>Diagnosis TB</b>		<b>p value</b>
	<b>PTB (n = 57)</b>	<b>TBEP (n = 12)</b>	
Exp mRNA Mean (SD)	9.64 ( 2.22)	10.05 (1.89)	0.550
TLR2 (fc) Min- max	9.05- 10.23	8.85 -11.26	
Exp mRNA Mean (SD)	11.56 (2.18)	12.00 (2.20)	0.527
TLR4 (fc) Min- max	10.98 -12.14	10.60- 13.40	
TLR2 Mean (SD)	26.01 (12.60)	27.23 (11.80)	0.758
(ng/ml) Min- max	2.82- 48.40	4.55- 42.08	
TLR4 Mean (SD)	13.36 (3.89)	13.93 (4.31)	0.646
(ng/ml) Min- max	6.00 - 20.38	6.68 -1 9.82	

\* Independent t test

Tabel di atas menunjukkan ekspresi mRNA gen TLR2 pada TBEP tidak berbeda banyak dengan PTB ( 10.05 ng/mL VS 9.64 ng/mL) demikian juga ekspresi mRNA gen TLR4 pada TBEP vs PTB (12.00 ng/mL VS 11.56 ng/mL) . Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 tidak dipengaruhi diagnosis TB. ( $p>0.05$ ) Kadar TLR2 pada TBEP tidak berbeda jauh dengan TBP ( 27.23 ng/mL VS 26.01 ng/mL) demikian juga kadar TLR4 ( 13.93 ng/mL VS 13.36 ng/mL) , kesimpulan kadar TLR2 dan TLR4 tidak dipengaruhi diagnosis TB ( $p>0.05$ ).

Tampak diatas kadar TLR 2 lebih tinggi daripada kadar TLR4 pada subjek dengan TBP maupun TBEP. Pasien dengan TBEP adalah meningitis TB 1 anak , Spondilitis TB 1 anak Efusi Pleura massif 2 anak, Pleuritis TB 1 anak ,selainnya limfadenitis TB 7 anak .

**Tabel 6.13** Hasil Uji Korelasi antara Biomarker

<b>Korelasi</b>		<b>Bivariat</b>	
<b>Variabel 1</b>	<b>Variabel 2</b>	<b>koefisien</b>	<b>Nilai p</b>
Ekpresi mRNA Gen TLR2	Kadar TLR2 serum	r=0,871	<0,001
Ekpresi mRNA Gen TLR4	Kadar TLR4 serum	r=0,878	<0,001

*\*Pearson Correlation*

Dari Tabel 6.13 dapat dilihat adanya korelasi antara ekspresi mRNA gen TLR2 dan kadar protein TLR2  $r=0.871$  ( $p<0.05$ ) korelasi positif kuat. Demikian juga korelasi antara ekspresi mRNA Gen TLR4 dan kadar protein TLR4  $r=0.878$  ( $p<0.05$ ) korelasi positif kuat.

## **BAB VII**

### **PEMBAHASAN**

Penelitian ini merekrut 74 penderita TB dengan 69 subjek telah divaksinasi dan setelah dilakukan anamnesis ulang ternyata 5 subjek tanpa vaksinasi, kebanyakan subjek pada kelompok usia 0-5 tahun yaitu sebesar 55.1%, kebanyakan 57 (82,6%) anak menderita tuberculosis paru (TBP) hanya 12 anak 17,4% yang menderita tuberculosis ekstraparu (TBEP), kebanyakan penderita TBEP berusia diatas 10 tahun ke atas dengan manifestasi pada susunan saraf pusat, musculoskeletal, pleura dan kelenjar getah bening. Subjek penelitian cenderung anak laki-laki 52.2% , subjek yang berusia dibawah 5 tahun yaitu 55,1%, subjek dengan gizi kurang 56,5% dan sebanyak 49,3% seubjek memiliki riwayat kontak dengan penderita TB. Dilakukan pemeriksaan uji tuberkulin untuk semua kasus dan didapatkan 55,1% subjek hasilnya positif .

Komponen imunitas alami adalah barrier epithelial di kulit yang merupakan tempat pertama kali *Mycobakterium bovis* BCG masuk ke dalam tubuh, saat anak di vaksin. Terdapat 3 sel utama yaitu pertama keratinosit sebagai antigen presenting cells (APC) yang mengekspresikan TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, kedua sel Langerhans yang mengekspresikan TLR2, TLR3, TLR4, TLR8, dan TLR lainnya, ketiga melanosit yang berperan mengenali mikroba di epidermis. Lapisan dermis didominasi oleh *fibroblast* dan *dermal dendritic cells*, fibroblast mengekspresikan TLR3 dan

TLR4. (Moliva et al., 2017). Reseptor TLR2 dan TLR4 mengenal *Mycobacterium bovis* dipermukaan sel kemudian merekrut protein adaptor sehingga jalur transduksi sinyal terjadi dan terjadi peningkatan ekspresi sitokin, kemokin, proinflamasi untuk melindungi inang (Abbas et al., 2015).

Subjek penelitian anak yang telah divaksin BCG saat bayi, meskipun semua subjek sudah divaksin namun kemungkinan besar untuk sakit TB tetap ada, karena efektivitas proteksi vaksin hanya (42%-85%) (A. Roy et al., 2014). Vaksin BCG telah ada sejak lama, setelah vaksin didistribusikan ke berbagai laboratorium di seluruh dunia di mana subkultur BCG yang diulang lebih lanjut menyebabkan munculnya strain vaksin yang berbeda secara fenotipik, strain yang berbeda telah berevolusi disimpan di setiap negara mempengaruhi efektifitas vaksin tidak seperti saat awal (Ritz & Curtis, 2009; Trunz et al., 2006).

Pada saat vaksin disuntikan intrakutan pada subjek (beberapa tahun lalu) keterlibatan reseptor pengenalan bakteri (TLR) oleh sel imun di epitel kulit sangat berperan, namun tidak untuk saat ini, karena respon innate hanya 0-12 jam, selanjutnya antigen dipresentasikan oleh sel dendrit menuju respon imunitas adaptif yang lebih lama, lebih spesifik dan aktivasi sel T memori sehingga waktu responnya lebih lama 12 jam hingga 5 hari dengan sel T memori menjadi lebih lama hingga 10-20 tahun kemudian (Abbas et al., 2015; Ritz & Curtis, 2009; Trunz et al., 2006).

Studi genomik komparatif telah mendokumentasikan bahwa strain vaksin BCG telah berevolusi dan berbeda satu sama lain dan dari BCG asli

yang pertama kali digunakan pada tahun 1921, karenanya perbedaan genetik ini mempengaruhi protein antigeniknya dalam melawan MTB dan dapat mempengaruhi efektifitas vaksin BCG (Angelidou et al., 2020; Ritz & Curtis, 2009).

Berdasarkan terbentuk scar BCG, dari 69 subjek ada 47 anak (68,1%) dengan scar BCG semua di lengan kanan, dari berbagai penelitian presentasi terbentuknya jaringan parut pasca vaksin BCG 18% -97% (Benn et al., 2020; Rakhmawati & Yulianti, 2020; Schaltz-Buchholzer et al., 2020). Berbagai faktor seperti usia saat diberikan, riwayat tersensitisasi dengan mikroba lingkungan, berapa berat badan saat lahir kecil, usia gestasi, tehnik penyuntikan, pelaku pemberi vaksin, strain/ jenis vaksinnya, bagaimana cold change vaksinnya, timbul wheal dilokasi suntikan, apakah ibu memiliki scar BCG semua itu memberikan pengaruh terhadap pembentukan scar BCG dan efek protektifnya (Benn et al., 2020; Mangtani et al., 2014; A. Roy et al., 2014). Tabel 6.3. menunjukkan bahwa scar BCG yang terbentuk pada subjek dipenelitian ini tidak dipengaruhi oleh jenis kelamin, usia subjek, status gizi, dan kontak TB dengan nilai  $p > 0.05$ . Penelitian ini tidak menganalisa lebih jauh faktor yang berhubungan dengan pembentukan scar BCG.

Imunitas bawaan dinilai melalui pengukuran ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya TLR2 dan TLR4 pada anak yang sudah divaksin BCG namun sakit TB. Didapatkan rerata ekspresi mRNA gen TLR2 9.71 fc, dan mRNA gen TLR4 11,63 fc,

ekspresi TLR4 lebih tinggi dibandingkan TLR2. Sedangkan rerata kadar proteinnya TLR2 serum 26,22 ng/mL lebih tinggi daripada kadar TLR4 adalah 13,46 ng/mL. TLR2 dan TLR4 adalah 2 reseptor pengenalan yang penting untuk pengenalan struktur dinding mikobakterium sebagai respon pertama dalam melawan MTB. Reseptor TLR banyak terdapat pada sel imun yaitu monosit, makrofag, sel dendritik dan sel limfosit, sel mast, sel endotel dan jaringan adiposa (Kawasaki & Kawai, 2014; Moliva et al., 2017).

TLR2 lebih tinggi karena memiliki ligan yang lebih banyak seperti lipoprotein, HMBG 1, yang terdapat pada bakteri, virus, parasite, jaringan rusak dan lain-lain (Gambar 2.15). TLR2 juga membentuk heterodimer dengan TLR1 dan TLR6 yang berfungsi menguatkan fungsi TLR2. Berbagai sel imun memiliki reseptor TLR2 dan TLR4 seperti makrofag, Dendritik sel, neutrofil, sel B dan sel T dan sel lainnya. (Gambar 2.14). Penelitian meta-analisis pada dewasa memberikan gambaran adanya TLR SNPs terhadap kerentanan penyakit TB (Schurz et al., 2015). Keterlibatan genetic pada ekspresi mRNA gen TLR telah ditemukan seperti penelitian di China melaporkan ada polimorfisme nukleotida tunggal Genotipe TLR1 rs5743618 -GT berhubungan dengan kerentanan (TB) anak. Hal ini karena terjadi penurunan ekspresi permukaan TLR1 dalam monosit dan granulosit terlepas dari stimulasi dengan H37Rv yang tidak aktif (Qi et al., 2015).

Semua subjek telah mendapatkan terapi obat anti tuberculosi dan dilakukan tracing sumber penularannya. Penelitian meta-analisis studi prospektif dan retrospektif-dari anak yang terpapar tuberkulosi. Anak yang

terinfeksi namun tidak minum obat pencegahan memiliki insiden tuberkulosis dalam 2 tahun yang cukup tinggi dan bermakna daripada anak-anak belum terinfeksi. Dari 91% anak yang terinfeksi 63% terlindungi dari sakit TB semua pada anak <5 tahun yang menjadi sakit tuberkulosis, 83% didiagnosis dalam 90 hari dari kunjungan awal (Martinez et al., 2020). Pentingnya mencari sumber penularan, indeks kontak dilingkungan subjek di rumah dan sekitarnya.

### **7.1. Karakteristik berdasarkan usia**

Tuberkulosis anak merupakan faktor penting di negara berkembang karena jumlah anak berusia <15 tahun adalah 40%- 50% dari jumlah seluruh populasi. Penelitian ini mendapatkan penderita TB anak terbanyak pada kelompok usia 0 – 5 tahun 55,1%. Usia 0-5 tahun adalah usia yang rentan mendapatkan infeksi TB yang berat, selanjutnya subjek kelompok usia 6 – 12 tahun 31,9% dan 13% subjek berusia 13 tahun lebih .

Anak-anak antara usia 5-10 tahun berada pada risiko terendah untuk berkembang menjadi penyakit, sedangkan saat remaja membawa risiko yang lebih tinggi terkait reaktivasi MTB yang bermanifestasi sebagai penyakit aktif setelah bertahun-tahun penahanan yang berhasil (Marais et al., 2004) Pada penelitian ini didapatkan anak yang mengalami sakit berat 80% (4/5 anak) berada pada usia di atas 10 tahun (tabel 6.9), demikian juga didapatkan anak yang menderita TBEP cenderung pada anak berusia lebih besar > 5 tahun (tabel 6.11)

Hasil penelitian ini ekspresi mRNA gen TLR2 terjadi peningkatan sedikit sekali seiring bertambahnya usia, demikian juga pada mRNA gen TLR4, padahal makin tinggi kelompok usia makin sedikit jumlah subjeknya, namun nilai makin besar. Demikian juga kadar protein TLR2 dan kadar protein TLR4 menunjukkan sedikit peningkatan kadar protein dengan bertambah usia, namun tidak ditemukan perbedaan ke 4 nilai biomarker yang bermakna pada kedua kelompok umur ( $p > 0,05$ ). Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar proteinnya tidak dipengaruhi kelompok usia. ( $p > 0.05$ ).

Berdasarkan tabel 6.9 tentang faktor yang berhubungan dengan keparahan sakit dan 6.11 tentang faktor yang berhubungan dengan derajat keparahan sakit dan diagnosis TBP dan TBEP dipengaruhi oleh faktor usia ( $p < 0.05$ ) Pada populasi penelitian subjek yang berusia dibawah 6 tahun memiliki kecenderungan menderita TBEP (OR 0.49 (CI 95% 0.006-0.409  $p < 0.05$ ) dan kecenderungan menjadi sakit TB ringan (OR 1.192 (CI 95% 1.02-1.39  $p < 0.05$ ). Ada efek perlindungan vaksin BCG pada subjek dibawah < 6 tahun sehingga tidak ditemukan yang sakit berat. Nilai biomarker cenderung dipengaruhi oleh kelompok usia dan keparahan sakit atau TBEP.

Penelitian tentang imunitas adaptif dengan subjek yang sama oleh Farsida 2021 bahwa ekspresi mRNA gen Treg meningkat dengan bertambahnya usia, demikian pula kadar T reg dan kadar CD4 menunjukkan peningkatan dengan bertambahnya usia namun tidak




berbeda bermakna ( $p > 0.05$ ). Sebaliknya kadar CD8 awalnya menunjukkan kenaikan namun pada kelompok usia diatas 12 tahun kadarnya menurun dan tidak berbeda bermakna ( $p > 0.05$ ) (Farsida, 2021). Hal ini menunjukkan bahwa respon imunitas adaptif masih responsive disebabkan sifatnya yang memberikan respon lebih besar, lebih kuat dan lebih lama dibandingkan respon imunitas innate.

Penelitian respon imun innate dengan mengukur kadar IL10 dan TNF terhadap PPD yang diperantarai TLR2 dan LPS yang diperantarai TLR4 pada anak sebelum BCG dan sesudah vaksin BCG (5 bulan, 12 bulan dan 24 bulan) didapatkan bahwa tidak terjadi peningkatan sitokin IL10 dan pada usia 24 bulan malah menurun, demikian hal yang sama terjadi pada sitokin TNF- $\alpha$ . Namun terdapat perbedaan yang bermakna jika dibandingkan sebelum vaksin dan saat usia 24 bulan pada kadar IL-10 dan TNF- $\alpha$ , hal ini menunjukkan ada pengaruh vaksin terhadap respon imunitas (Djuardi et al., 2010).

Hasil yang berbeda pada respon imunitas adaptif dengan mengukur kadar IFN- $\gamma$  yang berfungsi meningkatkan ekspresi sel TCD4 (Th1) dan IL-5 dan IL13 (sitokin dari respon Th2) terhadap PPD, terjadi kenaikan kadar IFN- $\gamma$  hingga usia 2 tahun secara bermakna, namun kadar IL-5 dan IL-13 akan naik hingga usia 5 bulan, dan setelah itu kadarnya menurun. Terdapat korelasi dan bermakna antara pembentukan scar pasca vaksin BCG dengan IL-5 dan IL-13 hingga 5 bulan, namun sejalan bertambah usia korelasinya menurun. Parasit usus ibu juga dapat mempengaruhi tingkat

produksi sitokin pada anak, namun pola perubahan pola sitokin dari waktu ke waktu tidak terpengaruh lagi (Djuardi et al., 2010)..

Fitria 2016 meneliti kadar interferon gamma kultur sel limfosit anak yang mendapat vaksin BCG dan sehat didapatkan kenaikan kadar terjadi saat anak berusia diatas 10 tahun, tidak ada perbedaan bermakna dengan usia dibawahnya. (Liza Fitria, 2016) Anak usia balita merupakan usia dengan kemungkinan besar terinfeksi oleh orang dewasa yang menderita TB latent, bayi dan anak-anak berisiko penyakit diseminata yang lebih tinggi, termasuk meningitis TB dan TB milier, termasuk angka mortalitas tinggi pada anak usia 0-4 tahun dibanding usia lainnya (Thomas, 2017). Gambar di bawah ini menunjukkan angka penurunan risiko sakit TB paru dan TB diseminata dengan bertambahnya usia.



Age at primary infection	Infancy	1-2 years	2-5 years	5-10 years	10-15 years	Adulthood
Risk of pulmonary disease (%)	30-40	10-20	5	2	10-20	5-10*
Risk of disseminated disease (%)	10-20	2-5	0.5	<0.5	<0.5	<0.5

\* Lifetime risk. Adapted from Marais *et al.* IJTLD 2004

**Gambar 7.1** Risiko Penyakit Paru dan Penyakit Menular

Usia dan fungsi imunologi adalah berperan dalam keparahan penyakit, bayi dan anak kecil memiliki kecenderungan paling tinggi untuk berkembang menjadi penyakit aktif yang dapat meluas karena defisiensi terkait usia dan/atau penurunan regulasi faktor imunologi . Bayi yang

terinfeksi memiliki risiko 50% untuk berkembang menjadi penyakit TB, namun, risiko ini berkurang antara usia 5 dan 10 tahun, sebelum kemudian meningkat lagi saat anak-anak memasuki masa remaja (Sloot et al., 2014; Vanden Driessche et al., 2013).

Beberapa penelitian di Indonesia juga melaporkan kejadian penyakit TB banyak ditemukan pada anak dibawah 6 tahun namun penelitian yang melaporkan biomarker TLR 2/TLR4 masih terbatas sehingga belum dapat dibandingkan secara sesuai.(Husnah, 2017; Nasution et al., 2021; Putra & Amelia, 2013; Siregar et al., 2018).

## **7.2. Biomarker Berdasarkan Jenis Kelamin**

Subjek yang sakit TB pada penelitian 36 anak laki-laki (52,2%) dan kebanyakan 63,9% anak laki-laki berusia dibawah 6 tahun, 58.3% memiliki gizi kurang, 52,8% anak laki-laki memiliki riwayat kontak TB, subjek scar negatip 63.6% adalah anak laki, dan 5,6% anak laki-laki menderita TBEP dan hanya 2,8% anak laki-laki sakit TB berat. Tidak ditemukan hubungan yang bermakna antara diagnosis TB dan keparahan sakit dengan jenis kelamin ( $p>0.05$ )

Nilai ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 pada perempuan sedikit lebih tinggi dari laki-laki. Demikian juga pada kadar protein TLR2 dan TLR4 pada anak perempuan lebih tinggi dari pada anak laki-laki namun tidak didapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik. ( $p>0,05$ ) . Anak laki-laki yang sakit lebih banyak dari perempuan

nilai biomarker cenderung dipengaruhi faktor scar negatif dan kebanyakan kelompok usia dibawah 6 tahun yang rentan untuk terinfeksi. .

Subjek perempuan yang sakit TB 33 (47,8%) dari semua subjek perempuan yang berusia diatas 6 tahun sebanyak 54,5 %, yang gizi kurang 54,5%, dan 45,5% ada riwayat kontak TB, 75,8% subjek perempuan memiliki scar BCG, namun semuanya tidak berbeda bermakna berdasarkan jenis kelamin (  $p>0.05$ ) . Adanya scar BCG dan usia diatas 6 tahun keparahan dan sakit TBEP dapat mempengaruhi nilai biomarker yang meningkat pada anak perempuan.

Berdasarkan derajat sakit didapatkan 8 dari 12 yang sakit TBEP adalah perempuan , dan berdasarkan diagnosis sakit TB 4 dari 5 yang sakit berat adalah perempuan , semuanya berusia diatas 6 tahun. Beberapa faktor yang dipertimbangkan dapat mempengaruhi nilai biomarker pada subjek perempuan adalah banyaknya penderita TB yang sakit berat dan sakit TBEP yang berusia di atas 10 tahun dan banyaknya yang memiliki scar BCG . dalam keadaan sakit parah terjadi kerusakan jaringan yang akan dikenal sebagai DAMPs ( damage association molecular patterns) yang ligannya dikenal oleh TLR4 , disamping itu keterlibatan dari organ yang terinfeksi hanya paru saja (TBP) dan atau organ lain (TBEP) sebagai target infeksi MTB juga menambah jumlah keterlibatan reseptor TLR2 dan TLR4 serta reseptors lainnya.

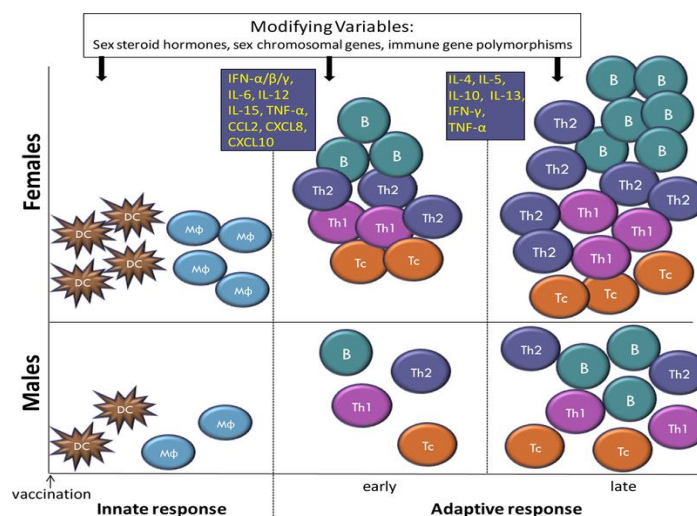
Penelitian Farsida 2021 dengan subjek yang sama melaporkan bahwa ekspresi mRNA gen Treg, kadar protein Treg juga lebih tinggi pada anak

perempuan dibandingkan laki-laki dengan perbedaan yang bermakna. ( $p < 0.05$ ). Kadar protein CD4 juga lebih tinggi pada anak perempuan sebaliknya kadar protein CD8 lebih tinggi pada anak laki-laki namun kedua kadar protein tersebut tidak berbeda bermakna berdasarkan jenis kelamin (Farsida, 2021). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi respon imunitas yang sama pada anak yang sakit TB dan telah divaksinasi BCG, baik respon imunitas innate maupun respon imunitas adaptif yaitu sama sama meningkat, namun pada respon imunitas adaptif terjadi perbedaan yang bermakna khusus ekspresi mRNA Treg dan kadar Treg. Sedangkan kadar CD4 dan CD8 tidak berbeda bermakna, yang mana kadar CD8 lebih tinggi pada laki-laki. Hal ini menunjukkan bahwa respon imunitas adaptif masih bekerja, hal ini disebabkan sifatnya yang memberikan respon lebih besar, lebih kuat dan lebih lama dibandingkan respon imunitas innate.

Faktor jenis kelamin memiliki peranan terkait dengan kemungkinan terjadinya penyakit menular dengan hipotesis bahwa jenis kelamin menunjukkan perbedaan fisiologis (misalnya, regulasi hormonal dari respons imun) yang berkontribusi pada perbedaan pria-wanita dalam mengontrol dan mengendalikan patogen serta ada perbedaan anatomi yang dapat mempengaruhi paparan dan transmisi patogen. Jenis kelamin juga dikaitkan dengan perilaku yang mempengaruhi paparan terhadap patogen, termasuk mempengaruhi akses ke perawatan kesehatan dan perilaku mencari kesehatan, yang dapat mempengaruhi perbedaan pria-wanita dalam durasi dan tingkat keparahan infeksi di beberapa negara .

Pada umumnya, keparahan penyakit dan prevalensi infeksi seringkali lebih tinggi untuk laki-laki daripada perempuan (vom Steeg & Klein, 2016), namun pada penelitian ini terjadi sebaliknya .

Laki-laki dan perempuan berbeda dalam respons imun bawaan hal ini disebabkan oleh genetic mis gen kromosom seks (misalnya, Il2ry, Irak, Tlr7, Tlr8, Foxp3, dan Ikk), polimorfisme gen, pengaruh hormone (estradiol, progesterone testosterone), basal immunoglobulin, perbedaan pada reseptor pengenalan pola (PRRs), dalam induksi gen yang terkait dengan respon antivirus, dan tingkat ekspresi sel imun yang 10 kali lipat lebih besar pada perempuan daripada laki-laki. Hormon androgen memiliki sifat menekan fungsi makrofag. (Klein et al., 2010; vom Steeg & Klein, 2016).



**Gambar 7.2** Perbedaan respon imunitas pada laki-laki dan perempuan Setelah vaksinasi, aktivitas sel imun bawaan, termasuk sel dendritik (DC) dan makrofag (Mφ), dan produksi sitokin inflamasi dan faktor nekrosis tumor dan kemokin meningkat pada wanita dibandingkan dengan pria. Peningkatan jumlah dan aktivitas sel imun bawaan pada wanita mendorong peningkatan ekspansi dan aktivitas sel B dan sel T selama respons imun adaptif awal. (Klein SL, 2010)

Studi pada manusia penderita asthma dan pada hewan coba menunjukkan bahwa jumlah dan aktivitas sel imun bawaan, termasuk makrofag dan DC serta respon imun inflamasi, lebih tinggi pada wanita daripada pria. Faktor faktor gen, anatomi, profil imunologi, perilaku dan lingkungan hormonal yang secara langsung dapat mempengaruhi pathogenesis serta perkembangan penyakit setelah infeksi (Melgert et al., 2010). Wanita menunjukkan aktivitas sel T sitotoksik yang lebih tinggi, ekspresi gen antivirus dan proinflamasi yang diregulasi terkait dengan respons estrogen (Hewagama et al., 2009; vom Steeg & Klein, 2016). Testosteron menekan kekebalan sehingga meningkatkan keparahan penyakit malaria, leishmaniasis, amebiasis, dan tuberkulosis, namun dapat menurunkan jumlah kuman toksoplasmosis (Bernin & Lotter, 2014).

Studi ini membandingkan profil sitokin sel T-helper memori khusus untuk cytomegalovirus (CMV) pada pria dan wanita yang seropositif CMV yang sehat, Pria memiliki jumlah sel T CD3+ dan CD4+, rasio sel CD4+ terhadap CD8+ dan respons Th1 yang lebih rendah, dibandingkan wanita (Villacres et al., 2004; vom Steeg & Klein, 2016) (Klein, 2016). Beberapa penelitian yang dilakukan di Indonesia pada anak tuberkulosis juga ditemukan bahwa anak laki-laki lebih banyak daripada anak perempuan dengan perbandingan 1:1.5 hingga 2:3 (Husnah, 2017; Nasution et al., 2021; Putra & Amelia, 2013; Siregar et al., 2018).

Efek hormon steroid seks pada sistem kekebalan tubuh yaitu estradiol, testosteron, dan progesteron mempengaruhi sel-sel sistem imun bawaan

dan adaptif. Jenis kelamin dan penuaan mempengaruhi sistem kekebalan tubuh (Giefing-Kröll et al., 2015). Aktivasi TLR9 dengan ligan virus pada pria menghasilkan produksi interleukin10 (IL10) yang lebih besar dibandingkan wanita, yang berkorelasi positif dengan konsentrasi androgen. Neutrofil dari laki-laki manusia mengekspresikan tingkat TLR4 yang lebih tinggi dan menghasilkan lebih banyak TNF daripada neutrofil perempuan setelah terikat ligan LPS. Makrofag peritoneal dari tikus jantan mengekspresikan tingkat TLR4 yang lebih tinggi dan menghasilkan lebih banyak ligan CXCchemokine 10 (CXCL10) mengikuti stimulasi LPS daripada makrofag dari betina. Sebaliknya, ekspresi TLR7 yang lebih tinggi dalam sel imun dari wanita dibandingkan dengan pria.

Kerentanan terhadap infeksi TB berkaitan antara polimorfisme dengan jenis kelamin, terdapat 23 polimorfisme dalam lima gen TLR digenotipekan dalam studi populasi orang dewasa di Afrika Selatan. Terdapat hubungan jenis kelamin dengan polimorfisme TLR8, dengan rs3761624, rs3764879, dan rs3764880 terkait pada wanita dan rs3764879 dan rs3764880 terkait pada pria. Ditemukan juga interaksi epistatik yaitu polimorfisme TLR1\_rs4833095 berinteraksi dengan mikrosatelit TLR2\_rs3804100 dan mengubah kerentanan terhadap TB (Salie et al., 2015). Polimorfisme juga ditemukan pada TLR2, TLR8 dan TLR9 pada penduduk Moldavian (Varzari et al., 2019).

Pada penelitian ini 60 subjek berusia dibawah 12 tahun, diantaranya 38 subjek berusia dibawah 6 tahun, maka pengaruh anatomi tubuh dan



hormonal mungkin belum banyak berperan , termasuk dalam hal perilaku dalam pathogenesis terjadinya penyakit. Faktor genetik terkait fungsi dan aktifitas sel sel imun khususnya makrofag, sel dendrit, neutrophil , sel limfosit T dan limfosit B yang terlibat didalamnya; pathogenesis infeksi dan sakit tuberkulosis memiliki karakteristik tersendiri terkait jenis kelamin seperti gambar 7.3 dibawah ini

Immune component	Characteristic	Sex difference
<b>Sex differences in the innate immune system</b>		
TLR pathways	TLR pathway gene expression	Higher in females
	TLR7 expression	Higher in females
	IL-10 production by TLR9-stimulated PBMCs	Higher in males
APCs	APC efficiency	Higher in females
Dendritic cells	TLR7 activity	Higher in females
	Type 1 interferon activity	Higher in females
Macrophages	TLR4 expression	Higher in males
	Activation	Higher in females
	Phagocytic capacity	Higher in females
	Pro-inflammatory cytokine production	Higher in males
	IL-10 production	Higher in females
Neutrophils	Phagocytic capacity	Higher in females
	TLR expression	Higher in males
NK cells	NK cell numbers	Higher in males
<b>Sex differences in the adaptive immune system</b>		
Thymus	Size of thymus	Larger in males
T cells	CD4 <sup>+</sup> T cell counts	Higher in females
	CD4/CD8 T cell ratio	Higher in females
	CD8 <sup>+</sup> T cell counts	Higher in males
	Number of activated T cells	Higher in females
	T cell proliferation	Greater in females
	Cytotoxic T cells	Increased cytotoxic activity in females
	T <sub>H</sub> 1 versus T <sub>H</sub> 2 cell bias	T <sub>H</sub> 2 cell bias in females, T <sub>H</sub> 1 cell bias in males
T <sub>reg</sub> cell numbers	Increased in males	
B cells	B cell numbers	Increased in females
Immunoglobulins	Antibody production	Higher in females
APC, antigen-presenting cell; IL, interleukin; NK, natural killer; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; T <sub>H</sub> , T helper; TLR, Toll-like receptor; T <sub>reg</sub> , regulatory T. *Based on data from humans and rodents and primary cell cultures.		

**Gambar 7.3** Perbedaan respon imunitas bawaan dan adaptif berdasarkan perbedaan jenis kelamin

### **7.3. Biomarker Berdasarkan Status Gizi**

Malnutrisi energi protein- (MEP) makronutrien atau mikronutrien menyebabkan perubahan homeostasis imun, yang sangat meningkatkan kerentanan individu terhadap infeksi atau perkembangan infeksi menjadi penyakit. Didapatkan data 39 subjek gizi kurang (56,5%) dan 30 anak (43,5%) gizi normal menurut kriteria Waterlow, WHO 2006 dan CDC 2000 (tabel 2.2) . Tidak ditemukan gizi buruk, gizi lebih dan obesitas. Dari seluruh subjek gizi kurang 53,8% laki-laki, berusia < 6 tahun 53,8% , memiliki kontak TB 53,8%, memiliki scar BCG 66,7% semua menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna. Berdasarkan derajat keparahan dari semua yang gizi kurang ditemukan 7,7% sakit berat dan 17,9% TBEP, Semua tidak menunjukkan perbedaan bermakna ( $p>0.05$ )

Status gizi kurang pada subjek penelitian mungkin masih dalam batas gizi baik, sehingga belum tampak ada pengaruh terhadap respon imunitas, baik yang mempengaruhi makronutrien maupun mikronutrien. Pada kelompok gizi baik ternyata didapatkan juga subjek yang scar BCG negative yang mungkin menyebabkan sakit TBEP dan sakit berat, namun jumlahnya subjek yang seperti ini lebih sedikit dibandingkan dengan gizi kurang yang menderita TBEP dan sakit berat. Pengaruh adanya defisiensi

makro dan mikronutrien, defisiensi vitamin A, D dan zink belum terlihat pada subjek dengan gizi kurang.

Nilai ekspresi mRNA gen TLR2 , ekspresi mRNA gen TLR4 , kadar protein TLR2 dan TLR4 hampir sama pada kedua kelompok, dan tidak ditemukan perbedaan bermakna. Nilai masing-masing biomarker tidak dipengaruhi oleh status gizi anak. ( $p>0,05$ ). Penelitian dengan subjek yang sama juga mendapatkan bahwa ekspresi mRNA gen Treg, kadar protein Treg, kadar CD4 dan kadar CD8 tidak berbeda bermakna antara gizi kurang dan gizi baik ( $p>0.05$ ) (Farsida, 2021)..

Fitria 2016 meneliti kadar interferon gamma kultur sel limfosit anak yang mendapat vaksin BCG dan sehat didapatkan kadar tinggi terjadi anak gizi baik dibandingkan gizi kurang atau lebih, namun tidak ada perbedaan bermakna (Liza Fitria, 2016) Meskipun ditemukan malnutrisi 56,5% namun tidak mempengaruhi nilai biomarker yang diperiksa. Beberapa penelitian di Indonesia pada tuberculosis anak menunjukkan bahwa kejadian tuberculosis lebih sering ditemukan pada anak anak dengan gizi kurang, namun terkait nilai TLR laporan penelitian masih terbatas (Husnah, 2017; Nasution et al., 2021; Putra & Amelia, 2013; Siregar et al., 2018).

Fagositosis dan kaskade komplemen adalah dua mekanisme utama yang terlibat dengan eliminasi organisme patogen dari tubuh. Malnutrisi menyebabkan, kedua fungsi menjadi terganggu, faktor pelengkap opsonik C3 serta kemampuan fagositosis untuk menelan dan membunuh patogen juga sangat berkurang. Selain itu, fungsi berbagai jenis sel penyaji antigen

seperti limfosit B, makrofag, sel dendritik (DC), dan sel Kupffer menurun pada malnutrisi (Abbas et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2017).

PEM yang parah memicu atrofi timus serta organ limfoid perifer, yang pada gilirannya mengurangi jumlah sel (leukopenia), menurunkan rasio CD4/CD8, meningkatkan jumlah sel T negatif ganda CD4 dan CD8, dan meningkatkan jumlah sel T imatur di darah tepi (Savino, 2002). Anak-anak yang kekurangan gizi telah menunjukkan penurunan produksi sitokin tipe 1 (IL-2 dan IFN- $\gamma$ ), yang merupakan mediator utama imunitas. Perubahan imunitas yang diperantarai sel seperti itu menyebabkan peningkatan kerentanan individu terhadap infeksi. Kadar albumin serum yang rendah meningkatkan risiko kuat kematian di rumah sakit akibat TB (Chandrasekaran et al., 2017).

Vitamin D telah diakui sebagai modulator vital dari respon imun bawaan dan adaptif terhadap infeksi TB, meningkatkan sifat antimikroba dari fagosit yaitu, monosit, makrofag, DC, dan neutrofil . Vitamin D juga menginduksi diferensiasi monosit menjadi makrofag di tempat infeksi dan meningkatkan penyerapan bakteri dengan mempromosikan fagositosis , upregulate penanda spesifik seperti CD14, reseptor mannose, tanda DC di atas permukaan sel penyaji antigen untuk meningkatkan aktivitas fagositosis, dan pembunuhan intraseluler (Estrella et al., 2011; Tenforde et al., 2017). Vitamin D juga menginduksi ekspresi beberapa peptida antimikroba, terutama cathelicidin (CAMP) dan -defensin 2 (DEFB4), menginduksi hCAP18, yang memicu mekanisme autophagy dari sel yang

terinfeksi, dengan memediasi fusi fagosom-lisosom dan memainkan peran penting dalam eliminasi *M.tb* intraseluler (Shin DM, 2010). Vitamin D menurunkan regulasi ekspresi HAMP (protein antibakteri hepcidin), yang membantu dalam transportasi intraseluler besi, sehingga menekan pertumbuhan bakteri dalam makrofag (Bacchetta et al., 2014).

Penelitian di lokasi non endemis yang melibatkan 996 anak yang diskriminasi untuk TB, (4,4%) memiliki TB aktif, (13,9%) TB laten dan (81,7%) adalah kontrol, didapatkan tingginya prevalensi hipovitaminosis D dan ada peningkatan risiko hipovitaminosis D pada anak dengan TB laten dan aktif dibandingkan dengan kontrol (Venturini et al., 2014). Ketika kelompok tikus eksperimen telah mencapai sekitar 20% kehilangan berat badan asli mereka, menunjukkan anemia, leukopenia dan penurunan parah pada sumsum tulang, limpa dan selularitas rongga peritoneum. Produksi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  dan IL-6 dirangsang *in vivo* dengan LPS dan produksi IL-6 dalam sel sumsum tulang yang dikultur dengan LPS dan produksi TNF- $\alpha$  di sumsum tulang, sel limpa dan peritoneum yang dikultur dengan LPS secara signifikan lebih rendah pada hewan yang kekurangan gizi. Ekspresi reseptor CD14 dan TLR-4/MD-2 ditemukan secara signifikan lebih rendah pada makrofag hewan yang kekurangan gizi (Fock et al., 2007).

#### **7.4. Biomarker Berdasarkan Riwayat Kontak TB**

Didapatkan 49,3% subjek dengan riwayat kontak penderita TB positif, dari seluruh subjek yang kontak TB positif didapatkan 55,9% anak laki-laki, 50,0% berusia dibawah 6 tahun, 61,8% adalah gizi kurang, 70,6% memiliki

scar BCG, semuanya tidak berbeda bermakna. ( $p>0.05\%$ ). Berdasarkan keparahan sakit didapatkan 11,8% sakit berat, dan 20,6% anak sakit TBEP semuanya tidak berbeda bermakna.

Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok yang ada kontak TB tidak ada perbedaan dengan yang tidak. Kadar protein TLR 2 dan TLR4 pada kelompok yang memiliki riwayat kontak TB juga tidak berbeda dengan yang tidak ada riwayat kontak TB.. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya tidak dipengaruhi riwayat kontak TB ( $p>0,05$ ) subjek yang memiliki scar BCG, sakit berat dan TBEP kecenderungan mempengaruhi nilai biomarker pada populasi penelitian.

Penelitian ini tidak melakukan anamnesis lebih jauh terkait sumber kontak, siapa, berapa lama kontak, kontak sudah dapat pengobatan belum apakah sputum BTA positif, apakah CXR ada kelainan yang merupakan faktor penting untuk terjadinya penularan. Sebuah penelitian di India mendefinisikan kontak dekat sebagai tinggal, memasak, dan makan di rumah yang sama dengan kasus indeks untuk periode tiga bulan segera sebelum dimulainya pengobatan untuk kasus indeks (Triasih et al., 2012). Sumber kontak tertinggi adalah ibu, diikuti ayah, lama kontak > dari 18 jam dengan penderita TB dan kontak dengan penderita dalam 2 tahun terakhir (Laghari et al., 2019).

Penelitian oleh Farsida ekspresi mRNA Treg dan kadar protein Treg tidak berbeda jauh antara yang kontak positif dengan yang tidak kontak,

namun kadar protein CD4 dan CD8 menunjukkan perbedaan nilai yang cukup banyak namun ke 4 biomarker menunjukkan tidak ada hubungan yang bermakna. ( $p > 0.05$ ) (Farsida, 2021). Hal ini menunjukkan bahwa respon imunitas adaptif bertahan, hal ini disebabkan sifatnya yang memberikan respon lebih besar, lebih kuat dan lebih lama dibandingkan respon imunitas innate.

Anak memiliki resiko terpajan dengan orang dewasa dengan TB aktif (kontak TB positif), karena faktor daerah endemis, kemiskinan, lingkungan yang tidak sehat dan tempat penampungan umum (panti asuhan, penjara, atau panti perawatan lain), yang banyak terdapat pasien TB dewasa aktif. Faktor lain adalah jumlah orang serumah (kepadatan hunian), lamanya tinggal serumah dengan pasien, pernah sakit TB, dan satu kamar dengan penderita TB di malam hari, terutama bila satu tempat tidur (Kartasasmita, 2009; Lienhardt et al., 2003).

Penelitian kasus TB anak di Aceh dan daerah lainnya di Indonesia menunjukkan adalah masih ada anak-anak yang tidak mendapatkan vaksinasi BCG, padahal sekitarnya adalah penderita TB dewasa dan tinggal di dalam rumah yang padat penghuninya (Husnah, 2017; Kartasasmita, 2009). Sumber infeksi TB pada anak yang terpenting adalah pajanan terhadap orang dewasa yang infeksius, terutama dengan BTA positif. Berarti 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 renik (*droplet nuclei*) yang infeksius (Kartasasmita, 2009; Rahajoe et al., 2018).

Risiko timbulnya transmisi kuman dari orang dewasa ke anak akan lebih tinggi jika pasien dewasa tersebut mempunyai BTA sputum positif, infiltrat luas atau kavitas pada lobus atas, produksi sputum banyak dan encer, batuk produktif dan kuat, serta terdapat faktor lingkungan yang kurang sehat terutama sirkulasi udara yang tidak baik. Pasien TB anak jarang menularkan kuman pada anak lain atau orang dewasa di sekitarnya. Hal ini dikarenakan kuman TB sangat jarang ditemukan di dalam sekret endobronkial pasien anak (Kartasasmita, 2009; Rahajoe et al., 2018).

Penelitian screening dengan kuesioner dan tes tuberkulin di Gambia, (82,6%) didiagnosis sebagai terpajan TB tetapi tidak menunjukkan gejala klinis, (15,8%) terinfeksi laten dan 64 (1,6%) menderita TB ko-prevalen. Dari 64 kasus TB, (78,1%) berasal dari rumah tangga dan kontak erat dan (21,9%) dari dalam lokasi yang sama. Dari 27 anak tanpa gejala tetapi TST-positif yang didiagnosis dengan TB, 7 dikonfirmasi secara mikrobiologis. Usia rata-rata kasus TB adalah 4,4 tahun, 53,1% berusia <5 tahun. Dari 28,1% kasus TB terjadi pada kelompok kontak erat 5% tidur seranjang. Skrining gejala saja akan mendeteksi hanya 57,8% dari kasus ko-prevalen (Egere et al., 2017).

Penelitian sistematik review pada anak-anak dengan kontak penderita tuberkulosis dan tanpa kontak tuberkulosis. Anak-anak yang terpapar adalah 3,79 kali lebih mungkin untuk terinfeksi daripada yang tidak, infeksi



lebih tinggi pada anak usia 0-4 tahun dibandingkan dengan anak usia 10-14 tahun 2,24 kali lebih tinggi dan bila di antara kasus indeks BTA-positif versus BTA-negatif 5,45 kali lebih tinggi pada BTA positif. Pada tingkat populasi, kami memperkirakan bahwa sebagian kecil (<20%) penularan disebabkan oleh paparan rumah tangga (Martinez et al., 2017).

Penelitian di daerah non endemis TB, dengan angka kejadian rata-rata 6,9 per 1.000.000 pada anak di bawah usia 15 tahun. Rasio laki-laki dan perempuan adalah 1,3. Usia rata-rata adalah 5 tahun (83%) anak diketahui memiliki kontak TB yang 60% di antaranya adalah kontak serumah, terutama orang tua. Enam puluh enam (75%) anak-anak diklasifikasikan sebagai bagian dari kelompok epidemiologi. Tiga puluh lima (40%) anak memiliki TB berdasarkan kultur dimana informasi tentang genotipe tersedia untuk 34 (97%). Dari jumlah tersebut, 35% milik cluster C2/1112-15, cluster paling umum di antara orang Denmark dewasa (Nordholm et al., 2019).

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) penyebab tuberkulosis ditularkan melalui udara (droplet) yang terhirup dan dikenal oleh makrofag dan sel dendritic selanjutnya terjadi infeksi primer. Selama aktivasi mekanisme pertahanan host yaitu neutrofil dan sel T helper 1 (TH1) dan TH17 direkrut ke tempat infeksi. Interleukin (IL)-17 yang diturunkan dari sel TH17 akan menginduksi cathelicidin LL37 yang menunjukkan efek antimikobakteri langsung. Ditemukan bahwa IL-26 mRNA dan protein sangat meningkat pada kelenjar getah bening, IL-26 dapat membunuh MTB secara langsung

dan menurunkan tingkat infeksi pada makrofag. Pengikatan IL-26 ke lipoarabinomannan menjadi salah satu mekanisme penting dalam eliminasi MTB ekstraseluler. Makrofag dan sel dendritik merespons IL-26 dengan sekresi faktor nekrosis tumor (TNF)- $\alpha$  dan kemokin seperti CCL20, CXCL2 dan CXCL8. Dalam sel dendritik tetapi tidak dalam makrofag, induksi sitokin oleh IL-26 sebagian dimediasi melalui Toll like receptor (TLR) 2 (Hawerkamp et al., 2020).

Studi investigasi kontak di Asia Tenggara menunjukkan potensi skrining dan IPT untuk mengurangi risiko penyakit TB pada kontak anak, namun jarang diterapkan.

## **7.5. Biomarker Berdasarkan Scar**

Imunisasi BCG, status gizi, status social ekonomi berpengaruh terhadap kejadian tuberculosis pada anak (Husnah, 2017; Kartasasmita, 2009; Putra & Amelia, 2013; Siregar et al., 2018; WHO, 2016). Beberapa studi kohort prospektif menunjukkan scar yang terbentuk pasca imunisasi sebesar 52% -93%, penelitian ini menunjukkan scar BCG terbentuk pada 68.1 %, menurut penelitian lainnya luka BCG terbentuk pada 40%-93% anak-anak setelah vaksinasi BCG (Benn et al., 2020; Putra & Amelia, 2013). Diantara anak anak dengan scar BCG positif , 59,6% berusia dibawah 6 tahun, 53,2% kebanyakan perempuan, 55,3% dengan gizi kurang, dan sebagian 51.1% dengan riwayat kontak TB positif dan uji tuberkulin positif

57,4%, semuanya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. (Tabel 6.3).

Hasil pemeriksaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan ekspresi mRNA gen TLR4 dan kadar protein TLR2 dan TLR4 menunjukkan nilai lebih tinggi pada yang memiliki scar BCG dibandingkan yang tidak ada scar BCG, khususnya kadar proteinnya, semuanya dengan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) Hasil pemeriksaan biomarker menunjukkan dipengaruhi adanya scar BCG.

Penelitian oleh Farsida menunjukkan nilai ekspresi mRNA Treg, dan kadar Treg serta kadar CD4 yang cukup besar perbedaannya dengan yang tidak memiliki scar BCG dengan uji kemaknaan  $p < 0,001$ . Namun kadar CD8 sedikit lebih tinggi pada subjek dengan scar BCG negatif dan tidak berbeda bermakna (Farsida, 2021).

Vaksinasi BCG dapat melindungi dari penyakit tuberculosis pada anak khususnya TB miliar dan meningitis TB, jika terbentuk scar BCG perlindungan menjadi semakin besar (Aaby et al., 2011; Kusuma, 2011; Rosandali et al., 2016). Dari (96,3%) memiliki scar BCG pascavaksinasi sebagian besar (72%) dari subyek divaksinasi dalam minggu pertama kehidupan, kebanyakan laki-laki, berat lahir normal dan usia saat vaksinasi secara signifikan dipengaruhi oleh maturasi kehamilan. Maturasi gestasional merupakan predictor kuat pembentukan scar BCG (Atimati & Osarogiagbon, 2014; Kousha et al., 2021).

Penelitian Kousha 2021, mengkonfirmasi bahwa vaksin memiliki efek berbeda pada subspecies tuberculosis yang berbeda. Penyebab tingginya

kemungkinan resistensi obat pada pasien dengan Beijing-TB dan ada riwayat vaksinasi namun banyak yang tidak membentuk scar BCG (Kousha et al., 2021). Dilakukan penelitian terhadap scar BCG antara usia 6 dan 12 bulan untuk (98%) telah terbentuk scar BCG. Sebagai perbandingan, kelompok anak yang yang divaksinasi BCG di tempat lain, (79%) memiliki bekas luka, RR yang tidak memiliki bekas luka adalah 10,91 kali dibandingkan dengan anak yang divaksinasi faskes. Di antara anak-anak yang divaksinasi faskes mereka yang menerima galur BCG Rusia lebih mungkin untuk tidak timbul scar BCG dibandingkan dengan anak-anak yang menerima galur BCG Denmark. Anak-anak tanpa wheal pasca-injeksi atau wheal <3 mm lebih mungkin untuk tidak terbentuk scar BCG, dan status gizi dan status sosial ekonomi tidak berhubungan dengan skarifikasi. Teknik vaksinasi dan strain vaksin dikaitkan dengan pembentukan scar BCG (Funch et al., 2018).

Pembentukan bekas luka berhubungan dengan penurunan mortalitas dan peningkatan kelangsungan hidup bayi, terutama pada tahun pertama dan kedua kehidupan, terutama jika vaksinasi dilakukan pada periode neonatal (Benn et al., 2020; Covián et al., 2019). Strain BCG-Rusia/BCG-Denmark RR untuk reaksi besar adalah 0,38 kali dan BCG-Rusia/BCG-Jepang RR adalah 0,61 kali. Timbulnya ukuran scar BCG memiliki respons sitokin spesifik dan non-spesifik 4 minggu yang lebih tinggi, bayi yang divaksinasi BCG, dan memiliki scar BCG pada usia 2 bulan dikaitkan

dengan kelangsungan hidup yang jauh lebih baik, seperti ukuran reaksi (Schaltz-Buchholzer et al., 2020).

Pembentukan scar BCG dipengaruhi oleh jenis vaksin, strain, usia pemberian, teknik injeksi, faktor genetik, status gizi, manajemen rantai dingin yang buruk, pemberian OPV simultan, paparan mikobakterium lingkungan (EM), usia kehamilan, dan subspecies yang berbeda (Covián et al., 2019; Funch et al., 2018; Kousha et al., 2021; Schaltz-Buchholzer et al., 2020).

Paparan prenatal seperti infeksi dan imunisasi dapat mempengaruhi respon imunitas bawaan pada bayi. Scar BCG ibu dibandingkan keadaan TB latent pada ibu menunjukkan hubungan yang kuat dan konsisten dengan respon dari IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL-10, VEGF, dan IP-10 bayi (Mawa et al., 2017).

Namun usia dan jenis kelamin bukan penentu keberhasilan pembentukan jaringan scar BCG (Dhanawade et al., 2015). Pembentukan scar BCG diamati pada bayi usia 2,4,6 bulan tercatat pada 84 bayi (19,6%) tidak terbentuk scar BCG. Ada hubungan yang bermakna antara tidak adanya bekas luka dan hasil Mantoux yang negatif sangat signifikan ( $P < 0,05$ ) sehingga tidak ada kekebalan (Tabatabaei, 2019).

Namun laporan WHO 2018 merekomendasikan bahwa telah menunjukkan bukti minimal atau tidak ada manfaat tambahan dari vaksinasi BCG berulang terhadap TB atau kusta. Oleh karena itu, vaksinasi ulang tidak dianjurkan bahkan jika reaksi TST atau hasil IGRA negatif. Tidak

adanya bekas luka BCG setelah vaksinasi tidak menunjukkan kurangnya perlindungan dan bukan merupakan indikasi untuk vaksinasi ulang. (Report, 2018)

#### **7.6. Perbedaan nilai biomarker berdasarkan derajat klinis**

Diagnosis TB pada anak merupakan tantangan karena tanda dan gejalanya seringkali tidak khas. Anak-anak juga biasanya mengalami kesulitan dalam mengeluarkan dahak untuk pemeriksaan mikrobiologi. Sebaliknya, diagnosis TB pada orang dewasa relatif lebih mudah, karena tanda dan gejala yang khas dan didukung oleh tanda-tanda yang khas pada rontgen dada dan lebih mudahnya orang dewasa mengeluarkan sputum untuk diuji MTB (Kartasasmita, 2009; López Ávalos & Prado Montes de Oca, 2012).

Penelitian ini mendapatkan 69 anak dengan 5 anak (0,07%) dengan gejala penyakit yang berat, semuanya TBEP yaitu meningitis TB, efusi pleura, pleuritis, dan spondylitis. Subjek yang sakit berat semua berusia diatas 6 tahun (10 tahun), 80% perempuan, 60% gizi kurang, 80% ada kontak dengan penderita TB, semua 100% scar BCG nya positif, tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada semua karakteristik. ( $p > 0.05$ ) Scar BCG positif namun masih bisa terjadi sakit TB berat, bahwa proteksi vaksin BCG di daerah endemis terbatas 5 tahun -10 tahun, jenis vaksin yang digunakan, usia saat pemberian vaksin, umur saat menderita sakit, semua berpengaruh pada subjek penelitian.

Hasil pemeriksaan ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 dan kadar protein TLR2 dan kadar protein TLR4 menunjukkan bahwa pada penderita dengan derajat klinis yang berat, memiliki nilai yang lebih tinggi dan bermakna ( $p < 0,05$ ) dibandingkan yang derajat klinis tidak berat. Namun kadar protein TLR2 meskipun nilainya tinggi pada yang klinis berat tapi tidak bermakna secara statistik. Kecenderungan nilai biomarker dipengaruhi oleh jenis kelamin perempuan, usia diatas 6 tahun, memiliki scab BCG, dan ada riwayat kontak TB, sehingga nilai beda bermakna antara sakit berat dan tidak sakit berat.

Toll Like Receptors (TLR) 2 dan TLR4 adalah reseptor pengenalan mikroba yang terdapat di banyak sel seperti monosit/makrofag, sel mast, sel dendritik (DC), neutrofil, jaringan adiposa, limfosit B dan limfosit T. TLR2 mengenali glikolipid dan peptidoglikan bakteri dan TLR4 khusus untuk lipopolisakarida bakteri yang ada di dinding MTB. Di antara keluarga TLR, TLR2, TLR4, TLR9 dan molekul adaptornya MyD88 memainkan peran paling menonjol dalam memulai respon imun terhadap TB. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) adalah vaksin hidup yang dilemahkan yang dapat mempengaruhi respon imun bawaan dan adaptif untuk mencegah dan melawan infeksi TB (Mortaz et al., 2015).

Kerusakan jaringan yang berat akibat proses peradangan dari organ yang terlibat pada tuberculosis berat, sebagai molekul DAMPs. DAMPs akan mengeliminasi sel yang rusak dan menginisiasi proses perbaikan jaringan, dan akan berinteraksi juga dengan TLR2 dan TLR4 (Roh & Sohn,

2018; D. Tang et al., 2012). TLR memiliki banyak peranan dalam infeksi, inflamasi, reproduksi, perkembangan, autoimunitas, kanker, inflamasi/ penolakan allograft dan regenerasi (Kleinnijenhuis et al., 2011; Vijay, 2018).

Penelitian Farsida menunjukkan bahwa ekspresi mRNA Treg, kadar protein Treg tinggi pada subjek yang klinis berat, demikian juga kadar CD4 dan berbeda secara bermakna. ( $P < 0.05$ ). Kadar CD8 menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada subjek yang tidak berat, namun tdk ada perbedaan bermakna.

#### **7.7. Perbedaan nilai biomarker berdasarkan Diagnosis TB**

Tuberkulosis ekstraparu (TBEP) terjadi pada 17,4% subjek penelitian, kebanyakan 66,7% anak perempuan, berusia diatas 6 tahun 91,7%, 58,3% gizi kurang, scar BCG positif 66,7% dan kontak dengan penderita TB 58,7% namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna kecuali pada usia. Hasil pemeriksaan biomarker didapatkan ekspresi mRNA gen TLR2 pada TBEP lebih tinggi daripada TBP, demikian juga ekspresi mRNA gen TLR4, tidak ditemukan perbedaan yang bermakna. Kadar protein TLR2 lebih tinggi pada TBEP dibanding TBP, sedangkan kadar protein dari TLR4 TBEP hampir sama dengan TBP, semuanya tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. ( $p > 0.05$ ). Jenis kelamin perempuan menunjukkan kadar yang lebih tinggi, demikian juga usia dan adanya scar BCG ditambah adanya kontak positif memungkinkan kecenderungan kadar yang lebih tinggi pada TBEP namun tidak bermakna.



TBEP memiliki gejala yang tidak khas, gejala sesuai dengan organ dimana terjadi infeksi tuberculosis, sehingga gejala bisa bermacam-macam, dan tidak khas, akibatnya pasien berobat berulang-ulang namun tidak ada perbaikan dan saat didiagnosis sudah terlambat. Hal ini menyebabkan lama rawat menjadi panjang akibat gejala sudah berat, dan bisa menimbulkan kematian atau menimbulkan gejala sekuele (López Ávalos & Prado Montes de Oca, 2012; Maltezou et al., 2000; Santiago-García et al., 2016).

Gejala TBEP yang ditemukan berturut-turut terbanyak adalah limfadenitis superfisial, efusi pleura meningitis, tuberculosis tulang, tuberculosis milier, tuberculosis perut, dan perikarditis. Tuberculosis milier berkembang pada bayi, limfadenitis dan meningitis pada anak prasekolah, dan efusi pleura dan tuberculosis tulang pada anak yang lebih besar. Tak satu pun dari pasien dengan TB ekstra paru meninggal; namun, 1 pasien dengan meningitis mengalami defisit neurologis permanen. Kemiskinan, imigrasi, dan akses terbatas ke layanan medis umum merupakan salah satu faktor yang tidak langsung menyebabkan keterlambatan diagnosis dan keparahan penyakit (Maltezou et al., 2000).

Menurut Global Tuberculosis Report 2019, kasus baru TBEP di Asia Tenggara adalah 15%, lebih tinggi dari rata-rata dunia 14%, 11% dari semua kasus TB di Indonesia, sebagian besar pada anak-anak di atas 5–10 tahun (Benn et al., 2020; A. Roy et al., 2014; WHO, 2019). Organisasi Kesehatan Dunia merekomendasikan vaksinasi BCG untuk mencegah

bentuk penyakit TB yang berat, dan mengobati TB laten pada anak yang hidup dengan HIV dan anak di bawah 5 tahun yang memiliki riwayat kontak dengan kasus TB yang dikonfirmasi. Efektivitas perlindungan dari vaksinasi BCG adalah 60-80% dan menurun seiring bertambahnya usia, terutama di daerah endemik TB. Efektivitas perlindungan tergantung pada populasi, daerah endemik TB, paparan sebelumnya terhadap mikobakterium lingkungan, dan usia saat vaksinasi. Sebagian besar pasien TBEP berusia di atas 5 tahun, sehingga efek perlindungan dari vaksinasi berkurang (Scheelbeek et al., 2014; WHO, 2018, 2019).

Tingkat TLR yang lebih tinggi pada TBEP dapat disebabkan oleh adanya dua lesi primer dan/atau sekunder sebagai tempat masuknya patogen pada TBEP, di mana beberapa kasus TBEP dapat disertai dengan keterlibatan paru-paru atau tidak, disamping organ diluar paru-paru. Peradangan terjadi di kedua lokasi, menginduksi respon imun bawaan dan adaptif (Maltezou et al., 2000; Santiago et al., 2003).

Setelah pengenalan PAMP dan DAMP, TLR2 dan TLR4 di permukaan sel akan mengenal molekul jaringan yang rusak akibat lesi intra dan ekstraparu. Molekul protein adaptor yang mengandung domain TIR akan terikat dengan ligan untuk memulai jalur transduksi sinyal yang berujung pada ekspresi sitokin, kemokin, pro-inflamasi yang bergantung pada NF-kappa B dan AP-1, dan ekspresi interferon tipe I dan tipe III yang bergantung pada IRF3-/IRF7 pada akhirnya melindungi inang dari infeksi mikroba.

TLR2 juga dapat mengenali banyak ligan, termasuk lipopeptida bakteri, zymosan jamur, protein parasit dan virus. Gram-positif lipoteichoic acid (LTA) karena pembentukan heterodimer TLR2 dengan dua TLR lainnya, yaitu TLR1 atau TLR6. Heterodimer TLR1/TLR2 dapat mengenali lipoprotein triasilasi, sedangkan TLR2/TLR6 dapat mengenali lipoprotein diasilasi, oleh karena itu kadar TLR2 lebih tinggi daripada TLR4 (Abbas et al., 2015; Kleinnijenhuis et al., 2011; Mortaz et al., 2015).

Ras/etnis dan strain patogen dapat mempengaruhi respon TLR2 dan TLR4 untuk menghasilkan sitokin pada infeksi MTB sebagaimana perbedaan ditemukan pada orang Filipina, Cina dan kulit putih (P. Nahid, 2018). Polimorfisme gen TLR2 dan TLR4 dapat mempengaruhi kerentanan risiko, keparahan dan hasil dari infeksi tuberkulosis paru (PTB). Respon imun bawaan setelah vaksinasi BCG memberikan perlindungan dari TB berat pada anak <5 tahun (Laghari et al., 2019; Mangtani et al., 2014).

### **7.8. Hasil Uji Korelasi antar biomarker**

Didapatkan adanya korelasi positif kuat antara ekspresi mRNA gen TLR2 dengan kadar protein TLR2 dan juga ekspresi mRNA TLR4 dengan kadar protein TLR4 dengan nilai yang bermakna secara statistik.  $r=0,871$   $p<0,001$ ,  $r=0,878$   $p<0,001$ . Korelasi positif kuat, adanya proses respon imunisasi innate yang selanjutnya imunitas adaptif yang lebih tinggi, lebih cepat, lebih lama keberadaannya (stabil) akibat adanya sel memori. Penelitian Farsida melaporkan mRNA Treg, berkorelasi positif dengan

kadar Protein Treg, kemudian kadar Protein Treg berkorelasi dengan kadar Protein CD4  $r=0,751$   $r=0,781$  dan  $p<0.001$  (Farsida, 2021).

### **7.9. Keterbatasan Penelitian**

Penelitian ini tidak dilakukan pada kelompok kontrol yang sehat dan telah divaksinasi sebagai perbandingan dengan anak TB aktif, diagnosis TB paru ditentukan bukan dengan pemeriksaan TCM, sesuai saran WHO, juga tidak dilakukan pemeriksaan jaringan histopatologis untuk kasus TBEP. Penelitian tidak membandingkan nilai sebelum pengobatan dan sesudah pengobatan sehingga tidak didapatkan data yang lebih informatif.

## **BAB VIII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **1.1. Kesimpulan**

1. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta, Kadar protein TLR2 dan TLR4 lebih tinggi pada TB anak dengan Scar positif
2. Ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 serta kadar protein TLR2 dan TLR4, lebih tinggi pada derajat klinis berat dibandingkan derajat klinis ringan pada TB anak dengan Scar positif
3. Ekspresi mRNA gen TLR2 / TLR4 berkorelasi positif dengan kadar TLR2 dan kadar TLR4 pada TB anak yang telah divaksin BCG

#### **1.2. Saran**

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai peran ekspresi mRNA gen TLR2 dan mRNA gen TLR4 dan kadar proteinnya pada anak sehat yang telah divaksin BCG
2. Perlu dilakukan pemeriksaan TCM untuk semua kasus TB anak untuk diagnosis yang lebih akurat, sehingga setiap rumah sakit atau setiap zona daerah endemic TB memiliki sarana alat pemeriksaan tersebut.
3. Perlu di pertimbangkan vaksin BCG yang baru yang memiliki kemungkinan pembentukan scar lebih baik lagi dan dilakukan lebih awal khususnya di daerah endemis .

## DAFTAR PUSTAKA

- Aaby, P., Roth, A., Ravn, H., Napirna, B. M., Rodrigues, A., Lisse, I. M., Stensballe, L., Diness, B. R., Lausch, K. R., Lund, N., Biering-Sørensen, S., Whittle, H., & Benn, C. S. (2011). Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(2), 245–252. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir240>
- Abbas, M. A. K., Lichtman, A. H., & Shiv Pillai, M. (2015). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Health Sciences. [https://books.google.co.id/books?id=tR\\_mCgAAQBAJ](https://books.google.co.id/books?id=tR_mCgAAQBAJ)
- Ahmed, A., Feng, P.-J. I., Gaensbauer, J. T., Reves, R. R., Khurana, R., Salcedo, K., Punnoose, R., & Katz, D. J. (2020). Interferon- $\gamma$  Release Assays in Children <15 Years of Age. *Pediatrics*, *145*(1). <https://doi.org/10.1542/peds.2019-1930>
- Akira, S., Hoshino, K., & Kaisho, T. (2000). The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *Journal of Endotoxin Research*, *6*(5), 383–387.
- Amaral, E. P., & Andrade, B. B. (2017). Nuclear Factor  $\kappa$ B Activation Pathways During Infection Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Communication Insights*, *9*, 1–10. <https://doi.org/10.1177/1179568917695833>
- American Thoracic Society, & CDCP. (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*(4 Pt 1), 1376–1395. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.4.16141>
- Angelidou, A., Diray-Arce, J., Conti, M. G., Smolen, K. K., van Haren, S. D., Dowling, D. J., Husson, R. N., & Levy, O. (2020). BCG as a Case Study for Precision Vaccine Development: Lessons From Vaccine Heterogeneity, Trained Immunity, and Immune Ontogeny. *Frontiers in Microbiology*, *11*(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00332>
- Atimati, A., & Osarogiagbon, O. (2014). Prevalence of BCG scar among BCG-vaccinated children in a southern Nigeria tertiary hospital. *Nigerian Journal of Paediatrics*, *41*, 229–233.
- Bacchetta, J., Zaritsky, J. J., Sea, J. L., Chun, R. F., Lisse, T. S., Zavala, K., Nayak, A., Wesseling-Perry, K., Westerman, M., Hollis, B. W., Salusky, I. B., & Hewison, M. (2014). Suppression of iron-regulatory hepcidin by vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *25*(3), 564–572. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013040355>
- Bancin, D. (2014). *Pelacakan kontak tuberculosis secara sentrifugal terhadap anak kontak erat dengan penderita tuberculosis paru dewasa: faktor kedekatan dan risiko infeksi*. Universitas Gadjah Mada.

- Benn, C. S., Roth, A., Garly, M.-L., Fisker, A. B., Schartz-Buchholzer, F., Timmermann, A., Berendsen, M., & Aaby, P. (2020). BCG scarring and improved child survival: a combined analysis of studies of BCG scarring. *Journal of Internal Medicine*, *288*(6), 614–624. <https://doi.org/10.1111/joim.13084>
- Bernin, H., & Lotter, H. (2014). Sex bias in the outcome of human tropical infectious diseases: influence of steroid hormones. *The Journal of Infectious Diseases*, *209 Suppl*, S107-13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit610>
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*(3), 495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Bourke, C. D., Berkley, J. A., & Prendergast, A. J. (2016). Immune Dysfunction as a Cause and Consequence of Malnutrition. *Trends in Immunology*, *37*(6), 386–398. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.003>
- Chandrasekaran, P., Saravanan, N., Bethunaickan, R., & Tripathy, S. (2017). Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01316>
- Covián, C., Fernández-Fierro, A., Retamal-Díaz, A., Díaz, F. E., Vasquez, A. E., Lay, M. K., Riedel, C. A., González, P. A., Bueno, S. M., & Kalergis, A. M. (2019). BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Frontiers in Immunology*, *10*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02806>
- Dahlan, M. S. (2013). *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat Dilengkapi Aplikasi dengan Menggunakan SPSS*. Salemba Medika.
- de Oliveira Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, *3*, 79. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>
- Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime Reports*, *6*, 97. <https://doi.org/10.12703/P6-97>
- Dewi, D. N. S. S., Mertaniasih, N. M., & Soedarsono. (2020). Severity of TB classified by modified Bandim TB scoring associates with the specific sequence of *esxA* genes in MDR-TB patients. *African Journal of Infectious Diseases*, *14*(1), 8–15. <https://doi.org/10.21010/ajid.v14i1.2>
- Dhanawade, S. S., Kumbhar, S. G., Gore, A. D., & Patil, V. N. (2015). Scar formation and tuberculin conversion following BCG vaccination in infants: A prospective cohort study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, *4*(3), 384–387. <https://doi.org/10.4103/2249-4863.161327>
- Djuardi, Y., Sartono, E., Wibowo, H., Supali, T., & Yazdanbakhsh, M.

- (2010). A longitudinal study of BCG vaccination in early childhood: The development of innate and adaptive immune responses. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014066>
- Dwiyanti, R., Hatta, M., Natzir, R., Pratiwi, S., Sabir, M., Yasir, Y., Noviyanthi, R. A., Junita, A. R., Tandirogan, N., Amir, M., Fias, M., Saning, J., & Bahar, B. (2017). Association of Typhoid Fever Severity with Polymorphisms NOD2, VDR and NRAMP1 Genes in Endemic Area, Indonesia. *Journal of Medical Sciences*, 17(3), 133–139. <https://doi.org/10.3923/jms.2017.133.139>
- ECDC. (2011). Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. In *European Centre for Disease Prevention and Control*.
- Egere, U., Togun, T., Sillah, A., Mendy, F., Otu, J., Hoelscher, M., Heinrich, N., Hill, P. C., & Kampmann, B. (2017). Identifying children with tuberculosis among household contacts in The Gambia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 21(1), 46–52. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0289>
- Estrella, J. L., Kan-Sutton, C., Gong, X., Rajagopalan, M., Lewis, D. E., Hunter, R. L., Eissa, N. T., & Jagannath, C. (2011). A Novel in vitro Human Macrophage Model to Study the Persistence of Mycobacterium tuberculosis Using Vitamin D(3) and Retinoic Acid Activated THP-1 Macrophages. *Frontiers in Microbiology*, 2, 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00067>
- Farsida. (2021). *Analisis ekspresi MRNA gen T regulator, kadar protein T regulator, CD4 dan CD8 pada TB anak dengan scar*. Universitas Hasanuddin.
- Farsida, Shabariah, R., Hatta, M., Patellongi, I., Prihantono, Nasrum Massi, M., Asadul Islam, A., Natzir, R., Dwi Bahagia Febriani, A., Hamid, F., Fatimah, Akaputra, R., & Aprilia Savitri, P. (2020). Relationship between expression mRNA gene Treg, Treg, CD4+, and CD8+ protein levels with TST in tuberculosis children: A nested case-control. *Annals of Medicine and Surgery*, 61, 44–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.12.011>
- Favorov, M., Ali, M., Tursunbayeva, A., Aitmagambetova, I., Kilgore, P., Ismailov, S., & Chorba, T. (2012). Comparative tuberculosis (TB) prevention effectiveness in children of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines from different sources, Kazakhstan. *PloS One*, 7(3), e32567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032567>
- Fithriasari, M., & Wahyuni, C. U. (2017). Pengaruh Faktor Paparan Dan Status Gizi Terhadap Kejadian TB Anak Yang Tinggal Serumah Dengan Penderita TB Paru Dewasa. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Media Husada*, 6(1), 93–108. <https://doi.org/10.33475/jikmh.v6i1.65>
- Fock, R. A., Vinolo, M. A. R., de Moura Sá Rocha, V., de Sá Rocha, L. C., & Borelli, P. (2007). Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to



- lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*, *40*(2), 105–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.08.007>
- Funch, K. M., Thyssen, S. M., Rodrigues, A., Martins, C. L., Aaby, P., Benn, C. S., & Fisker, A. B. (2018). Determinants of BCG scarification among children in rural Guinea-Bissau: A prospective cohort study. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *14*(10), 2434–2442.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1421879>
- Gangloff, M., & Gay, N. J. (2004). MD-2: the Toll “gatekeeper” in endotoxin signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(6), 294–300.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.008>
- García-Basteiro, A. L., López-Varela, E., Augusto, O. J., Gondo, K., Muñoz, J., Sacarlal, J., Marais, B., Alonso, P. L., & Ribó, J. L. (2015). Radiological Findings in Young Children Investigated for Tuberculosis in Mozambique. *PLOS ONE*, *10*(5), 1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127323>
- Gebregergs, G. B., & Alemu, W. G. (2015). Household Contact Screening Adherence among Tuberculosis Patients in Northern Ethiopia. *PloS One*, *10*(5), e0125767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125767>
- Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G., & Grubeck-Loebenstein, B. (2015). How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*, *14*(3), 309–321.  
<https://doi.org/10.1111/accel.12326>
- Gwela, A., Mupere, E., Berkley, J. A., & Lancioni, C. (2019). Undernutrition, Host Immunity and Vulnerability to Infection Among Young Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, *38*(8), e175–e177. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002363>
- Hatta, M., & Smits, H. L. (2007). Detection of Salmonella typhi by nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine and Stool Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(1), 139–143.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.139>
- Hatta, M., Surachmanto, E. E., Islam, A. A., & Wahid, S. (2017). Expression of mRNA IL-17F and sIL-17F in atopic asthma patients. *BMC Research Notes*, *10*, 2–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2517-9>
- Hawerkamp, H. C., van Geelen, L., Korte, J., Di Domizio, J., Swidergall, M., Momin, A. A., Guzmán-Vega, F. J., Arold, S. T., Ernst, J., Gilliet, M., Kalscheuer, R., Homey, B., & Meller, S. (2020). Interleukin-26 activates macrophages and facilitates killing of Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, *10*(1), 17178.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73989-y>
- Hewagama, A., Patel, D., Yarlagaadda, S., Strickland, F. M., & Richardson, B. C. (2009). Stronger inflammatory/cytotoxic T-cell response in women identified by microarray analysis. *Genes and Immunity*, *10*(5), 509–516. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.12>
- Holmberg, P. J., Temesgen, Z., & Banerjee, R. (2019). Tuberculosis in Children. *Pediatrics in Review*, *40*(4), 168–178.

- <https://doi.org/10.1542/pir.2018-0093>
- Husnah. (2017). Prevalensi Tuberkulosis dan Status Gizi pada Anak di Puskesmas Tiju Pidie Periode Januari sampai Desember 2013. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 17(1), 16–19.
- Jaganath, D., & Mupere, E. (2012). Childhood tuberculosis and malnutrition. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(12), 1809–1815. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis608>
- Jahiroh, & Prihartono, N. (2017). Hubungan Stunting Dengan Kejadian Tuberkulosis Relationship Nutritional Stunting and Tuberculosis. *The Indonesian Journal of Infectious Disease*, 6–13.
- Kaba, Ö., Kara, M., Odacılar, C. A., Kamer, İ., Sütçü, M., Demir, S. Ö., Çalışkan, E., Törün, S. H., Salman, N., & Somer, A. (2019). Evaluation of cases of pediatric extrapulmonary tuberculosis: a single center experience. *Turk Pediatri Arsivi*, 54(2), 86–92. <https://doi.org/10.14744/TurkPediatriArs.2019.33239>
- Kartasmita, C. B. (2009). Epidemiologi Tuberkulosis. *Sari Pediatri*, 11(2), 124–129. <https://doi.org/10.14238/sp11.2.2009.124-9>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Kemenkes RI. (2018). Infodatin. In *Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI* (Vol. 1, Issue april). [www.kemendes.go.id](http://www.kemendes.go.id)
- Kemenkes RI. (2020). Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2019. In *Kementerian Kesehatan RI*.
- Kemenkes RI. (2014). *Buku Ajar Imunisasi*. Kementerian Kesehatan RI.
- Kemenkes RI. (2016). *Petunjuk Teknis Manajemen dan Tatalaksana TB Anak*.
- Kemenkes RI. (2021). *Situasi Tuberkulosis di Indonesia Tahun 2020*. <https://tbindonesia.or.id/pustaka-tbc/dashboard-tb/>
- Khan, A., Bakhru, P., Saikolappan, S., Das, K., Soudani, E., Singh, C. R., Estrella, J. L., Zhang, D., Pasare, C., Ma, Y., Sun, J., Wang, J., Hunter, R. L., Tony Eissa, N., Dhandayuthapani, S., & Jagannath, C. (2019). An autophagy-inducing and TLR-2 activating BCG vaccine induces a robust protection against tuberculosis in mice. *Npj Vaccines*, 4(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0122-8>
- Klein, S. L., Jedlicka, A., & Pekosz, A. (2010). The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *The Lancet. Infectious Diseases*, 10(5), 338–349. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70049-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70049-9)
- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., & Van Crevel, R. (2011). Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011, 405310. <https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- Kousha, A., Farajnia, S., Ansarin, K., Khalili, M., Shariat, M., & Sahebi, L. (2021). Does the BCG vaccine have different effects on strains of tuberculosis? *Clinical and Experimental Immunology*, 203(2), 281–285. <https://doi.org/10.1111/cei.13549>

- Kurniawan, E., Raveinal, Fauzar, & Arsyad, Z. (2016). Nilai Diagnostik Metode “ Real Time ” PCR GeneXpert pada TB Paru BTA Negatif. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 5(3), 730–738.
- Kusuma, I. S. (2011). *Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Kejadian Tuberkulosis (TB) Paru pada Anak yang Berobat di Puskesmas Wilayah Kecamatan Cimanggis, Depok Februari-April 2011*.
- Laghari, M., Sulaiman, S. A. S., Khan, A. H., Talpur, B. A., Bhatti, Z., & Memon, N. (2019). Contact screening and risk factors for TB among the household contact of children with active TB: a way to find source case and new TB cases. *BMC Public Health*, 19(1), 1274. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7597-0>
- Lienhardt, C., Fielding, K., Sillah, J., Tunkara, A., Donkor, S., Manneh, K., Warndorff, D., McAdam, K. P., & Bennett, S. (2003). Risk factors for tuberculosis infection in sub-Saharan Africa: a contact study in The Gambia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(4), 448–455. <https://doi.org/10.1164/rccm.200212-1483OC>
- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology*, 14(12), 963–975. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
- Liu, X., Zhan, Z., Li, D., Xu, L., Ma, F., Zhang, P., Yao, H., & Cao, X. (2011). Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nature Immunology*, 12(5), 416–424. <https://doi.org/10.1038/ni.2015>
- López Ávalos, G. G., & Prado Montes de Oca, E. (2012). Classic and New Diagnostic Approaches to Childhood Tuberculosis. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 818219. <https://doi.org/10.1155/2012/818219>
- Madiyono, B., Mz, S. M., Sastroasmoro, S., Budiman, I., & Purwanto, S. H. (2011). Perkiraan Besar Sampel. In *Dasar-dasar Metodologi Penelitian* (p. 348). Sagung Seto.
- Maltezou, H. C., Spyridis, P., & Kafetzis, D. A. (2000). Extra-pulmonary tuberculosis in children. *Archives of Disease in Childhood*, 83(4), 342–346. <https://doi.org/10.1136/adc.83.4.342>
- Mangtani, P., Abubakar, I., Ariti, C., Beynon, R., Pimpin, L., Fine, P. E. M., Rodrigues, L. C., Smith, P. G., Lipman, M., Whiting, P. F., & Sterne, J. A. (2014). Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58(4), 470–480. <https://doi.org/10.1093/cid/cit790>
- Marais, B. J., Gie, R. P., Schaaf, H. S., Hesselning, A. C., Obihara, C. C., Nelson, L. J., Enarson, D. A., Donald, P. R., & Beyers, N. (2004). The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 8(3), 278–285.
- Martinez, L., Cords, O., Horsburgh, C. R., Andrews, J. R., Acuna-

- Villaorduna, C., Desai Ahuja, S., Altet, N., Augusto, O., Baliashvili, D., Basu, S., Becerra, M., Bonnet, M., Henry Boom, W., Borgdorff, M., Boulahbal, F., Carvalho, A. C. C., Cayla, J. A., Chakhaia, T., Chan, P. C., ... Zhu, L. (2020). The risk of tuberculosis in children after close exposure: a systematic review and individual-participant meta-analysis. *The Lancet*, *395*(10228), 973–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30166-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30166-5)
- Martinez, L., Shen, Y., Mupere, E., Kizza, A., Hill, P. C., & Whalen, C. C. (2017). Transmission of Mycobacterium Tuberculosis in Households and the Community: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology*, *185*(12), 1327–1339. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx025>
- Mawa, P. A., Webb, E. L., Filali-Mouhim, A., Nkurunungi, G., Sekaly, R. P., Lule, S. A., Prentice, S., Nash, S., Dockrell, H. M., Elliott, A. M., & Cose, S. (2017). Maternal BCG scar is associated with increased infant proinflammatory immune responses. *Vaccine*, *35*(2), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.079>
- Mayer-Barber, K. D., & Barber, D. L. (2015). Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018424>
- Melgert, B. N., Oriss, T. B., Qi, Z., Dixon-McCarthy, B., Geerlings, M., Hylkema, M. N., & Ray, A. (2010). Macrophages: regulators of sex differences in asthma? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *42*(5), 595–603. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0016OC>
- Moliva, J. I., Turner, J., & Torrelles, J. B. (2017). Immune Responses to Bacillus Calmette-Guérin Vaccination: Why Do They Fail to Protect against Mycobacterium tuberculosis? *Frontiers in Immunology*, *8*, 407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00407>
- Mollen, K., Mollen, K., Kaczorowski, D., Yoneyama, T., Vallabhaneni, R., Kilgore, T., Bo, M., Lotze, M., & Billiar, T. (2007). MD2 and CD14 mediate toll-like receptor 4 (TLR4) activation by high mobility group box 1 (HMGB1). *Journal of the American College of Surgeons*, *205*(3), S28. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.063>
- Mortaz, E., Adcock, I. M., Tabarsi, P., Masjedi, M. R., Mansouri, D., Velayati, A. A., Casanova, J. L., & Barnes, P. J. (2015). Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Clinical Immunology*, *35*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0103-7>
- Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *20*(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>
- Nagai, Y., & Takatsu, K. (2014). Role of the Immune System in Obesity-

- Associated Inflammation and Insulin Resistance. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*, 281–293.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407869-7.00026-X>
- Nasution, D. A. D., Airlangga, E., Delyuzar, & Sinaga, N. (2021). Gambaran Karakteristik Anak Penderita TB Paru pada Anak Usia 0-17 Tahun di Rumah Sakit Umum Haji Medan. *Jurnal Ilmiah Maksitek*, 6(2), 128–134.
- Nayak, S., & Acharjya, B. (2012). Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatology Online Journal*, 3(1), 2–6.  
<https://doi.org/10.4103/2229-5178.93479>
- Nordholm, A. C., Holm, L. L., Svensson, E., Andersen, P. H., & Johansen, I. S. (2019). Tuberculosis Transmission in Danish Children: A Nationwide Register-based Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(4), 340–343.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002139>
- Panteleev, A. V., Nikitina, I. Y., Burmistrova, I. A., Kosmiadi, G. A., Radaeva, T. V., Amansahedov, R. B., Sadikov, P. V., Serdyuk, Y. V., Larionova, E. E., Bagdasarian, T. R., Chernousova, L. N., Ganusov, V. V., & Lyadova, I. V. (2017). Severe Tuberculosis in Humans Correlates Best with Neutrophil Abundance and Lymphocyte Deficiency and Does Not Correlate with Antigen-Specific CD4 T-Cell Response. *Frontiers in Immunology*, 8, 963.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00963>
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Sun, Z., Chen, Y., & Chen, Z. (2008). Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology*, 123(1), 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02691.x>
- Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. (2016). *Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan Tuberkulosis di Indonesia*.
- Purnamaningsih, I., Adi, M. S., & Dian, L. (2018). Relationship History Status of BTA + Contact on Events Child TB (Study at the Semarang Regional Public Health Center) (Hubungan Status Riwayat Kontak Bta+ Terhadapkejadian Tb Anak(Studi Di Balai Kesehatan Masyarakat Wilayah Semarang)). *Jurnal Kesehatan Masyarakat (e-Journal)*, 6(1), 273–278.
- Putra, I. A., & Amelia. (2013). Profil Tuberkulosis Pada Anak di Instalasi Rawat Jalan RSUD Raden Mattaher Jambi. *Jambi Medical Journal*, 1, 51–60.
- Qi, H., Sun, L., Wu, X., Jin, Y., Xiao, J., Wang, S., Shen, C., Chu, P., Qi, Z., Xu, F., Guo, Y., Jiao, W., Tian, J., & Shen, A. (2015). Toll-like receptor 1(TLR1) Gene SNP rs5743618 is associated with increased risk for tuberculosis in Han Chinese children. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 95(2), 197–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2014.12.001>
- R&D Systems. (2021). *Toll-like Receptors (TLRs)*.  
<https://www.rndsystems.com/research-area/toll-like-receptors--tlrs>

- Rahajoe, N. N., Supriyatno, B., & Setyanto, D. B. (2018). *Buku Ajar Respiriologi Anak* (4th ed.). Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Rahmawati, A., Utomo, B., & Makhfudli, M. (2020). *Contact Investigation and Preventive Therapy as Tuberculosis prevention in Children with Tuberculosis Household Contact : A Systematic Review*. 15(2).
- Rakhmawati, F. J., & Yulianti, A. B. (2020). *Angka Kejadian Tuberkulosis Paru pada Anak dengan Imunisasi BCG di RSUD Al-Ihsan Bandung Bulan Januari – Juni 2019 Numbers of Lung Tuberculosis in Children with BCG Immunization in Al Ihsan Bandung Hospital Months January – June 2019*. 2(2), 114–117.
- Ramírez-Lapausa, M., Menéndez-Saldaña, A., & Noguerado-Asensio, A. (2015). Extrapulmonary tuberculosis. *Revista espanola de sanidad penitenciaria*, 17(1), 3–11. <https://doi.org/10.4321/S1575-06202015000100002>
- Ravn, P. (2016). *Interferon Gamma Release Assays in Denmark, population-based studies from a tuberculosis low-incidence country*.
- Re, F., & Strominger, J. L. (2003). Separate functional domains of human MD-2 mediate Toll-like receptor 4-binding and lipopolysaccharide responsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(10), 5272–5276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5272>
- Ritz, N., & Curtis, N. (2009). Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 89(4), 248–251. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.03.002>
- Rodrigues, L. C., Mangtani, P., & Abubakar, I. (2011). How does the level of BCG vaccine protection against tuberculosis fall over time? *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 343, d5974. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5974>
- Rodríguez, L., Graniel, J., & Ortiz, R. (2007). Effect of leptin on activation and cytokine synthesis in peripheral blood lymphocytes of malnourished infected children. *Clinical and Experimental Immunology*, 148(3), 478–485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03361.x>
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, 18(4), e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Rosandali, F., Aziz, R., & Suharti, N. (2016). Hubungan antara Pembentukan Scar Vaksin BCG dan Kejadian Infeksi Tuberkulosis. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 5(2), 381–384. <https://doi.org/10.25077/jka.v5i2.526>
- Roy, A., Eisenhut, M., Harris, R. J., Rodrigues, L. C., Sridhar, S., Habermann, S., Snell, L., Mangtani, P., Adetifa, I., Lalvani, A., & Abubakar, I. (2014). Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 349, g4643. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4643>
- Roy, P., Vekemans, J., Clark, A., Sanderson, C., Harris, R. C., & White, R.

- G. (2019). Potential effect of age of BCG vaccination on global paediatric tuberculosis mortality: a modelling study. *The Lancet Global Health*, 7(12), e1655–e1663. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30444-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30444-9)
- Rudolf, F. (2014). The Bandim TBscore--reliability, further development, and evaluation of potential uses. *Global Health Action*, 7, 24303. <https://doi.org/10.3402/gha.v7.24303>
- Rutherford, M. E., Nataprawira, M., Yulita, I., Apriani, L., Maharani, W., van Crevel, R., Hill, P. C., & Alisjahbana, B. (2012). QuantiFERON®-TB Gold In-Tube assay vs. tuberculin skin test in Indonesian children living with a tuberculosis case. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 16(4), 496–502. <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0491>
- Salie, M., Daya, M., Lucas, L. A., Warren, R. M., van der Spuy, G. D., van Helden, P. D., Hoal, E. G., & Möller, M. (2015). Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 34, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.004>
- Santiago-García, B., Blázquez-Gamero, D., Baquero-Artigao, F., Ruíz-Contreras, J., Bellón, J. M., Muñoz-Fernández, M. A., & Mellado-Peña, M. J. (2016). Pediatric Extrapulmonary Tuberculosis: Clinical Spectrum, Risk Factors and Diagnostic Challenges in a Low Prevalence Region. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(11), 1175–1181. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001270>
- Santiago, E. M., Lawson, E., Gillenwater, K., Kalangi, S., Lescano, A. G., Du Quella, G., Cummings, K., Cabrera, L., Torres, C., & Gilman, R. H. (2003). A prospective study of bacillus Calmette-Guérin scar formation and tuberculin skin test reactivity in infants in Lima, Peru. *Pediatrics*, 112(4), e298. <https://doi.org/10.1542/peds.112.4.e298>
- Savino, W. (2002). The thymus gland is a target in malnutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 Suppl 3, S46-9. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601485>
- Sayedi, S. M., Seddiq, M. K., Rashidi, M. K., Qader, G., Ikram, N., Melese, M., & Suarez, P. G. (2020). Active household contact screening for tuberculosis and provision of isoniazid preventive therapy to under-five children in Afghanistan. *PLOS ONE*, 15(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240031>
- Schaltz-Buchholzer, F., Berendsen, M., Roth, A., Jensen, K. J., Bjerregaard-Andersen, M., Kjær Sørensen, M., Monteiro, I., Aaby, P., & Stabell Benn, C. (2020). BCG skin reactions by 2 months of age are associated with better survival in infancy: A prospective observational study from Guinea-Bissau. *BMJ Global Health*, 5(9), 1–13. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-002993>

- Scheelbeek, P. F. D., Wirix, A. J. G., Hatta, M., Usman, R., & Bakker, M. I. (2014). Risk factors for poor tuberculosis treatment outcomes in Makassar, Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *45*(4), 853–858.
- Schurz, H., Daya, M., Möller, M., Hoal, E. G., & Salie, M. (2015). TLR1, 2, 4, 6 and 9 Variants Associated with Tuberculosis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS One*, *10*(10), e0139711. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>
- Seddon, J. A., Paton, J., Nademi, Z., Keane, D., Williams, B., Williams, A., Welch, S. B., Liebeschütz, S., Riddell, A., Bernatoniene, J., Patel, S., Martinez-Alier, N., McMaster, P., & Kampmann, B. (2016). The impact of BCG vaccination on tuberculin skin test responses in children is age dependent: evidence to be considered when screening children for tuberculosis infection. *Thorax*, *71*(10), 932–939. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207687>
- Siregar, P. A., Gurning, F. P., Eliska, & Pratama, M. Y. (2018). Analysis of Factors Associated with Pulmonary Tuberculosis Incidence of Children in Sibuhuan General Hospital. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, *6*(3), 268. <https://doi.org/10.20473/jbe.v6i32018.268-275>
- Sloot, R., Schim van der Loeff, M. F., Kouw, P. M., & Borgdorff, M. W. (2014). Risk of tuberculosis after recent exposure. A 10-year follow-up study of contacts in Amsterdam. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *190*(9), 1044–1052. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1159OC>
- Storgaard, L., Rodrigues, A., Martins, C., Nielsen, B. U., Ravn, H., Benn, C. S., Aaby, P., & Fisker, A. B. (2015). Development of BCG Scar and Subsequent Morbidity and Mortality in Rural Guinea-Bissau. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *61*(6), 950–959. <https://doi.org/10.1093/cid/civ452>
- Tabatabaei, H. (2019). Newborn BCG Vaccinations: Scar Formation and Tuberculin Conversion Rates: A Retrospective Study. *American Journal of Pediatrics*, *5*(1), 1. <https://doi.org/10.11648/j.ajp.20190501.11>
- Tang, C.-L., & Chen, Z. (2009). Differential gene expression between asymptomatic HBV carriers and normal adults. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International : HBPD INT*, *8*(4), 383–388.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, *249*(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Tellez-Navarrete, N. A., Ramon-Luing, L. A., Muñoz-Torrico, M., Osuna-Padilla, I. A., & Chavez-Galan, L. (2021). Malnutrition and tuberculosis: the gap between basic research and clinical trials. *Journal of Infection in Developing Countries*, *15*(3), 310–319. <https://doi.org/10.3855/jidc.12821>
- Tenforde, M. W., Yadav, A., Dowdy, D. W., Gupte, N., Shivakoti, R., Yang,



- W.-T., Mwelase, N., Kanyama, C., Pillay, S., Samaneka, W., Santos, B., Poongulali, S., Tripathy, S., Riviere, C., Berendes, S., Lama, J. R., Cardoso, S. W., Sugandhavesa, P., Christian, P., ... Gupta, A. (2017). Vitamin A and D Deficiencies Associated With Incident Tuberculosis in HIV-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy in Multinational Case-Cohort Study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)*, *75*(3), e71–e79.  
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001308>
- Thomas, T. A. (2017). Tuberculosis in Children. *Pediatric Clinics of North America*, *64*(4), 893–909.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.03.010>
- Thyssen, S. M., Benn, C. S., Gomes, V. F., Rudolf, F., Wejse, C., Roth, A., Kallestrup, P., Aaby, P., & Fisker, A. (2020). Neonatal BCG vaccination and child survival in TB-exposed and TB-unexposed children: a prospective cohort study. *BMJ Open*, *10*(2), e035595.  
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-035595>
- Triasih, R., Rutherford, M., Lestari, T., Utarini, A., Robertson, C. F., & Graham, S. M. (2012). Contact investigation of children exposed to tuberculosis in South East Asia: a systematic review. *Journal of Tropical Medicine*, *2012*, 301808.  
<https://doi.org/10.1155/2012/301808>
- Trunz, B. B., Fine, P., & Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet (London, England)*, *367*(9517), 1173–1180.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68507-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68507-3)
- Vanden Driessche, K., Persson, A., Marais, B. J., Fink, P. J., & Urdahl, K. B. (2013). Immune Vulnerability of Infants to Tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*, 781320.  
<https://doi.org/10.1155/2013/781320>
- Varzari, A., Deyneko, I. V., Vladei, I., Grallert, H., Schieck, M., Tudor, E., & Illig, T. (2019). Genetic variation in TLR pathway and the risk of pulmonary tuberculosis in a Moldavian population. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *68*, 84–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.005>
- Venturini, E., Facchini, L., Martinez-Alier, N., Novelli, V., Galli, L., de Martino, M., & Chiappini, E. (2014). Vitamin D and tuberculosis: a multicenter study in children. *BMC Infectious Diseases*, *14*, 652.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-014-0652-7>
- Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*, *59*, 391–412. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002>
- Villacres, M. C., Longmate, J., Auge, C., & Diamond, D. J. (2004). Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion.

- Human Immunology*, 65(5), 476–485.  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.021>
- vom Steeg, L. G., & Klein, S. L. (2016). SeXX Matters in Infectious Disease Pathogenesis. *PLOS Pathogens*, 12(2), e1005374.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005374>
- Wang, C., Chen, T., Zhang, J., Yang, M., Li, N., Xu, X., & Cao, X. (2009). The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 “preferentially” promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nature Immunology*, 10(7), 744–752.  
<https://doi.org/10.1038/ni.1742>
- WHO. (2016). *Tuberculosis*. WHO.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- WHO. (2018). BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 - Recommendations. *Vaccine*, 36(24), 3408–3410.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.009>
- WHO. (2019). *Global Tuberculosis Report Executive Summary*.
- WHO. (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*.
- Widyastuti, N. N., Nugraheni, W. P., Wahyono, T. Y. M., & Yovsyah, Y. (2021). Hubungan Status Gizi Dan Kejadian Tuberculosis Paru Pada Anak Usia 1-5 Tahun Di Indonesia (Analisis Data Riskesdas 2018). *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*, 24(2).
- Yajima, T., Yagihashi, A., Kameshima, H., Kobayashi, D., Furuya, D., Hirata, K., & Watanabe, N. (1998). Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clinical Chemistry*, 44(12), 2441–2445.
- Yumoto, H., Hirao, K., Hosokawa, Y., Kuramoto, H., Takegawa, D., Nakanishi, T., & Matsuo, T. (2018). The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity. *The Japanese Dental Science Review*, 54(3), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.03.001>