

DISERTASI

**IMUNOPATOGENESIS TUBERKULOSIS PARU :
ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN HIGH-MOBILITY
GROUP BOX 1 (HMGB-1), SOLUBLE PROTEIN HMGB 1,
TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR 4) DAN INTERLEUKIN 6 (IL 6)**

***IMMUNOPATHOGENESIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS
: ANALYSIS EXPRESSION OF mRNA HIGH-MOBILITY
GROUP BOX 1 (HMGB-1) GENE, SOLUBLE PROTEIN
HMGB 1, TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR 4) AND
INTERLEUKIN 6 (IL 6)***

**TRI ARIGUNTAR WIKANNING TYAS
(NPM : P02003140450)**



**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2019**

TIM PENILAI PROMOSI

Promotor : Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi , Ph.D

Ko-promotor : dr. Uleng Bahrun, Ph. D, Sp.PK(K)

Ko-promotor : Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)

Penilai : Prof. Dr. dr. Muh. Amin, Sp.P(K)

Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam,Sp.BS(K)

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)

Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes

Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, Sp.PD(K), Sp.P(K)

Dr. dr. Nursin Abdul Kadir, Sp.PK

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Tri Ariguntar Wikanning Tyas

Nomor Mahasiswa : P0200314050

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penelitian yang saya tulis ini adalah 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, Februari 2019

Yang menyatakan

Tri Ariguntar Wikanning Tyas

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Alhamdulillah *rabbi'l'alamin*, penulis panjatkan ke hadirat **Allah SWT**, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini. dengan judul **“IMUNOPATOGENESIS TUBERKULOSIS PARU : ANALISIS EKSPRESI mRNA GEN *HIGH-MOBILITY GROUP BOX 1* (HMGB1), *SOLUBLE PROTEIN HMGB 1*, *TOLL LIKE RECEPTOR 4* (TLR4) DAN INTERLEUKIN 6 (IL6)”** sebagai salah satu persyaratan mencapai gelar Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita **Nabi Besar Muhammad SAW** beserta keluarga, sahabat dan pengikut-Nya hingga akhir zaman.

Pertama-tama penulis haturkan rasa hormat dan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada orang tua saya tercinta, Almarhum Bapak **Drs. Gunanto** dan almarhumah Ibunda **Hj. Sutarsih** yang semasa hidupnya memelihara, mendidik dan membesarkan dengan penuh kasih sayang, selalu mendukung dan memotivasi penulis, serta senantiasa mendoakan kami dari kecil hingga mampu seperti sekarang ini. Semoga Allah SWT mencatat amal ibadahnya dan diberi tempat yang layak disisiNya.

Penyusunan dan penyelesaian disertasi ini tidak terlepas dari keterlibatan dan bantuan dari berbagai pihak. Dalam kesempatan ini, penulis dengan tulus menyampaikan rasa hormat dan terimakasih kasih yang tak terhingga kepada:

Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A., selaku Rektor Universitas Hasanuddin. **Prof. Dr. Budu, Ph.D, SpM-KVR, M.Med.Ed**, selaku dekan Fakultas kedokteran UNHAS dan **Prof. Dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran FK UNHAS periode 2014-2018 atas izin dan dukungannya dalam mengikuti pendidikan doktor. Dan selaku anggota tim penilai, terima kasih yang tidak terhingga atas asupan dan koreksi yang diberikan pada penulisan disertasi ini. **dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK**, selaku ketua Program studi S3 UNHAS dan **Prof. dr. H. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)**, selaku Ketua Program Studi S3 Kedokteran UNHAS sebelumnya dan anggota penilai, saya sampaikan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga atas segala bantuan, dorongan, motivasi, bimbingan yang tiada lelah dalam menyelesaikan penelitian ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan membalas amal kebaikan mereka.

Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, selaku promotor dan guru yang telah meluangkan waktu mengarahkan, mendorong, memotivasi, memberikan ide dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi ini. **dr. Ulung Bahrin, Ph.D, Sp.PK(K)** dan **Dr. dr. Irawati Djaharuddin, Sp.P(K)**, selaku Co-Promotor dan guru, yang telah

meluangkan waktu dengan penuh kesabaran membimbing, mengarahkan dan memotivasi penulis hingga penyelesaian disertasi ini. Saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga dan permohonan maaf yang sebesar-besarnya kepada promotor dan kopromotor, bila selama bimbingan ada kesalahan dan kekhilafan yang penulis perbuat, Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan membalas amal kebaikan mereka.

Prof. Dr. dr. Muhammad Amin, Sp.P(K), selaku Penguji Eksternal yang selalu menyempatkan waktu di sela kegiatannya yang padat untuk memberi masukan dan perbaikan sejak persiapan hingga akhir penulisan disertasi ini. Semoga Allah SWT mencatat semua amal kebaikan beliau.

Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.S., selaku penguji yang banyak memberikan inspirasi, bimbingan dan koreksi khususnya bidang pengolahan statistik dan metodologi penelitian dari awal hingga penyelesaian disertasi ini, **Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, Sp.P(K), Sp.PD**, dan **Dr. dr. Nursin Abdul Kadir, Sp.PK**. atas kesediaannya membimbing sekaligus menjadi penguji. Koreksian dan saran yang tajam membangun substansi disertasi ini. Semoga Allah SWT, senantiasa melindungi dan mencatat seluruh amal kebaikan mereka.

Kepada **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)** selaku kepala Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi FK Unhas beserta staff **H. Romi dan Pak Mus** atas bantuan dan fasilitas selama penelitian. Semoga Allah SWT membalas semua amal kebaikan mereka.

Rektor Universitas Muhammadiyah Jakarta. **Prof. Dr. Syaiful Bahri, S.H., M.H.** dan jajarannya atas dukungan baik moril maupun materi.. Dekan FKK UMJ, **dr. Muhammad Fachri, Sp.P** sekaligus teman seperjuangan dalam menempuh pendidikan S3, terima kasih atas dukungan, motivasi dan bantuannya terutama bantuan dana selama pendidikan dan penelitian, dari awal pendidikan hingga selesainya disertasi ini. Keluarga besar fakultas kedokteran Universitas Muhammadiyah Jakarta, **Guru Besar, para Dosen dan seluruh staf** yang selama ini mendoakan dan memotivasi hingga selesainya disertasi ini. Terima kasih yang tak terhingga. Semoga Allah SWT membalas semua amal kebaikan mereka.

Direktur RSIJ Pondok Kopi dan Sukapura atas ijinnya sebagai tempat pengambilan sampel penelitian selama pendidikan, seluruh perawat yang telah membantu pengambilan sampel. **Dr. Murtiyas Galuh, Sp.PK** selaku kepala Laboratorium Patologi Klinik di RSIJ Pondok kopi dan Sukapura dan juga sebagai Ketua PDS PATKLIN cabang Jakarta, yang selalu mendorong dan memotivasi serta membantu selama proses sampling dan penanganan sampel penelitian. Terima kasih yang sebesar-besarnya semoga Allah SWT membalas semua amal kebaikan mereka.

Para Direktur dan seluruh analis di RS Karya Medika Bantar Gebang, RS Bhineka Bakti Husada, dan RS Kartika Husada Setu. Terima kasih yang tak terhingga atas dukungan dan ijin selama menempuh pendidikan sehingga penulis dapat mengikuti Program Doktor ini dengan baik.

dr. Amir Syafruddin, M.Med.Ed, dan **dr. Slamet Sudi Santoso, M.Pd.Ked,** selaku rekan kerja sekaligus teman angkatan pendidikan S3 UNHAS, yang selalu memotivasi dan berbagi ilmu. **dr. Indah Pratiwi** yang sangat membantu selama proses pengambilan sampel dan tabulasi data. Terima kasih yang tak terhingga semoga Allah SWT membalas segala amal baik mereka.

Staf Program S3 Ilmu Kedokteran UNHAS, **Pak Akmal, Pak Mumu dan Ibu Nur,** atas dukungan dan bantuannya baik secara moril maupun secara administratif.

Seluruh pasien maupun keluarga pasien serta sukarelawan yang secara ikhlas tanpa paksaan, ikut berpartisipasi dalam penelitian ini.

Secara khusus kami sampaikan rasa terimakasih dan penghormatan tak terhingga kepada Bapak dan ibu mertua saya, almarhum **Prof. Dr. Sudjinggo** dan ibunda **Hj. Lasmiyati** atas dukungan moril serta doanya yang senantiasa diberikan. Kepada Kakak-kakak & Adik-adikku yang selalu mendukung dan mendoakan, **Eko Ariguntar P, Dwi Ariguntar S, Catur Ariguntar A, dan Panca Ariguntar W.**

Tak terhingga ungkapan rasa syukur, telah memiliki **Yoga Fortuna Wisnu Wardana, S.E., M.M.,** suami tercinta yang penuh pengertian dan

setia mendampingi dalam keadaan susah maupun senang. Kesabaran, pengertian, dorongan serta doa yang senantiasa dipanjatkan yang sangat mendukung terselesainya disertasi ini. Juga untuk ketiga putraku **Muhammad Reynaldi Anandita Ganing, Muhammad Reyzandi Anandita Ganing, dan Muhammad Rafialdi Anandita Ganing** sebagai penyemangat dan penghibur selama menempuh pendidikan doktoral. Semoga perjuangan Ibu dapat menjadi tauladan bagi kalian, serta disertasi ini menjadi motivasi kalian untuk menuntut ilmu setinggi-tingginya karena sesungguhnya “Allah mengangkat derajat orang-orang yang beriman dan berilmu” (QS. Al-Mujadalah 58:11), semoga Ridho Allah senantiasa bersama kalian dan menjadi anak-anak yang soleh dan sukses. *Aamiin.*

Kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian Pendidikan Doktor dan penerbitan disertasi ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, dengan ketulusan hati, saya sampaikan penghargaan yang setinggi-tingginya. Semoga Allah SWT membalas kebaikan Bapak, Ibu, saudara dan saudari sekalian dengan pahala yang berlipat ganda. *Aamiin.*

Saya menyadari bahwa disertasi ini tidak luput dari kekurangan dan keterbatasan, karena itu kritikan dan saran membangun sangat diharapkan dari berbagai pihak untuk penyempurnaan disertasi ini.

Akhir kata, semoga dengan terbitnya disertasi ini dapat bermanfaat untuk kepentingan ilmu pengetahuan dan untuk kepentingan aplikasi klinis

kepada masyarakat, khususnya dalam penanganan, pencegahan dan penanggulangan tuberkulosis di Indonesia.

Aamiin, aamiin, Ya Rabbal Aalamiin.

Wassalamu 'alaikum warahmatullahi wabarakatuh.

Makassar, Februari 2019

Tri Ariguntar Wikaning Tyas

ABSTRAK

TRI ARIGUNTAR WIKANNING TYAS. Imunopatogenesis Tuberkulosis Paru: Analisis Ekspresi mRNA gen High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), Soluble Protein HMGB1, Toll Like Receptor 4 (TLR 4) dan Interleukin 6 (IL6) (dibimbing oleh **Muhammad Nasrum Massi, Uleng Bahrin, Irawati Djaharuddin**)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui imunopatogenesis tuberkulosis baik TB aktif maupun TB laten yang melibatkan ekspresi gen HMGB1, TLR4 dan IL6; serta kemungkinan ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, protein TLR4 dan protein IL6 dijadikan biomarker penanda proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif.

Desain penelitian *cross sectional*, dilakukan di RS Islam Jakarta Pondok Kopi dan Sukapura pada bulan November 2017 hingga Februari 2018. Sampel penelitian sebanyak 52 sampel terdiri dari 26 sampel TB aktif dan 26 sampel TB laten. Pemeriksaan protein serum HMGB 1, TLR 4 dan IL 6 secara ELISA dan mRNA gen HMGB1 menggunakan qRT-PCR di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin..

Hasil penelitian mendapatkan rerata mRNA gen HMGB1 pada TB Aktif ($11,49 \pm 0,86$ kopi/ μ L) lebih tinggi dari TB Laten ($8,40 \pm 0,78$ kopi/ μ L) dengan $p < 0,001$. Kadar soluble protein HMGB1 pada TB Aktif ($1234,87 \pm 105,2$ pg/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($183,66 \pm 110,65$ pg/mL). Kadar protein TLR 4 pada TB Aktif ($10,42 \pm 0,68$ ng/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($0,94 \pm 0,55$ ng/mL) dan kadar protein IL 6 pada TB Aktif ($24,32 \pm 1,31$ ng/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($3,38 \pm 1,41$ ng/mL) dengan $p < 0,001$. Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan kadar soluble protein HMGB1, antara kadar soluble protein HMGB1 dengan kadar protein TLR4, antara kadar soluble HMGB1 dengan kadar protein IL6 dan antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB 1. Rentang nilai mRNA gen HMGB1 antara 8,73 – 11,14 kopi/ μ L, rentang nilai kadar soluble protein HMGB1 antara 228,36 – 1192,41 pg/mL serta rentang nilai kadar protein TLR4 antara 1,17 – 10,15 ng/mL dapat dipakai sebagai penanda untuk pertimbangan pemberian terapi profilaksis antituberkulosis pada TB laten.

Kata kunci: mRNA HMGB1, soluble protein HMGB1, TLR4, IL 6, TB aktif, TB laten

ABSTRACT

TRI ARIGUNTAR WIKANNING TYAS. Immunopathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: Analysis expression of mRNA High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) gene, Soluble Protein HMGB1, Toll Like Receptor 4 (TLR 4) and Interleukin 6 (IL 6) (Supervised by **Muhammad Nasrum Massi, Uleng Bahrn, Irawati Djaharuddin**)

This study aims to knowing tuberculosis immunopathogenesis in both active TB and latent TB involving the expression of HMGB1 gene, TLR4 and IL6; and the possibility of expression mRNA HMGB1 gene, HMGB1 soluble protein, TLR4 protein and IL6 protein used as biomarkers of the reactivation process of latent TB to active TB.

The cross-sectional study design was carried out at the Jakarta Islamic Hospital Pondok Kopi and Sukapura in November 2017 to February 2018. The study samples were 52 samples consisting of 26 samples of active TB and 26 samples of latent TB. Examination of HMGB 1, TLR 4 and IL 6 serum proteins by ELISA and mRNA HMGB1 gene using qRT-PCR at the Laboratory of Molecular Biology and Immunology Faculty of Medicine, Hasanuddin University.

The results shows that mean expression of mRNA HMGB1 gene in active TB (11.49 ± 0.86 copies/ μ L) higher than latent TB (8.40 ± 0.78 copies/ μ L) with $p < 0.001$. HMGB1 protein soluble levels in active TB (1234.87 ± 105.2 pg/mL) were higher than latent TB (183.66 ± 110.65 pg / mL). TLR4 protein levels in active TB (10.42 ± 0.68 ng / mL) were higher than latent TB (0.94 ± 0.55 ng / mL) and IL 6 protein levels in active TB ($24.32 \pm 1, 31$ ng/mL) were higher than latent TB (3.38 ± 1.41 ng / mL) with $p < 0.001$. There is a significant correlation between HMGB1 gene mRNA expression with HMGB1 soluble protein levels, between HMGB1 soluble protein levels and TLR4 protein levels, between soluble HMGB1 levels and IL6 protein levels and between IL6 protein levels and HMGB gene mRNA expression 1. The range of mRNA HMGB1 gene values between 8.73 - 11.14 copies / μ L, range of HMGB1 protein soluble levels between 228.36 - 1192.41 pg / mL and range of TLR4 protein levels between 1.17 - 10.15 ng / mL can be used as a marker for consideration of giving antituberculosis prophylactic therapy to latent TB.

Keywords: mRNA HMGB1 gene, HMGB1 protein soluble, TLR 4, IL 6, active TB, latent TB

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
LEMBARAN PENGESAHAN	II
TIM PENILAI PROMOSI	III
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	IV
KATA PENGANTAR	V
ABSTRAK	XII
ABSTRACT	XIII
DAFTAR ISI	XIV
DAFTAR TABEL	XVII
DAFTAR GAMBAR	XVIII
DAFTAR SINGKATAN	XIX
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	
1.4.1. Aspek Pengembangan Ilmu	8
1.4.2. Aspek Aplikasi Klinis	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tuberkulosis	
2.1.1. Definisi Tuberkulosis	10
2.1.2. Etiologi Tuberkulosis	11
2.1.3. Faktor Risiko Tuberkulosis	11
2.1.4. Cara penularan Tuberkulosis	12
2.1.5. Patogenesis Tuberkulosis	13
2.1.6. Klasifikasi TB	17
2.1.7. Gejala Klinis TB	22
2.1.8. Pemeriksaan Fisik TB	23
2.1.9. Pemeriksaan Penunjang TB	24
2.1.10. Diagnosis TB	27
2.1.11. Pengobatan TB	29
2.1.12. Evaluasi Pengobatan TB	35
2.1.13. Pencatatan dan Pelaporan TB	36
2.2. Infeksi TB Laten (ITBL)	
2.2.1. Definisi TB Laten	38

2.2.2.	Diagnosis TB Laten	39
2.2.3.	Pemeriksaan TB Laten	40
2.2.4.	Kelompok Risiko TB Laten	44
2.2.5.	Kelompok Risiko Tinggi TB Laten	45
2.3.	Sistem Imunitas Tubuh Terhadap Infeksi	
2.3.1.	Respon Imun Terhadap MTB	46
2.4.	High Mobility Group Box 1 (HMGB1)	
2.4.1.	Definisi HMGB1	51
2.4.2.	Struktur HMGB1	51
2.4.3.	Fisiologi dan Peranan HMGB1	53
2.4.4.	Peran Proimflamatorik HMGB1	56
2.4.5.	Peran HMGB1 pada Infeksi	58
2.4.6.	Peranan HMGB1 pada Infeksi TB	63
2.5.	Penanda Biologis Interleukin 6 (IL6)	
2.5.1.	Definisi	74
2.5.2.	Biosintesis dan Sekresi IL6	74
2.5.3.	Aktivitas Biologi IL6	75
2.6.	Penanda Biologis Toll Like Receptor 4 (TLR4)	
2.6.1.	Definisi	77
2.6.2.	Peranan TLR4 sebagai reseptor transmembran	78
2.6.3.	Peranan TLR4 terhadap Patogen	79
BAB III	KERANGKA TEORI	82
BAB IV	KERANGKA KONSEP	
4.1.	Kerangkap Konsep	83
4.2.	Hipotesis	83
BAB V	METODA PENELITIAN	
5.1.	Disain Penelitian	84
5.2.	Populasi	84
5.3.	Tempat dan Waktu	84
5.4.	Sampel Penelitian	
5.4.1.	Tehnik Sampling	85
5.4.2.	Besar Sampel	85
5.4.3.	Kriteria Sampel	86
5.5.	Cara Kerja	
5.5.1.	Pemilihan Subjek Penelitia	87
5.5.2.	Pengumpulan data Penelitian	88
5.5.3.	Persiapan Alat dan Reagen	89
5.6.	Etika Penelitian	103
5.7.	Alur Penelitian TB Aktif	104

5.8.	Alur Penelitian TB Laten	105
5.9.	Definisi Operasional	106
5.10.	Metoda Analisis Data	107
BAB VI	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
6.1.	Hasil Penelitian	109
6.2.	Pembahasan	119
6.3.	Keterbatasan Penelitian	130
BAB VII	SIMPULAN DAN SARAN	
7.1.	Ringkasan	131
7.2.	Simpulan	132
7.3.	Saran	133
PUSTAKA		134
LAMPIRAN		143

DAFTAR TABEL

2.1.	Jenis dan dosis obat antituberkulosis (OAT)	32
2.2.	Dosis Panduan OAT KDT kategori 1	33
2.3.	Dosis Panduan OAT KDT kategori 2	34
2.4.	Perbedaan TB Aktif dan TB Laten	40
2.5.	Interpretasi test Tuberkulosis	42
6.1.	Karakteristik dasar subjek penelitian	112
6.2.	Hasil pemeriksaan parameter variabel yang diteliti	113
6.3.	Hubungan antara ekspresi HMGB1, kadar protein HMGB1, kadar TLR4 dan kadar IL6 pada TB aktif dan TB laten	115
6.4.	Nilai rentang ekspresi gen HMGB1 dan kadar protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada TB aktif dan TB laten	119

DAFTAR GAMBAR

1.	Faktor risiko kejadian TB	12
2.	Patogenesis TB	16
3.	Spektrum infeksi MTB dan daur hidup MTB	17
4.	Klasifikasi TB	20
5.	Klasifikasi TB berdasarkan tipe kasus	22
6.	Alur diagnosis TB	29
7.	Imunitas Innate	50
8.	Struktur HMGB1	52
9.	Mekanisme sekresi dan peran HMGB1	55
10.	Reseptor HMGB1 dan pengaktifan jalur transduksi signal	56
11.	Alat Real Time PCR	97
12.	Kurva standar dan siklus amplifikasi RT PCR	98
13.	Prinsip Elisa sandwich	100
14.	Pengenceran sampel pemeriksaan HMGB1, TLR4, IL6	101
15.	Pengenceran standar pemeriksaan HMGB1, TLR4, IL6	102
16.	Mesin ELISA	104
17.	Perbandingan ekspresi mRNA gen HMGB1 pada TB aktif dan TB laten	114
18.	Perbandingan kadar soluble protein HMGB1 pada TB aktif dan TB laten	114
19.	Perbandingan kadar protein TLR 4 pada TB aktif dan TB laten	117
20.	Perbandingan kadar protein IL6 pada TB aktif dan TB laten	117

DAFTAR SINGKATAN

AIDS	: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
BCG	: <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
BTA	: Basil Tahan Asam
CRP	: <i>C-Reactive Protein</i>
DAMPs	: <i>Damaged associated molecular patterns</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	: <i>Etilen diamin tetra acetat</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HMGB1	: <i>High mobility group box 1</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IGRA	: <i>Interferon gamma release assay</i>
IRF3	: <i>Interferon respon factor 3</i>
IUATLD	: <i>International Union Against Tuberculosis and Lung Disease</i>
KDT	: Kombinasi Dosis Tetap
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
LTA	: <i>Lipoteichoic acid</i>
MyD 88	: <i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
MMR	: <i>Macrophage Mannose Receptors</i>
MIP	: <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic acid</i>
MTB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF κ β	: <i>Nuclear Factor kappa beta</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
OAT	: Obat Anti Tuberculosis
PAMPs	: <i>Pathogen associated molecular patterns</i>

PDPI	: Persatuan Dokter Paru Indonesia
PI3K	: <i>Phosphatidyl Inositol 3 Kinase</i>
PMO	: Pengawas Minum Obat
PMN	: <i>Polymorphonuclear neutrophils</i>
RT PCR	: <i>Real time polymerase chain reaction</i>
RAGE	: <i>Receptors for advanced glycation end product</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen spesies</i>
SAA	: <i>Serum Amyloid A</i>
TIR	: <i>Toll interleukin 1 receptor</i>
TLR4	: <i>Toll like receptors 4</i>
TNF α	: <i>tumor necroting factor alpha</i>
TRIF	: <i>TIR domain containing adapter inducing IFNβ</i>
TST	: <i>Tuberculin Skin Test</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
VDR	: <i>Vitamin D Receptors</i>

ABSTRAK

TRI ARIGUNTAR WIKANNING TYAS. Imunopatogenesis Tuberkulosis Paru: Analisis Ekspresi mRNA gen High-Mobility Group Box 1 (HMGB1), Soluble Protein HMGB1, Soluble protein Toll Like Receptor 4 (sTLR 4) dan Interleukin 6 (IL6) (dibimbing oleh **Muhammad Nasrum Massi, Uleng Bahrin, Irawati Djaharuddin**)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui imunopatogenesis tuberkulosis baik TB aktif maupun TB laten yang melibatkan ekspresi gen HMGB1, TLR4 dan IL6; serta kemungkinan ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, *soluble* protein TLR4 dan protein IL6 dijadikan biomarker penanda proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif.

Desain penelitian *cross sectional*, dilakukan di RS Islam Jakarta Pondok Kopi dan Sukapura pada bulan November 2017 hingga Februari 2018. Sampel penelitian sebanyak 52 sampel terdiri dari 26 sampel TB aktif dan 26 sampel TB laten. Pemeriksaan protein serum HMGB 1, TLR 4 dan IL 6 secara ELISA dan mRNA gen HMGB1 menggunakan qRT-PCR di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin..

Hasil penelitian mendapatkan rerata mRNA gen HMGB1 pada TB Aktif ($11,49 \pm 0,86$ kopi/ μ L) lebih tinggi dari TB Laten ($8,40 \pm 0,78$ kopi/ μ L) dengan $p < 0,001$. Kadar soluble protein HMGB1 pada TB Aktif ($1234,87 \pm 105,2$ pg/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($183,66 \pm 110,65$ pg/mL). Kadar soluble protein TLR 4 pada TB Aktif ($10,42 \pm 0,68$ ng/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($0,94 \pm 0,55$ ng/mL) dan kadar protein IL 6 pada TB Aktif ($24,32 \pm 1,31$ ng/mL) lebih tinggi dari TB Laten ($3,38 \pm 1,41$ ng/mL) dengan $p < 0,001$. Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan kadar soluble protein HMGB1, antara kadar soluble protein HMGB1 dengan kadar soluble protein TLR4, antara kadar soluble HMGB1 dengan kadar protein IL6 dan antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB 1. Rentang nilai mRNA gen HMGB1 antara 8,73 – 11,14 kopi/ μ L, rentang nilai kadar soluble protein HMGB1 antara 228,36 – 1192,41 pg/mL serta rentang nilai kadar soluble protein TLR4 antara 1,17 – 10,15 ng/mL dapat dipakai sebagai penanda untuk pertimbangan pemberian terapi profilaksis antituberkulosis pada TB laten.

Kata kunci: mRNA gen HMGB1, soluble protein HMGB1, soluble protein TLR4,
Interleukin 6, TB aktif, TB laten

ABSTRACT

TRI ARIGUNTAR WIKANNING TYAS. Immunopathogenesis of Pulmonary Tuberculosis: Analysis expression of mRNA High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) gene, Soluble Protein HMGB1, Soluble Protein Toll Like Receptor 4 (sTLR 4) and Interleukin 6 (IL 6) (Supervised by **Muhammad Nasrum Massi, Uleng Bahrin, Irawati Djaharuddin**)

This study aims to knowing tuberculosis immunopathogenesis in both active TB and latent TB involving the expression of HMGB1 gene, TLR4 and IL6; and the possibility of expression mRNA HMGB1 gene, HMGB1 soluble protein, TLR4 soluble protein and IL6 protein used as biomarkers of the reactivation process of latent TB to active TB.

The cross-sectional study design was carried out at the Jakarta Islamic Hospital Pondok Kopi and Sukapura in November 2017 to February 2018. The study samples were 52 samples consisting of 26 samples of active TB and 26 samples of latent TB. Examination of HMGB 1, TLR 4 and IL 6 serum proteins by ELISA and mRNA HMGB1 gene using qRT-PCR at the Laboratory of Molecular Biology and Immunology Faculty of Medicine, Hasanuddin University.

The results shows that mean expression of mRNA HMGB1 gene in active TB (11.49 ± 0.86 copies/ μ L) higher than latent TB (8.40 ± 0.78 copies/ μ L) with $p < 0.001$. HMGB1 protein soluble levels in active TB (1234.87 ± 105.2 pg/mL) were higher than latent TB (183.66 ± 110.65 pg / mL). TLR4 soluble protein levels in active TB (10.42 ± 0.68 ng / mL) were higher than latent TB (0.94 ± 0.55 ng / mL) and IL 6 protein levels in active TB ($24.32 \pm 1, 31$ ng/mL) were higher than latent TB (3.38 ± 1.41 ng / mL) with $p < 0.001$. There is a significant correlation between HMGB1 gene mRNA expression with HMGB1 soluble protein levels, between HMGB1 soluble protein levels and TLR4 soluble protein levels, between soluble HMGB1 levels and IL6 protein levels and between IL6 protein levels and HMGB gene mRNA expression 1. The range of mRNA HMGB1 gene values between 8.73 - 11.14 copies / μ L, range of HMGB1 protein soluble levels between 228.36 - 1192.41 pg / mL and range of TLR4 soluble protein

levels between 1.17 - 10.15 ng / mL can be used as a marker for consideration of giving antituberculosis prophylactic therapy to latent TB.

Keywords: mRNA HMGB1 gene, HMGB1 protein soluble, TLR 4 soluble protein, Interleukin 6, active TB, latent TB

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis adalah penyakit menular yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Terutama mengenai paru disebut TB paru tetapi dapat juga mengenai organ lain disebut TB ekstraparu (PDPI., 2011; WHO., 2015). Tuberkulosis merupakan satu dari sepuluh penyakit penyebab kematian dan sebagai agen infeksi tunggal penyebab utama kematian diatas *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)/*Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS). *Global Tuberculosis Report 2018* melaporkan terdapat 1,3 juta kematian pada orang dengan HIV negatif dan 300.000 kematian pada orang dengan HIV positif. Diperkirakan terdapat 10 juta penderita TB pada 2017 di dunia: 5,8 juta pada pria, 3,2 juta pada wanita dan 1 juta pada anak-anak dan lebih dari 90% pada orang dewasa, lebih dari 15 tahun (WHO., 2018).

Indonesia menduduki urutan ketiga setelah India dan Cina dengan jumlah penderita TB sekitar 8% dari total jumlah kasus TB paru di dunia (WHO., 2018). Hingga saat ini tuberkulosis masih menjadi masalah kesehatan utama di Indonesia walaupun upaya pengendalian TB dengan strategi *Directly Observed Treatment Shortcourse chemotherapy* (DOTS) telah diterapkan sejak 1995. Laporan kementerian kesehatan Republik Indonesia 2017, mendapatkan jumlah kasus baru TB dengan basil tahan

asam (BTA) positif pada tahun 2016 sebesar 156.723 kasus. Angka cakupan penemuan kasus (*Case Detection Rate*) penyakit TB tahun 2016 baru mencapai 60,59% dan angka keberhasilan pengobatan (*success rate*) sebesar 75,4% yang masih rendah dengan tingkat penularan pasien TB BTA positif yang masih tinggi sebesar 65%. Masalah ini bertambah dengan makin meningkatnya kasus HIV dan resistensi terhadap obat antituberkulosis (Kemenkes RI., 2017).

Pasien TB dapat menyebarkan kuman MTB ke udara dalam bentuk percikan dahak, yang sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 *droplet nuclei*/percik renik. Dengan Imunitas yang baik seseorang yang terpapar kuman MTB, tidak akan bermanifestasi klinik dan tidak menularkan kepada orang lain atau infeksi laten TB, akan tetapi saat imunitas tubuh menurun keadaan ini dapat berkembang menjadi penyakit TB yang berpotensi menjadi sumber penularan (Kemenkes., 2014). Sekitar 2-5% infeksi TB laten ini dapat berkembang menjadi TB aktif dan merupakan reservoir paling besar untuk menularkan kuman MTB. (Druszczynska M et al., 2012; Cliff J. M et al., 2015; PDPI., 2016). Proses imunopatogenesis TB merupakan proses yang dinamis yang melibatkan faktor pejamu dan agen. Faktor pejamu berupa sistem imunitas, genetik, gizi dan lingkungan, sedangkan faktor agen berupa virulensi dan jumlah kuman /*bacterial load* (Subowo, 2014). Oleh karena itu perlu pemahaman tentang patomekanisme imun respons pada infeksi TB, dengan harapan dapat mengurangi berkembangnya TB laten menjadi TB aktif dan juga dapat

menemukan secara dini kemungkinan terjadinya proses reaktivasi TB laten menjadi aktif.

Sistem imunitas sangat penting pada saat terjadinya infeksi oleh kuman MTB. Mekanisme imun respons baik alami maupun adaptif berperan untuk menentukan seseorang menjadi TB laten atau aktif. Respons inflamasi lokal merupakan hal yang krusial dalam proses imunopatogenesis tuberkulosis (Russel D.G., 2007). Infeksi MTB akan menyebabkan MTB difagositosis oleh makrofag dan sel dendritik melalui berbagai reseptor yang ada pada permukaan membran seperti *Toll Like Reseptor 2 (TLR2)*, TLR4, TLR9 dan *Receptors for Advanced Glycalation End products (RAGE)*. Ikatan dengan reseptor TLR4 yang kemudian akan mengaktifasi jalur signal *Natural Killer Kappa Beta (NK- $\kappa\beta$)* untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti *Interleukin 6 (IL6)* dan *Tumor Necrosis Factor α (TNF α)* oleh makrofag (Magna M., et al., 2014). Sedangkan respons imun adaptif terstimulasi saat makrofag dan sel dendritik yang terinfeksi MTB mempresentasikan MTB ke sel limfosit T naive. Sel limfosit T kemudian berproliferasi dan berdiferensiasi untuk memproduksi *interferon gamma (IFN γ)* yang berfungsi mematikan mikobakterial intrasel dalam makrofag. Sekresi IFN γ akan mengaktifasi makrofag untuk mengeluarkan berbagai sitokin seperti IL1, TNF α , IL6, IL12 dan berperan dalam pembentukan granuloma pada tempat infeksi (Dheda K et al., 2010; Subowo, 2014., PDPI., 2016). Respons inflamasi lokal berupa perekrutan makrofag maupun sel-sel limfosit T yang kemudian akan memicu pelepasan limfokin dan

kemokin yang mengaktivasi pembentukan granuloma (Subowo., 2014; Erika de witt., 2009; Van Crevel R., 2002).

Selama proses infeksi MTB, berbagai mediator proinflamasi terlibat dan berkontribusi terhadap pembentukan granuloma pada TB yang merupakan pertahanan tubuh untuk membunuh MTB atau menghambat pertumbuhan MTB oleh makrofag. Selain mengeluarkannya berbagai sitokin, makrofag yang teraktivasi maupun yang nekrosis juga mensekresi *High mobility group box 1* (HMGB1). *High mobility group box 1* adalah protein inti non histon yang bertindak seperti sitokin proinflamasi yang dilepaskan oleh monosit dan makrofag saat teraktivasi. Sel imun alami termasuk makrofag, monosit, sel dendritik, sel mast, neutrofil, eosinofil, dan sel natural killer merupakan produsen utama dari HMGB1 (Zeng JC et al., 2015). Makrofag secara aktif mensekresi HMGB1 sebagai respons terhadap infeksi MTB yang bertindak sebagai sinyal dari jaringan atau sel yang cedera dan mempertinggi respons imun. Sel Nekrotik secara pasif juga melepaskan HMGB1 ditempat kerusakan jaringan yang menginduksi berbagai respons seluler, termasuk ekspresi mediator proinflamasi. Proses ini dimediasi oleh RAGE, TLR2, TLR 4 dan TLR 9. Diantara berbagai reseptor ini terutama TLR4 menyebabkan aktivasi jalur signaling akhir NF κ B, *interferon regulatory factor-3* (IRF 3) dan fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang kemudian mengaktivasi pengeluaran sitokin proinflamasi TNF α , IL 1 dan IL 6 oleh makrofag (Yu Y et al., 2015). Interferon γ tidak hanya menstimulasi fragmentasi caspase yang tergantung

DNA dan apoptosis pada infeksi berat makrofag, tetapi juga meningkatkan kerusakan mitokondria dan pelepasan LDH yang mengindikasikan nekrosis, dan proses ini juga akan meningkatkan pelepasan protein HMGB1 dan TLR4, sehingga *soluble* protein HMGB1 dan protein TLR4 dapat dipakai sebagai penanda nekrosis atau rusaknya makrofag (Lee J., 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Agnieszka M, dkk menunjukkan bahwa HMGB1 dapat terdeteksi pada aliran darah berbagai penyakit paru dengan konsentrasi tertinggi pada pasien dengan infeksi MTB (aktif dan laten). Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa konsentrasi HMGB1 mengalami peningkatan pada pasien dengan aktif tuberkulosis 47,5 ng/mL dibandingkan pada pasien dengan penyakit paru lainnya 36,87 ng/mL (Magrys A et al., 2013). Penelitian lain oleh Jin-Cheng Zeng, dkk menunjukkan bahwa HMGB1 terdeteksi pada plasma dan sputum pasien yang memiliki hasil kultur MTB positif dan mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok sehat selain itu juga terdapat peningkatan kadar IL-6, IL-10, dan TNF- α pada plasma, darah dan sputum subjek dengan infeksi TB (Zeng JC et al., 2015). Penelitian Houben, dkk memperlihatkan sitokin proinflamasi (TNF α , IL 1 dan IL 6) berperan memediasi proses inflamasi dan bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan akibat tuberkulosis pada hewan coba (Grover A. et al., 2008; Houben et al., 2006). Studi in vitro dan studi percobaan hewan menunjukkan bahwa MTB dan *Mycobacterium bovis* BCG dapat secara

efektif menginduksi sekresi HMGB1 yang menyebabkan hiperaktivasi sitokin dan kerusakan jaringan paru (Kim SY et al., 2017).

Strategi eliminasi TB yang disebut *End TB Strategy* mempunyai misi untuk mencapai angka *zero TB* pada 2050. Target di 2020 adalah penurunan angka kematian TB 35% dan penurunan angka kejadian TB 20% dibanding tahun 2015. Kecepatan penurunan ini tergantung pada terobosan teknologi yang bisa secara substansial mengurangi risiko berkembangnya infeksi TB laten ke arah penyakit TB aktif. Terobosan teknologi tersebut termasuk pembuatan vaksin yang efektif pasca vaksinasi, pengobatan yang singkat, manjur dan aman untuk infeksi TB laten serta teknologi diagnostik yang cepat dan efektif dalam mendiagnosis TB dan pengembangan regimen obat dan vaksin (WHO., 2018). Sehingga diperlukan penanda/biomarker yang baik, yang dapat menjelaskan proses imunopatogenesis infeksi tuberkulosis, khususnya perubahan TB laten menjadi TB aktif. Ekspresi gen HMGB1 sebagai petanda terstimulasinya makrofag akibat infeksi MTB akan memicu sekresi sitokin proinflamasi IL6 dan antiinflamasi IL10, serta menstimulasi proses apoptosis maupun kerusakan/nekrosis makrofag yang ditandai dengan pelepasan *soluble* protein HMGB1 dan protein TLR4 kedalam serum. Sitokin yang dihasilkan selanjutnya akan menstimulasi kembali makrofag. Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin mengetahui peranan ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada imunopatogenesis tuberkulosis serta

kemungkinan *soluble* protein HMGB1, protein TLR 4 dan protein IL 6 digunakan sebagai penanda reaktivasi TB.

1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan pada latar belakang masalah tersebut di atas, maka permasalahan penelitian ini, dirumuskan dalam pertanyaan penelitian sebagai berikut :

“ Bagaimanakah peranan ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada imunopatogenesis tuberkulosis paru baik yang aktif maupun yang laten dan dapatkah dipakai sebagai penanda proses reaktivasi TB? “

Pertanyaan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA gen HMGB1 antara TB aktif dan TB laten ?
2. Apakah ada perbedaan kadar *soluble* protein HMGB1 antara TB aktif dan TB laten ?
3. Apakah ada perbedaan kadar protein TLR4 antara TB aktif dan TB laten ?
4. Apakah ada perbedaan kadar protein IL 6 antara TB aktif dan TB laten ?
5. Apakah ada korelasi antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan kadar *soluble* protein HMGB1 pada infeksi tuberkulosis ?

6. Apakah ada korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar protein TLR4 pada infeksi tuberkulosis ?
7. Apakah ada korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar protein IL6 pada infeksi tuberkulosis ?
8. Apakah ada korelasi antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB1 pada infeksi tuberkulosis ?
9. Apakah ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, protein TLR4 dan protein IL6 terlibat pada mekanisme imunopatogenesis TB dan dapat dipakai sebagai penanda proses reaktivasi TB laten ?

1.3.Tujuan Penelitian

1.3.1.Tujuan umum

Untuk mengetahui imunopatogenesis tuberkulosis baik TB aktif maupun TB laten yang melibatkan ekspresi gen HMGB1, TLR4 dan IL6; serta kemungkinan ekspresi mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, protein TLR4 dan protein IL6 dijadikan biomarker penanda proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif.

1.3.2.Tujuan Khusus

1. Diketuainya perbedaan ekspresi mRNA gen HMGB1 antara TB aktif dan TB laten.
2. Diketuainya perbedaan kadar *soluble* protein HMGB1 antara TB aktif dan TB laten.

3. Diketuainya perbedaan kadar protein TLR4 pada TB aktif dan TB laten.
4. Diketuainya perbedaan kadar protein IL 6 pada TB aktif dan TB laten.
5. Diketuainya korelasi antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan kadar *soluble* protein HMGB1 pada infeksi Tuberkulosis.
6. Diketuainya korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar TLR4 pada infeksi Tuberkulosis.
7. Diketuainya korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar IL6 pada infeksi Tuberkulosis.
8. Diketuainya korelasi antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB1 pada infeksi Tuberkulosis
9. Diketuainya ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6 sebagai penanda reaktivasi TB laten.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat dari aspek pengembangan ilmu

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran lebih lengkap tentang peranan mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada respons imun penderita tuberkulosis paru.

1.4.2. Manfaat dari aspek aplikasi klinis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu klinisi dalam memahami mekanisme molekuler respons imun penderita TB Paru yang

melibatkan HMGB1, TLR4 dan IL6, serta membantu klinisi untuk memperoleh biomarker penanda reaktivasi TB laten untuk pertimbangan pemberian profilaksis antituberkulosis pada penderita TB laten.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tuberkulosis

2.1.1. Definisi Tuberkulosis

Tuberkulosis adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium tuberculosis complex* (PDPI., 2011). Suspek TB adalah seseorang dengan gejala atau tanda TB. Gejala umum TB paru adalah batuk produktif lebih dari 2 minggu yang disertai gejala pernafasan (sesak nafas, nyeri dada, hemoptisis) dan/atau gejala tambahan (tidak nafsu makan, penurunan berat badan, keringat malam dan mudah lelah). Dalam menentukan suspek TB harus dipertimbangkan faktor seperti usia pasien, imunitas pasien, status HIV atau prevalensi HIV dalam populasi (Kemenkes RI., 2014).

Kasus TB adalah seorang pasien yang setelah dilakukan pemeriksaan penunjang untuk TB sehingga didiagnosis TB oleh dokter maupun petugas kesehatan dan diobati dengan paduan dan lama pengobatan yang lengkap (PDPI., 2011).

Kasus TB pasti adalah pasien TB dengan ditemukan *Mycobacterium tuberculosis complex* yang diidentifikasi dari spesimen klinik (jaringan, cairan tubuh, usap tenggorok, dll) dan kultur. Pada negara dengan keterbatasan kapasitas laboratorium dalam mengidentifikasi MTB maka

kasus TB paru dapat ditegakkan apabila ditemukan satu atau lebih dahak dengan BTA positif (PDPI., 2011).

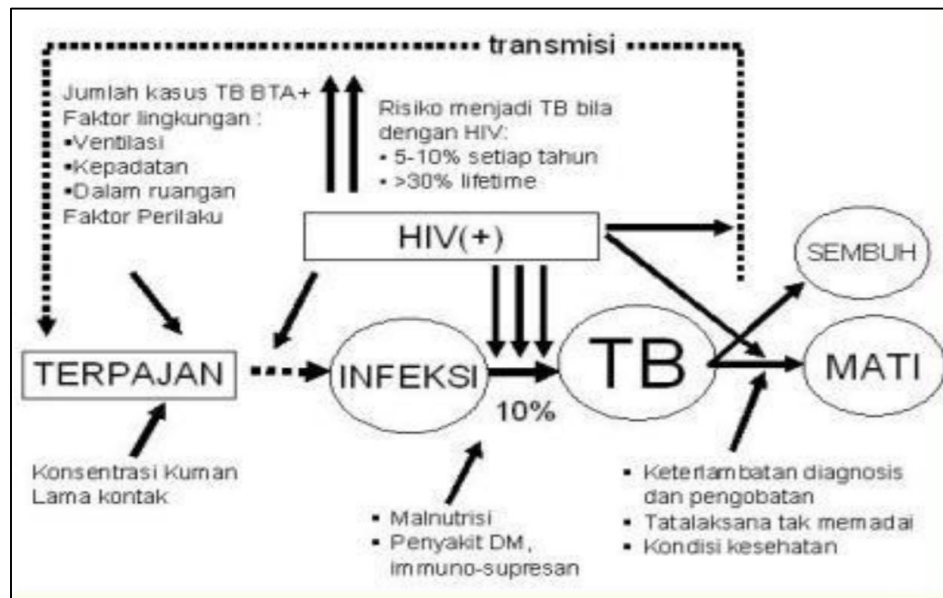
2.1.2. Etiologi Tuberkulosis

Tuberkulosis paru disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang berbentuk batang dengan panjang 1 – 10 mikron dan lebar 0,2 – 0,6 mikron (Kemenkes., 2014). *Mycobacterium tuberculosis* memiliki dinding yang sebagian besar terdiri atas asam lemak (lipid) peptidoglikan dan arabinomannan. Lipid inilah yang membuat kuman ini lebih tahan terhadap asam (asam alkohol) sehingga disebut Basil Tahan Asam (BTA), serta lebih tahan terhadap gangguan kimia dan fisis (Amir B., 2014). *Mycobacterium tuberculosis* sangat peka terhadap panas, sinar matahari dan sinar ultraviolet/UV (paparan langsung dari sinar UV dapat membunuh kuman dalam waktu beberapa menit), tetapi dapat bertahan hidup dalam jangka waktu lama pada suhu 4⁰C sampai minus 70⁰ C (Kemenkes RI., 2014).

2.1.3. Faktor Risiko Tuberkulosis

Faktor risiko terjadinya TB paru adalah usia produktif 15 – 50 tahun, daya tahan tubuh rendah (HIV/AIDS), malnutrisi/gizi buruk, DM, pemakaian immunosupresan, jumlah/konsentrasi kuman dan lama kontak dengan penderita TB paru. Selain itu, faktor perilaku hidup bersih dan sehat serta faktor lingkungan seperti ventilasi, kepadatan penduduk dan keadaan dalam ruangan juga merupakan faktor yang dapat mempengaruhi timbulnya penyakit TB paru (Kemenkes RI., 2011; Kemenkes RI., 2014).

Faktor risiko kejadian TB secara ringkas dapat dijelaskan pada gambar berikut:



Gambar 1. Faktor risiko kejadian TB (Kemenkes RI, 2011)

2.1.4. Cara Penularan Tuberkulosis

Sumber penularan adalah pasien TB paru BTA positif yang pada saat batuk atau bersin dapat menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk percikan dahak (*droplet nuclei* percik renik), sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak. Infeksi akan terjadi apabila orang lain menghirup udara yang mengandung percik renik dahak yang infeksius tersebut. Pasien TB paru dengan BTA negatif juga masih memiliki kemungkinan untuk menularkan penyakit TB. Tingkat penularan pasien TB paru BTA positif adalah 65%, pasien TB BTA negatif dengan hasil kultur positif adalah 26% dan pasien TB dengan hasil kultur negatif dan foto toraks positif adalah 17% (Kemenkes RI., 2014).

2.1.5. Patogenesis Tuberkulosis

Setelah terhirup, droplet infeksius berada pada seluruh saluran pernafasan. Sebagian besar basil terjebak di bagian atas saluran pernafasan di mana sel goblet akan mensekresi mukus. Mukus yang dihasilkan akan menangkap benda asing, dan silia pada permukaan sel bergerak secara terus menerus untuk mengeluarkan mucus yang berisi benda asing tersebut (Frieden TR et al., 2003). Tubuh mempunyai sistem pertahanan fisik awal yang dapat mencegah infeksi pada kebanyakan individu yang terpapar kuman tuberculosis (Jensen PA et al., 2005).

Bakteri dalam droplet menembus sistem mukosiliar dan mencapai alveoli, kemudian secara cepat akan dikelilingi dan difagosit oleh makrofag alveolar, sebagai efektor imun paling banyak pada daerah alveolar tersebut (CDC.,2009; Frieden TR et al.,2003). Makrofag, merupakan pertahanan tubuh berikutnya, yang merupakan bagian dari sistem imun alami/innate yang memberikan tubuh kemampuan untuk menghancurkan mikrobakteri yang menyerang dan mencegah infeksi akibat mikrobakteri tersebut (Van Crevel R., 2002).

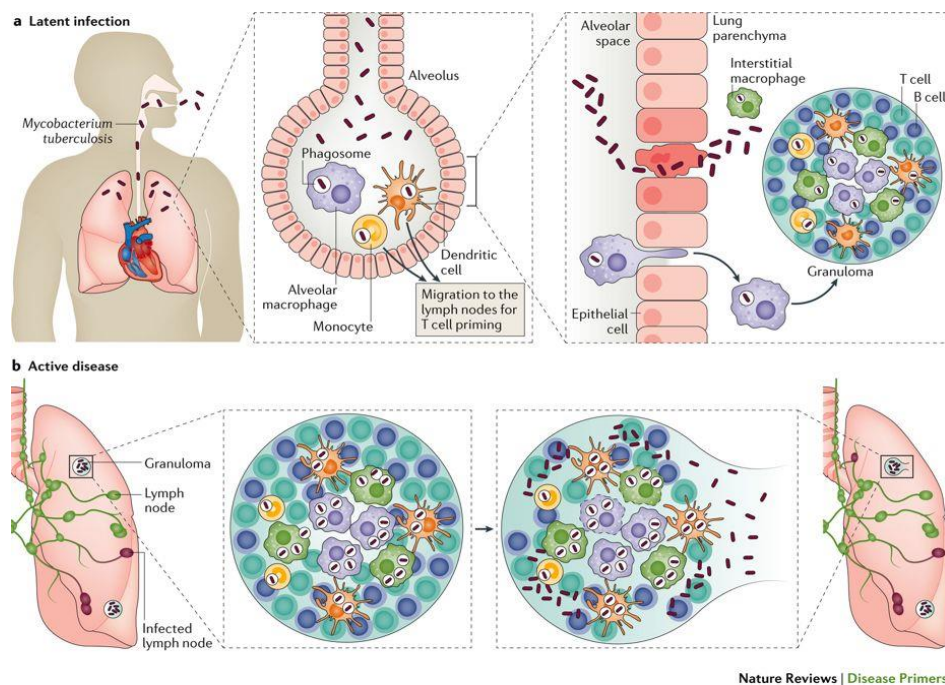
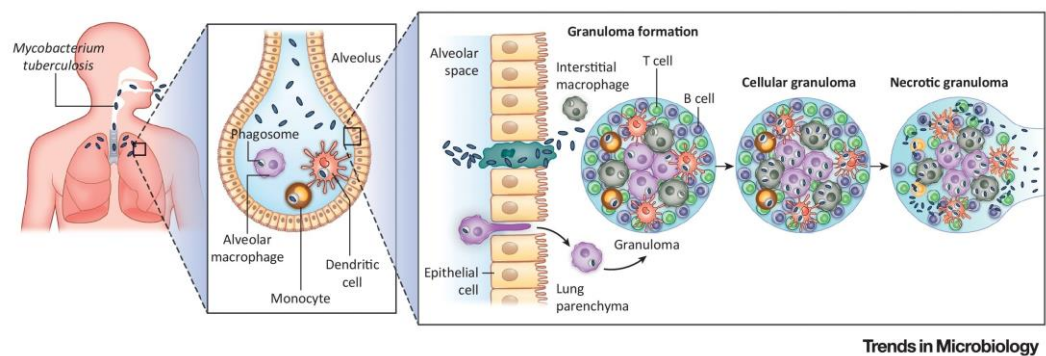
Makrofag merupakan sel fagosit yang tersedia dalam melawan banyak patogen tanpa membutuhkan paparan sebelumnya dengan patogen. Beberapa mekanisme dan reseptor makrofag terlibat dalam proses fagositosis mikobakterium (Van Crevel R., 2002). Lipoarabinomannan mikobakteri adalah ligan kunci untuk reseptor makrofag. Sistem komplemen juga berperan dalam fagositosis bakteri

(Nicod LP., 2007). Komplemen protein C3 mengikat dinding sel dan meningkatkan pengenalan MTB oleh makrofag. Oponisasi oleh C3 berlangsung cepat, bahkan di rongga udara tubuh tanpa paparan sebelumnya oleh MTB (Ferguson JS., 2004). Proses fagositosis oleh makrofag berikutnya menginisiasi kaskade yang menyebabkan suksesnya kontrol terhadap infeksi, diikuti dengan TB laten, atau pengembangan menjadi penyakit aktif, yang disebut tuberkulosis progresif primer. Hasil infeksi MTB pada dasarnya ditentukan oleh kualitas pertahanan tubuh dan keseimbangan yang terjadi antara pertahanan tubuh dan invasi MTB (van Crevel R., 2002; Goyot-revol V., 2006). Setelah difagosit oleh makrofag, mikobakteri terus untuk memperbanyak diri secara lambat. dengan pembelahan sel bakteri terjadi setiap 25-32 jam (CDC., 2009).

Terlepas dari apakah infeksi terkontrol atau menjadi progresif, perkembangan awal akan melibatkan produksi enzim proteolitik dan sitokin oleh makrofag dalam upaya untuk menghilangkan bakteri (van Crevel R., 2002; Nicod LP., 2007). Sitokin yang dikeluarkan akan menarik limfosit T ketempat infeksi, sel-sel ini merupakan bagian dari imunitas seluler. Makrofag kemudian mempresentasikan antigen mikobakterium permukaan selnya ke sel limfosit T (van Crevel R., 2002). Proses imunitas awal berlangsung selama 2 sampai 12 minggu; mikroorganisme terus tumbuh sampai mereka mencapai jumlah yang cukup untuk sepenuhnya mendapatkan respons imun seluler dan dapat dideteksi dengan pemeriksaan skin test (Freiden TR et al., 2003; van Crevel R., 2002). Pada

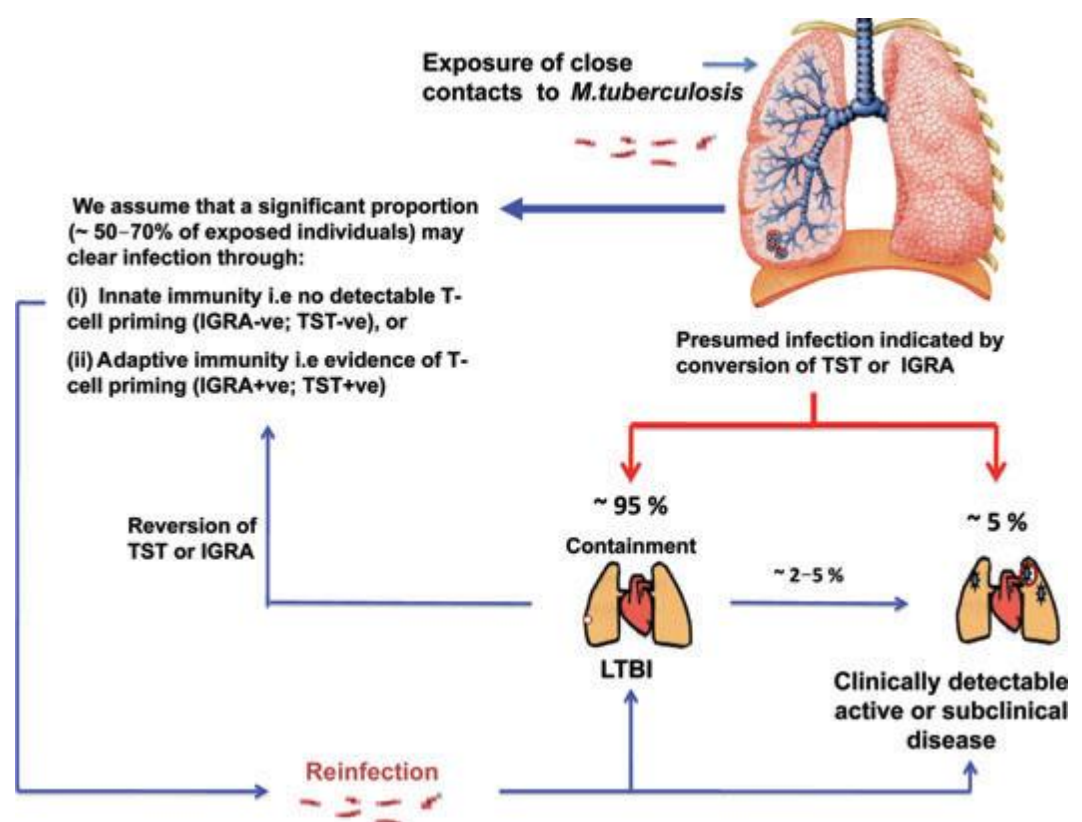
orang dengan imunitas seluler yang baik, tahap pertahanan selanjutnya adalah pembentukan granuloma yang mengelilingi MTB terlihat pada Gambar 1. Lesi tipe nodular ini terbentuk dari akumulasi limfosit T yang teraktivasi dan makrofag, yang membuat lingkungan mikro yang membatasi replikasi dan penyebaran mikobakterium (Frieden TR et al.,2003; Nicod LP., 2007). Lingkungan ini menghancurkan makrofag dan menghasilkan awal nekrosis padat di pusat lesi. Basil dapat beradaptasi untuk bertahan hidup, bahkan MTB dapat mengubah ekspresi fenotip mereka, seperti regulasi protein, untuk meningkatkan hidupnya (Dheda K et al., 2005). Lingkungan nekrotik dalam 2 atau 3 minggu, menjadi menyerupai keju lembut, sering disebut nekrosis caseous, dan ditandai dengan tingkat oksigen rendah, pH rendah, dan nutrisi yang terbatas. Kondisi ini membatasi pertumbuhan lanjut dan keadaan laten yang tetap yang berupa infeksi TB laten. Lesi pada orang dengan sistem imunitas tubuh baik secara umum akan menjadi fibrosis dan kalsifikasi, keberhasilan mengendalikan infeksi yang menjadikan basil menjadi dorman, dan lesi hilang . Orang dengan kekebalan tubuh yang kurang efektif, akan menjadi tuberkulosis progresif primer (Frieden TR.,2003; Dheda K.,2005). Orang dengan imunokompeten, pembentukan granuloma dimulai, namun akhirnya tidak berhasil membendung basil tuberkulosis. Jaringan nekrotik mengalami pencairan, dan hilangnya integritas struktur dinding fibrous. Bahan nekrotik semicair kemudian mengalir ke dalam bronkus atau pembuluh darah di dekatnya, meninggalkan rongga/ cavitas berisi udara di tempat asal. Pada

pasien yang terinfeksi dengan MTB, droplet dapat dibatukkan dari bronkus dan menginfeksi orang lain. Jika cairan masuk ke pembuluh darah dapat terjadi tuberkulosis ekstrapulmoner. Basil juga dapat masuk ke sistem limfatik dan berkumpul di kelenjar getah bening trakeobronkial yang mempengaruhi paru-paru, di mana organisme dapat membentuk granuloma caseous baru (Dheda K.,2005).



Gambar 2. Patogenesis tuberkulosis: A. Infeksi Laten, B. Tuberkulosis Aktif (Anastasia K et al.,2018).

Lima puluh sampai 70% individu yang terpajan MTB diperkirakan dapat mengatasi infeksi tersebut melalui mekanisme imun bawaan atau adaptif. Sisanya 30-50% akan berkembang menjadi TB aktif (5%) dan TB laten (95%). Infeksi TB laten sekitar 2-15% dapat berkembang menjadi TB aktif (PDPI. ,2016; Getahun H., 2015).



Gambar 3. Spektrum infeksi MTB dan daur hidup MTB (Dheda K.,2010).

2.1.6. Klasifikasi Tuberkulosis

Kasus TB diklasifikasikan berdasarkan:

- 1) Berdasarkan letak anatomi penyakit

- a) Tuberkulosis paru adalah kasus TB yang mengenai parenkim paru. TB milier diklasifikasikan sebagai TB paru karena lesinya yang terletak dalam paru.
- b) Tuberkulosis ekstraparu adalah kasus TB yang mengenai organ lain selain paru seperti pleura, kelenjar getah bening (termasuk mediastinum dan/atau hilus), abdomen, traktus genitourinarius, kulit, sendi, tulang dan selaput otak (PDPI., 2011).

2) Berdasarkan hasil pemeriksaan dahak atau bakteriologi

- a) Tuberkulosis paru BTA positif, apabila :

Minimal satu dari sekurang-kurangnya dua kali pemeriksaan dahak menunjukkan hasil positif pada laboratorium yang memenuhi syarat *quality external assurance* (EQA). Sebaiknya satu kali pemeriksaan dahak tersebut berasal dari dahak pagi hari. Saat ini Indonesia sudah memiliki beberapa laboratorium yang memenuhi syarat EQA. Pada negara atau daerah yang belum memiliki laboratorium dengan syarat EQA, maka TB paru BTA positif adalah:

1. Dua atau lebih hasil pemeriksaan dahak BTA positif, atau
2. Satu hasil pemeriksaan dahak BTA positif dan didukung hasil pemeriksaan foto toraks sesuai dengan gambaran TB yang ditetapkan oleh klinisi, atau
3. Satu hasil pemeriksaan dahak BTA positif ditambah hasil kultur MTB positif (PDPI., 2011).

b) Tuberkulosis paru BTA negatif, apabila :

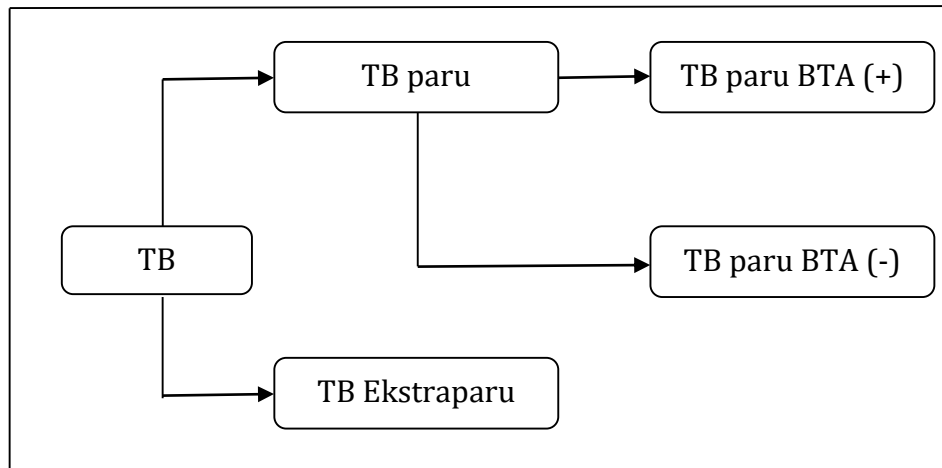
Hasil pemeriksaan dahak negatif (sedikitnya dua hasil pemeriksaan dahak BTA negatif pada laboratorium yang memenuhi syarat EQA) tetapi hasil kultur positif (dianjurkan pemeriksaan kultur pada hasil pemeriksaan dahak BTA negatif untuk memastikan diagnosis terutama pada daerah dengan prevalensi HIV > 1% atau pasien TB dengan kehamilan $\geq 5\%$).

1. Jika hasil pemeriksaan dahak BTA dua kali negatif di daerah yang belum memiliki fasilitas kultur MTB.
2. Jika hasil foto toraks sesuai dengan gambaran TB aktif dan disertai salah satu dibawah ini : Hasil pemeriksaan HIV positif atau secara laboratorium sesuai HIV, atau jika HIV negatif (atau status HIV tidak diketahui atau prevalensi HIV rendah), tidak menunjukkan perbaikan setelah pemberian antibiotik spektrum luas (kecuali antibiotik yang mempunyai efek anti TB seperti fluorokuinolon dan aminoglikosida) (PDPI., 2011).

c) Kasus bekas TB, apabila :

Hasil pemeriksaan BTA negatif (biakan juga negatif bila ada) dan gambaran radiologi paru menunjukkan lesi TB yang tidak aktif atau foto serial (dalam 2 bulan) menunjukkan gambaran yang menetap. Riwayat Pengobatan OAT adekuat akan lebih mendukung. Pada kasus dengan gambaran radiologi meragukan dan telah mendapat pengobatan OAT 2

bulan tetapi pada foto toraks ulang tidak ada perubahan gambaran radiologi. (PDPI., 2011).



Gambar 4. Klasifikasi TB (PDPI., 2011).

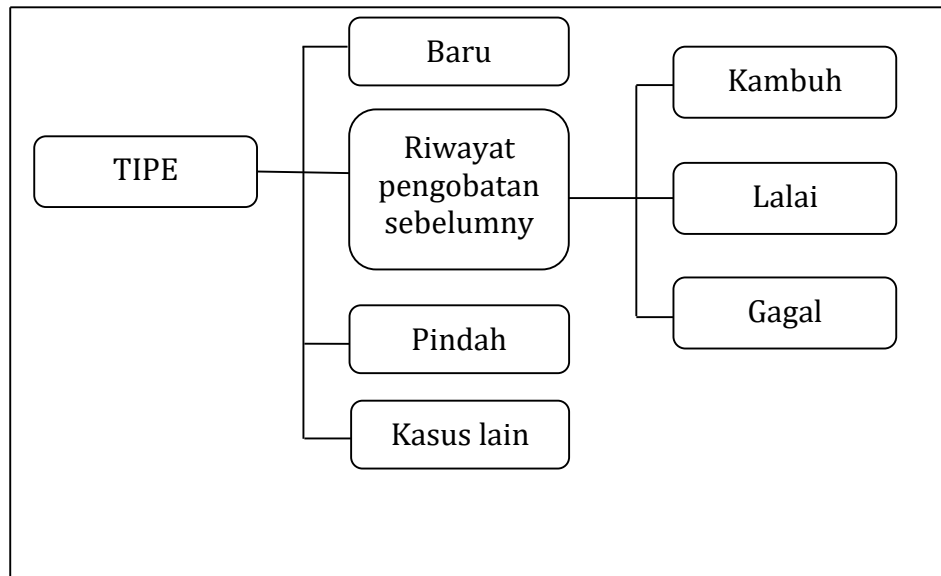
3) Berdasarkan riwayat pengobatan sebelumnya

Riwayat pengobatan sangat penting diketahui untuk melihat risiko resistensi obat atau MDR. Pada kelompok ini perlu dilakukan pemeriksaan kultur dan uji kepekaan OAT. Tipe pasien berdasarkan riwayat pengobatan sebelumnya, yaitu :

- a) Pasien baru adalah pasien yang belum pernah mendapatkan pengobatan TB sebelumnya atau sudah pernah mendapatkan OAT kurang dari satu bulan. Pasien dengan hasil dahak BTA positif atau negatif dengan lokasi anatomi penyakit dimanapun.
- b) Pasien dengan riwayat pengobatan sebelumnya adalah pasien yang sudah pernah mendapatkan pengobatan TB sebelumnya minimal selama satu bulan, dengan hasil dahak BTA positif atau negatif dengan lokasi anatomi penyakit dimanapun (PDPI., 2011).

3. Kasus kambuh adalah pasien yang pernah dinyatakan sembuh atau pengobatan lengkap dan saat ini didiagnosis TB berdasarkan hasil pemeriksaan bakteriologis atau klinis (baik karena benar-benar kambuh atau karena reinfeksi).
 4. Pasien lalai/putus berobat (*default/lost to follow-up*) adalah pasien yang pernah diobati dan dinyatakan *lost to follow-up*.
 5. Pasien gagal (*failure*) adalah pasien TB yang pernah diobati dan dinyatakan gagal pada pengobatan terakhir. (Kemenkes., 2011; Kemenkes., 2014).
- c) Pasien pindah (*transfer in*) adalah pasien yang dipindahkan ke register lain untuk melanjutkan pengobatannya (Kemenkes., 2011).
 - d) Kasus lain adalah semua kasus yang tidak memenuhi kriteria diatas (Kemenkes., 2011; Kemenkes., 2014; PDPI., 2011).
- 4) Berdasarkan status HIV

Status HIV pasien merupakan hal yang penting untuk keputusan pengobatan



Gambar 5. Klasifikasi TB berdasarkan tipe kasus (PDPI, 2011).

2.1.7. Gejala Klinis Tuberkulosis

Gejala klinis TB dapat dibagi menjadi 2 golongan, yaitu gejala lokal sesuai organ yang terlibat dan gejala sistemik. Bila organ yang terkena adalah paru maka gejala lokal ialah gejala respiratori (PDPI., 2011).

1) Gejala respiratori

Batuk \geq 2 minggu, Batuk darah, Sesak nafas, Nyeri dada. Gejala respiratori ini sangat bervariasi, dari mulai tidak ada gejala sampai gejala yang cukup berat tergantung dari luas lesi. Kadang pasien terdiagnosis pada saat *medical check up*. Bila bronkus belum terlibat dalam proses penyakit, maka pasien mungkin tidak ada gejala batuk. Batuk yang pertama terjadi karena iritasi bronkus dan selanjutnya batuk diperlukan untuk membuang dahak keluar (PDPI., 2011).

2) Gejala sistemik

Demam , Gejala sistemik lain adalah malaise, keringat malam, anoreksia dan berat badan menurun (PDPI., 2011).

2.1.8. Pemeriksaan Fisik Tuberkulosis

Pada pemeriksaan fisik kelainan yang akan dijumpai tergantung dari organ yang terlibat. Pada TB paru, kelainan yang didapat tergantung luas kelainan struktur paru. Pada awal perkembangan penyakit umumnya tidak (atau sulit sekali) menemukan kelainan. Kelainan paru pada umumnya terletak di daerah lobus superior terutama daerah apeks dan segmen posterior (S1 dan S2), serta daerah apeks lobus inferior (S6). Pada saat inspeksi dapat ditemukan tanda-tanda penarikan paru, diafragma dan mediastinum, sedangkan saat auskultasi dapat ditemukan suara nafas *bronchial* yang melemah, ronki basah dan amforik (PDPI., 2011). Ronki basah muncul karena terbentuknya sekret dan jaringan nekrotik (semakin banyak sekret dan semakin besar bronkus tempat sekret berada, semakin kasar suara ronki yang terdengar, sedangkan amforik timbul karena terbentuknya kavitas pada jaringan paru biasanya disertai dengan suara timpani pada saat perkusi kedua lapang paru (Danusantoso., 2014).

2.1.9. Pemeriksaan Penunjang Tuberkulosis

Diagnosis TB melalui pemeriksaan kultur atau biakan dahak merupakan metode baku emas (gold standard), namun pemeriksaan kultur merlukan waktu lebih lama, paling cepat sekitar 6 minggu dan mahal. Pemeriksaan 3 spesimen dahak secara mikroskopis nilainya identik dengan pemeriksaan dahak secara kultur atau biakan.

Pemeriksaan dahak mikroskopis merupakan pemeriksaan yang paling efisien, mudah, murah, bersifat spesifik, sensitif dan hanya dapat dilaksanakan di semua unit laboratorium. Untuk mendukung kinerja penanggulangan TB, diperlukan ketersediaan laboratorium TB dengan manajemen yang baik agar terjamin mutu laboratorium tersebut (Kemenkes., 2011).

1) Pemeriksaan bakteriologi

a) Bahan pemeriksaan bakteriologi

Pemeriksaan bakteriologi untuk menemukan kuman TB mempunyai arti yang sangat penting dalam menegakkan diagnosis (PDPI., 2011).

b) Cara pengumpulan bahan pemeriksaan bakteriologi

Pemeriksaan bakteriologi dengan menggunakan dahak sebagai bahan pemeriksaan untuk penegakan diagnosis dilakukan dengan mengumpulkan 3 contoh uji dahak yang berupa dahak sewaktu-pagi-sewaktu (Kemenkes., 2014). Pemeriksaan bakteriologi terbaru sesuai dengan kemenkes 2018 pemeriksaan sputum hanya 2 kali yaitu sputum sewaktu dan pagi hari (Kemenkes., 2018)

c) Cara pemeriksaan bakteriologi

Pemeriksaan bakteriologi dari spesimen dahak dan bahan lain (cairan pleura, *liquor cerebrospinal*, bilasan bronkus, bilasan lambung, BAL, urin, feses dan jaringan biopsi (termasuk BJH)) dapat dilakukan dengan cara :

1. Pemeriksaan mikroskopis MTB

Pemeriksaan mikroskopis biasa yaitu pewarnaan Ziehl-Nielsen.

2. Pemeriksaan mikroskopis fluoresens yaitu pewarnaan auramin-rhodamin (PDPI., 2011).

Menurut rekomendasi WHO, interpretasi pemeriksaan mikroskopis dibaca dengan skala *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD). Skala IUATLD yaitu :

- a. Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapang pandang disebut negatif.
- b. Ditemukan 1 – 9 BTA dalam 100 lapang pandang, ditulis jumlah kuman yang ditemukan.
- c. Ditemukan 10 – 99 BTA dalam 100 lapang pandang disebut + (1+).
- d. Ditemukan 1 – 10 BTA dalam 1 lapang pandang disebut ++ (2+).
- e. Ditemukan > 10 BTA dalam 1 lapang pandang disebut +++ (3+).

3. Biakan MTB

4. Uji molekular MTB

5. Uji kepekaan MTB

6. Uji serologi MTB

2) Pemeriksaan radiologi

Pemeriksaan standar ialah foto toraks PA. Pemeriksaan lain sesuai indikasi yaitu foto lateral, *top-lordotic*, oblik atau CT-scan. Pada pemeriksaan foto toraks, TB dapat memberi gambaran bermacam-macam bentuk (multiform). Gambaran radiologi yang

dicurigai sebagai lesi TB aktif adalah : Bayangan berawan/nodular di segmen apikal dan posterior lobus atas paru dan segmen superior lobus bawah. Kavitas, terutama lebih dari satu, dikelilingi oleh bayangan opak berawan atau nodular. Bayangan bercak milier. Umumnya Efusi pleura unilateral atau bilateral tetapi jarang. Gambaran radiologi yang dicurigai lesi TB inaktif adalah : Fibrotik, Kalsifikasi, *Schwarte* atau penebalan pleura (PDPI., 2011).

Gambaran luluh paru (*destroyed lung*) adalah gambaran radiologi yang menunjukkan kerusakan jaringan paru yang berat. Gambaran radiologi luluh paru terdiri dari atelektasis, ektasis/multikavitas dan fibrosis parenkim paru. Sulit untuk menilai aktivitas lesi atau penyakit hanya berdasarkan gambaran radiologi tersebut. Perlu dilakukan pemeriksaan bakteriologi untuk memastikan aktivitas proses penyakit (PDPI., 2011).

3. Pemeriksaan Penunjang Lain

a) Analisis cairan pleura

Pemeriksaan analisis cairan pleura dan uji rivalta cairan pleura perlu dilakukan pada pasien efusi pleura untuk membantu menegakkan diagnosis. Interpretasi hasil analisis yang mendukung diagnosis TB adalah uji rivalta positif dan kesan cairan eksudat, serta pada analisis cairan pleura terdapat sel limfosit dominan dan glukosa rendah (PDPI, 2011).

b) Pemeriksaan histopatologi jaringan

Pemeriksaan histopatologi dilakukan untuk membantu menegakkan diagnosis TB. Pemeriksaan yang dilakukan ialah pemeriksaan histopatologi. Pada pemeriksaan biopsi sebaiknya diambil 2 sediaan, satu sediaan dimasukkan ke dalam larutan salin dan dikirim ke laboratorium mikrobiologi untuk dikultur serta sediaan yang kedua difiksasi untuk pemeriksaan histologi (PDPI., 2011).

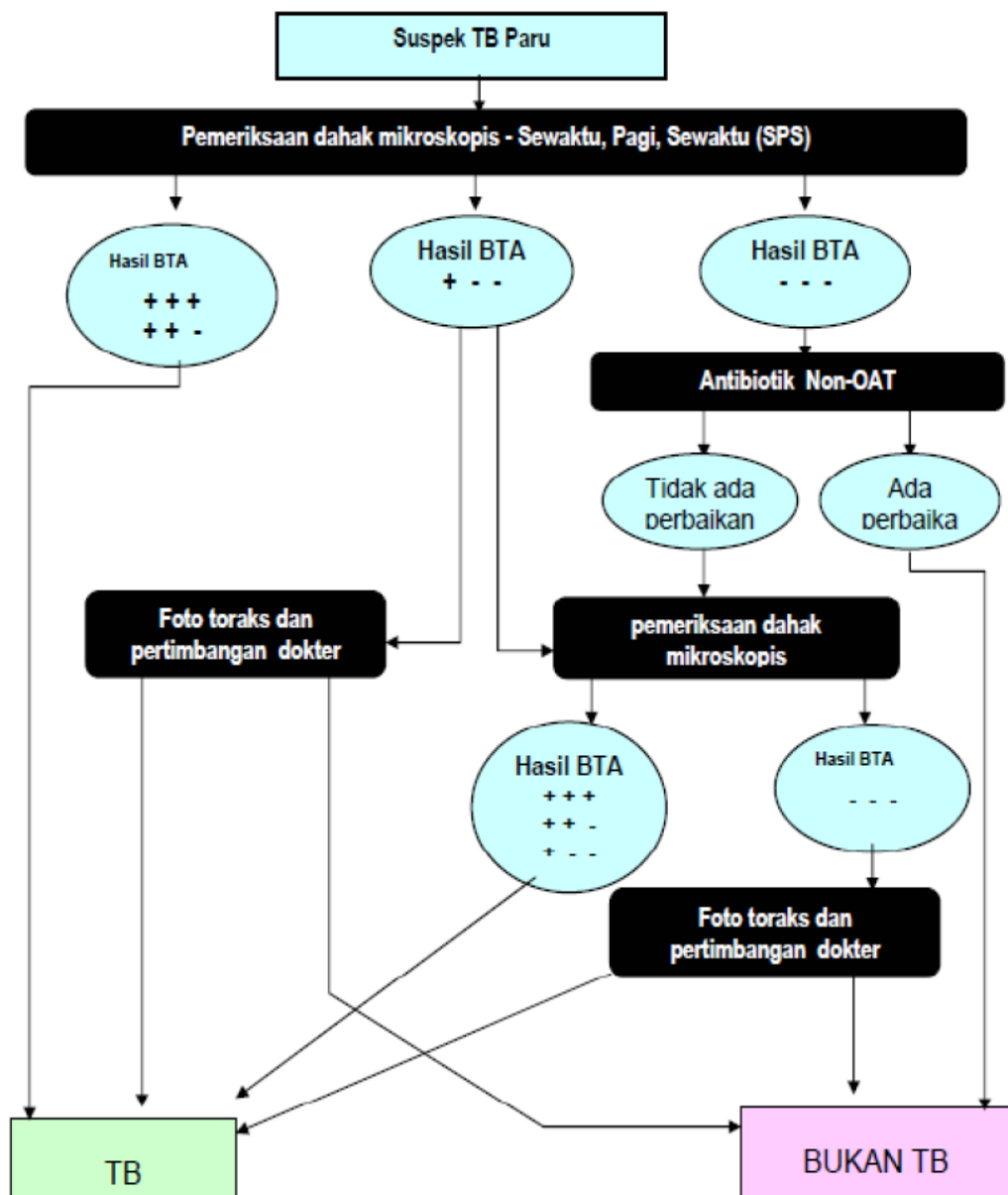
c) Pemeriksaan darah

Hasil pemeriksaan darah rutin kurang menunjukkan indikator yang spesifik untuk TB. Laju endap darah (LED) jam pertama dan kedua dapat digunakan sebagai indikator penyembuhan pasien. LED sering meningkat pada proses aktif, tetapi laju endap darah yang normal tidak menyingkirkan TB. Limfosit juga kurang spesifik (PDPI., 2011).

2.1.10. Diagnosis Tuberkulosis

Dalam upaya pengendalian TB secara nasional, maka diagnosis TB paru pada orang dewasa harus ditegakkan terlebih dahulu dengan pemeriksaan bakteriologis. Pemeriksaan bakteriologis yang dimaksud adalah pemeriksaan mikroskopis langsung, biakan dan tes cepat molekular. Apabila pemeriksaan bakteriologis hasilnya negatif, maka penegakkan diagnosis TB paru dapat dilakukan secara klinis menggunakan hasil pemeriksaan klinis dan penunjang (setidak-tidaknya pemeriksaan foto toraks) yang sesuai dan ditetapkan oleh dokter yang telah terlatih TB. Pada

rumah sakit dengan sarana yang terbatas untuk penegakkan diagnosis secara klinis, penegakkan diagnosis dapat dilakukan setelah pemberian terapi antibiotika spektrum luas (non OAT dan non kuinolon) yang tidak memberikan perbaikan klinis. Tidak dibenarkan mendiagnosis TB paru hanya dengan pemeriksaan uji tuberkulin, pemeriksaan serologis, atau hanya berdasarkan pemeriksaan foto toraks. Foto toraks tidak selalu memberikan gambaran yang spesifik pada TB paru, sehingga dapat menyebabkan terjadi *overdiagnosis* ataupun *underdiagnosis* (Kemenkes., 2014).



Gambar 6 Alur Diagnosis Tuberkulosis Paru (Kemenkes., 2011).

2.1.10. Pengobatan Tuberkulosis

1) Tujuan pengobatan TB (PDPI., 2011)

- a. Menyembuhkan pasien dan mengembalikan kualitas hidup dan produktivitas.

- b. Mencegah kematian karena penyakit TB aktif atau efek lanjutannya
 - c. Mencegah kekambuhan.
 - d. Mengurangi transmisi atau penularan kepada yang lain.
2. Mencegah terjadinya resistensi obat serta penularannya. Prinsip pengobatan TB :
- a. Pengobatan diberikan dalam bentuk paduan OAT yang tepat mengandung minimal 4 macam obat untuk mencegah terjadinya resistensi.
 - b. Diberikan dalam dosis yang tepat.
 - c. Ditelan secara teratur dan diawasi secara langsung oleh PMO (Pengawas Minum Obat) sampai selesai pengobatan.
 - d. Pengobatan diberikan dalam jangka waktu yang cukup terbagi dalam tahap awal serta tahap lanjutan (intensif) untuk mencegah kekambuhan (Kemenkes., 2014).
3. Tahapan pengobatan TB

Pengobatan TB harus selalu meliputi pengobatan tahap awal dan tahap lanjutan dengan maksud :

a) Tahap awal (fase intensif)

Pengobatan pada tahap ini diberikan setiap hari dengan tujuan untuk secara efektif menurunkan jumlah kuman yang ada dalam tubuh pasien dan meminimalisir pengaruh dari sebagian kecil kuman yang mungkin sudah resistan sejak sebelum pasien

mendapatkan pengobatan. Pengobatan pada tahap awal pada semua pasien baru harus diberikan selama 2 bulan.

b) Tahap lanjutan

Pengobatan tahap lanjutan merupakan tahap yang penting untuk membunuh sisa-sisa kuman yang masih ada dalam tubuh khususnya kuman persisten sehingga pasien dapat sembuh dan mencegah terjadinya kekambuhan (Kemenkes., 2014).

4. Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

a) Jenis obat lini pertama adalah :

INH, Rifampisin, Pirazinamid, Etambutol dan Streptomisin.

b) Jenis obat lini kedua adalah :

Kanamisin, Kapreomisin, Amikasin, Kuinolon, Sikloserin, Etionamid/Protionamid, Para-Amino Salisilat (PAS), Obat-obatan yang efikasinya belum jelas (Makrolid, Amoksisilin + Asam Klavulanat, Linezolid, Clofazimin) (PDPI., 2011).

Obat Anti Tuberkulosis lini kedua hanya digunakan untuk kasus resistensi obat, terutama TB *multidrug resistant* (MDR). Beberapa obat seperti kapreomisin, sikloserin, etionamid dan PAS belum tersedia di pasaran Indonesia tetapi sudah digunakan pada pusat pengobatan TB-MDR (PDPI., 2011).

Obat Anti Tuberkulosis (OAT) terdiri dari dua kemasan yaitu:

- a. Obat tunggal yaitu obat yang disajikan secara terpisah, masing-masing INH, rifampisin, pirazinamid, etambutol dan streptomisin.
- b. Obat Kombinasi Dosis Tetap/KDT (*Fixed Dose Combination/FDC*) adalah obat dengan kombinasi dosis tetap yang terdiri dari 2 – 4 obat dalam satu tablet (PDPI., 2011).

Tabel 2.1. Jenis dan Dosis Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

Obat	Dosis (mg/kgBB/hari)	Dosis yang dianjurkan		Dosis maks/hari (mg)	Dosis (mg)/berat badan (kg)/hari		
		Harian (mg/kgBB/hari)	Intermitten (mg/kgBB/hari)		<40	40 – 60	>60
R	8 – 12	10	10	600	300	450	600
H	4 – 6	5	10	300	300	300	300
Z	20 – 30	25	35		750	1000	1500
E	15 – 20	15	30		750	1000	1500
S*	15 – 18	15	15	1000	Sesuai BB	750	1000

*pasien berusia lebih dari 60 tahun tidak bisa mendapatkan dosis lebih dari 500 mg perhari Sumber: (PDPI, 2011)

c. Paduan Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

Paduan yang digunakan oleh Program Nasional Pengendalian Tuberkulosis di Indonesia (sesuai dengan rekomendasi WHO dan ISTC) yang terdiri dari 2 kategori, yaitu

a) Kategori 1 (2RHZE/4H3R3)

Paduan OAT kategori ini diberikan untuk pasien baru :

1. Pasien TB paru yang terkonfirmasi bakteriologis
2. Pasien TB paru terdiagnosis klinis
3. Pasien TB ekstra paru (Kemenkes., 2014).

Tabel 2.2. Dosis Paduan OAT KDT Kategori 1

Berat Badan	Tahap Intensif (setiap hari selama 56 hari)	Tahap Lanjutan (3 kali seminggu selama 16 minggu)
	RHZE (150/75/400/275)	RH (150/150)
30 – 37 kg	2 tablet 4 KDT	2 tablet 2 KDT
38 – 54 kg	3 tablet 4 KDT	3 tablet 2 KDT
55 – 70 kg	4 tablet 4 KDT	4 tablet 2 KDT
≥ 71 kg	5 tablet 4 KDT	5 tablet 2 KDT

Sumber: (Kemenkes, 2014)

4. Kategori 2 (2HRZES/HRZE/5HR3E3)

Paduan OAT kategori ini diberikan untuk pasien BTA positif yang pernah diobati sebelumnya (pengobatan ulang) :

- a. Pasien kambuh
- b. Pasien gagal pada pengobatan dengan OAT kategori 1 sebelumnya
- c. Pasien yang diobati kembali setelah putus berobat (Kemenkes., 2014).

Tabel 2.3. Dosis Paduan OAT KDT Kategori 2

Berat Badan	Tahap Intensif (setiap hari) RHZE (150/75/400/275) + S		Tahap lanjutan 3 kali seminggu RH (150/150) + E (400)
	Selama 56 hari	Selama 28 hari	Selama 20 minggu
30 – 37 kg	2 tab 4 KDT + 500 mg Streptomisin inj.	2 tab 4 KDT	2 tab 2 KDT + 2 tab Etambutol
38 – 54 kg	3 tab 4 KDT + 750 mg Streptomisin inj.	3 tab 4 KDT	3 tab 2 KDT + 3 tab Etambutol
55 – 70 kg	4 tab 4 KDT + 1000 mg Streptomisin inj.	4 tab 4 KDT	4 tab 2 KDT + 4 tab Etambutol
≥ 71 kg	5 tab 4 KDT + 1000 mg Streptomisin inj.	5 tab 4 KDT	5 tab 2 KDT + 5 tab Etambutol

Sumber: (Kemenkes, 2014)

d. Efek samping OAT

Sebagian besar pasien TB dapat menyelesaikan pengobatan tanpa efek samping. Namun sebagian kecil dapat mengalami efek samping, oleh karena itu pemantauan kemungkinan terjadinya efek samping sangat penting dilakukan selama pengobatan (PDPI., 2011).

e. Terapi pembedahan

Indikasi mutlak dilakukannya terapi pembedahan/operasi pada pasien TB paru adalah:

1. Pasien batuk darah masif yang tidak dapat diatasi dengan cara konservatif.
2. Pasien dengan fistula bronkopleura dan empiema yang tidak dapat diatasi secara konservatif.

Indikasi relatif dilakukannya terapi pembedahan/operasi pada pasien TB paru adalah :

- a. Pasien dengan dahak negatif tetapi mengalami batuk darah berulang.
- b. Kerusakan satu paru atau lobus dengan disertai keluhan.
- c. Sisa kavitas yang menetap (PDPI., 2011).

2.1.11. Evaluasi Pengobatan Tuberkulosis

Evaluasi pasien meliputi evaluasi klinis, bakteriologi, radiologi dan efek samping obat, serta evaluasi keteraturan berobat.

1) Evaluasi klinis

- a. Pasien dievaluasi secara periodik.
- b. Evaluasi terhadap respons pengobatan dan ada tidaknya efek samping obat serta ada tidaknya komplikasi penyakit.
- c. Evaluasi klinis meliputi keluhan, berat badan dan pemeriksaan fisis (PDPI., 2011).

2) Evaluasi bakteriologi (0 – 2 – 6/8 bulan pengobatan)

- a. Tujuan untuk mendeteksi ada tidaknya konversi dahak.
- b. Bila ada fasilitas biakan, dilakukan pemeriksaan biakan dan uji kepekaan.
- c. Pemeriksaan dan evaluasi pemeriksaan mikroskopis yaitu pada saat sebelum pengobatan dimulai, setelah 2 bulan pengobatan (setelah fase intensif) dan pada akhir pengobatan (PDPI., 2011).

- 3) Evaluasi radiologi (0 – 2 – 6/8 bulan pengobatan)
 - a. Sebelum pengobatan.
 - b. Setelah 2 bulan pengobatan (kecuali pada kasus yang juga dipikirkan kemungkinan keganasan dapat dilakukan 1 bulan pengobatan).
 - c. Pada akhir pengobatan (PDPI., 2011)
- 4) Evaluasi pasien yang telah sembuh

Pasien TB yang telah dinyatakan sembuh sebaiknya tetap dievaluasi minimal dalam 2 tahun pertama setelah sembuh, hal ini dimaksudkan untuk mengetahui kekambuhan. Hal yang dievaluasi adalah mikroskopis BTA dahak dan foto toraks (sesuai indikasi/bila ada gejala) (PDPI., 2011).

2.1.13. Pencatatan dan Pelaporan Tuberkulosis

Dalam pelaksanaan monitoring dan evaluasi program TB paru, diperlukan suatu sistem pencatatan dan pelaporan baku yang dilaksanakan dengan baik dan benar dengan maksud mendapatkan data yang valid untuk diolah, dianalisis, diinterpretasi, disajikan dan disebarluaskan untuk dimanfaatkan sebagai dasar perbaikan program. Data yang dikumpulkan harus memenuhi standar yang meliputi:

1. Lengkap, tepat waktu dan akurat.
2. Data sesuai dengan indikator program.

3. Jenis, sifat, format, basis data yang dapat dengan mudah diintegrasikan dengan sistem informasi kesehatan yang generic (Kemenkes., 2014).

Dasar untuk program pengendalian TB diperoleh dari sistem pencatatan dan pelaporan TB. Pencatatan menggunakan formulir standar secara manual didukung dengan sistem informasi secara elektronik, sedangkan pelaporan TB menggunakan sistem informasi elektronik. Penerapan sistem informasi TB secara elektronik disemua fasilitas kesehatan dilaksanakan secara bertahap dengan memperhatikan ketersediaan sumber daya di wilayah tersebut. Sistem pencatatan dan pelaporan TB secara elektronik menggunakan Sistem Informasi TB Terpadu yang berbasis web dan terintegrasi dengan sistem informasi kesehatan secara nasional (Kemenkes., 2014). Dinas kesehatan Kab/Kota menggunakan formulir pencatatan dan pelaporan : Register TB Kab/Kota (TB.03). Laporan triwulan penemuan dan pengobatan pasien TB (TB.07). Laporan triwulan hasil pengobatan (TB.08). Laporan triwulan hasil konversi dahak akhir tahap intensif (TB.11). Formulir pemeriksaan sediaan untuk uji silang dan analisis hasil uji silang kabupaten (TB.12) dan Laporan OAT (TB.13).

Dinas kesehatan Provinsi menggunakan formulir pelaporan sebagai berikut :Rekapitulasi penemuan dan pengobatan pasien TB per Kab/Kota. Rekapitulasi hasil pengobatan per Kab/Kota. Rekapitulasi hasil pengobatan gabungan TB dan TB resistan obat di tingkat Provinsi. Rekapitulasi hasil

konversi dahak per Kab/Kota.Rekapitulasi analisis hasil uji silang provinsi per Kab/Kota.Rekapitulasi laporan OAT per Kab/Kota.Rekapitulasi data situasi *public-private* mix (PPM) dalam pelayanan TB (Kemenkes., 2014).

2.2. Tuberkulosis Laten (ITBL)

2.2.1 Definisi Infeksi TB Laten (ITBL)

Infeksi tuberkulosis Laten adalah suatu kondisi adanya infeksi MTB tanpa adanya tanda dan gejala klinik serta tidak dapat menularkan kepada orang lain. Hasil foto toraks paru normal dan hasil uji imunologik seperti tes uji tuberkulin atau *interferon Gamma Release Assay* (IGRA) positif..Tidak ada gejala dan tanda Klinis TB aktif di paru maupun ekstraparu (PDPI.,2016; CDC., 2013; WHO., 2015).

Setelah terpapar MTB diperkirakan 30% dari individu akan berkembang menjadi ITBL berdasarkan diagnosis tes kulit tuberkulin (*tuberculin skin test/TST*) positif. Lima sampai 10% dari orang sehat dengan TST positif akan berkembang dari ITBL menjadi TB aktif (reaktivasi) (Kahwati L C et al., 2016).

2.2.2. Diagnosis Infeksi TB Laten (ITBL)

Pada infeksi TB laten tidak didapatkan adanya gejala sehingga Diagnosis ITBL dilakukan melalui tes kulit tuberkulin atau IGRA. Sebagai penanda infeksi TB dilakukan pemeriksaan imunologis pada individu ITBL karena pada kondisi tersebut terjadi induksi imun respons seluler Th-1 yang cukup kuat dan merupakan penanda(marker) yang sensitif terhadap bakteri

tuberkulosis yang dorman (CDC., 2013; WHO., 2015). Saat ini pemeriksaan imunologi untuk ITBL ada 2 cara yaitu pemeriksaan “in vivo” berupa uji tuberkulin dan pemeriksaan “ex vivo” yaitu IGRA (PDPI., 2016).

Diagnosis ITBL juga harus dilakukan untuk menyingkirkan tidak terdapatnya gambaran TB aktif melalui anamnesis, riwayat pengobatan, foto thorax, pemeriksaan fisik dan pada kondisi tertentu sputum mikrobiologi, selain TST atau IGRA. Untuk penegakan Diagnosis ITBL baik IGRA maupun uji tuberkulin memiliki kemampuan yang sama tetapi tidak untuk diagnosis TB aktif (PDPI., 2016).

Tabel 2.4. Perbedaan TB aktif dan ITBL (WHO ., 2015)

TB Aktif	Infeksi TB Laten
1. Memiliki gejala sakit yaitu demam, batuk, nyeri dada, berat badan menurun, keringat malam, hemoptisis, lemah dan nafsu makan menurun	Tidak ada gejala
2. Merasa sakit	Tidak merasa sakit
3. Tes Tuberkulin atau IGRA positif	Tes tuberkulin atau IGRA positif
4. Dapat menular	Tidak menular
5. Foto thoraks abnormal tetapi bisa normal pada orang imunokompromis atau TB ekstraparu	Foto thoraks normal
6. Hasil pemeriksaan Mikrobiologi dapat positif atau negatif, termasuk TB ekstraparu	Hasil pemeriksaan mikrobiologi (BTA, kultur dan gene Xpert) negatif
7. Perlu pengobatan sesuai standar terapi TB	Perlu terapi pencegahan pada kondisi tertentu

2.2.3. Pemeriksaan Infeksi TB Laten (ITBL)

Untuk penegakan diagnosis ITBL dapat dilakukan tes tuberkulin dan IGRA, yang mempunyai kemampuan yang sama (CDC., 2013).

2.2.3.1. Tes Tuberkulin

Merupakan pengukuran Imunitas seluler *delayed type hypersensitivity* (DTH) terhadap *purified protein derevative* (PPD) tuberkulin, yang merupakan antigen berbagai mikobacteria termasuk MTB, BCG MTB, BCG M bovis dan berbagai mikobacteria di lingkungan. Reaksi DTH ini terjadi 2-3 minggu setelah seseorang terinfeksi bakteri TB. Pengukuran reaksi pada manusia dilakukan dengan mengukur diameter indurasi yang terjadi pada kulit 48-72 jam setelah penyuntikan antigen (PDPI., 2016).

Tes tuberkulin dilakukan dengan menyuntikkan tuberkuloprotein 0.1 mL PPD 5 TU, secara intradermal menggunakan jarum yang kecil pada daerah volar lengan bawah (PDPI.,2016). Prosedur tindakan tes tuberkulin :

1. Bersihkan sepertiga tengah sisi volar lengan bawah menggunakan akuabides steril, kemudian keringkan dengan menggunakan kasa steril.
2. Suntukkan 0,1 mL PPD 5 TU secara intradermal dari arah distal sampai terjadi benjolan dengan diameter \pm 5 mm

kemudian buat tanda melingkari benjolan tersebut menggunakan spidol tahan air

3. Bekas suntikan jangan ditekan atau diusap dengan kapas alkohol atau kasa steril
4. Baca Indurasi yang terjadi setelah 48-72 jam dengan mengukur diameter transversal dan lihat terjadi bula atau tidak. Tes tuberkulin positif bila terjadi bula atau vesikel atau terjadi konversi.

Tabel 2.5. Interpretasi Tes Tuberkulin (PDPI.,2016)

Hasil Uji Tuberkulin positif	Kelompok Pasien
Indurasi > 5 mm	<ul style="list-style-type: none"> • Pasien HIV • Kontak dengan TB aktif yang infeksius (BTA positif) dalam waktu dekat • Pasien dengan gambaran fibrotik pada foto toraks disertai riwayat TB sebelumnya • Pasien dengan Transpalantasi organ dan pasien dengan gangguan sistem imun
Indurasi > 10 mm	<ul style="list-style-type: none"> • Pasien dari negara endemik TB dalam 5 tahun terakhir • Pengguna narkoba suntik • Individu atau pekerja ditempat dengan kepadatan tinggi (RS, Penjara, rumah singgah, panti) • Pekerja Laboratorium Mikrobiologi • Pasien dengan risiko tinggi menjadi TB aktif (DM, malnutrisi) • Anaka yang kontak dengan individu berisiko TB
Indurasi > 15 mm	<ul style="list-style-type: none"> • Individu dengan risiko rendah terinfeksi TB (untuk skrining atau syarat masuk sekolah atau bekerja)

2.2.3.2. *Interferon-Gamma Release Assays (IGRA)*

Interferon Gamma Release Assay adalah pemeriksaan laboratorium diagnostik in vitro dengan cara *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang mengukur reaksi pembentukan interferon- γ dalam darah pasien dikaitkan dengan infeksi kuman MTB. Dilakukan untuk menentukan ITBL dengan mengukur respons imun seluler terhadap antigen spesifik MTB dalam darah. Termasuk *early secretory antigenic target-6* (ESAT-6), *culture filtrate protein 10* (CFP-10), dan antigen TB7.7. Saat ini terdapat 2 jenis pemeriksaan IGRA yang terdapat dipasaran yaitu QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay (QFT-GIT) dan T-SPOT-TB . (ECDC Guidance.,2011). Hasil pemeriksaan IGRA adalah berdasarkan jumlah IFN γ yang dikeluarkan.

Cara Pemeriksaan QFT- GIT (brosur QFT.,2014) :

- a. Siapkan 3 tabung darah yaitu tabung Nil, tabung TB Antigen, dan tabung Mitogen. Tabung TB Antigen berisikan campuran cocktail peptida yang menyerupai protein-protein ESAT-6, CFP-10, dan TB7.7 (p4) untuk merangsang sel limfosit T yang memproduksi IFN γ dalam darah heparin tersebut.
- b. Tabung-tabung tersebut kemudian segera diinkubasi pada suhu 37 °C dalam jangka waktu 16 jam sejak pengambilan. Inkubasi selama 16-24 jam, lalu plasma dipisahkan dengan cara pemusingan

(centrifuge). Tabung Mitogen menjadi kontrol positif dan juga untuk mengetahui apakah prosedur penanganan spesimen darah serta inkubasi sudah benar. Plasma diperiksa dengan cara ELISA terhadap kadar interferon- γ (IFN- γ) yang dikaitkan dengan infeksi MTB.

Interpretasi hasil QFT :

Pemeriksaan IGRA menggunakan purified antigens M. Tuberculosis untuk menstimulasi limfosit darah perifer memproduksi IFN- γ . Interpretasi pemeriksaan IGRA Quantiferon (QFT) berdasarkan jumlah IFN- γ yang dikeluarkan menggunakan ELISA. Pada T-SPOT TB dengan menghitung jumlah sel yang mengeluarkan IFN- γ menggunakan ELISPOT (PDPI., 2016).

Uji dianggap positif bila kadar IFN- γ yang terbentuk pada tabung TB Antigen lebih banyak secara bermakna (dalam IU/mL) daripada tabung Nil. Tabung Mitogen dapat dipakai sebagai kontrol positif. Bila responss rendah terhadap Mitogen dan hasil tabung TB Antigen juga negatif maka dinyatakan sebagai **indeterminate**. Ini dapat dijumpai pada keadaan limfosit sedikit, keaktifan limfosit rendah karena penanganan spesimen yang kurang baik. Tabung kosong dipakai untuk menilai latar belakang (background), pengaruh antibodi heterofil, atau IFN- γ tidak spesifik dalam darah. Hasil **positif** menunjukkan amat mungkin ada infeksi TB (baik TBC aktif maupun LTBI). Hasil **negatif** menunjukkan tidak sesuai dengan infeksi TB dan Hasil **indeterminate** memerlukan penilaian lebih lanjut atau uji ulangan (Brosur QFT., 2014).

Laboratorium harus melaporkan kedua data kuantitatif (berupa angka meliputi antigenrespons antigen, nil dan mitogen) dan kualitatif (berupa positif, negatif dan intermediate atau borderline (PDPI., 2016).

2.2.4. Kelompok risiko infeksi TB laten

Terdapat kelompok orang yang berisiko untuk menjadi ITBL, kelompok tersebut adalah mereka yang berhubungan erat dengan penderita TB aktif atau tersangka TB, berada pada tempat berisiko tinggi untuk tertular TB seperti lembaga pemasyarakatan, penampungan tunawisma, bangsal perawatan jangka panjang untuk penderita TB. Kelompok risiko tinggi yang lain adalah bayi, anak-anak dan dewasa muda yang terpajan atau terpapar orang dewasa yang berisiko tinggi terinfeksi TB aktif (CDC., 2010; PDPI., 2016).

2.2.5. Kelompok risiko tinggi TB laten menjadi TB aktif

Proses reaktivasi ITBL menjadi Tb aktif membutuhkan keadaan bakteri M.tb tidak berada dalam fase dorman. Ada beberapa sebab yang dapat memicu proses reaktivasi ini. Keadaan tersebut antara lain (PDPI., 2016; WHO., 2015)

1. Infeksi HIV
2. Bayi dan anak usia < 5 tahun
3. Pasien yang mendapat pengobatan immunoterapi misal Tumor Necrosis Faktor-alfa (TNF α) antagonis, kortokosteroid sistemik, terapi immunosupresi pada transplantasi organ

4. Individu dengan riwayat terinfeksi tuberkulosis pada 2 tahun terakhir
5. Individu tidak pernah mendapatkan pengobatan TB tetapi pada foto thorax ada fibrotik
6. Pasien diabetes mellitus, silikosis, gagal ginjal kronik, leukemia, limfoma atau kanker kepala, leher atau paru
7. Pasien yang telah dilakukan operasi gastrektomi atau by pass usus halus
8. Individu yang berat badannya < 90% berat ideal
9. Tuna wisma, perokok, peminum alkohol atau penyalahgunaan obat
10. Warga binaan lembaga pemasyarakatan
11. Petugas dan tenaga medis

2.3. Sistem Imunitas Tubuh pada Infeksi

Tubuh manusia mengembangkan mekanisme yang cukup canggih untuk menghadapi patogen yang memiliki potensi invasi ke dalam tubuh. Mekanisme tersebut merupakan bentuk dasar dari pertahanan alami, sistem kekebalan alami (nonspesifik) adalah pertahanan lini pertama tubuh terhadap infeksi yang diaktifkan bila patogen masuk ke dalam tubuh manusia melewati barier pertahanan fisik, mekanik dan kimiawi tubuh. Patogen yang dimaksud termasuk endotoksin *lipopolysaccharida* (LPS), *peptidoglycan* (PG), *lipoteichoic acid* (LTA), *flagelin*, *mannan*, *Zymosan* dan

RNA virus. Sistem kekebalan yang didapat (spesifik) akan membantu sistem kekebalan alami melalui aktivitas sel limfosit. Limfosit T bersifat seluler dan limfosit B bersifat humoral.

2.3.1. Respons imun terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Respons imun terhadap infeksi tuberkulosis ada 2 macam yaitu respons imun seluler (sel T dan makrofag yang teraktivasi) bersama sejumlah sitokin dan respons imun humoral (antibodi-mediated). Respons imun seluler memegang peranan utama sebagai pertahanan tubuh terhadap infeksi tuberkulosis, sedangkan respons imun humoral tidak bersifat protektif (Bothamley G.H., 1995). Tuberkulosis merupakan penyakit yang unik respons seluler baru terdeteksi cukup lama setelah 2-12 minggu setelah infeksi (Fogel N., 2015).

Saat MTB masuk ke paru-paru melalui inhalasi aerosol *droplet nuclei* yang selanjutnya akan berinteraksi dengan berbagai reseptor termasuk *pattern recognition receptors* seperti *toll-like receptors* (TLR), *complement receptor*, *mannose receptor*, *scavenger receptor*. *DC-specific intercellular-adhesion-molecule-3-grabbing non-integrin*, pada permukaan makrofag dan sel dendritik. Reseptor ini mengenali komponen MTB seperti lipoprotein, *CpG-containing DNA*, *mannose-capped lipoarabinomannan* dan *phosphatidylinositol mannoside*. Protein D surfaktan paru berikatan dengan *lipoarabinomannan* permukaan MTB dan menghambat pertumbuhan intraselular dari MTB dengan peningkatan fusi fagosom-lisosom. Selain itu, ikatan *cytosolic nucleotide* dan oligomerisasi reseptor

seperti NOD2 yang mengenali *muramyl peptide* dan juga *C-type lectin dectin-1* yang berinteraksi dengan MTB bekerja sama dengan TLR-2 untuk mengaktifasi NF-kB dan aktivasi jalur vitamin D (Dheda K et al., 2010).

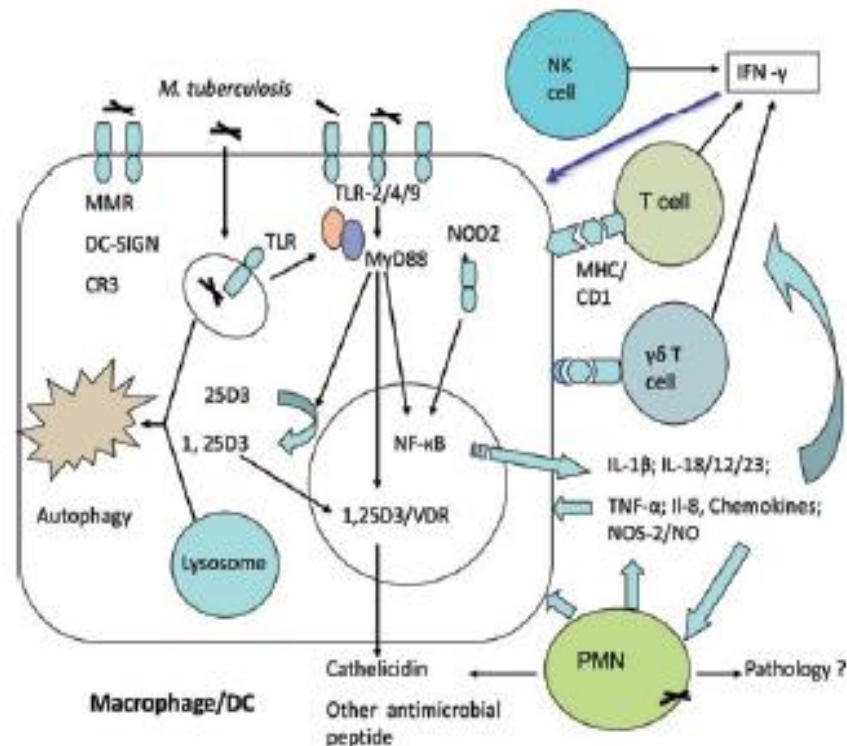
Aktivasi dari jalur TLRs - NFkB mempromosikan translokasi nukleus NF-kB dan aktivasi jalur vitamin D yang menyebabkan :

1. Aktivasi NF-kB menyebabkan produksi dan sekresi dari berbagai mediator proinflamasi termasuk sitokin TNF- α , IL-1, IL-12, IL-18 dan kemokin yang akan mengundang neutrofil, sel NK, sel T, sel dendritik, dan makrofag ke lokasi infeksi
2. Aktivasi TLR juga melakukan upregulasi ekspresi reseptor vitamin D (VDR) yang selanjutnya menyebabkan induksi dari peptida *antimicrobial cathelicidin* dan *beta-defensin* untuk membunuh *mycobacteria* intraselular (Dheda K et al., 2010).

Interferon- γ yang disekresikan dari sel T yang teraktivasi dan sel NK memiliki kemampuan untuk aktivasi makrofag dan mempromosikan pembunuhan bakteri dengan cara melakukan maturasi fagosomal dan produksi *intermediate nitrogen antimicrobial reaktive* dan *intermediate oksigen reaktive*. Studi terkini juga menemukan bahwa IFN- γ dan jalur sinyal TLR menginduksi autofagi pada makrofag yang akan meningkatkan kemampuan lisosom. Sitokin Th1 IFN- γ memfasilitasi fusi fagosom-lisosom (autofagi) melalui jalur sinyal sel IRGm1 (LRG-47) dan PI3K dimana sitokin Th2, IL-4 dan IL-13 memfasilitasi autofagi dan autofagi yang memediasi pembunuhan MTB. Selain IFN- γ , TNF- α juga berperan dalam membunuh

MTB intraselular melalui intermediate nitrogen reaktif bersamaan dengan IFN- γ dan terlibat dalam pembentukan granuloma. TNF dibutuhkan untuk mengontrol infeksi laten tuberkulosis sebagai antibodi anti-TNF infliximab yang meningkatkan risiko aktivasi infeksi TB laten melalui netralisasi langsung TNF dan juga deplesi subset *granulysin-expressing CD45RA+* dari sel T CD8+ memori efektor yang berkontribusi dalam membunuh MTB intraselular (Dheda K et al., 2010).

Peran neutrofil dalam pertahanan host melawan MTB masih kontroversial. *Polymorphonuclear neutrophils* (PMN) merupakan sel pertama yang direkrut ke lokasi masuknya mikroba dan mengekspresikan sejumlah reseptor dan molekul efektor pada makrofag. Sebagian besar percobaan pada PMN manusia menyebutkan bahwa PMN dapat teraktivasi dalam respon terhadap MTB dan memiliki kemampuan untuk membatasi pertumbuhan mikobakterial secara *in vitro*. Sebagai contoh, PMN memproduksi *human neutrophil peptides 1–3* dan *cathelicidin LL-7* dan *lipocalin 2* yang memiliki kemampuan untuk membatasi pertumbuhan MTB. Selanjutnya PMN akan mengaktivasi makrofag melalui pelepasan protein granulasi dan *heat shock protein 72* dari neutrofil apoptotic (Dheda K et al., 2010).



Gambar 2.7. Imunitas *innate* terhadap infeksi tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis* difagosit oleh makrofag dan sel dendritik melalui reseptor-terikat membran seperti CR3, reseptor *scavenger*, MMR, TLR, NOD2 dan DC-SIGN. Hal ini menyebabkan aktivasi dari jalur pesinyal makrofag (NF- κ B), yang menyebabkan sekresi dari sitokin pro-inflamatorik, kemokin, molekul antimikrobal, dan aktivasi VDR yang mana menginduksi ekspresi dari peptide antimikrobal cathelicidin dan β -defensin. Selain itu, induksi autofagi memediasi aktivitas antimikrobal. Sel PMN mengenali dan memakan *M.tuberculosis* dan mensekresikan peptida antimikrobal untuk membunuh bakteri. Sel NK, sel T $\gamma\delta$ dan sel *CD1-restricted* juga diaktivasi oleh ligan spesifik dan sitokin, menghasilkan faktor sitotoksik dan mensekresikan IFN- γ yang mengaktivasi makrofag. CR3, reseptor komplemen 3, DC-SIGN, sel dendritik-intraselular spesifik-molekul-adesi-3-grabbing-non-integrin: INF, *interferon*; MMR, *macrophage mannose receptor*; NK, *natural killer*; PMN, *polymorphonuclear neutrophils*; TLR, *toll-like receptors*; TNF, *tumour necrosis factor*; VDR, *vitamin D receptor* (Dheda K et al. 2010).

2.4. High Mobility Group Box 1 (HMGB 1)

2.4.1. Definisi HMGB 1

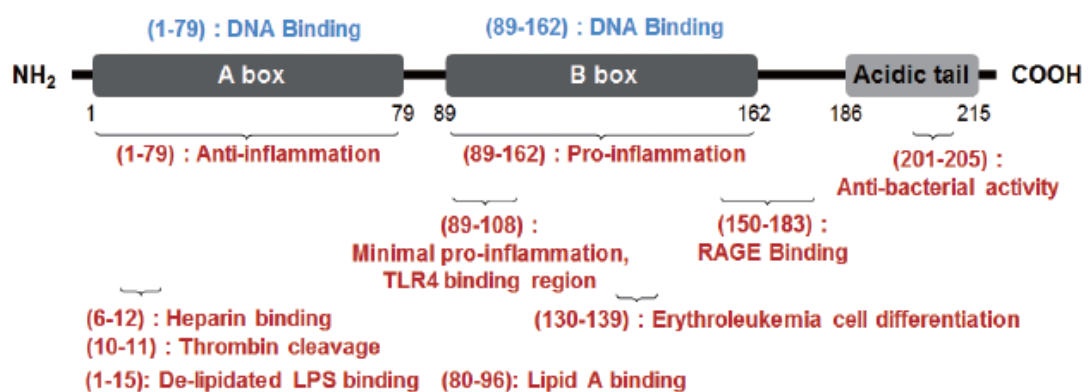
High Mobility Group Box 1 (HMGB1) merupakan protein pengikat DNA nuklear. HMGB1 merupakan salah satu *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs) yang mengaktivasi sistem imun bawaan dan bagian dari keluarga *High Mobility Group* (Kang R et al., 2014).

2.4.2. Struktur HMGB 1

Gen HMGB1 manusia terletak di kromosom 13q12 dan enam lokus polimorfik di seluruh lokus gen yang diidentifikasi baru-baru ini (Chen Q et al., 2016). Protein HMGB1 mempunyai berat molekul 25--30 kDa terdiri dari dua domain DNA-binding homolog yaitu kotak A dan kotak B, masing-masing terdiri dari sekitar 80 residu asam amino dan ujung C terminal asam bermuatan negatif yang terdiri dari sekitar 30 residu asam aspartat dan glutamat. Struktur HMGB1 pada Gambar 2.8 memperlihatkan protein HMGB1 terdiri dari 215 asam amino dalam tiga domain struktural: kotak A (1--79), kotak B (89--162), dan ujung C terminal asam (186--215). Fungsi Kotak A adalah pengikatan DNA dan menginduksi efek anti-inflamasi, sedangkan domain kotak B memainkan peran penting dalam pengikatan DNA dan merangsang respons proinflamasi. Domain kotak B terdiri dari dua tempat pengikatan penting untuk TLR4 dan RAGE yang memediasi pelepasan sitokin proinflamasi. Secara khusus, 20 asam amino tempat mengikat TLR4 (89--108) adalah urutan minimal yang diperlukan untuk

menginduksi aktivitas sitokin. Dua wilayah peptida (1--15, 80--96) dari HMGB1 mengikat LPS dan LPA (Lee SA et al., 2014).

Domain Box A dari HMGB1 berperan dalam pengikatan HMGB 1 dengan DNA yang rusak dan bertindak sebagai antagonis spesifik HMGB 1, menunjukkan efek antiinflamasi. Hal ini juga terlihat pada domain pengikatan heparin dan tempat pemecahan yang dimediasi thrombin. Disisi lain, domain box B berhubungan dengan aktivitas sitokin pada sepanjang lengan HMGB 1 yang distimulasi oleh pelepasan *Tumor necrosis factor α* (TNF α) dan berbagai sitokin proinflamasi dalam makrofag, selain perannya dalam pengikatan DNA. Terdapat dua tempat pengikatan penting yaitu *Toll like receptor4* (TLR4) (89 - -108) dan *Receptor for advanced glycalation end products* (RAGE) (105 - -183) yang krusial dalam aktivasi pelepasan sitokin oleh makrofag, dimana 20 residu pertama mewakili jumlah minimum peptida yang diperlukan untuk menginduksi respons inflamasi (Lee SA., 2014).



Gambar 8. Struktur HMGB 1 (Lee SA.,2014)

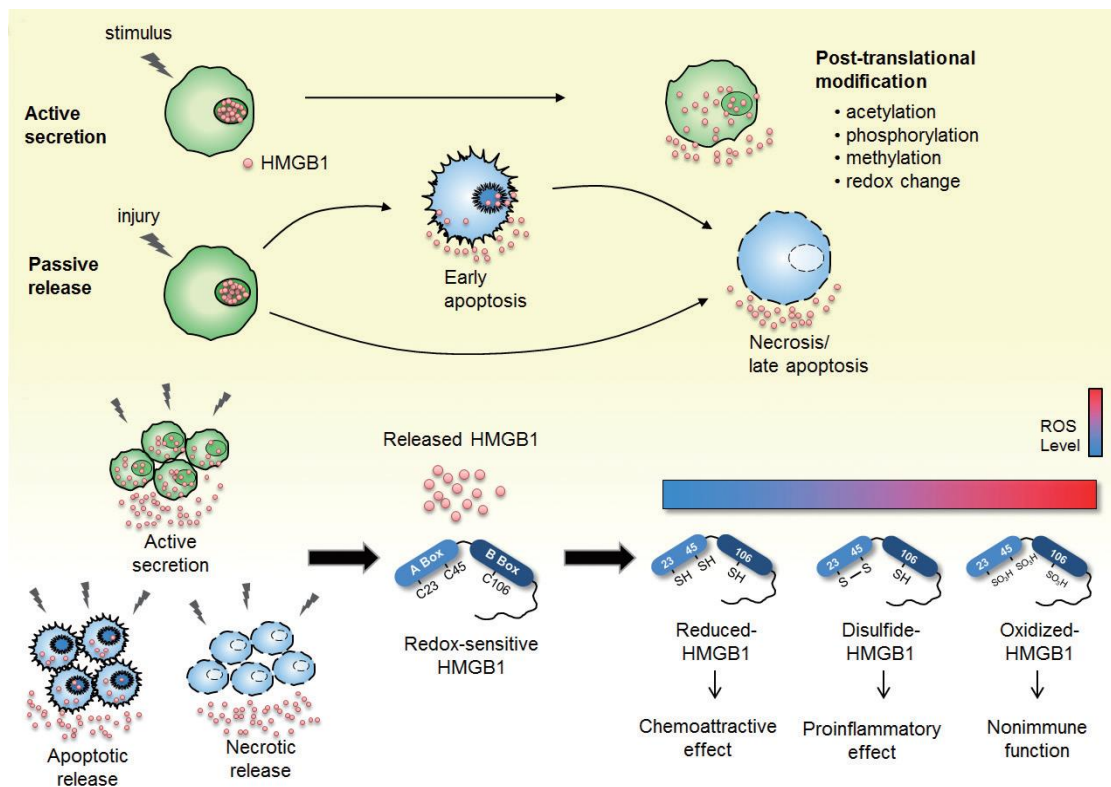
2.4.3. Fisiologi dan Peranan HMGB 1

HMGB1 merupakan bagian dari keluarga HMG. Beberapa Keluarga HMG diantaranya adalah HMGA, HMGN, dan HMGBs. HMGB1 termasuk pada kelompok HMGB yang paling banyak diespresikan (Kang R et al., 2014).

Peran HMGB1 ada tiga bentuk nuklear, sitosol/sitoplasma dan ekstraseluler. Bentuk HMGB1 nuklear memiliki peran pada banyak kegiatan DNA, yaitu replikasi, perbaikan, rekombinasi, transkripsi DNA serta stabilitas genomic (Kang R et al., 2014). Dalam sitoplasma, HMGB1 mengambil bagian dalam mengatur *autophagy* dan menjaga keseimbangan antara *autophagy* dan apoptosis (Tang D et al., 2010). Selain itu HMGB 1 juga mempromosikan proses autofagi melalui jalur degradasi lisosom. Dalam beberapa kasus HMGB 1 yang berada di membran sel berkontribusi pada aktivasi trombosit dan adesi sel (Yu Y et al., 2015).

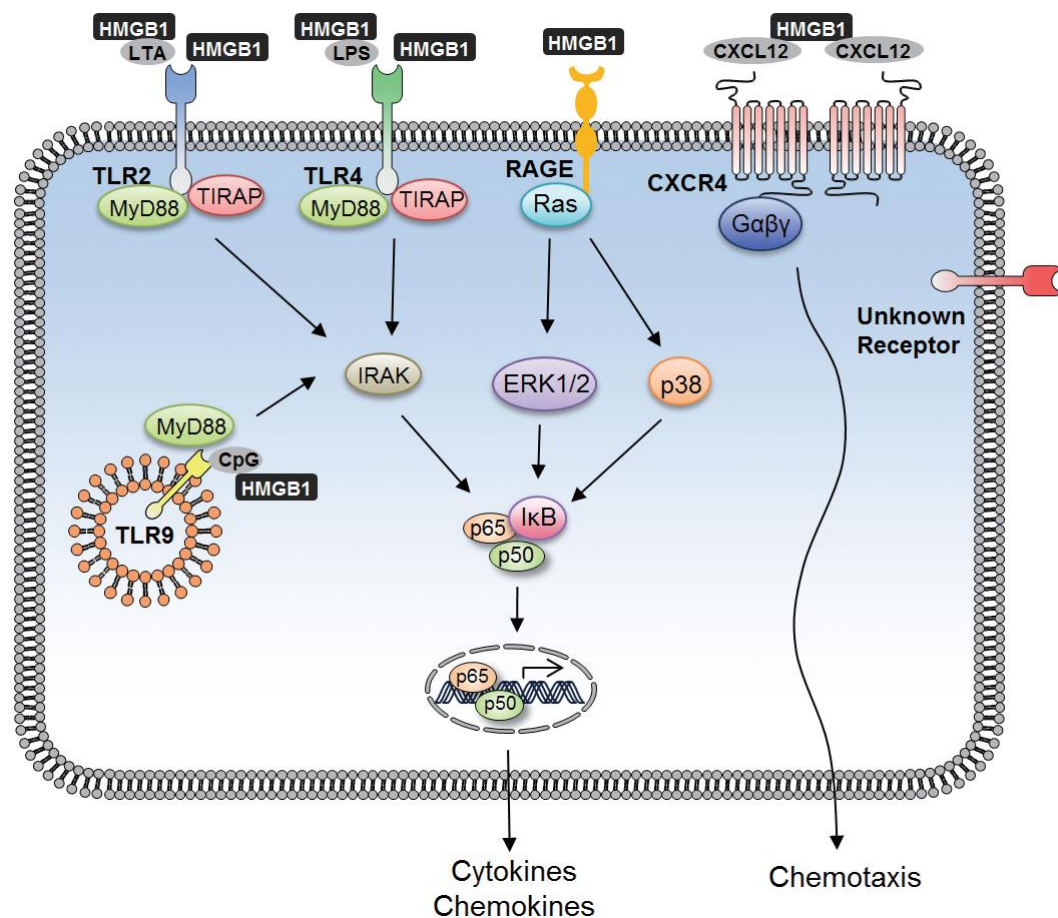
High Mobility Group Box 1 ekstraseluler memiliki peranan pada proses inflamasi, imunitas, pertumbuhan sel, proliferasi dan kematian sel. Fungsi HMGB 1 ekstraseluler untuk aktivasi sitokin dan kemokin, dimediasi oleh RAGE dan *toll like receptors* seperti TLR2, TLR 4 dan TLR 9, untuk mengaktivasi jalur signaling akhir seperti *nuclear factor kappa* β (NF κ β), *interferon regulatory factor-3* (IRF 3) dan *phosphatidylinositol 3-kinase* yang kemudian mengaktivasi pengeluaran sitokin proinflamasi *Tumour necrosis factor* α (TNF α), interleukin 1 (IL 1) dan interleukin 6 (IL 6) oleh makrofag (Yu Y et al., 2015).

Translokasi HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler melalui dua mekanisme sekresi: sekresi aktif oleh sel inflamasi atau sekresi pasif oleh sel nekrotik atau apoptosis. Secara aktif HMGB1 dalam nukleus disekresi ketika sel-sel imunokompeten diaktifkan oleh stimulus inflamasi dan mengalami modifikasi paska-translasi seperti asetilasi, fosforilasi, metilasi, dan perubahan redoks. Sekresi pasif HMGB1 dimediasi oleh kematian sel nekrotik dan apoptosis yang disebabkan oleh cedera, salah satunya akibat infeksi MTB. Sekresi HMGB1 memicu respons inflamasi dalam tubuh. Aktivitas inflamasi akibat sekresi HMGB1 ekstraseluler tergantung pada keadaan redoksnya. Bentuk HMGB1 terdiri dari tiga residu sistein yaitu C23, C45 dan C106 yang dimodifikasi selama perubahan redoks pada Gambar 2.9. Bentuk HMGB1 tereduksi pada semua kelompok tiol mendefinisikan aktivitas kemokin dari HMGB1, sedangkan bentuk disulfida HMGB1 pada C23 dan C45, membentuk ikatan disulfida antarmolekul, menginduksi aktivitas sitokin. Bentuk teroksidasi penuh dari HMGB1 dengan sistein bentuk sulfonat berfungsi sebagai imunitas tubuh dalam sel (Lee SA., 2014).



Gambar 9. Mekanisme sekresi dan peranan HMGB1 (Lee SA.,2014)

Interaksi HMGB1 dengan transduksi sinyal selular RAGE, TLR2, TLR4, dan TLR 9 melalui jalur umum yang selanjutnya akan mengaktifasi NF- κ B pada gambar 2.10.. Interaksi HMGB1 dengan LPS, LTA, dan CpG meningkatkan signal yang dimediasi TLR4, TLR2, dan TLR9 dan mengarah ke signal akhir aktivasi NF- κ B dan produksi sitokin proinflamasi. Diaktifkannya NF- κ B akan melepaskan I κ B, kemudian akan bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan DNA dalam bentuk bentuk heterodimer p65 / p50. Interaksi HMGB1 dengan CXCL12, yang mengikat CXCR4 akan menginduksi kemo-taksis dan perekrutan sel inflamasi (Lee S. A.,2014).



Gambar 10. Reseptor HMGB1 dan pengaktifan jalur transduksi signal (Lee S. A., 2014)

2.4.4. Peran pro-inflamatorik HMGB1

Interaksi HMGB1 dengan molekul lainnya (contoh LPS bakterial) atau berikatan ke reseptor untuk mengaktifasi berbagai gen proinflamatorik. HMGB1 dihasilkan oleh sel hidup maupun sel mati pada berbagai jaringan. Sekresi HMGB1 ke lingkungan ekstraselular dari sel nekrotik maupun makrofag yang teraktivasi, akan menginduksi berbagai sitokin proinflamatorik termasuk *tumor necrosis factor (TNF)-α*, *interleukin*

(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, *macrophage inflammatory protein* (MIP)-1 α , dan MIP-1 β , yang akan mempromosikan terjadinya proses inflamasi kronik. Sekresi HMGB1 disebut juga mediator fase lambat dari inflamasi yang diinduksi oleh sitokin proinflamatorik dini dan memicu efek immunosupresif dan patologikal yang mengikuti pengeluaran sitokin selanjutnya seperti TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 selama infeksi (Kim SY et al., 2017).

Peran proinflamatorik yang kuat dari HMGB1 ditunjukkan pada penyakit autoimun, trauma, sepsis, pneumonia bakterialis dan kondisi patologis termasuk aterosklerosis, arthritis, cedera paru akut seperti infeksi TB. Studi ilmiah menunjukkan bahwa kadar serum HMGB1 mengalami peningkatan pada pasien dengan tuberkulosis (TB). Sekresi HMGB1 yang oleh makrofag paru merupakan mediator inflamatorik yang penting dan terlibat dalam sekresi sitokin proinflamatorik dan pengeluaran *Nitric Oxide* (NO) selama TB paru. Sebagai tambahan terhadap pelepasan sitokin inflamatorik contohnya TNF- α , HMGB1 akan mengaktifasi fungsi sel imun dan menginduksi maturasi sel tersebut seperti monosit dan sel dendritik myeloid/plasmacytoid (Kim SY et al., 2017).

Selama awal infeksi, makrofag yang teraktivasi akan memproduksi NO yang akan menghasilkan lingkungan oksidasi tinggi. Produksi NO oleh makrofag yang teraktivasi akan mengoksidasi HMGB1 dan secara temporer menekan inflamasi yang berlebih dan menurunkan imunitas protektif. Selanjutnya, lingkungan oksidatif mengalami penurunan yang diakibatkan oleh melemahnya aktivasi makrofag, produksi NO yang menurun dan

penurunan apoptosis makrofag, menyebabkan penurunan produksi HMGB1 (Kim SY et al., 2017).

2.4.5. Peran HMGB1 pada infeksi dan cedera

Pelepasan HMGB1 terjadi selama infeksi atau cedera dengan mekanisme aktif dan pasif. Pengeluaran pasif diinisiasi oleh adanya kerusakan pada integritas selular yang terjadi secara langsung. Pengeluaran aktif diinisiasi oleh transduksi sinyal selular melalui interaksi reseptor membrane plasma dengan produk ekstraselular yang terjadi lebih lambat. Sekresi aktif dari HMGB1 terjadi ketika monosit, makrofag, sel *Natural-killer*, sel dendritik, sel endothelial, platelet, dan sel komponen imunologis lainnya yang terpajan *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), dan mediator inflamasi yang berasal secara endogen termasuk TNF, IL-1 dan INF- γ (Anderson U et al., 2011). Sebagai salah satu mediator proinflamasi responss lambat HMGB1 disekresi oleh makrofag 20 jam setelah aktivasi oleh LPS dari bakteri (Wang et al., 1999).

Sel lainnya yang dapat menstimulasi pelepasan HMGB1 secara aktif termasuk neurons, astrosit, sel eritroleukemia, sel neuroblastoma, dan sel tumor lainnya. Sebagian besar sel termasuk monosit dan makrofag dapat mengekspresikan protein HMGB1 dan mRNA HMGB1 pada kondisi basal. Akibat aktivasi makrofag oleh LPS, kadar mRNA HMGB1 akan meningkat dalam beberapa jam dan akan tetap terus meningkat selama 24 hingga 48 jam. Sekresi aktif HMGB1 ke ekstraselular dimulai 8 – 12 jam setelah ligasi

dengan TLRs dan terus meningkat selama 18-36 jam (Anderson U et al., 2011).

Pelepasan HMGB1 yang terjadi selama kematian sel terprogram berasal dari paling tidak 2 sumber : 1) Secara langsung dari sel apoptotik dan 2) Oleh monosit yang teraktivasi untuk mensekresikan HMGB1 mengikuti pajanan terhadap sel apoptotik. Bukti terakhir menunjukkan bahwa sel yang mengalami apoptosis dapat menghasilkan sejumlah HMGB1 yang *immunodetectable* namun secara imunologikal bersifat inaktif, oleh karena itu makrofag yang berkaitan akan gagal menstimulasi pengeluaran TNF dibandingkan dengan saat terjadinya pengeluaran HMGB1 secara pasif selama nekrosis sel. Hal ini disebabkan adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan oleh miktokondria pada sel apoptotik yang dapat menekan aktivitas inflamatorik dari HMGB1 dengan mengoksidasi cystein pada posisi 106. Mekanisme ini memberikan pemahaman yang penting mengapa apoptosis gagal untuk mengaktivasi responns inflamatorik yang bermakna karena adanya hambatan pada tahapan oksidasi HMGB1 yang penting dalam responns inflamatorik. Hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa HMGB1 endogen (yang didapat dari sel nekrotik) dibutuhkan untuk stimulasi pengeluaran TNF monosit dan HMGB1 rekombinan (rHMGB1) yang secara imunologis bersifat inaktif mengonfirmasi pentingnya C106 pada mekanisme molekular dari inflamasi yang dimediasi oleh HMGB1. Peran fungsional HMGB1 endogen sangat penting sebagai molekul pemberi sinyal yang menginformasikan sel lain

bahwa kerusakan atau invasi patogen telah terjadi (Anderson U et al., 2011).

Reseptor pertama yang diimplikasikan merupakan binding-partner untuk HMGB1 adalah *Receptor for advanced glycation end products* (RAGE). Reseptor RAGE merupakan anggota superfamili immunoglobulin transmembran, berada di permukaan sel. Ikatan HMGB1 dengan RAGE memberikan sinyal untuk memediasi kemotaksis dan stimulasi pertumbuhan sel, diferensiasi sel imun, migrasi sel imun dan sel otot polos serta up-regulasi reseptor sel permukaan termasuk RAGE dan TLR4. Ikatan HMGB1 dengan TLR4-MD2 melalui transduksi sinyal yang akan menstimulasi pengeluaran TNF dari makrofag. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan suasana redoks-sensitif pada cystein posisi 106 dan penggantian pada posisi cystein ini akan mencegah pengikatan HMGB1 terhadap TLR4. Reseptor TLR4 merupakan reseptor primer dari HMGB1 dalam memediasi aktivasi makrofag, pengeluaran sitokin, dan kerusakan jaringan (Anderson U et al., 2011).

High Mobility Group Box 1 merupakan mediator awal pada injuri steril dan merupakan mediator lanjut pada infeksi. Infeksi akan mengaktivasi sel imun bawaan untuk memproduksi HMGB1 yang bermakna dan kemudian akan menurun pada kemunculan responss TNF awal. Selama iskemia dan bentuk lain dari kerusakan sel steril, HMGB1 dihasilkan sebagai mediator dini yang akan mengaktivasi pengeluaran lanjut TNF dan sitokin lainnya (Anderson U et al., 2011).

High Mobility Group Box 1 merupakan protein nuklear non-histon yang memiliki peran penting sebagai *minor-groove binding enhancer*. Secara struktural, HMGB1 terdiri dari 2 kotak dasar yang berperan dalam pengikatan DNA dan ujung terminal C yang bersifat asidik. (Keyel et al., 2011) Berkebalikan dengan sitokin, HMGB1 berikatan dengan banyak reseptor, yang paling utama adalah TLR4 dan *receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. Dalam banyak kasus, pengikatan ini ditingkatkan atau dipotensiasi oleh ikatan pada *pathogen associated molecular patterns (PAMPs)* seperti LPS dan sitokin, termasuk IL-1. Walaupun HMGB1 berikatan dengan berbagai macam reseptor, namun bersifat spesifik dan memiliki interaksi afinitas yang rendah. Sebagai contoh, HMGB1 tidak berikatan dan tidak bersinergi dengan IL-18. Hal ini disebabkan oleh modifikasi post-translasi dan status redoks (Keyel et al., 2011).

2.4.5.1 Aktivitas sitokin oleh HMGB1

High Mobility Group Box 1 secara aktif dihasilkan dari sel imun termasuk makrofag, monosit, sel NK, sel dendritik, sel endothelial, dan platelet. Sekresi HMGB1 secara pasif dihasilkan dari sel nekrotik dan sel yang rusak. Kedua mekanisme dapat memproduksi pengeluaran sejumlah HMGB1 ekstraselular (Yang H et al., 2010). *High Mobility Group Box 1* ekstraseluler mempunyai banyak fungsi seperti aktivasi sitokin dan kemokin, dimana proses ini dimediasi oleh *receptor for advanced glycation end products (RAGE)* dan *toll like receptors* TLR2, TLR 4 dan TLR 9 untuk

mengaktivasi jalur signaling akhir seperti NF κ B, *interferon regulatory factor-3* (IRF 3) dan *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) yang kemudian mengaktivasi pengeluaran sitokin proinflamasi (*Tumour necrosis factor α* (TNF α), interleukin 1 (IL 1) dan interleukin 6 (IL 6) oleh makrofag (Yu Y et al., 2015). Aktivitas inflamatorik dari HMGB1 bergantung pada status oksidasi dari cysteine 106 yang terletak pada *B box DNA-binding domain* dari HMGB1, yaitu wilayah yang penting dalam stimulasi pengeluaran sitokin dan inflamasi. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa cysteine 106 dibutuhkan untuk proses sinyal HMGB1 melalui TLR4 untuk menstimulasi pengeluaran sitokin dan inflamasi (Yang H et al., 2010).

2.4.5.2. Reseptor yang memediasi aktivitas HMGB1

High Mobility Group Box 1 dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel termasuk RAGE, TLR2, TLR4 dan TLR9. Interaksi HMGB1 dengan reseptor ini menyebabkan transduksi sinyal intraselular dan memediasi respon seluler termasuk perpindahan sel kemotaktik dan pelepasan sitokin pro inflamatorik (misalnya TNF dan IL-1) secara *in vitro* dan inflamasi akut secara *in vivo* (Yang H et al., 2010). Target utama dari HMGB1 ekstraseluler adalah TLR4, yang mengarahkan translokasi faktor nuklir kappa B (NF κ B) ke nukleus, dan aktivasi faktor regulasi interferon 3 (IRF3) dan activator protein 1 (AP-1) untuk menghasilkan repertoar sitokin inflamasi. HMGB1 adalah mediator lambat dari kerusakan infeksi, tetapi awal salah satu kerusakan steril. Selama aktivasi sel imunitas, HMGB1 diekspresikan dan disekresi sekitar 8-12 jam. Umpan positif HMGB1

memperkuat respons imun melalui induksi sitokin selama stres, infeksi, atau hipoksia (Asavarut P et al., 2013).

Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE) merupakan protein transmembran dan diekspresikan pada sel endothelial, sel otot polos vascular, neurons, dan makrofag/monosit. Percobaan in vivo menunjukkan bahwa interaksi HMGB1/RAGE penting dalam pembentukan tumor dan proliferasi. Terdapat 2 jenis *Toll-like receptors* (TLRs) yang terlibat dalam sinyal HMGB1, yaitu TLR2 dan TLR4. TLR4 berperan sebagai reseptor primer dalam memediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin dan injuri jaringan. Sinyal HMGB1 melalui TLR4 pada sel darah manusia dan makrofag primer akan menginduksi pelepasan sitokin. HMGB1 dapat juga menghasilkan sinyal selular melalui TLR2. Park, dkk mengamati bahwa TLR2 dan TLR4 terlibat dalam aktivasi seluler oleh HMGB1. *Fluorescent resonance energy transfer* (FRET) dan analisis immuno-presipitasi pada makrofag menunjukkan bahwa HMGB1 berikatan dengan TLR2 dan TLR4 pada permukaan sel namun bukan pada RAGE (Yang H et al., 2010).

2.4.6. Peranan HMGB 1 pada Infeksi tuberkulosis

Infeksi MTB berhubungan erat dengan respons inflamasi lokal yang mungkin merupakan hal yang krusial dalam proses imunopatogenesis tuberkulosis (Russel D.G et al., 2007). Selain berperan sebagai proinflamatorik pada penyakit infeksi, HMGB1 juga memiliki peran pada infeksi Tuberkulosis. Berbagai mediator proinflamasi terlibat dan

berkontribusi terhadap pembentukan granuloma pada TB, salah satu yang terdeteksi dan disekresi jika terjadi infeksi MTB adalah HMGB 1 (Orme I.M et al., 2001). Sel imunitas bawaan (innate) aktif mensekresi HMGB1 sebagai respons terhadap infeksi mikobakterial yang menstimulasi mediator proinflamasi. HMGB1 yang disekresi oleh makrofag selama tuberkulosis dapat bertindak sebagai sinyal dari jaringan atau sel yang cedera dan mempertinggi respons imun. Sel Nekrotik juga melepaskan HMGB1 ditempat kerusakan jaringan yang menginduksi berbagai respons seluler, termasuk ekspresi mediator proinflamasi (Grover A. et al.,2008). Studi in vitro dan studi percobaan hewan menunjukkan bahwa MTB dan M.bovis BCG dapat secara efektif menginduksi sekresi HMGB1 yang menyebabkan hiperaktivasi sitokin dan kerusakan jaringan paru (Kim SY et al., 2017).

Penelitian Houben dkk memperlihatkan sitokin proinflamasi (TNF α , IL 1 dan IL 6) mempunyai peran memediasi proses inflamasi dan bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan oleh tuberkulosis pada hewan coba (Houben et al.,2006). Penelitian Grover A dkk memperlihatkan pelepasan HMGB 1 oleh makrofag paru merupakan mediator penting dari respons inflamasi dan membantu sekresi sitokin proinflamasi (TNF α dan IL 1 β) dan pelepasan NO selama tuberkulosis. Interaksi berbagai mediator proinflamasi ini berkontribusi pada pembentukan granuloma pada tuberkulosis (Grover A et al.,2008).

Studi yang dilakukan oleh Kim Su Young, dkk menunjukkan bahwa terdapat peningkatan sitokin pro-inflamatorik dan aktivasi dari jalur sinyal HMGB1/RAGE pada tuberkulosis paru aktif, yang mana berkorelasi dengan keparahan klinik/radiologi. Stimulasi HMGB1 oleh antigen MTB akan meningkatkan respons inflamasi. Penelitian tersebut juga mendapatkan adanya jalur sinyal HMGB1/RAGE pada tuberkulosis paru aktif. Gen HMGB1 dan RAGE keduanya mengalami upregulasi begitu pula ekspresi transmembran RAGE pada permukaan sel imun, juga mengalami peningkatan pada infeksi TB aktif. Walaupun hanya terjadi peningkatan sedikit pada kadar HMGB1 yang bersirkulasi hal ini tetap dapat terdeteksi, sedangkan reseptor RAGE larut dan hilang disirkulasi. Ekspresi RAGE meningkat begitu pula kadar sitokin plasma pada perluasan konsolidasi paru, hasil serupa di dapat untuk HMGB1. Pada analisis multivariat yang terkontrol untuk *cofounder* klinis dan kadar sitokin, HMGB1 diketahui menjadi prediktor independen untuk hasil yang buruk (Kim Sy et al., 2017).

Kadar HMGB1 serum/plasma dalam banyak studi, dilaporkan sebesar 1,12 - 3,9 ng/mL lebih besar dibandingkan dengan rerata atau median subjek kontrol yang sehat (Kim SY et al., 2017).

Penelitian yang dilakukan oleh Jin-Cheng Zeng et al., menunjukkan bahwa kadar plasma HMGB1 pasien tuberkulosis aktif lebih tinggi bermakna dibandingkan dengan kelompok sehat. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa adanya peningkatan kadar plasma dari IL-6 dan TNF- α pada pasien tuberkulosis aktif yang konsisten dengan studi pada

pasien TB sebelumnya. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa kadar HMGB1 dan TNF- α pada sputum secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok sehat (Zeng JC et al., 2015). Temuan tersebut menunjukkan bahwa HMGB1, IL-10 dan TNF- α mungkin terlibat dalam respons inflamatorik dinamik terhadap infeksi TB pada darah dan jalan napas atau parenkima paru. Utamanya pada jalan napas, pelepasan HMGB1, IL-10 dan TNF- α dapat menjadi penanda yang berguna untuk menilai jalur napas atau respons inflamasi parenkima paru terhadap infeksi TB (Zeng JC et al., 2015).

Sel innate termasuk makrofag, monosit, sel dendritik, sel mast, neutrofil, eosinofil, dan sel natural killer merupakan produsen utama dari HMGB1, IL-10, TNF- α dan IL-6 pada infeksi pulmonal. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Jin-Cheng Zeng et al., menunjukkan bahwa HMGB1 terdeteksi pada plasma dan sputum pasien yang memiliki hasil positif pada kultur MTB sputum dan mengalami peningkatan dibandingkan dengan kelompok sehat. Terlebih lagi, peningkatan kadar IL-6, IL-10, dan TNF- α juga terdeteksi pada plasma, darah dan sputum subjek dengan infeksi TB (Zeng JC et al., 2015).

Penelitian ini menunjukkan bahwa kadar HMGB1 secara positif berkorelasi dengan kadar IL-6 baik pada plasma dan sputum dari pasien tuberkulosis aktif, pada saat yang sama, baik HMGB1 dan IL-6 berhubungan dengan monosit namun tidak dengan respons dinamik neutrofil atau limfosit pada pasien tuberkulosis aktif. Hal ini menunjukkan

bahwa HMGB1 berperan pada keterlibatan IL-6 dalam respons inflamatorik dinamis monosit terhadap infeksi TB (Zeng JC et al., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Rogelio,dkk menunjukkan bahwa adanya sekresi aktif dan tinggi dari HMGB1 selama infeksi awal dari TB paru yang diikuti dengan produksi yang rendah dan konstan selama fase lanjut. Sekresi aktif dari HMGB1 terlihat pada banyak jenis sel seperti monosit, makrofag, sel dendritik, hepatosit, sel endothelial, sel glial dan neuron. Sekresi HMGB1 mengalami peningkatan ke puncak tertingginya setelah hari pertama infeksi diikuti dengan penurunan tajam pada hari ketiga dan meningkat lagi pada hari ketujuh namun 3 kali lipat lebih kecil dibandingkan dengan hari pertama dan konsentrasi rendah ini terjaga konstan hingga tahapan lanjut penyakit. *Immunostaining* HMGB1 paling jelas terlihat selama infeksi awal yang ditunjukkan oleh sejumlah makrofag yang teraktivasi sehingga elemen dari imunitas bawaan seperti epitelium bronchial dan makrofag merupakan sumber yang penting dari HMGB1 selama infeksi TB dini dan epitelium jalan napas dipertimbangkan sebagai sel yang aktif mensekresikan protein ini (Hernandez-Pando R et al., 2015).

Secara khusus, ketika HMGB1 dilepaskan dari sel nekrotik dan setelah berikatan dengan RAGE dan TLR4 maka akan menginduksi maturasi dari sel dendritik dan sekresi IL-12 dan IFN- γ . Interaksi HMGB1 dengan TLR4 dibutuhkan untuk aktivasi pelepasan sitokin dari makrofag. Stimulasi neutrofil dan monosit oleh HMGB1 akan menginduksi pelepasan

sitokin dan mempromosikan migrasi sel ke jaringan yang mengalami inflamasi seperti aktivasi endotelium (Hernandez-Pando R et al., 2015).

Selama fase awal infeksi MTB, kondisi lingkungan oksidatif pada paru akan membantu produksi dari HMGB1 yang teroksidasi dengan aktivitas immune-toleragenik. Hal ini terkonfirmasi dengan pemberian antibodi yang menghambat secara spesifik sejak hari pertama infeksi. Aktivitas hambatan pada HMGB1 selama minggu pertama infeksi menginduksi ekspresi yang lebih rendah dari TNF- α , IFN- γ dan IL-17, menunjukkan aktivitas pro-inflamatorik HMGB1 tertentu namun pada hari ke-14, ketika bentuk teroksidasi dari HMGB1 dihasilkan dan aktivitasnya dihambat, terdapat penurunan yang signifikan pada muatan basil di paru serta adanya ekspresi yang lebih tinggi dari sitokin pro-inflamatorik. Respons berkebalikan terlihat ketika rekombinan HMGB1 diberikan selama infeksi awal maka akan menginduksi peningkatan yang signifikan dari muatan basil seiring dengan ekspresi rendah dari sitokin proinflamatorik dan ekspresi yang tinggi mendadak dari IL10 pada sejumlah sel. Hal ini mengonfirmasi efisiensi HMGB1 dalam melakukan rekrutmen dan aktivasi dari jenis sel (Hernandez-Pando R et al., 2015).

Selama fase lanjut infeksi, pada hari ke-28 dan hari ke-60, area ekstensif dari pneumonia, epithelium bronchial pada zona ini menunjukkan adanya penurunan immunostaining HMGB1 dan didapatkan makrofag sebagai sel imunoreaktif yang paling banyak dan padat. Pemberian penghambat antibodi pada hari ke-60 infeksi menginduksi adanya

peningkatan yang signifikan dari beban basil paru seiring dengan ekspresi rendah dari sitokin pro-inflamatorik. Hal ini menunjukkan bahwa produksi dari HMGB1 pada fase lanjut infeksi memiliki aktivitas proinflamatorik dan berkontribusi dalam melakukan kontrol pada pertumbuhan basil. Menariknya, pemberian rekombinan HMGB1 dengan konsentrasi tinggi menginduksi muatan basil yang lebih tinggi dan signifikan, kerusakan jaringan yang lebih ekstensif, ekspresi yang lebih rendah dari sitokin proinflamatorik dengan ekspresi yang tinggi dari IL-10, seiring dengan sejumlah sel T regulatorik, menunjukkan bahwa tidak hanya jenis HMGB1, reduksi atau oksidasi, namun juga jumlah protein penting untuk meregulasi responss imun dan interaksinya dengan subtype sel T spesifik. Reseptor RAGE diekspresikan lebih banyak pada sel T regulatorik dibandingkan pada sel T konvensional sehingga HMGB1 menginduksi migrasi dan memperpanjang ketahanan hidup dari sel T regulatorik dengan meningkatkan pelepasan IL-10. Sebagai tambahan, HMGB1 dapat menekan secara langsung pelepasan IFN- γ dengan sel T efektor dan menghambat proliferasinya melalui TLR4 pada kondisi inflamatorik kronis seperti yang dihasilkan oleh infeksi MTB. Oleh karena itu, HMGB1 dilepaskan selama infeksi TB dan dapat memodifikasi respon imun, mempromosikan atau menekan inflamasi bergantung pada keadaan redoks dan konsentrasinya (Hernandez-Pando R et al., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Grace Lui et al., menunjukkan bukti bahwa adanya aktivasi jalur sinyal HMGB1/RAGE pada tuberkulosis aktif.

Peningkatan ekspresi RAGE dan HMGB1 berkorelasi dengan kadar sitokin plasma, dan perluasan konsolidasi paru. Pada percobaan hewan dengan TB aktif, peningkatan ekspresi dari HMGB1 sebagai sitokin pro-inflamtorik terlihat pada paru, berkorelasi dengan derajat kerusakan jaringan. Sebagai reseptor terhadap HMGB1, sinyal melalui RAGE akan mengaktifasi jalur NF- κ B (mungkin melalui ERK dan p38-mAPK) yang mana akan mempromosikan transkripsi dari gen pro-inflamatorik (contohnya IL8 / CXCL8 / IL6 / TNF- α) pada paru dan sel imun. Selain itu, data percobaan hewan terkini menunjukkan bahwa RAGE berperan penting dalam kontrol mikobakterial. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa mekanisme imun bawaan memiliki peran patogenik penting pada TB aktif (Lui G et al., 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Agnieszka et al., menunjukkan bahwa HMGB1 dapat terdeteksi pada aliran darah berbagai penyakit paru dengan konsentrasi tertinggi pada pasien dengan infeksi MTB aktif dan laten. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa konsentrasi HMGB1 mengalami peningkatan pada pasien dengan tuberkulosis aktif 47,5 ng/mL dibandingkan pada pasien dengan penyakit paru lainnya 36,87 ng/mL (Magrys A et al., 2013).

Pada grup pasien dengan penyakit paru non-TB, hasil menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang secara statistik signifikan pada konsentrasi TNF- α dan HMGB1 antara pasien dengan infeksi TB laten dan pasien tanpa infeksi TB laten ($p < 0,05$). Penelitian tersebut juga menunjukkan adanya korelasi positif yang bermakna secara statistik antara TNF- α dan HMGB1

pada pasien dengan infeksi TB Laten, $r = 0.7$, $p = 0.04$. Korelasi positif yang bermakna juga terlihat jika membandingkan HMGB1 serum dan kadar TNF- α pada pasien penyakit paru non-TB, $r = 0.71$, $p = 0.0006$ (Magrys A et al., 2013).

Penelitian tersebut dapat dilihat bahwa HMGB1 serum secara substansial mengalami peningkatan pada TB aktif dan laten bahkan setelah dilakukan penyesuaian terhadap usia dan jenis kondisi penyerta yang mengindikasikan peran mediator ini pada tuberkulosis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar HMGB1 serum secara bermakna meningkat pada pasien dengan TB dibandingkan pada pasien dengan penyakit paru lainnya dan subjek sehat. Telah diketahui bahwa subjek sehat memiliki ekspresi HMGB1 yang sangat rendah bahkan tidak ada namun akan mengalami peningkatan secara dramatis selama kondisi patologis tertentu (Magrys A et al., 2013).

Beberapa studi sebelumnya menunjukkan adanya peningkatan kadar HMGB1 pada kondisi inflamasi seperti kanker, COPD, atau asthma. Penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar HMGB1 dan peningkatan jumlah sel yang menghasilkan HMGB1 telah teridentifikasi pada lokasi spesifik inflamasi dan pada plasma (Hernandez-Pando R et al., 2015). Tidak ada peningkatan yang signifikan pada konsentrasi HMGB1 pada pasien dengan penyakit paru non-TB. Oleh karena itu, kami menyimpulkan bahwa peningkatan kadar HMGB1 pada kelompok

tuberkulosis aktif sebagaimana dengan kasus infeksi TB laten merupakan hasil dari infeksi MTB (Magrys A et al., 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Qiu-yue Liu et al., menunjukkan bahwa sebanyak 124 pasien dengan TB paru menunjukkan adanya upregulasi sel imun pada serum. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kadar konsentrasi serum dari limfosit, plasmasit, neutrofil, dan monosit secara signifikan meningkat pada pasien dengan infeksi MTB dibandingkan dengan subjek kontrol sehat ($p < 0,01$). Sebagai tambahan, hasil studi juga mengindikasikan bahwa makrofag, sel mast dan sel endothelial juga mengalami peningkatan pada jaringan paru pasien dengan infeksi MTB dibandingkan dengan subjek kontrol sehat. (Liu QY et al., 2016)

Selanjutnya, studi tersebut juga menunjukkan bahwa kadar ekspresi HMGB1 yang tinggi secara signifikan mengalami upregulasi pada jaringan paru pasien dengan infeksi MTB dibandingkan dengan subjek sehat ($p < 0,01$) yang mana hal ini merupakan kontribusi inflamasi pada pasien. tersebut juga menunjukkan bahwa adanya asosiasi antara faktor inflamasi dan MTB, kadar serum faktor inflamasi yang diukur pada pasien dengan TB paru di ICU dengan subjek sehat sebagai kontrol. Kadar konsentrasi serum dari IL-1, IL-6, IL-10 dan IL-12 secara signifikan mengalami upregulasi pada pasien dengan TB paru di ICU dibandingkan dengan subjek sehat ($p < 0,01$).

Akan tetapi, kadar serum dari IL-2 dan IL-15 secara bermakna lebih rendah pada pasien dengan TB paru dibandingkan dengan subjek sehat ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa faktor inflamasi mengalami peningkatan pada

serum sementara faktor anti-inflamasi mengalami penurunan pada pasien dengan infeksi TB paru di ICU (Lui G et al., 2016).

Faktor inflamasi yang dihasilkan dari sel inflamatorik dilaporkan berhubungan dengan patogenitas dan keparahan dari TB paru dan mungkin menginduksi penyakit yang berhubungan dengan tuberkulosis lainnya. Kadar ekspresi dari IL-1, IL-6, IL-10 dan IL-12 diinvestigasi pada pasien dengan TB paru. Studi tersebut menunjukkan bahwa kadar serum dari IL-6 berperan sebagai biomarker yang potensial dari kemajuan penyakit pada tuberkulosis paru setelah terapi obat anti tuberkulosis. Dari studi tersebut juga diketahui adanya peningkatan kadar serum IL-6 pada pasien dibandingkan dengan subjek control (Liu QY et al., 2018).

High Mobility Group Box 1 yang secara pasif dihasilkan oleh sel apoptotik dan secara aktif dihasilkan oleh sel imun yang teraktivasi memiliki perbedaan yang signifikan pada modifikasi molekular dan menunjukkan fungsi yang berbeda. Pelepasan HMGB1 secara pasif dapat menginduksi toleransi imun sementara HMGB1 yang dilepaskan secara aktif memiliki efek proinflamatorik (Ding J et al., 2017).

Bacillus Calmette–Guerin (BCG) dapat secara efektif menginduksi produksi HMGB1 pada sel *phorbol myristate acetate* (PMA)-treated THP-1. Penelitian terkini menunjukkan bahwa HMGB1 dapat menjadi adjuvant untuk subunit vaksin tuberkulosis untuk meningkatkan efikasi protektif dan respons imun seluler dan efek ini tidak bergantung pada interaksi antara HMGB1 dan reseptor. Hal ini menunjukkan bahwa HMGB1 dapat bertindak

sebagai biomarker untuk diagnosis aktif tuberkulosis dan prognosis dan meningkatkan efikasi subunit vaksin sebagai adjuvant (Ding J et al., 2017).

2.5. Penanda biologis IL-6

2.5.1. Definisi

Interleukin-6 (IL-6) merupakan sitokin proinflamatorik dan sitokin immunoregulatorik yang berperan dalam pertahanan host dalam melawan infeksi dan cedera jaringan. Interleukin IL-6 disebut juga sebagai faktor stimulator sel-B yang meningkatkan sintesis immunoglobulin oleh sel B yang teraktivasi (Kishimoto T et al., 2015).

2.5.2. Biosintesis dan Pengeluaran IL 6

Interleukin 6 manusia merupakan glikoprotein yang memiliki 212 asam amino. Pada kondisi inflamasi infeksi, IL-6 dihasilkan oleh monosit dan makrofag setelah stimulasi terhadap *Toll-like receptors* (TLRs) dengan pola molekular terkait patogen yang berbeda sementara pada kondisi inflamasi non-infeksi seperti luka bakar atau cedera trauma, *damage associated molecular patterns* (DAMPs) dari sel yang rusak atau mati menstimulasi TLRs untuk memproduksi IL-6. Sebagai tambahan, IL-6 dapat diproduksi oleh sel dendritik, sel T dan sel B, neutrofil, sel mast, fibroblast, sel sinovial, keratinosit, sel endotelial, sel stromal, sel mesangial, sel glia, neuron, kondrosit, osteoblast, sel otot polos, adiposit, dan sel lainnya termasuk sel tumor (Kishimoto T et al., 2015).

Sintesis IL-6 secara ketat diregulasi oleh mekanisme transkripsional dan post-transkripsional. Faktor transkripsional meliputi *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B), *nuclear factor IL-6* (NF-IL6), *activation protein 1*, and *interferon regulatory factor 1* mengaktivasi gen IL-6. Sementara itu, glukokortikoid, estrogen, *aryl hydrocarbon* menekan ekspresi gen IL-6 (Tanaka T et al., 2014).

2.5.3. Aktivitas Biologis IL 6

Interleukin 6 merupakan mediator inflamasi yang penting. Diproduksi oleh lesi infeksi atau lesi yang mengalami kerusakan dan memberikan sinyal ke seluruh tubuh. Ketika IL-6 memberikan stimulasi terhadap hepatosit, IL-6 secara kuat akan menginduksi protein fase akut spectrum luas seperti *C-reactive protein (CRP)*, *serum amyloid A (SAA)*, *fibrinogen*, *hepcidin*, *haptoglobin*, dan *antichymotrypsin* dimana protein ini akan menurunkan albumin, *cytochrome p450*, *fibronectin*, dan transferin. Protein CRP merupakan biomarker inflamasi yang cukup dikenal dan digunakan untuk mengevaluasi keparahan inflamasi dimana peningkatan IL-6 ditemukan sebelum adanya peningkatan serum CRP yang mengikuti infeksi akut dan operasi abdominal. Kadar hepcidin tinggi akan menghambat ferroportin pada makrofag, hepatosit, dan sel epitelial usus yang menyebabkan hipoferremia dan anemia yang berkaitan dengan inflamasi (Gantz T et al., 2011). Interleukin IL-6 berperan penting dalam inflamasi lokal dengan stimulasi produksi IL-8 oleh sel endothelial, protein kemoatraktan monosit, dan ekspresi molekul adesi yang menyebabkan

rekrutmen leukosit ke lesi inflamasi. Pada respons imun *acquired*, IL-6 menginduksi diferensiasi sel B menjadi sel *immunoglobulin-producing* dan mempromosikan pertumbuhan plasmablast dan sel myeloma, selain itu IL-6 juga berperan dalam diferensiasi *naïve CD4 positive T cells* menjadi sel T efektor spesifik. Bersama dengan TGF- β , IL-6 mempromosikan diferensiasi menjadi sel yang memproduksi IL-17 (Th-17) dimana IL-6 menghambat perkembangan *TGF- β -induced regulatory T cell (T-reg)*. Ketidakseimbangan antara Th17/Treg menyebabkan eradikasi dari toleransi imunologis dan kepentingan patologikal untuk perkembangan autoimun dan penyakit inflamasi kronik. Selanjutnya, IL-6 mempromosikan perkembangan dari *T follicular helper cell* dan produksi IL-21 yang berperan dalam meningkatkan sintesis immunoglobulin (Awasthi A. Et al., 2009).

2.6. Penanda Biologis TLR4

2.6.1. Definisi

Toll-like Receptor (TLRs) merupakan pola reseptor pengenal yang merupakan bagian dari imunitas bawaan yang dapat mengenali dan menyerang mikroorganisme yang melakukan invasi. TLRs dapat berikatan dengan *damage-associated molecular patterns(DAMPs)* yang diproduksi oleh sel yang mengalami apoptosis atau jaringan yang rusak. TLRs dapat membangun koneksi antara imunitas bawaan dan autoimunitas. Terdapat

5 adaptor terhadap TLRs yaitu *Myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *TIR-related adaptor protein inducing interferon* (TRIF), *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP)/ *MyD88 adaptor like* (MAL), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) dan *Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein* (SARM). Reseptor TLRs merekrut adaptor spesifik untuk menginisiasi jalur sinyal sehingga terjadi produksi sitokin dan kemokin inflamasi (Liu Y et al., 2014).

2.6.2. Peranan TLR4 sebagai reseptor transmembran

Toll Like Receptors dapat dibagi menjadi kelompok yaitu TLR transmembran dan TLR intraselular (Portou MJ et al., 2015). Reseptor TLRs secara efisien dapat mengenali berbagai komponen patogen yang berperan dalam metabolisme patogen tersebut, mencegah mutasi yang menyebabkan patogen menjadi tidak terdeteksi. Reseptor TLRs 1,2, dan 6 mampu mengenali dinding sel bakteri gram positif seperti lipoprotein, peptidoglikan, asam *lipotechoic*. Reseptor TLR4 diaktivasi oleh komponen dinding sel bakteri gram negatif yaitu Lipopolisakarida (LPS) dan *flagelin bacterial*. Reseptor TLRs intraselular 3, 7, dan 8 mampu mengenali RNA virus ds dan ss, dan TLR9 mengenali *non-methylated CpG dinucleotides* yang terdapat pada DNA bakteri (Mukherjee S et al., 2016).

Toll Like Receptor 4 merupakan bagian dari sub-kelompok TLR transmembran. Reseptor TLRs transmembran atau TLRs yang berada pada sel membran menunjukkan domain ekstraselular yang kaya akan *leucine* yang dapat mengenali PAMPs yang berbeda dan domain *toll-*

interleukin 1 (IL-1) receptor (TIR) yang dapat mengaktivasi *transcription factor nuclear factor-B (NF-B)* dalam menginduksi sitokin pro-inflamatorik dan kemokin serta melakukan up-regulasi molekul co-stimulator pada sel antigen-presenting atau APC seperti makrofag, sel dendritik yang pada akhirnya dapat mensensitisasi aktivasi sel-T (Portou MJ et al., 2015).

2.6.3. Peran TLR4 terhadap patogen

Peran TLR-4 mampu mensensitisasi PAMPs dari berbagai organisme mikro dan makro. Penjelasan yang paling mungkin dari aktivasi TLR pada permukaan sel adalah adanya presentasi dan pengikatan Lipopolisakarida (LPS) terhadap TLR4. Kompleks LPS-LPB akan bersatu dengan *glycosyl phosphatidyl inositol linked CD14* yang kemudian akan berikatan dengan kompleks TLR4-MD2. Reseptor TLR4 akan membentuk kompleks dengan MD2 pada permukaan sel yang berperan dalam komponen pengikatan LPS yang utama. Kompleks TLR4-MD2-LPS menyebabkan inisiasi transduksi sinyal dengan cara rekrutmen molekul adaptor intrasel seperti MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP atau MAL dan SARM (Portou MJ et al., 2015).

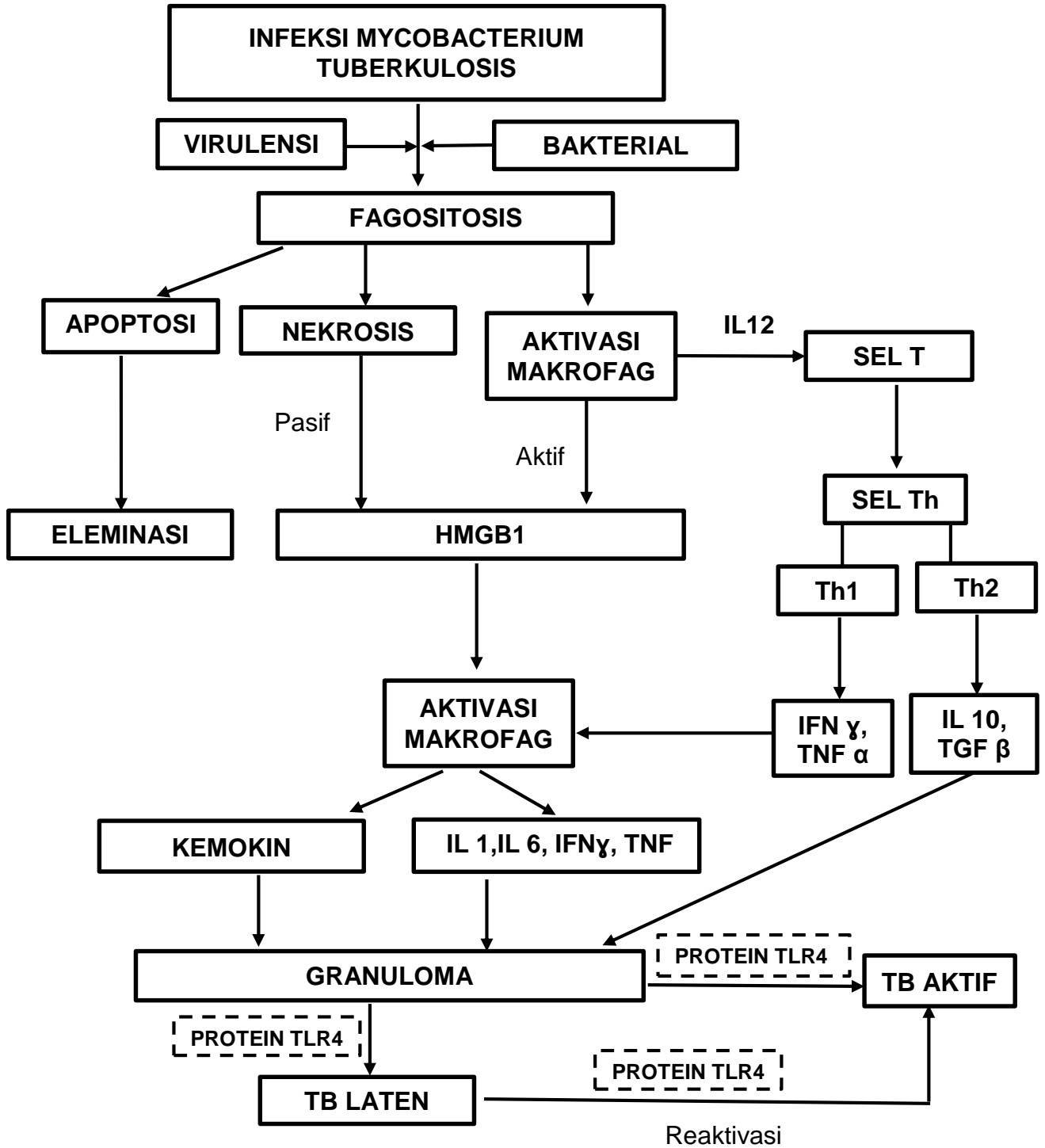
Toll Like Receptor 4 diekspresikan pada berbagai sel imun termasuk neutrofil, monosit dan DCs. Diantara sel-sel ini, neutrofil pertama kali akan bermigrasi ke lokasi infeksi, melakukan sensitisasi patogen dan menghasilkan respons imun. Akan tetapi, aktivasi respons adaptif yang terkoordinasi dimediasi melalui ikatan pada ligan spesifik pada monosit atau DCs yang juga dimediasi oleh TLR2 dan TLR4. Setelah mengenali PAMPs

oleh TLR2 dan 4 pada jenis sel tertentu, domain TIR dan adaptor terkait (MyD88, TRIF, SARM) teraktivasi yang selanjutnya akan mengarahkan pada aktivasi dari faktor transkripsi termasuk NF-kB dan atau IRF3. Aktivasi dari TLRs ini mendorong 2 jalur pesinyal yang berbeda yaitu MyD88 depended dan MyD88 independen atau jalur dependen TRIF. MyD88, TRIF, TRAM, MAL dan SARM merupakan 5 adaptor yang penting dalam aktivasi TLR. Adaptor MyD88 merupakan adaptor pertama yang digunakan oleh semua TLRs kecuali TLR3. Pada aktivasi TLR, MyD88 merekrut *interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK-4)* yang memfosforilasi IRAK1 yang mana akan mengaktivasi *TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6)*. Kedua protein tersebut meninggalkan kompleks reseptor dan berinteraksi dengan TGF activated kinase 1 (TAK1) dan 2 protein pengikat TAK1 yaitu TAB1 dan TAB2. Protein TAK1 terfosforilasi dan selanjutnya akan mengaktivasi kompleks I-kB kinase (IKK) sehingga akan terjadi translokasi NF-kB ke nukleus dan menginduksi ekspresi sitokin IL-6, IL-12 dan TNF- α (Oeckinghaus A et al., 2011; Kagan JC et al.,2006). Adaptor MAL dan TIRAP merupakan adaptor kedua yang mentransmisikan sinyal dari TLR4 an TLR2 dengan cara memfasilitasi perpindahan MyD88 ke TLR4 untuk mengaktivasi faktor transkripsi seperti NF-kB, JNK, dan *Extracellular regulated kinases 1(ERK-1)*. Adaptor TRIF merupakan adaptor ketiga pada TLR4 yang mengaktivasi *Interferon regulatory factor 3 (IRF3)* dengan cara mengaktivasi kinase TBK1 dan I-kB kinase. Adaptor TRAM merupakan adaptor ke 4 yang terlibat dalam transmisi sinyal TLR4

dan menyebabkan produksi dari MyD88 *independent interferon- β* . Adaptor kelima adalah SARM yang terutama akan berinteraksi dengan TRIF dan secara negatif meregulasi NF-kB dan mengaktivasi IRF3 (Babu S et al., 2011; Carpenter S et al., 2007) .

BAB III

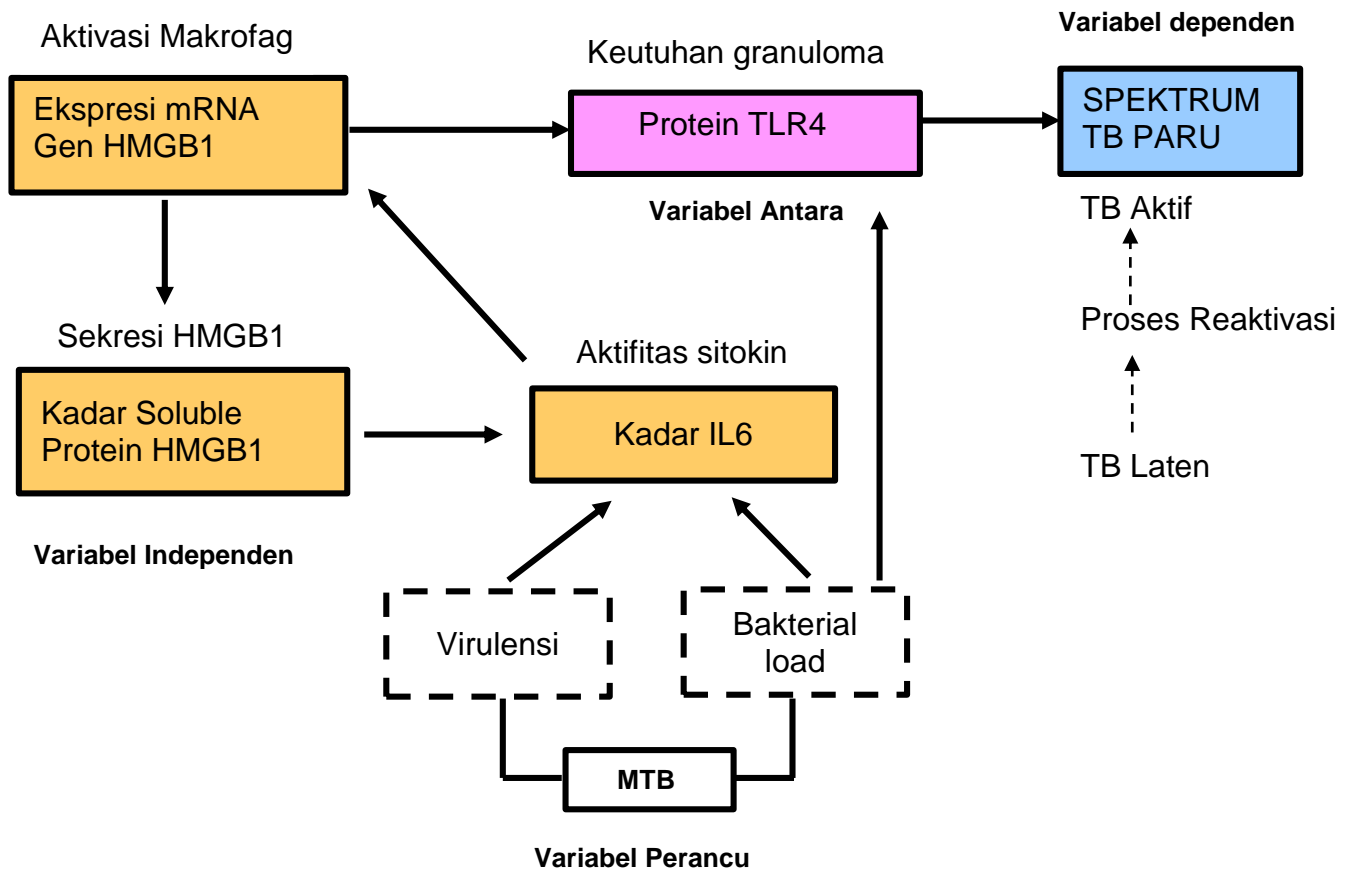
KERANGKA TEORI



BAB IV

KERANGKA KONSEP

4.1. Kerangka Konsep



Keterangan :

- = variabel Independen
- = variabel antara
- = variabel dependen

4.2. Hipotesis

- 1.5.1. Ekspresi mRNA gen HMGB1 lebih tinggi pada pasien TB aktif dibanding TB laten.
- 1.5.2. Kadar *soluble* protein HMGB1, kadar TLR4 dan kadar IL6 lebih tinggi pada pasien TB aktif dibanding TB laten.
- 1.5.3. Semakin tinggi ekspresi mRNA HMGB1 akan semakin tinggi pula kadar soluble protein HMGB1 pada infeksi Tuberkulosis.
- 1.5.4. Semakin tinggi kadar soluble protein HMGB1 semakin tinggi pula kadar TLR4 pada infeksi Tuberkulosis.
- 1.5.5. Semakin tinggi kadar HMGB1 semakin tinggi pula kadar IL6 pada infeksi Tuberkulosis.

BAB V

METODE PENELITIAN

5.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan rancangan penelitian potong lintang (*cross sectional*).

5.2. Populasi

5.2.1. Populasi target

Semua pasien yang datang ke RS Islam Jakarta Pondok Kopi dan RS Islam Sukapura.

5.2.2. Populasi terjangkau

Semua pasien yang datang ke poliklinik paru dan yang dirawat di RS Islam Jakarta Pondok Kopi dan RS Islam Jakarta Sukapura.

5.3. Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di RS Islam Jakarta Pondok Kopi dan RS Islam Jakarta Sukapura untuk pengambilan sampel penelitian, pemeriksaan pasien dan diagnosis pasien, pemeriksaan penunjang dan pengambilan sampel darah. Untuk pemeriksaan IGRA dilakukan di Laboratorium Prodia Jakarta. Untuk pemeriksaan ekspresi mRNA gen HMBG1 dan kadar soluble protein HMBG1 dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan imunologi Fakultas kedokteran Universitas

Hasanuddin (FK UNHAS), Makassar. Penelitian dilakukan pada 1 Nopember 2017 hingga 1 Februari 2018 di Jakarta.

5.4. Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah semua penderita TB yang datang ke poliklinik paru dan pasien yang dirawat di RS Islam Jakarta Pondok Kopi maupun RS Islam Jakarta Sukapura, serta keluarga atau petugas kesehatan yang kontak langsung dengan penderita TB paru di rumah sakit yang sama yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

5.4.1. Teknik sampling

Teknik sampling dalam penelitian ini adalah *quota sampling*.

5.4.2. Besar sampel

Penentuan besar sampel yang akan dihitung menggunakan rumus analitis komparatif yaitu (Dahlan M. S. 2016) :

$$n_1 = n_2 = \left\{ \frac{(Z\alpha + Z\beta)SD}{x_1 - x_2} \right\}^2$$

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 = 26,1 (Kim SY 2016)

$x_1 - x_2 = 15$ ditetapkan oleh peneliti

maka

$$n_1 = n_2 = \left\{ \frac{(1,96 + 0,84) 26,1}{15} \right\}^2$$

$$n_1 = n_2 = 23,7 = 24$$

Berdasarkan kepustakaan, SD pemeriksaan kadar HMGB 1 pada penderita tuberkulosis adalah 26.1 ng/dL dan perbedaan rerata antara kelompok TB aktif dan TB laten ditetapkan oleh peneliti 15 ng/dL , sehingga dari perhitungan jumlah sampel, dibutuhkan 24 orang sampel perkelompok, ditambah 10% bila ada yang *drop out* jadi 26 orang perkelompok (Madiyono dkk, 2014; Dahlan MS, 2016).

5.4.3. Kriteria sampel

5.4.3.1 Kriteria inklusi TB aktif

- Pasien TB paru baru yang didiagnosis sebagai penderita TB paru berdasarkan hasil anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan radiologi dan pemeriksaan mikrobiologi (sputum BTA atau TCM).
- Berusia 18 tahun keatas (≥ 18 thn)
- Bersedia dengan sukarela mengikuti seluruh program penelitian dengan menandatangani *informed consent* atau persetujuan setelah penjelasan (PSP)

5.4.3.2. Kriteria eksklusi TB aktif

- Penderita TB paru yang menderita penyakit paru lainnya (seperti asma, PPOK, dan tumor paru)

- Mempunyai riwayat DM, HIV atau Penyakit autoimun
- Dalam keadaan Hamil

5.4.3.3. Kriteria Inklusi TB laten

- a. Usia 18 tahun keatas (≥ 18 thn)
- b. Keluarga/petugas kesehatan yang kontak dengan penderita TB minimal selama 6 bulan
- c. Hasil anamnesis dan pemeriksaan fisik tidak ditemukan gejala dan tanda penyakit TB
- d. Hasil Pemeriksaan IGRA (+) dan Hasil Pemeriksaan Foto Thoraks normal
- e. Bersedia dengan sukarela mengikuti seluruh program penelitian dengan menandatangani *informed consent* atau persetujuan setelah penjelasan (PSP)

5.4.3.4. Kriteria eksklusi TB Laten

- a. Pernah menderita penyakit TB sebelumnya
- b. Mempunyai riwayat DM, HIV atau Penyakit autoimun
- c. Dalam keadaan hamil

5.5. Cara Kerja

5.5.1. Pemilihan subjek penelitian

Penelitian dilakukan pada semua pasien baru dewasa yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, telah dilakukan pemeriksaan fisik dan penunjang di RS Islam Pondok Kopi dan RS Islam Sukapura.

5.5.2. Pengumpulan data penelitian

Pemeriksaan klinis, pemeriksaan penunjang dan diagnosis subjek penelitian dilakukan oleh dokter spesialis Paru secara terpisah, kemudian hasilnya disusun dalam catatan medis penderita. Pengambilan sampel darah vena subjek yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebanyak 3 mL untuk pemeriksaan mRNA HMBG1, kadar *soluble protein* HMBG1, kadar TLR 4 dan kadar IL 6 . Untuk pemeriksaan mRNA HMGB1 diambil 1 tetes darah di masukkan ke tabung yang berisi 500 uL larutan L6 kemudian disimpan dalam suhu ruang hingga waktu pemeriksaan. Untuk pemeriksaan kadar HMGB1, TLR4 dan IL6, sampel darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan sel darah dan serum. Serum darah diambil dan dimasukkan kedalam tabung ependorf dan disimpan dalam freezer/kulkas pendingin pada suhu - 20°C hingga seluruh sampel terpenuhi. 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 HMBG1, kadar protein HMBG1, kadar TLR 4 dan kadar IL 6 serum oleh peneliti. Ekstraksi RNA menggunakan metode Boom. Konsentrasi mRNA diukur dengan *fluorometer* Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, *United States*) sesuai instruksi pabrik, dan sampel mRNA kemudian disimpan pada -80°C sampai analisis berikutnya.

5.5.3. 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 HMGB1 menggunakan RT-PCR, dan 3) Pemeriksaan kadar *soluble protein* HMGB1, TLR 4 dan IL 6 dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

1). Alat dan bahan/reagen untuk ekstraksi asam nukleat mRNA gen HMGB1 (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 µL
- l) Perangkap Cair
- m) shaker (Rotary)
- n) Pipet steril plastik 10 mL dan 50 mL

o) Kotak untuk sampel penyimpanan pada suhu -20°C

p) Lemari es -20°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 2,6 g
- b. **Silika (SiO₂):** Untuk membuat 60 mL silica, gunakan 60 g SiO₂ (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 μl di setiap tabung) dan sterilisasi pada 121°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 H₂O 300ml
- e. **Tris 1M:** Larutkan 121.1g Tris base dalam 800 mL H₂O, 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 H₂O, 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 HMGB1, 1 kit primer gen HMGB1 (Oligo,Macrogen).**

2). Metoda pemeriksaan ekspresi mRNA gen HMGB1

a. Ekstraksi asam nukleat dengan metoda 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; Hatta & Smits, 2007).

Volume sampel sekitar 100 µg/uL darah dimasukkan ke dalam 900 µL larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocianate (GuSCN) dari 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 μ L yang terdiri dari 50mL H₂O dan 500 μ L dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") dari Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79. Sebanyak 20 μ L suspensi diatom ini dapat mengikat 10 μ g RNA darah, kemudian dilakukan *vortex* dan disentrifugasi di dalam tabung *eppendorf* 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 μ L 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°C sebelum dilakukan analisis PCR. (Mochammad Hatta. Henk L Smits. 2007 dan Rene B.et al.,1990)

b. Ekspresi mRNA gen HMGB 1 dengan *metode real time Polymerase Chain Reaction (RT PCR)*.

1. Pembuatan PCR mix

Realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen HMGB1. Proses pemeriksaan gen spesifik oligonukleotida primer untuk hGAPDH sebagai *primer forward*: 5'-TGCCAAATATGATGACATCAAGAA-3' dan *primer reverse* : 5'-GGAGTTGGGTGTCGCTGTTG-3' sebagai '*housekeeping gene*' (*internal control*). Cara untuk mendeteksi gen mRNA HGMB1 dengan menggunakan *primer spesifik forward* 5'-GCGGACAAGGCCCGTTA-3' dan *Reverse* 5'-AGAGGAAGAAGGCCGAAGGAA-3' sebagai target, sesuai prosedur Chuanxin Wu (Wu C, et al., 2012).

Proses kuantifikasi mRNA gen HMGB1 diawali dengan pembuatan PCR mix mengandung 1 × iQ SYBR Hijau SUPERMIX (Bio-Rad Laboratories) dan 250 nm masing-masing *forward (sense)* and *reverse (antisense)* primer dan sampel 1 µL dalam volume akhir 10 µL. Pengenceran serial sebanyak lima kali dibuat untuk menghasilkan kuantitas dalam enam standar mulai dari konsentrasi 50; 25; 12,25; 6,125 dan 3,675 ng, dan satu kontrol negatif (CTN) yang diisi dengan air. Pengenceran yang sama digunakan untuk mengamplifikasi gen standar dan gen target.

2. Running *Real Time PCR*

a. Buat masing-masing *master mix* untuk setiap parameter dan/atau sampel yang telah disiapkan

b. Masukkan 9 μL reaksi PCR ke dalam masing-masing tabung PCR strip, sesuai settingan *layout*. Setting *layout* dalam triplikat sampel sebagai berikut:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	Std1	Unk1	Unk1	Unk1	Unk2	Unk2	Unk2	Unk3	Unk3	Unk3
B	Std2	Std2	Std2	Unk4	Unk4	Unk4	Unk5	Unk5	Unk5	Unk6	Unk6	Unk6
C	Std3	Std3	Std3	Unk7	Unk7	Unk7	Unk8	Unk8	Unk8	Unk9	Unk9	Unk9
D	Std4	Std4	Std4	Unk10	Unk10	Unk10	Unk11	Unk11	Unk11	Unk12	Unk12	Unk12
E	Std5	Std5	Std5	Unk13	Unk13	Unk13						
F	Std6	Std6	Std6									
G	NTC	NTC	NTC									
H												

- Inkubasi di refrigerator 18 – 24 jam
- Masukkan masing-masing sampel sebanyak 1 μL ke dalam masing-masing tabung PCR strip.
- Tutup tabung PCR strip, kemudian *flick* tabung perlahan untuk memastikan semua larutan sudah turun ke dasar tabung atau *spin down* menggunakan mini sentrifus
- Setelah siap, set mesin *CFX connect BioRad* atau *mini opticon* sesuai dengan protokol reaksi.

Protokol reaksi RT- PCR ditetapkan sebagai berikut: 1 siklus denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 40 siklus pada 95°C selama 30 detik dan *annealing* 55°C selama 30 detik. Kedua gen referensi diamplifikasi secara bersamaan dalam *well* yang terpisah. PCR diprogram

dalam *triplicate* sampel. Kuantifikasi dilakukan oleh metode siklus ambang komparatif. Reaksi disentrifus dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin *Realtime PCR* gambar 11 (*CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 mL, USA*) . Konsentrasi mRNA dilaporkan dalam satuan jumlah kopi/ μ L yang diperoleh dari rata-rata penjumlahan ke tiga konsentrasi (*triplikat*) mRNA per sampel dan dilaporkan secara otomatis oleh alat.

Protokol RT PCR mRNA gen HMGB1, dilakukan denaturasi DNA pada 95°C selama 3 menit, siklus diulang 40 kali dengan 95°C (30 detik) dan *annealing* 55°C selama 30 detik .

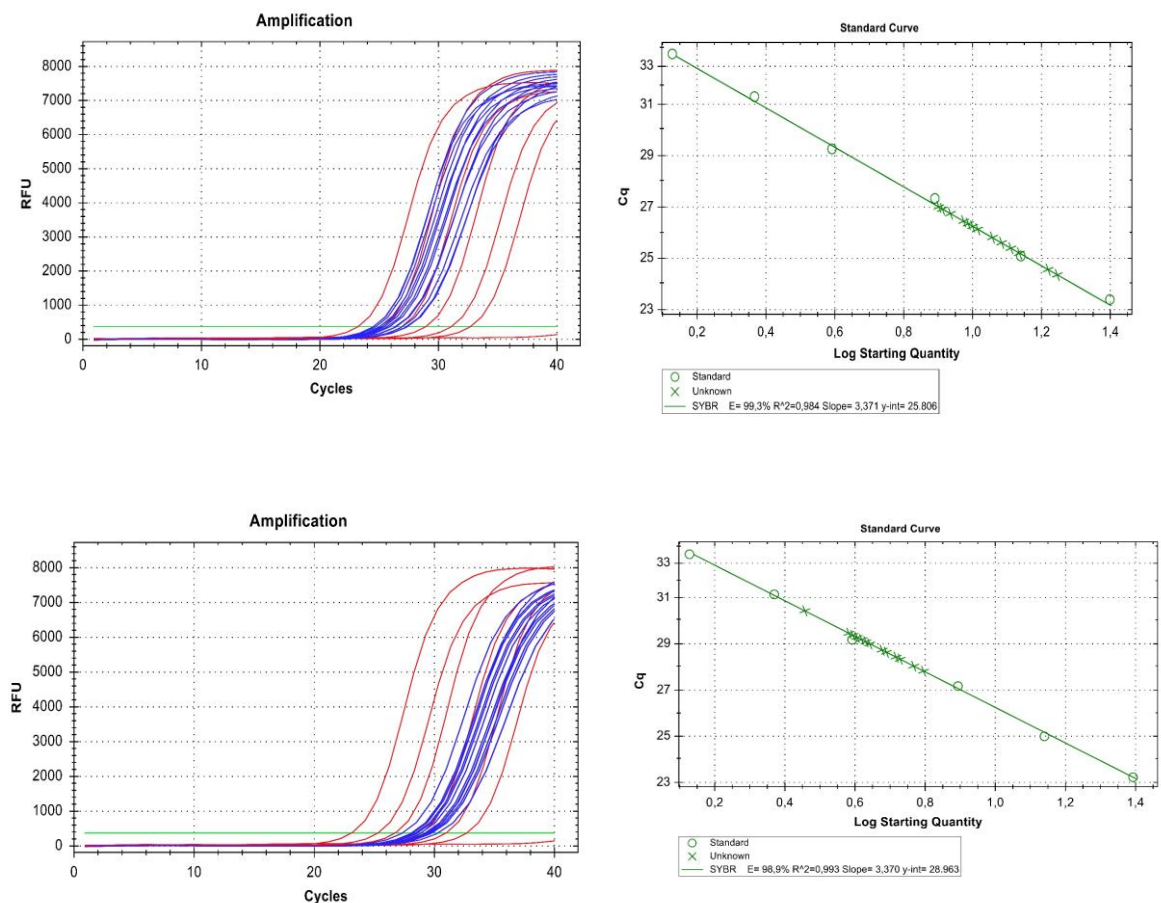


Gambar 11. Alat *Real Time PCR*

3. Perhitungan Kurva Standar dengan Ct (*Cycle threshold*).

Pengukuran kuantifikasi ekspresi gen mRNA HMGB 1 secara absolut

dengan membuat kurva standar dengan 6 standar dilusi dan satu standar negatif. Sebagai 'housekeeping' adalah hGAPDH, yang digunakan sebagai kontrol endogen. Kurva standar 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 standar. Konsentrasi mRNA dilaporkan dalam satuan kopi/uL yang diperoleh dari rata-rata penjumlahan ke tiga konsentrasi (triplikat) mRNA persampel dan dilaporkan otomatis oleh alat (Gambar 12).



Gambar 12. Kurva standar dan siklus amplifikasi mRNA gen HMGB1 pada TB aktif (atas) dan TB Laten (bawah)

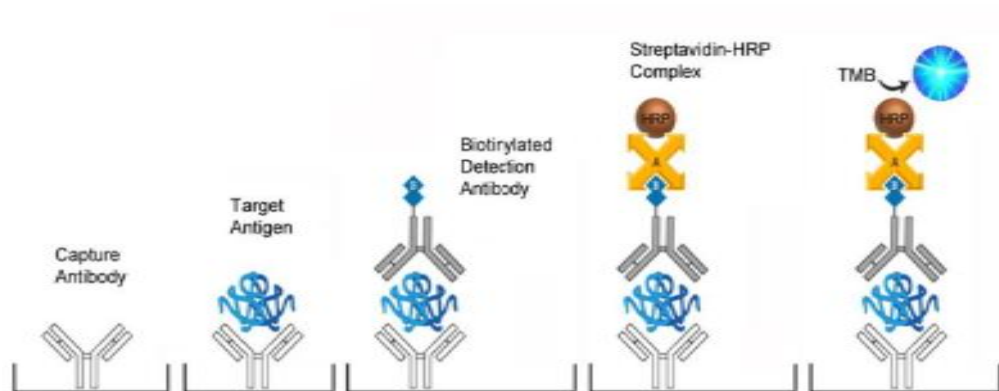
4. Pemeriksaan kadar Protein serum HMGB1, TLR4 dan IL6 dengan metode *Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

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 HMGB1, TLR4 dan IL6 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 *Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP)* kemudian ditambahkan untuk mengikat biotin. Konjugat Streptavidin-HRP yang tidak terikat dicuci. Substrat TMB ditambahkan kemudian bereaksi dengan enzim HRP untuk pengembangan warna. Larutan *stop solution* asam sulfur ditambahkan untuk menghentikan reaksi pengembangan warna dan densitas optik (OD) *well* kemudian diukur pada panjang gelombang

450 ± 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 13. Prinsip ELISA Sandwich

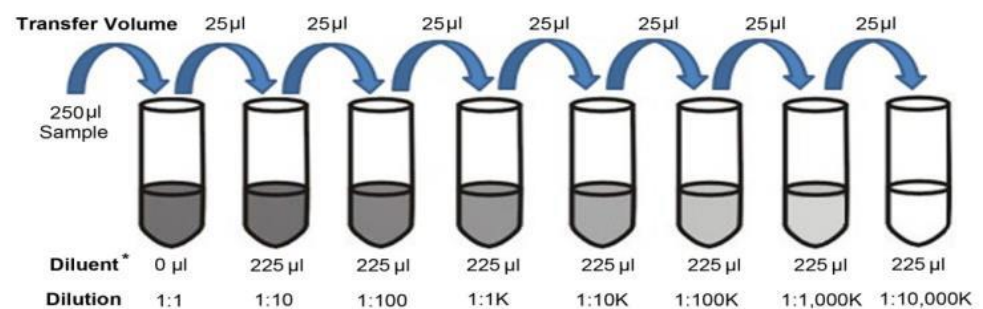
- b. Alat dan Bahan untuk pemeriksaan kadar protein HMGB1, TLR 4 dan IL 6 dengan ELISA

Pemeriksaan kadar protein serum HMGB1, TLR4 dan IL6 menggunakan tabung separator gel, cup sampel, sentrifus, Kit Elisa, serum, microplate reader dengan filter panjang gelombang 450 nm, pipet presisi, tip pipet, tabung *ependorf*, inkubator 37°C, air deionisasi atau air suling, kertas absorban, ELISA reader (*Reader 270, Biomeriaux*), kit reagent HMGB1(LSBio no Lot: LS-F4038), TLR 4 (LSBio no Lot: LS-F22086) dan IL 6 (LSBio no Lot: LS-F9754).

- c. Pemeriksaan Sampel dengan ELISA

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.



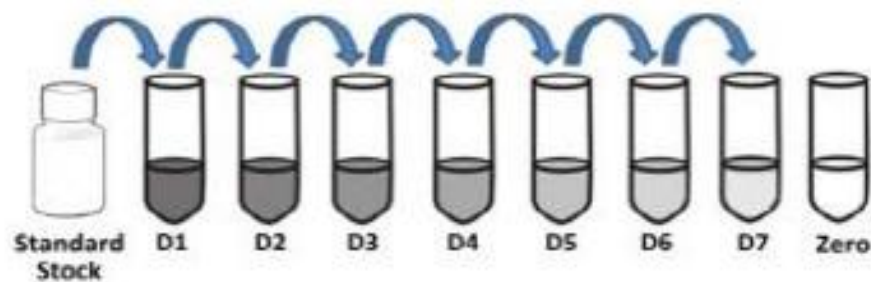
Gambar 14. Pengenceran sampel pemeriksaan HMGB1, TLR4 dan IL6

2. Preparasi Standar HMGB1, TLR4 dan IL 6

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 HMGB1 (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.



Gambar 15. Pengenceran larutan standar pemeriksaan kadar protein HMGB1, TLR4 dan IL6

3. Preparasi Reagen HMGB1, TLR4 dan IL6

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 menggunakan diluent A dan B. *Buffer Wash* 1x: 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 TMB yang dibutuhkan sesuai jumlah well yang akan dijalankan. Buang larutan substrat TMB yang tidak digunakan.

4. Prosedur Kerja tes ELISA HMGB1, TLR4 dan IL6

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 µL Sampel, Standar, atau Kosong (Blanko) ke masing-masing well dan inkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Aspirasi dan tambahkan 100 µL reagen deteksi A, dan inkubasi 1 jam pada suhu 37°C. Aspirasi dan cuci sebanyak 3 kali. Tambahkan 100 µL reagen deteksi B dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Aspirasi dan cuci 5 kali. Tambahkan 90 µL larutan substrat TMB dan inkubasi selama 10-20 menit pada suhu 37°C. Tambahkan 50 µL stop solution. Baca segera pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *ELISA Reader 270* lihat gambar 16.



Gambar 16. Mesin ELISA microplate reader

d. Penentuan kadar protein serum HMGB1, TLR4 dan IL6

Kadar protein serum HMGB1, TLR4 dan IL6 dilaporkan dalam satuan pg/mL dan ng/mL, dengan rentang deteksi 62.5 – 4000 pg/mL untuk protein HMGB1. Untuk protein TLR4 dilaporkan dalam satuan ng/mL dengan rentang deteksi 0.313 – 20 ng/mL, dan untuk protein IL6 dilaporkan dalam satuan pg/mL dengan rentang deteksi 0.78 – 50 pg/mL.

Rata-rata dari duplikat dibaca untuk setiap hasil standar, kontrol dan sampel dikurangi rerata standar negatif *optical density* (OD) .

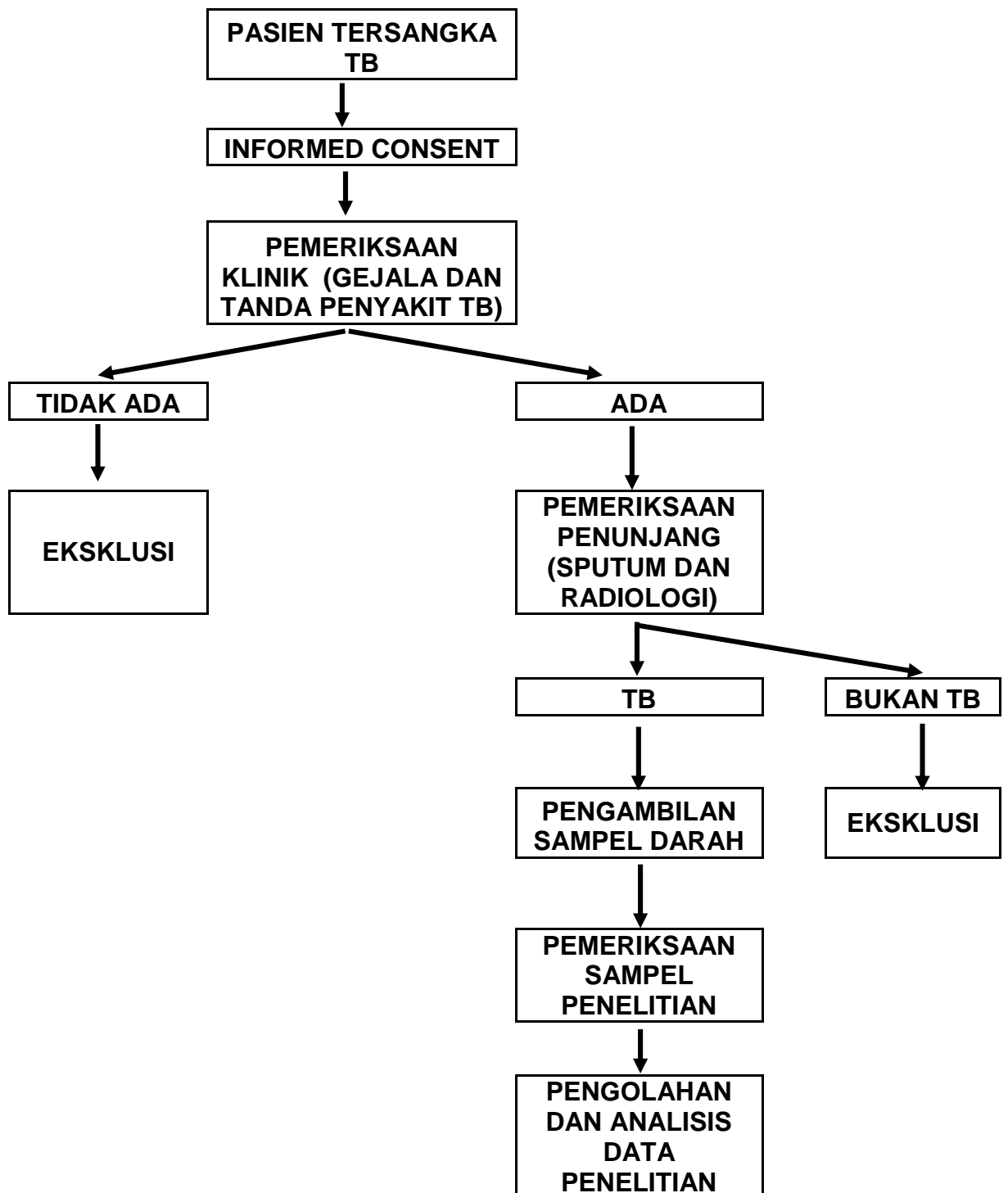
Buat kurva standar dengan memploting rerata absorban untuk setiap standar pada sumbu x terhadap konsentrasi sample pada sumbu Y.

Kurva linearitas dibuat dengan menghubungkan titik pada grafik.

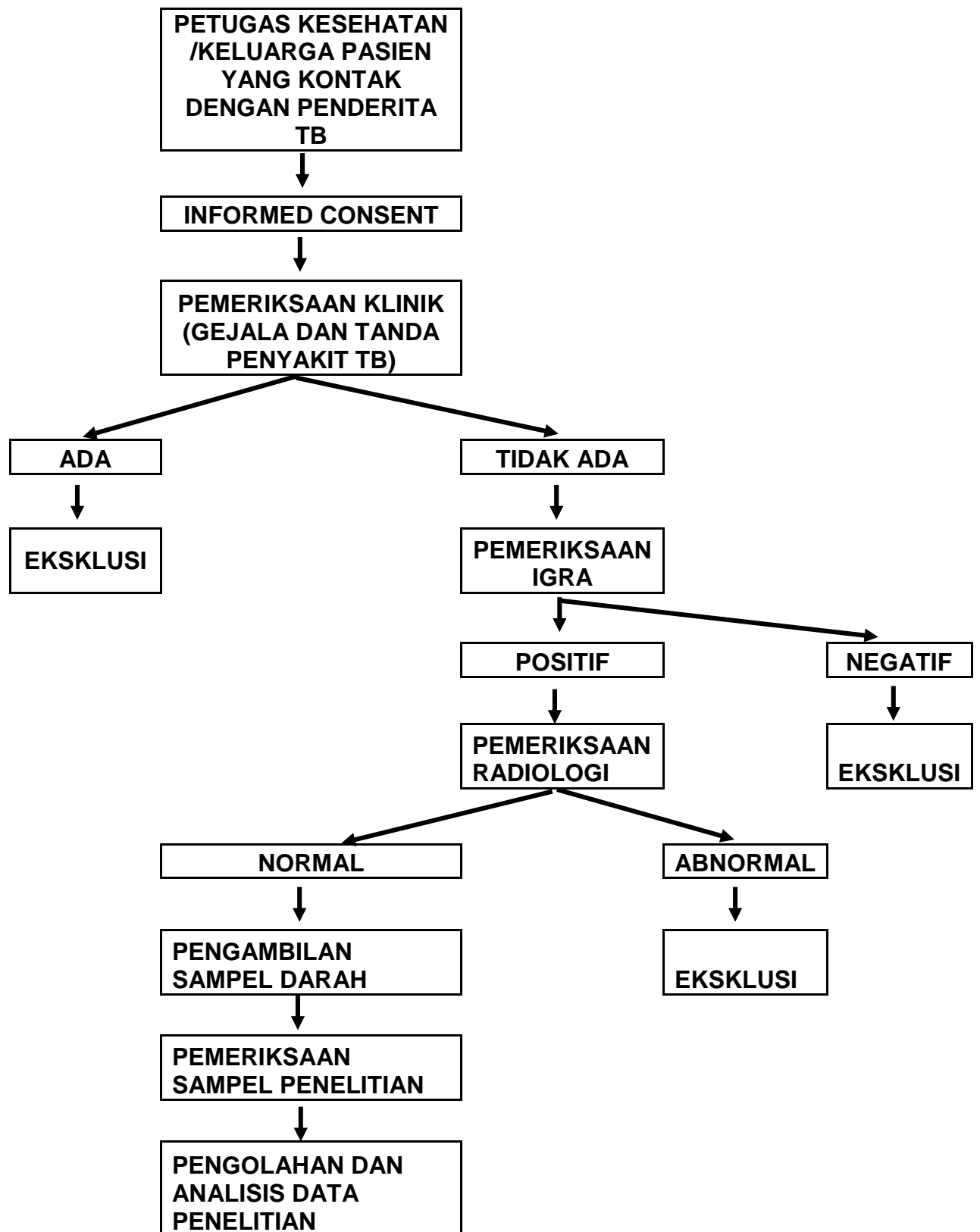
5.6. Etika penelitian

Penelitian ini diajukan kepada komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makasar untuk memperoleh surat lulus kaji etik/ *ethical clearance*, persetujuan etik nomor : L007 /H4.8.4.5.31. /PP36-KOMETIK / 2017.

5.7. Alur Penelitian Untuk sampel TB Aktif



5.8. Alur Penelitian Untuk sampel TB Laten



5.9. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif

5.9.1. Definisi Operasional

- a. Tuberkulosis aktif adalah pasien baru dengan gejala dan tanda tuberkulosis yang belum mendapat terapi, hasil pemeriksaan sputum BTA positif atau hasil Tes Cepat Molekular (TCM) terdeteksi MTB dan hasil pemeriksaan foto toraks menunjukkan adanya infeksi tuberkulosis.
- b. Tuberkulosis laten adalah seseorang yang terinfeksi bakteri *M. Tuberculosis* tetapi tidak menimbulkan tanda dan gejala klinik, serta gambaran radiologi normal dengan hasil uji imunologik seperti uji tuberkulin atau *Interferon Gamma Release Assay* (IGRA) positif (PDPI., 2016).
- c. Infeksi tuberkulosis adalah infeksi oleh kuman MTB yang menyerang individu baik yang bermanifestasi klinis menjadi TB aktif, maupun yang tidak bergejala klinis menjadi TB laten dan terdapat bukti adanya infeksi oleh MTB.
- c. Gen HMGB1 adalah gen yang mengkode HMGB1 yang diukur dengan pemeriksaan mRNA HMGB1 menggunakan kuantitatif RT-PCR dan dinyatakan dalam satuan jumlah kopi/uL
- d. Kadar protein HMGB1 adalah kadar protein HMGB1 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA dan dinyatakan dengan satuan pg/mL
- e. Kadar TLR 4 adalah kadar protein TLR4 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA dan dinyatakan dalam satuan ng/mL.
- f. Kadar IL6 adalah kadar protein IL6 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA dan dinyatakan dalam satuan pg/mL.

5.9.2. Kriteria Objektif masing-masing variabel

a. Ekspresi mRNA gen HMGB1 diukur dan dinyatakan sebagai ekspresi absolut dalam satuan kopi/uL. Nilai dilaporkan menggunakan 6 standar dilusi dan 1 standar negatif yang disertakan dalam kit pengujian (Oligo, Macrogen). Kuantitasi mRNA gen HMGB1 menggunakan kuantitatif RT-PCR dengan alat CFX Connect Real Time System Biorad.

b Kadar protein HMGB1 adalah kadar protein HMGB1 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA menggunakan kit LSBio (Lifspan Biosciences, Inc. Amerika Serikat). Nomor katalog: LS-F4038 dan dinyatakan dalam satuan pg/mL. Rentang deteksi kit : 62,5 - 4000 pg/mL.

c. Kadar TLR 4 adalah kadar TLR 4 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA menggunakan kit LSBio (Lifspan Biosciences, Inc. Amerika Serikat). Nomor katalog: LS-F22086 dan dinyatakan dalam satuan ng/mL. Rentang deteksi kit : 0,313-20 ng/mL.

d. Kadar IL 6 adalah kadar IL 6 dalam serum yang diukur dengan metode ELISA menggunakan kit LSBio (Lifspan Biosciences, Inc. Amerika Serikat). Nomor katalog: LS-F9754 dan dinyatakan dalam satuan ng/mL. Rentang deteksi kit : 0,78-50 pg/mL.

5.10. Metode analisis data

Seluruh data yang diperoleh selanjutnya diolah melalui program SPSS statistik sesuai kelompok dan jenis data. Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan histogram dengan skala ukur yang sesuai. Dilakukan analisis

univariat dan bivariat pada batas kemaknaan $\alpha = 5\%$. Analisis univariat untuk menilai parameter dan karakteristik sampel. Sedangkan analisis bivariat dilakukan untuk membandingkan parameter ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar protein HMGB1, Kadar TLR4 dan kadar IL 6 pada dua kelompok yaitu TB aktif dan Laten. Sebaran data variabel yang diteliti semua normal sehingga dilakukan uji parametrik pada dua kelompok yang tidak berpasangan dengan varian sama yaitu uji hipotesis *Independent sample t-Test* . Uji Korelasi antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan kadar protein HMGB1, korelasi kadar protein HMGB1 dengan kadar TLR4, korelasi kadar protein HMGB1 dengan kadar IL6 dan korelasi kadar TLR4 dengan kadar IL6, menggunakan uji korelasi *Pearson* karena data terdistribusi normal (Dahlan M. S. 2016).

BAB VI

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

1. Karakteristik Subjek

Penelitian telah dilakukan di RS Islam Pondok kopi dan RS Islam Sukapura Jakarta, di wilayah Jakarta Timur dan Jakarta Utara, pada pasien tuberkulosis dan petugas medis yang berkontak dengan pasien tuberkulosis selama November 2017 hingga Februari 2018. Jumlah subjek penelitian berjumlah 52 orang yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Subjek penelitian kemudian dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok subjek TB aktif dan kelompok subjek TB laten.

Berdasarkan Tabel 6.1, terlihat usia rerata subjek penelitian keseluruhan $37,19 \pm 12,21$ tahun ($n = 52$ orang) dengan usia minimum 18 tahun dan maksimum 58 tahun. Jenis kelamin hampir sama antara perempuan dan laki-laki masing-masing 27 orang dan 25 orang. Berdasarkan kelompok, maka jenis kelamin terbanyak kelompok TB aktif adalah laki-laki sebanyak 21 orang (80,8%), sedangkan pada kelompok TB laten jenis kelamin terbanyak adalah perempuan 22 orang (84,6%). Tingkat pendidikan pada kelompok TB aktif terbanyak adalah SMA 61,5% sedangkan pada kelompok TB laten adalah D3/D4/S1/S2/S2/S3 sebesar 92,3%. Berdasarkan pekerjaan pada kelompok TB aktif, pekerjaan sektor informal seperti buruh/ pedagang/ petani/ nelayan/ wiraswasta sebesar

42% sebanding dengan sektor formal PNS/ POLRI/ ABRI/ karyawan swasta sebesar 38.5%. Status gizi berdasarkan IMT pada kelompok TB aktif terbanyak adalah IMT normal 69,2%, sedangkan pada kelompok TB laten terbanyak IMT lebih/gemuk 69,3%.

Tabel 6.1. Karakteristik Dasar Subjek Penelitian

Karakteristik Dasar	TB aktif n=26 (100%)	TB laten n=26 (100%)	Total Keseluruhan n=52 (100%)
Umur :	38,08±14.1	36.31±10.2	37.19±12.21
Jenis kelamin : Pria	21 (80,8)	4 (15.4)	25 (48,1)
Wanita	5 (19,2)	22 (84,6)	27 (51,9)
Pendidikan :			
1. Tidak Sekolah/SD	3 (11,5)		3 (5,8)
2. SMP	4 (15,4)		4 (7,7)
3. SMA	16 (61,5)	2 (7,7)	18 (34,6)
4. D3/D4/S1/S2/S3	3 (11,5)	24 (92,3)	27 (51,9)
Pekerjaan :			
1. Tidak Bekerja/IRT/Siswa/Mahasiswa	5 (19,2)		5 (9,6)
2. Buruh/Pedagang /Petani/Nelayan/Wiraswasta	11 (42,3)		11 (21,2)
3. PNS/POLRI/ABRI/Karyawan Swasta	10 (38,5)	2 (7,7)	12 (23,1)
4. Profesi (Dokter/perawat/apoteker/analisis)		24 (92,3)	24 (46,2)
Indeks Massa Tubuh (IMT) :			
1. Normal	18 (69,2)	7 (26,9)	25 (48,1)
2. Kurus	7 (26,9)	1 (3,8)	8 (15,4)
3. Lebih/kegemukan	1 (3,8)	10 (38,5)	11 (21,2)
4. Obesitas		8 (30,8)	8 (15,4)

2. Profil pemeriksaan variabel yang diteliti

Profil hasil pemeriksaan ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6, dapat dilihat pada Tabel 6.2.

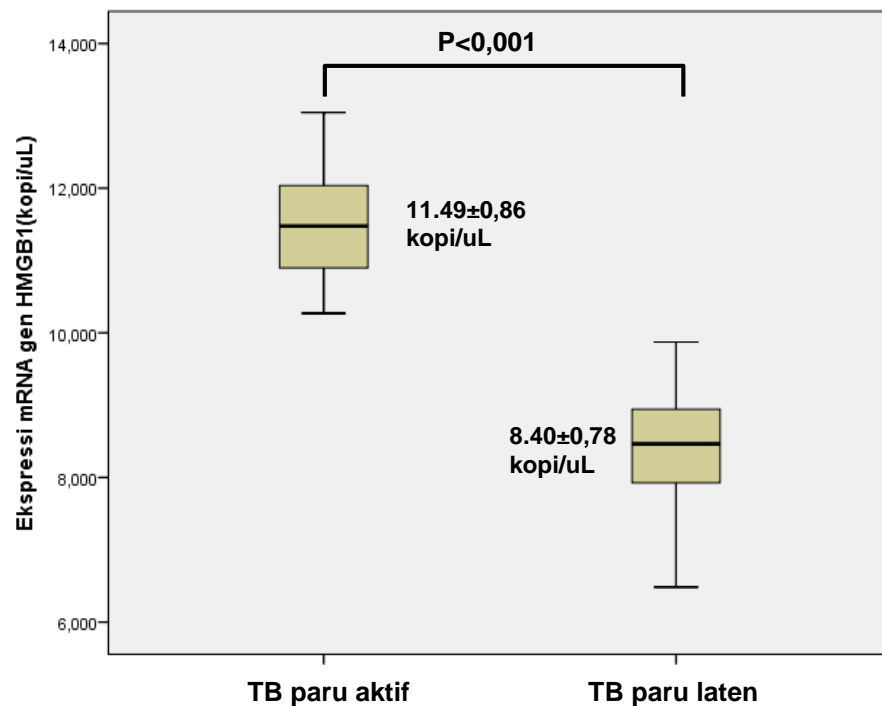
Tabel 6.2. Hasil Pemeriksaan parameter variabel yang diteliti

Parameter		N	Mean (Rerata)	Standar Deviasi (SD)	Minimum	Maksimum
Ekspressi Gen mRNA HMGB1 (kopi/uL)	TB	26	11,49	0,86	10,27	13,05
	AKTIF					
	TB	26	8,41	0,78	6,48	9,87
	LATEN					
	Total	52	9,95	1,76	6,48	13,05
Kadar protein HMGB1 (pg/mL)	TB	26	1234,92	105,26	1070,00	1442,00
	AKTIF					
	TB	26	183,67	110,65	17,15	372,39
	LATEN					
	Total	52	709,29	541,42	17,15	1442,00
Kadar protein TLR4 (ng/mL)	TB	26	10,43	0,68	9,35	11,49
	AKTIF					
	TB	26	0,94	0,55	0,04	1,85
	LATEN					
	Total	52	5,68	4,83	0,04	11,49
Kadar protein IL6 (pg/mL)	TB	26	24,33	1,31	22,18	26,48
	AKTIF					
	TB	26	3,38	1,42	1,04	5,62
	LATEN					
	Total	52	13,86	10,66	1,04	26,48

Terlihat peningkatan yang nyata ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL 6 pada kelompok TB aktif dibanding kelompok TB laten.

3. Peran ekspresi mRNA gen HMGB1 dan *soluble* protein HMGB1 pada TB aktif dan TB laten

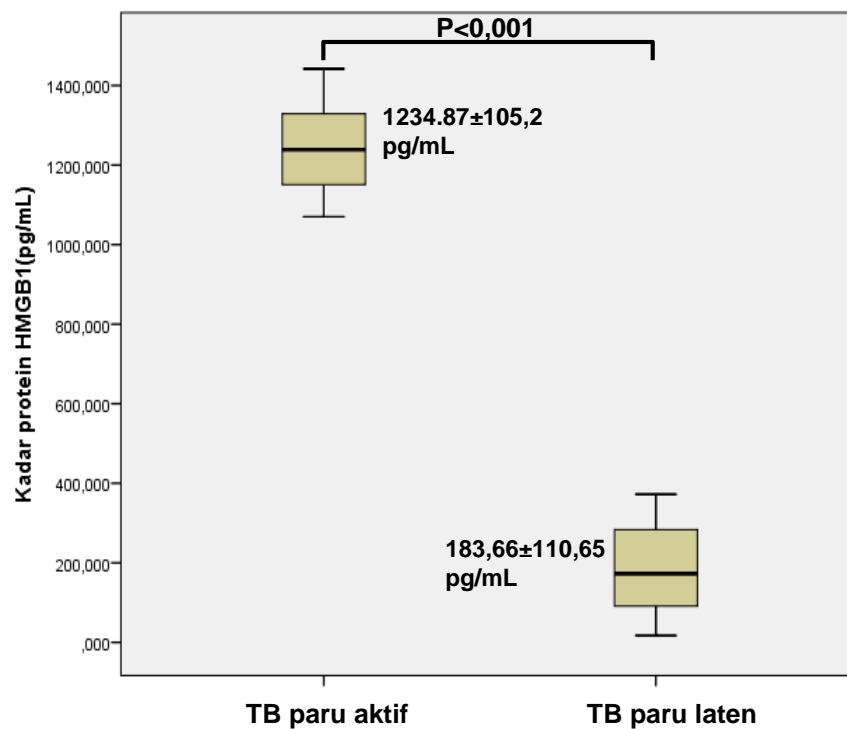
Perbandingan rerata ekspresi mRNA gen HMGB1 dan kadar *soluble* protein HMGB1 didapatkan lebih tinggi pada kelompok TB aktif dibandingkan dengan kelompok TB laten (Gambar 17 dan 18).



Gambar 17. Perbandingan rerata Ekspresi mRNA gen HMGB1 pada TB aktif dan TB laten
(Keterangan : * p uji T *test independent*)

Pada Gambar 17 didapatkan adanya peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1 pada kelompok TB aktif dibandingkan kelompok TB laten dengan peningkatan sebesar 1,37 kali lipat. Hasil uji T *test* terlihat adanya perbedaan yang bermakna rerata ekspresi mRNA gen HMGB1 antara kelompok TB aktif $11,49 \pm 0,86$ kopi/uL dengan TB laten $8,40 \pm 0,78$ kopi/uL

($p < 0,001$). Terlihat batas bawah nilai ekspresi mRNA gen HMGB1 pada kelompok TB aktif , sama sekali tidak bersinggungan atau terpisah dengan nilai batas atas ekspresi mRNA gen HMGB1 pada kelompok TB laten.



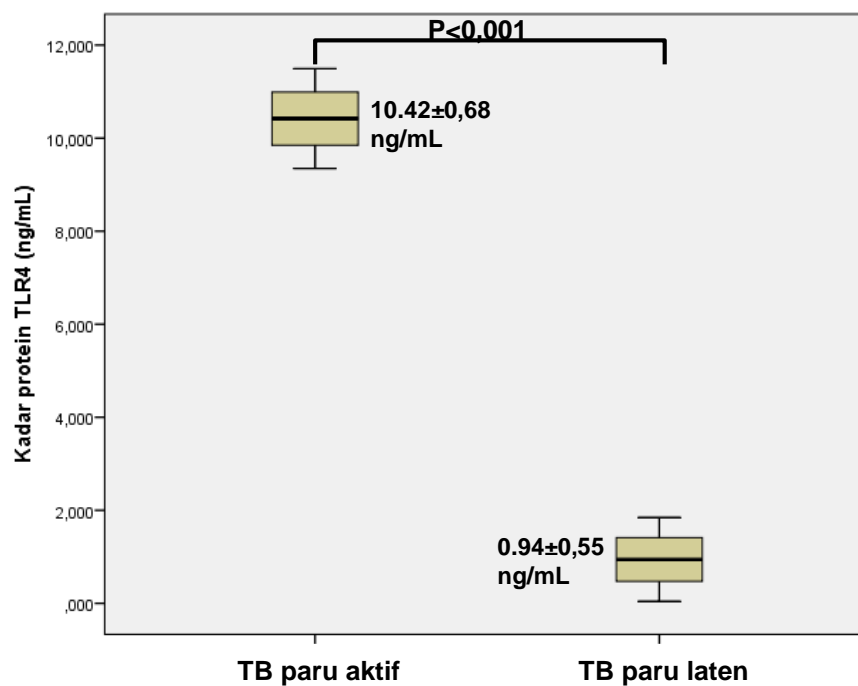
Gambar 18. Perbandingan rerata kadar soluble protein HMGB1 pada TB aktif dan TB laten
(Keterangan : * p uji T *test independent*)

Pada Gambar 18 didapatkan adanya peningkatan kadar *soluble* protein HMGB1 pada kelompok TB aktif dibandingkan kelompok TB laten dengan peningkatan sebesar 6,72 kali lipat. Terdapat perbedaan yang bermakna kadar *soluble* protein HMGB1 antara TB aktif $1234,87 \pm 105,2$ pg/mL dan TB laten $183,66 \pm 110,65$ pg/mL dengan $p < 0,001$. Didapatkan batas bawah kadar *soluble* protein HMGB1 kelompok TB aktif , sama sekali

tidak bersinggungan atau terpisah dengan nilai batas atas kadar protein HMGB1 pada kelompok TB laten.

4. Peranan TLR4 dan IL6 pada TB aktif dan TB laten

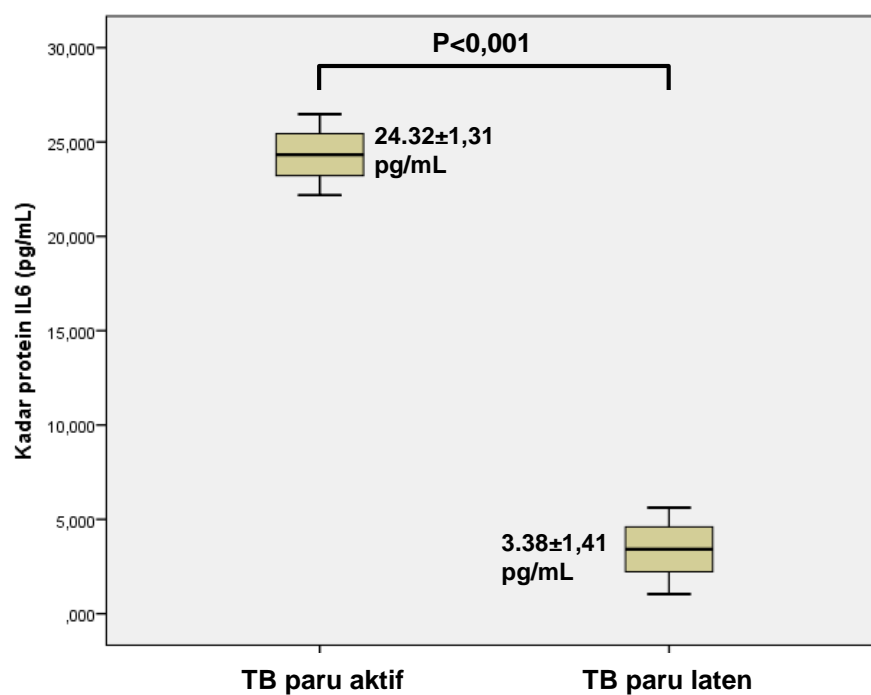
Perbandingan rerata kadar protein TLR4 dan protein IL6 didapatkan lebih tinggi pada kelompok TB aktif dibandingkan dengan kelompok TB laten. Didapatkan adanya peningkatan kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6 pada kelompok TB aktif dibandingkan kelompok TB laten dengan masing-masing peningkatan sebesar 11,09 dan 7,20 kali lipat.



Gambar 19. Perbandingan rerata Kadar TLR4 pada TB aktif dan TB laten
(*p = uji T test independent)

Terlihat pada Gambar 19 adanya perbedaan yang bermakna $p < 0,001$ antara kadar protein TLR4 pada kelompok TB aktif $10,42 \pm 0,68$

ng/mL dibanding TB laten $0,94 \pm 0,55$ ng/mL. Terlihat batas bawah kadar protein TLR4 pada kelompok TB aktif terpisah dengan batas atas kadar protein TLR4 pada kelompok TB laten. Hasil Ini memperlihatkan adanya peningkatan yang nyata kadar TLR4 pada pasien TB aktif dibanding TB laten.



Gambar 20. Perbandingan rerata kadar IL6 pada TB aktif dan TB laten

(*p = uji T test independent)

Terdapat perbedaan rerata kadar protein IL 6 yang bermakna $p < 0,001$, antara TB aktif $24,32 \pm 1,31$ pg/mL dengan TB laten $3,38 \pm 1,41$ pg/mL (Gambar 20). Terlihat batas bawah kadar protein IL6 pada kelompok TB aktif terpisah dengan batas atas kadar IL6 pada kelompok TB laten.

Hasil Ini memperlihatkan adanya peningkatan yang nyata kadar IL6 pada pasien TB aktif dibanding TB laten.

5. Hubungan antara mRNA gen HMGB1, *soluble* protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada Infeksi Tuberkulosis

Hasil penelitian mendapatkan korelasi yang bermakana $p < 0,001$ (Tabel 6.3), antara ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan *soluble* protein HMGB1, korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar protein TLR4, korelasi antara kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar protein IL6, dan korelasi antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB1, pada infeksi tuberkulosis yang berkorelasi positif sangat kuat dengan masing-masing koefisien korelasinya $r = 0.874$, $r = 0.975$, $r = 0.977$, dan $r = 0.888$.

Tabel 6.3. Hubungan antara Ekspresi gen mRNA HMGB1, *soluble* protein HMGB1, TLR4 dan IL6 pada TB aktif dan Laten

Korelasi antar variabel	Infeksi Tuberkulosis	
	r*	Nilai p*
1. Ekspresi mRNA HMGB1 dengan kadar protein HMGB1	0,874	<0,001
2. Kadar protein HMGB1 dengan kadar TLR4	0,975	<0,001
3. Kadar protein HMGB1 dengan kadar IL-6	0,977	<0,001
4. Kadar IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB1	0,888	<0,001

*Uji *Pearson*

r = koefisien korelasi

Hasil ini menunjukkan bahwa adanya infeksi oleh kuman MTB menyebabkan aktivasi sistem imun alami dan adaptif penderita. Sel imun alami terutama makrofag secara aktif maupun pasif akan mensekresi HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler. Melalui ikatan dengan reseptor TLR4 maupun TLR2, protein HMGB1 akan menginduksi berbagai respons seluler dan humoral, seperti kemotaksis makrofag, netrofil, sel dendritik ketempat infeksi, dan juga menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL 6 oleh makrofag dan limfosit Th1, serta pelepasan sitokin antiinflamasi IL10 oleh Th2. Pelepasan ini sitokin proinflamasi IL6 akan mengaktivasi kembali makrofag untuk memproduksi HMGB1 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1.

6. Nilai Ekspresi mRNA HMGB1 dan Kadar protein HMGB1 sebagai acuan pemberian terapi pada TB Laten yang berpotensi menjadi TB aktif.

Ekspresi mRNA gen HMGB1 pada TB aktif memperlihatkan peningkatan yang nyata dibanding pasien TB laten. Begitu pula kadar *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR 4 dan kadar protein IL6 juga mengalami peningkatan pada kelompok TB aktif dibanding TB laten. Penelitian ini mendapatkan adanya nilai rentang (95% CI) antara ekspresi mRNA HMGB1, *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6, pada TB aktif dan TB terlihat pada Tabel 6.4.

Terdapat nilai rentang sebagai daerah pemisah antara batas atas TB laten dan batas bawah TB aktif untuk ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6 pada 95% CI. Rentang nilai pemisah antara ekspresi mRNA HMGB1 adalah antara 8,73 – 11,13 kopi/uL, rentang nilai pemisah kadar *soluble* HMGB1 adalah antara 228.36 – 1192,41 pg/mL, rentang nilai pemisah kadar protein TLR4 adalah antara 1,17 – 10,15 ng/mL, dan rentang nilai pemisah kadar protein IL6 adalah antara 3,96 – 23,80 pg/mL. Rentang kadar pemisah ini dapat dipakai sebagai penanda atau biomarker adanya proses reaktivasi TB laten kearah TB aktif dan dapat digunakan sebagai acuan untuk pemberian terapi profilaksis antituberkulosis pada penderita TB laten.

Tabel 6.4. Nilai rentang ekspresi mRNA gen HMGB1 , kadar *soluble* protein HMGB1 , TLR 4, dan IL 6 pada TB Aktif dan TB Laten

Variabel	TB Aktif		TB Laten	
	Min-max	95% CI	Min-max	95% CI
1. Ekspresi Gen mRNA HMGB1 (kopi/uL)	10,27 – 13,05	11.14-11,84	6,48-9,87	8,09-8,73
2. Kadar serum HMGB1 (pg/mL)	1070 – 1442	1192,41-1277,44	17,15 - 372.39	138,97-228,36
3. Kadar serum TLR4 (ng/mL)	9,35 -11,49	10,15-10,70	0,04 - 1,85	0,72 - 1,17
4. Kadar serum IL6 (pg/mL)	22,18 - 26,48	23,80 - 24,87	1,04 - 5,62	2,81 - 3,96

B. PEMBAHASAN

Respons imun yang mendasari perlindungan tuberkulosis belum sepenuhnya dipahami. Sepertiga penduduk dunia diperkirakan terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, namun, hanya 10–20% dari individu tersebut berkembang menjadi penyakit aktif, sisanya tanpa gejala yang dikenal sebagai keadaan 'laten'. Respons imun akan sangat penting dalam menentukan mengapa beberapa orang terkena tuberkulosis dan sisanya tetap dalam keadaan laten selama perjalanan penyakit tuberkulosis (Cliff J.M et al., 2015).

Berbagai mediator berperan dalam proses imunopatogenesis selama infeksi tuberkulosis berlangsung, salah satu diantaranya adalah HMGB1. Peran proinflamatorik yang kuat dari HMGB1 ditunjukkan pada penyakit autoimun, trauma, sepsis, pneumonia bakterialis, aterosklerosis, arthritis, cedera paru akut termasuk infeksi tuberkulosis. Makrofag akan mengeluarkan HMGB1 akibat infeksi MTB, yang menjadi mediator inflamatorik yang penting dan terlibat dalam sekresi sitokin proinflamatorik dan pengeluaran *Nitric Oxide* (NO) selama TB paru. Interaksi HMGB1 tidak hanya dengan TLR4 tetapi juga dengan TLR2 dan RAGE. Ikatan HMGB1 terutama dengan TLR2 dan TLR4 yang akan mengaktifasi fungsi sel imun dan menginduksi maturasi sel tersebut, seperti monosit, sel dendritik dan myeloid/plasmasitoid (Kim SY et al., 2017; Grover A et al., 2008; Park J S et al., 2006). *Toll Like Receptor 4* adalah reseptor primer/utama HMGB1 dalam memediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin pada cedera jaringan

serta mengaktifkan kemotaksis sel imun ketempat infeksi/inflamasi. Sinyal ini akan mengaktifkan transkripsi NF κ B pada makrofag untuk menginduksi pengeluaran sitokin proinflamasi seperti TNF, IL1, IL 6, dan IL8 (Harris HE et al., 2012). Selain itu keterlibatan TLR2 dan TLR4 berperan utama untuk menghasilkan fosforilasi dan aktivasi p38 yang penting untuk memodulasi aktivitas transkripsi NF κ B. Interaksi HMGB1 dengan TLR2 dan TLR4 menyebabkan peningkatan kemampuan HMGB1 mengaktifasi respon inflamasi (Park J S et al., 2004).

1. Karakteristik subjek penelitian

Hasil penelitian ini didapatkan subjek penderita TB aktif sebanyak 26 orang dan penderita TB Laten sebanyak 26 orang. Penderita TB aktif lebih banyak laki-laki (80.8%) dibanding perempuan, dengan umur rerata 37.19 \pm 12.21 tahun. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Tri Ariguntar W dkk, yang mendapatkan lebih banyak penderita TB paru pada usia produktif dan berjenis kelamin laki-laki dibanding perempuan, salah satu faktor penyebab hal ini adalah perilaku laki-laki yang berisiko tinggi untuk mendapat TB paru, seperti merokok, pekerja lapangan dan minum alkohol (Wikanningtyas T A, 2018).

2. Peran ekspresi mRNA gen HMGB1 dan *soluble* protein HMGB1 pada TB Aktif dan TB Laten

Penelitian yang dilakukan memperlihatkan adanya peningkatan yang nyata ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kelompok TB aktif dibanding TB laten sebesar 1,37 kali lipat dan 6,72 kali lipat.

Pemeriksaan mRNA gen HMGB1 menggunakan kuantitatif RT-PCR menggunakan kurva standar dengan 6 standar dilusi dan satu standar negatif, hasilnya dilaporkan dalam satuan kopi/uL. Diperoleh nilai rerata mRNA gen HMGB1 pada TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten $11,49 \pm 0,86$ kopi/uL vs. $8,40 \pm 0,78$ kopi/uL dan begitu pula kadar protein HMGB1 pada TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten $1234,87 \pm 105,2$ pg/mL vs. $183,66 \pm 110,65$ pg/mL. Perbedaan ekspresi mRNA gen HMGB1 dan kadar protein HMGB1, pada kedua kelompok secara statistik bermakna dengan nilai $p < 0,001$. Hal ini menandakan pada infeksi TB aktif, MTB akan menyebabkan ekspresi mRNA gen HMGB1 untuk memproduksi HMGB1 pada sel imun bawaan terutama makrofag. Selain itu rangsangan sitokin proinflamasi IL6 pada makrofag juga menyebabkan peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1 untuk memproduksi HMGB1, sehingga terjadi pengeluaran HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler secara aktif. Secara pasif pengeluaran HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler, terjadi bila makrofag mati/nekrosis akibat hilangnya permeabilitas membran inti dan membran sel makrofag. Pada TB aktif banyaknya kuman MTB memicu aktivitas imun respons yang lebih tinggi dibanding TB laten. Pada TB laten oleh sistem imun, kuman MTB berhasil diatasi dan terlokalisasi dalam makrofag, sel dendritik, leukosit dan lainnya, sehingga tidak dapat mengaktivasi makrofag untuk memproduksi HMGB1 oleh mRNA gen HMGB1. Terjadi keseimbangan antara sitokin proinflamasi IL6 dengan sitokin antiinflamasi IL10. Sekresi HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler terutama oleh makrofag

yang mati secara pasif diiringi dengan produksi yang sedikit akan menyebabkan ekspresi mRNA gen HMGB1 dan protein HMGB1 lebih rendah pada TB Laten. Adanya peningkatan kadar protein HMGB1 membuktikan peran HMGB1 pada proses imunopatogenesis TB (Park J S et al., 2006; Magrys A et al., 2013).

Infeksi oleh MTB memicu imun respons untuk mengeluarkan HMGB1 sebagai alarm bahaya, HMGB1 merupakan salah satu dari *Danger Associated Molecular Patterns/DAMPs* (Kang R et al., 2014). Studi in vitro dan studi percobaan hewan menunjukkan bahwa kuman MTB dapat secara efektif menginduksi sekresi HMGB1 yang menyebabkan hiperaktivasi sitokin dan kerusakan jaringan paru (Kim SY et al., 2017). Studi yang dilakukan oleh Rogelio,dkk menunjukkan bahwa adanya sekresi aktif dan tinggi dari HMGB1 selama infeksi awal dari TB paru yang diikuti dengan produksi yang rendah dan konstan selama fase lanjut (Hernandes-Pando R et al., 2015).

Penelitian ini mendapatkan nilai rerata kadar protein HMGB1 pasien TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten ($1234,87 \pm 105,2$ pg/mL vs. $183,66 \pm 110,65$ pg/mL). Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kim Su-Young, dkk yang mendapatkan adanya peningkatan kadar HMGB1 yang signifikan pada pasien TB aktif dibanding kelompok kontrol sehat dengan nilai rerata pasien TB vs. kontrol sehat 47.5 ± 26.1 ng/mL vs. 13.8 ± 7.3 ng/mL (Kim SY et al., 2017). Studi yang dilakukan oleh Jin-Cheng Zeng, dkk juga menunjukkan bahwa kadar plasma HMGB1

pasien tuberkulosis aktif lebih tinggi bermakna dibandingkan dengan kelompok sehat (Zeng JC et al., 2015). Penelitian lain yang dilakukan oleh Agnieszka M dkk, menunjukkan bahwa HMGB1 dapat terdeteksi pada aliran darah berbagai penyakit paru dengan konsentrasi tertinggi pada pasien dengan infeksi MTB (Magrys A et al., 2013). Penelitian oleh Rogelio HP juga menunjukkan bahwa konsentrasi HMGB1 mengalami peningkatan pada pasien dengan aktif tuberkulosis (47,5 ng/mL) dibandingkan pada pasien dengan penyakit paru lainnya (36,87 ng/mL). Kadar HMGB1 juga lebih tinggi pada pasien TB laten yang memiliki penyakit paru lainnya 52.3 ng/mL dibandingkan pada pasien dengan gangguan paru non-TB 21,36 ng/mL (Hernandes-Pando R et al., 2015).

Penelitian ini membuktikan peranan HMGB1 pada imunopatogenesis TB yang terlihat dengan adanya peningkatan ekspresi gen HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada TB aktif dibanding TB laten. Infeksi kuman MTB akan menimbulkan respons lokal imun bawaan. Makrofag alveolus paru akan mensekresi HMGB1 secara aktif dan sel-sel yang telah mati (nekrotik) akan melepaskan HMGB1 secara pasif. Sel imun yang diaktivasi oleh pajanan dari MTB secara aktif akan memobilisasi HMGB1 dan memodifikasi HMGB1 melalui asetilasi, fosforilasi, metilasi dan perubahan redoks residu lisin, sehingga terjadi translokasi HMGB1 dari nukleus ke sitosol yang oleh vesikel sekretori akan dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler. Dalam intrasel HMGB1 berperan dalam replikasi, rekombinasi, transkripsi dan stabilitas genomik. Pada sitosol HMGB1

berperan dalam mengatur autofagi dan menjaga keseimbangan autofagi dan apoptosis. Sedangkan HMGB1 ekstraseluler berperan pada inflamasi, imunitas, proliferasi, pertumbuhan sel, kematian dan kerusakan sel (Yang H, et al., 2010; Lee S A, et al., 2014). Interaksi MTB dengan HMGB1 atau HMGB1 saja dengan TLR4 akan menyebabkan upregulasi imun respons. Ikatan HMGB1 dengan TLR4 akan memicu signal *downstream* jalur NF κ B melalui MyD88 sehingga terjadi translokasi ke nukleus yang akan mengaktivasi sekresi mediator proinflamasi seperti TNF α , IL1, IL 6, IL 12 dan IL18, serta sekresi kemokin yang menarik makrofag, netrofil, NK sel, sel dendritik ketempat infeksi dan NO (Hernandez-Pando R., et al., 2015., Yanai H., et al., 2011; Dheda K., et al., 2010; Grover A., et al., 2008).

Kadar HMGB1 pada kelompok TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten, memperlihatkan bahwa respons inflamasi yang diinduksi oleh banyaknya kuman MTB akan mengaktivasi makrofag untuk mensekresi HMGB1 lebih banyak ke ekstraseluler secara aktif , dibanding kelompok TB laten yang jumlah kumannya lebih sedikit dan dalam keadaan dorman sehingga pelepasan HMGB1 ke ekstraseluler terjadi secara pasif dalam jumlah yang lebih sedikit oleh sel makrofag yang nekrotik (Grover A., et al., 2008).

3. Peranan TLR4 dan IL6 pada TB aktif dan laten

Hasil penelitian ini mendapatkan adanya peningkatan kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6 pada TB aktif dibanding TB laten, dengan peningkatan masing-masing 11,09 kali lipat dan 7,20 kali lipat. Penelitian ini

juga mendapatkan perbedaan rerata kadar TLR4 yang bermakna antara TB aktif dan TB laten ($10,42 \pm 0,68$ ng/mL vs. $0,94 \pm 0,55$ ng/mL) dan perbedaan rerata IL 6 antara TB aktif dan TB laten ($24,32 \pm 1,31$ pg/mL vs. $3,38 \pm 1,41$ pg/mL) dengan $p < 0,001$. Hasil ini membuktikan keterlibatan TLR4 pada mekanisme imunopatogenesis TB yang menginduksi pengeluaran sitokin proinflamasi. Infeksi bakteri umumnya mengaktivasi sistem imun bawaan yang merupakan mekanisme pertama pertahanan tubuh. Adanya infeksi oleh MTB memicu imun respons untuk mengeluarkan HMGB1 sebagai alarm bahaya. Reseptor TLRs berperan dalam pengenalan sistem imun bawaan terhadap kuman patogen dan membentuk perkembangan respons imun adaptif. Kuman MTB dikenali oleh TLR2, TLR4 dan TLR9, yang kemudian berinteraksi dengan protein adaptor MyD88 dan domain TIR yang berisi adaptor protein TIR (TIRAP) untuk mengaktifasi makrofag dan sel dendritik. Reseptor TLRs, terutama TLR4 memainkan peran integral dalam aktivasi jalur signaling sitokin inflamasi dan imun respons adaptif yang berpengaruh pada ketahanan tubuh terhadap TB (Wu L., et al., 2015; Hernandez-Pando R., et al., 2015; Dheda K., et al., 2010). Interaksi HMGB1 dengan TLR2 dan TLR4 setelah infeksi MTB menghasilkan downregulasi dari reseptor membran setelah terpapar, yang menghasilkan respon inflamasi termasuk pengeluaran sitokin proinflamasi yang berkontribusi terhadap disfungsi atau kematian organ/sel makrofag (Park J S et al., 2006).

Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kim Su yong dkk yang mendapatkan adanya peningkatan kadar plasma IL6 pada pasien tuberkulosis paru aktif (Kim SY et al., 2017). Begitu pula dengan penelitian Jin-Cheng Zeng dkk yang mendapatkan adanya peningkatan kadar plasma IL6 dan TNF α pada pasien tuberkulosis aktif. Studi ini menunjukkan bahwa kadar HMGB1 secara positif berkorelasi dengan kadar IL6 baik pada plasma dan sputum dari pasien tuberkulosis aktif, pada saat yang sama, baik HMGB1 dan IL6 berhubungan dengan monosit namun tidak dengan respons dinamik neutrofil atau limfosit pada pasien tuberkulosis aktif. Hal ini menunjukkan bahwa HMGB1 menginduksi keterlibatan IL6 dalam respons inflamatorik dinamis monosit terhadap infeksi TB (Zeng JC et al., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Qiu-yue Liu ,dkk menunjukkan bahwa sebanyak 124 pasien dengan TB paru menunjukkan adanya asosiasi antara faktor inflamasi dan MTB, kadar serum faktor inflamasi yang diukur pada pasien dengan TB paru di ICU dengan subjek sehat sebagai kontrol. Kadar konsentrasi serum dari IL1, IL6, IL10 dan IL12 secara signifikan mengalami upregulasi pada pasien dengan TB paru di ICU dibandingkan dengan subjek sehat ($p < 0,001$). Hasil penelitian tersebut mendapatkan kadar serum dari IL6 berperan sebagai biomarker yang potensial dari kemajuan penyakit pada tuberkulosis paru setelah terapi obat anti tuberkulosis dengan didapatkannya peningkatan kadar serum IL6 pada pasien TB paru dibandingkan dengan subjek kontrol (Liu QY et al., 2018).

4. Hubungan antara mRNA HMGB1, Kadar protein HMGB1, kadar reseptor TLR4 dan kadar sitokin IL6 pada TB Aktif dan Laten

Hasil penelitian ini mendapatkan adanya peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1 dan kadar protein HMGB1 diikuti dengan peningkatan kadar TLR4 dan IL6 pada TB aktif dibanding dengan TB laten. Uji korelasi mendapatkan hubungan yang bermakna $p < 0,001$ dengan korelasi yang sangat kuat antara ekspresi mRNA HMGB1 dengan kadar *soluble* protein HMGB1, korelasi antara Kadar *soluble* protein HMGB1 dengan kadar protein TLR4, korelasi Kadar HMGB1 dengan IL6, dan korelasi antara kadar protein IL6 dengan ekspresi mRNA gen HMGB1 dengan koefisien korelasi (r) masing-masing 0,874, 0,975, 0,977 dan 0,888. Hasil ini membuktikan adanya peran keterlibatan mRNA gen HMGB1 dalam memproduksi protein HMGB1, peran protein HMGB1 dalam peningkatan protein TLR4, peran protein HMGB1 dalam peningkatan IL6 dan peran protein IL6 pada peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1 pada mekanisme imunopatogenesis TB. Adanya infeksi oleh kuman MTB menyebabkan aktivasi sistem imun alami dan adaptif penderita. Sel imun alami terutama makrofag secara aktif maupun pasif akan mensekresi HMGB1 ke lingkungan ekstraseluler untuk mengaktifkan jalur signaling yang diperantarai oleh MyD88 untuk mengaktifkan faktor transkripsi dan translokasi NF κ B ke nukleus yang menginduksi pengeluaran sitokin

proinflamasi IL6 serta proses kemotaksis. Melalui ikatan dengan reseptor TLR4 maupun TLR2, protein HMGB1 akan menginduksi berbagai respons seluler dan humoral. Respons ini berupa kemotaksis makrofag, netrofil dan sel dendritik ketempat infeksi, serta pelepasan sitokin proinflamasi oleh makrofag seperti IL1, TNF α , IL 12 dan IL6. Makrofag yang teraktivasi akan mempresentasikan MTB ke limfosit T naive untuk berdiferensiasi dan berproliferasi menjadi limfosit Th1 dan Th2. Limfosit Th1 akan melepaskan IFN γ dan IL6, sedangkan limfosit Th2 akan melepaskan sitokin antiinflamasi IL10 dan TGF β . Pelepasan sitokin proinflamasi IL6 akan mengaktivasi kembali makrofag untuk memproduksi HMGB1 akibat peningkatan ekspresi mRNA gen HMGB1 (Leventhal J S et al., 2012; Lee S. A., 2014., Wu L et al., 2015., Subowo., 2014). Proses infeksi pada TB aktif bisa akibat virulensi atau banyaknya kuman MTB, maupun akibat kerusakan granuloma, yang menyebabkan lebih banyak protein HMGB1 maupun protein TLR4 yang berada pada membran sel, dilepaskan ke jaringan ekstraseluler dibanding pada TB laten.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Siri L. Feruglio dkk. Penelitian tersebut mendapatkan adanya peningkatan kadar TLR4/MD2 yang lebih tinggi pada TB aktif dibanding TB laten (Feruglio S. L., et al., 2013).

2) Nilai Ekspresi mRNA HMGB1 dan soluble protein HMGB1 sebagai acuan pemberian terapi pada TB laten yang berpotensi menjadi TB aktif.

Pedoman tatalaksana infeksi TB laten yang dikeluarkan oleh PDPI tahun 2016 menyebutkan tidak semua individu yang terinfeksi TB harus diobati terutama di negara endemis seperti Indonesia. Diperlukan pertimbangan yang seksama untuk menentukan kelompok yang perlu diobati sebagai pencegahan dengan profilaksis agar tidak menjadi TB aktif. Tata laksana TB laten bertujuan untuk mencegah progresifitas penyakit menjadi TB aktif, tatalaksana ini dapat mengurangi risiko terjadinya penyakit TB sebesar 60% (PDPI., 2016). Perubahan TB laten menjadi TB aktif disebut proses reaktivasi. Beberapa faktor dapat memicu keadaan ini salah satunya faktor risiko terinfeksi TB seperti petugas kesehatan (WHO., 2015). Transmisi TB pada orang yang kontak TB tergantung dari lamanya pajanan/kontak, intensitas pajanan, faktor batuk dan sputum penderita, serta virulensi dan karakteristik MTB (Dheda K., et al., 2010).

Penelitian ini mendapatkan terdapat rentang nilai ekspresi mRNA gen HMGB1, kadar *soluble* protein HMGB1 dan kadar protein TLR4 yang tidak termasuk dalam kelompok TB aktif maupun kelompok TB laten. Nilai rentang ekspresi mRNA gen HMGB1 yang bukan termasuk kedalam kedua kelompok tersebut yaitu antara 8,73 – 11,14 kopi/uL. Begitu pula kadar soluble protein HMGB1 terdapat rentang yang tidak termasuk kedua kelompok tersebut yaitu antara 228,36 – 1192,41 pg/mL. Serta rentang

kadar TLR4 yang tidak termasuk kedua kelompok tersebut yaitu antara 1,17 – 10,15 ng/mL. Rentang nilai ini dapat digunakan sebagai penanda adanya proses reaktivasi pada TB laten kearah TB aktif. Berbagai mediator proinflamasi berinteraksi dan berkontribusi terhadap pembentukan granuloma pada TB. Kuman MTB dalam granuloma berada dalam kondisi *dormant* selama sistem imun pejamu baik. Jika sistem imun pejamu terganggu maka kuman *dormant* akan mengalami reaktivasi (de Witt E., 2009). Pada proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif, granuloma yang pecah akan menyebabkan sel-sel imun banyak yang rusak sehingga protein HMGB1, protein TLR4 dan kuman MTB keluar ke jaringan, kemudian selanjutnya akan mengaktifasi makrofag untuk mensekresi sitokin proinflamasi IL6 sehingga kadarnya akan meningkat (Hernandez-Pando R., et al., 2015).

C. KETERBATASAN PENELITIAN

1. Penelitian ini tidak dilakukan pada kelompok orang sehat yang terpapar kuman MTB, sehingga tidak diketahui kadar HMGB1 pada orang sehat untuk membedakan dengan TB Laten.
2. Penelitian ini tidak mengukur kadar sitokin antiinflamasi IL 10, sehingga penelitian ini tidak bisa melihat kemampuan sistem imun host terhadap pengeluaran sitokin proinflamasi IL6 selama proses infeksi oleh MTB.

3. Kadar TLR4 dan IL6 sangat dipengaruhi oleh kondisi infeksi/inflamasi yang tidak diekskusi pada penelitian ini.
4. Pada penelitian ini yang diukur adalah soluble protein TLR4, sehingga tidak diketahui kadar reseptor TLR4 yang transmembran.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

A. RINGKASAN

1. Rerata ekspresi mRNA gen HMGB1 pada pasien TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten yaitu $11,49 \pm 0,86$ Kopi/uL vs $8,40 \pm 0,78$ kopi/ul dengan $p < 0,001$. Ekspresi mRNA gen HMGB1 lebih tinggi pada TB aktif (95% CI = 11,14 – 11,84 kopi/uL) dari pada TB laten (95% CI = 8,09 – 8,73 kopi/uL) .
2. Rerata kadar *soluble* protein HMGB1 pada pasien TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten yaitu $1234,87 \pm 105,2$ pg/mL vs $183,66 \pm 110,65$ pg/mL dengan $p < 0,001$. Kadar *soluble* protein HMGB1 lebih tinggi pada TB aktif (95% CI = 1192,41 – 1277,44 pg/mL) dari pada TB laten (95% CI = 138,97 – 228,36 pg/mL).
3. Rerata kadar TLR4 pada pasien TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten yaitu $10,42 \pm 0,68$ ng/mL vs $0,94 \pm 0,55$ ng/mL dengan $p < 0,001$. Kadar protein TLR4 lebih tinggi pada TB aktif (95% CI = 10,15 – 10,70 ng/mL) dari pada TB laten (95% CI = 0,72 – 1,17 ng/mL).
4. Rerata kadar IL6 pada pasien TB aktif lebih tinggi dibanding TB laten yaitu $24,32 \pm 1,31$ ng/mL vs $3,38 \pm 1,41$ ng/mL. Kadar protein IL6 lebih tinggi pada TB aktif (95% CI = 23,80 – 24,87 ng/mL) dari pada TB laten (95% CI = 2,81 – 3,96 ng/mL).
5. Semakin tinggi ekspresi mRNA gen HMGB1 semakin tinggi kadar protein HMGB1 pada infeksi tuberkulosis ($p < 0,001$ dan $r = 0,874$).

6. Semakin tinggi kadar soluble protein HMGB1 semakin tinggi kadar protein TLR4 pada infeksi tuberkulosis ($p < 0,001$ dan $r = 0,975$).
7. Semakin tinggi kadar soluble protein HMGB1 semakin tinggi kadar protein IL6 pada infeksi tuberkulosis ($p < 0,001$ dan $r = 0,977$).
8. Semakin tinggi kadar protein IL6 semakin tinggi kadar ekspresi mRNA gen HMGB1 pada infeksi tuberkulosis ($p < 0,001$ dan $r = 0,888$).

B. SIMPULAN

1. Ekspresi mRNA gen HMGB1 dan *soluble* protein HMGB1, TLR4 serta IL6 terlibat dalam proses imunopatogenesis TB paru khususnya pada TB laten dan TB aktif.
2. Ekspresi mRNA atau *soluble* protein HMGB1, kadar protein TLR4 dan kadar protein IL6 dapat dijadikan biomarker petanda proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif terutama *soluble* protein HMGB1 dan atau protein TLR4.
3. Rentang nilai kadar *soluble* protein HMGB1 228,36 – 1192,41 pg/mL dan atau kadar protein TLR4 1,17 – 10,15 ng/mL dapat dianggap sebagai penanda reaktivasi TB laten kearah TB aktif.

C. SARAN

Saran Klinik

1. Pada individu TB laten dengan hasil pemeriksaan IGRA (+) sebaiknya dilanjutkan dengan pemeriksaan kadar soluble protein HMGB1 atau dan TLR4 serum untuk menilai kemungkinan adanya proses reaktivasi TB laten menjadi TB aktif.
2. Rentang nilai kadar protein HMGB1 228,36 – 1192,41 pg/mL dan kadar protein TLR4 1,17 – 10,15 ng/mL dapat dipakai sebagai pertimbangan pemberian terapi profilaksis antituberkulosis TB laten agar tidak berlanjut menjadi TB aktif.

Saran Akademik

1. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya dengan studi prospektif dengan mengikuti perkembangan individu TB paru laten dari waktu ke waktu.
2. Perlu penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih banyak untuk mendapatkan nilai *cut off* HMGB1 yang lebih valid.

KEPUSTAKAAN

- American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention. 2006. Diagnosis Standards and classifications of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*. 161: 1376-1395.
- Amin, Z., Bahar, A. 2014. Tuberkulosis Paru. In: Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, et al, editors. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* jilid 1. 6th ed., Interna Publishing; Jakarta.
- Anderson, U., Tracey, K. J. 2011. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*. 29(1(2)): 31-4. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101323.
- Asavarut, P., Zhao, H., Gu, J., Ma, D. 2013. The role of HMGB1 in Inflammation-mediated organ injury. *Acta Pharmaceutica Sinica B. Taiwan*. 6(3): 183-188. doi: 10.1016/j.aat.2013.03.007
- Awasthi, A., Kuchroo, V. K. 2009. The yin and yang of follicular helper T cells. *Science*. 325: 953–955. DOI: 10.1126/science.1178752
- Babu, S., Anuradha, R., Kumar, N.P., George, P.J., Kumaraswami, V., Nutman, T.B. 2011. Filarial lymphatic pathology reflects augmented toll-like receptor-mediated, mitogen-activated protein kinase-mediated proinflammatory cytokine production. *Infect Immun*. 79(11): 4600 – 8. doi: [10.1128/IAI.05419-11]
- Bagian Pulmonologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2001. *Prosedur dan tindakan bidang paru dan pernapasan: Diagnostik dan Terapi*. Balai Penerbit FKUI Jakarta. hal 103-4,113-5.
- 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. *J Clin Microbiol*. 28(3) : 495-503.
- Bothamley, G.H. 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. *ERS. Journals. Ltd. Suppl*. 20: 676s-688s.
- Carpenter, S., O'Neill, L.A. 2007. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses?. *Cell Microbiol*. 9(8):1891–901.
- Center For Disease Control and Prevention. 2010. Update Guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection. United States. 59: (RR-5).

- Center for Disease Control. 2009. The Difference Between Latent TB Infection and TB Disease. Available at: www.cdc.gov/tb.
- Center for Disease Control and Prevention. 2013. Latent Tuberculosis Infection: A Guide for Primary Health Care Providers.
- Chen, Q., Guan, X., Zuo, X., Wang, J., Yin, W. 2016. The Role of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) in Pathogenesis of Kidney Diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B.China*. 6(3): 183–188.
- Cliff J. M., Kaufmann S. H., McShane H., van Helden P., O'Garra A. 2015. The Human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunological Reviews. The Medical Research*. 264: 88-102.
- Danusantoso, H. 2014. Tuberkulosis Paru. In: Suyono JY, editor. *Buku Saku Ilmu Penyakit Paru*. 2nd ed. EGC;Jakarta.
- Dahlan, M. S. 2016. *Besar Sampel Dalam Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta. hal 69-74.
- de Martino, M., Galli, L., Chiappini, E. 2014. Reflections on the immunology of Tuberculosis: will we ever unveal the skein?. *BMC Infection Disease*. 14(Suppl 1): 1-6.
- de Witt, E. 2009. Analysis of Host Determiting Factors in Susceptibility to Tuberculosis in The South African coloured Population. Dissertation. Presented for the degree of Doctor of Philosophy in Medical Biochemistry. Stellenbosch University. Nedherland. 8-10.
- Dheda, K., Booth, H., Huggett, J. F., Johnson, M. A., Zumia, A., Rook, G, A. 2005. Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. *J Infect Dis*.192: 1201-1210. <https://doi.org/10.1086/444545>
- Dheda, K., Schwander, S. K., Zhu, B., Van Zyl-smith, R., Zhang, Y. 2010. The Immunology of Tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology*. 15: 433-50.
- Dheda, K., Smit, R.Z., Badri, M., Pai, M. 2009. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: Clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr. Opin. Pulm. Med*. 15(3): 188–200. DOI: 10.1097/MCP.0b013e32832a0adc
- Ding, J., Cui, X., Liu, Q. 2017. Emerging role od HMGB1 in Lung disease: Friend or foe. *Journal of cellular and molecular medicine*. 21(6): 1046-1057. doi: 10.1111/jcmm.13048.

- Druszczynska, M., Kowalewicz-Kulbat, M., Fol, M., Włodarczyk, M., Rudnicka, W. 2012. Latent *M.tuberculosis* infection - Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prevention Strategies. Polish Journal of Microbiology. Poland. 61(1): 3-10.
- Ferguson, J.S., Weiss, J.J., Martin, J.I. 2004. Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. *Infect Immun.* 72: 2564-2573.
- Feruglio, S. L., Trosheid, M., Damas, J.K., Kvale, D., Dyrhol-Riise, A.M. 2013. Soluble marker of the Toll-like Receptor 4 Pathway differentiate between Active and Latent Tuberculosis and Are Associated with Treatment Responses. *Plos One.* 13; 8(7): 1-8.
- Fogel, N. 2015. Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberculosis.* 95(5): 527-31.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, Watt, C.J., Dye, C. 2003. Tuberculosis. *Lancet.* 362: 887-899.
- Gabay, C. 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy.* 8(Suppl 2): S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>
- Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R.E., Raviglione, M. 2015. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *N Eng J Med.* 372: 2127-35. DOI: 10.1056/NEJMra1405427
- Goletti, D., Lee, M.R., Wang, J.Y., Walter, N., Ottenhoff, T. H. M. 2018. Update on Tuberculosis biomarker: From correlate of risk, to correlate of active disease and of cure from disease. *ASPR.* 23: 455-66. Doi: 10.1111/resp.13272.
- Goodwin, G.H., Rabbani, A., Nicolas, P.H., Johns, E.W. 1997. The isolation of the high mobility group non-histone chromosomal protein HMG 14. *FEBS Lett.*80: 413-6.
- Goyot-Revol, V., Innes, J., Hackforth. S. 2006. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 173: 803-810.
- Grover, A., Taylor, J., Troudt, J., Keyser, A., Sommersted, K., Schenkel, A., et al. 2008. *Mycobacterial* infection induces the secretion of high mobility group box 1 protein. *Cellular Microbiology.* Blackwell Publishing Ltd. USA. 10; 6: 1390-1404.

- Hatta, M., Smits, H. L. 2007. Detection of *Salmonella typhi* by nested Polymerase Chain Reaction in blood, urine and stool samples. *American J. Tropical Medicine Hygiene*.76: 139- 43.
- Hernandez-Pando, R., Barrios-Payan, J., Mata-Espinosa, D., Marquina-Castillo, B., Hernandez-Ramirez, D., Botasso, O. A., et al. 2015. The Role of High Mobility Group Box 1 Protein in the Immunopathology Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Plos ONE*. 10(7): 1-14. DOI 10.1371/journal.pone.0133200
- Human High Mobility Group Box 1 (HMGB-1). 2017. Elisa Kit. LSBio. Leaflet. 1-12.
- Houben, E. N., Nguyen, L., Pieters, J. 2009. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbial*. 9: 76-85. DOI: 10.1016/j.mib.2005.12.014
- Jensen, P.A., Lambert, L.A., Iadernarco, M.F., Rene, R. 2005. Center for disease Control and Prevention. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings. *MMWR Recomm Rep*. 54(RR-17): 1-141.
- Kagan, J.C., Medzhitov, R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*. 125(5): 943–55.
- Kahwati, L. C., Feltner, C., Halpern, M., Woodell, C. L., Boland, E., Amick H. R., et al. 2016. Primary Care Screening and Treatment for Latent Tuberculosis Infection in Adult: Evidence Report and Systemic Review for the US preventive Service Task Force. *JAMA*. 316(7): 971-5.
- Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., et al. 2014. HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 40: 1-116. DOI: 10.1016/j.mam.2014.05.001
- Kardjito, T.V.M. 1997. Host defense against tuberculosis. Naskah Lengkap Seminar Nasional Tuberkulosis dan Lepra. Pusat Kedokteran Tropis Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta. hal 1- 20.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis. Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta. hal 1-20.

- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014. Petunjuk Teknis Pengendalian terpadu Tuberkulosis Resistan Obat. Dirjen Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Jakarta. Hal 67-100.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2015. Profil Kesehatan Indonesia. Jakarta. hal 161-2.
- Keyel , P. A. 2014. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine*. 69(1): 136-145. doi: 10.1016/j.cyto.2014.03.007
- Kim, S. Y., Koh, W.J., Park, H.Y., Jeon, K., Lee, S.Y., Yim, J.J., et al. 2017. Down-regulation of serum high-mobility group Box 1 protein in patients with pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease. *Tuberculosis and respiratory diseases*, Seoul. 80(2): 153-158.
- Kimura, A., Kishimoto, T. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*. 40: 1830–1835. doi: 10.1002/eji.201040391
- Kishimoto, T., Toshio, T. 2015. Interleukin 6. *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*. 1-8.
- Laudet, V., Stehelin, D., Clevers, H. 1993. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 21: 2493-501.
- Lawn, S.D., Nicol, M. P. 2011. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol*. 6(9):1067–82.
- Lee, S. A., Kwak, M. S., Kim, S., Shin, J. S. 2014. The Role of High Mobility Group Box 1 in innate Immunity. *Yonsei Med J.*, Seoul. 55(5): 1165 - 1176. doi: 10.3349/ymj.2014.55.5.1165
- Lin, P. L., Ford, C. B., Coleman, M. T., Myers, A. J., Gawenda, R., Ioerger, T., et al. 2014. Sterilization of granulomas is common in both active and latent tuberculosis despite extensive within-host variability in bacterial killing. *Nat Med.*, USA. 20(1): 1-19.
- Liu, Y., Yin, H., Zhao, M., Lu, Q. 2014. TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 47(2): 136-47. doi: 10.1007/s12016-013-8402-y.
- Liu, Q. Y., Han, F., Pan, L. P., Jia, H. Y., Li, Q., Zhang, Z. D. 2018. Inflammation responses in patients with pulmonary tuberculosis in

an intensive care unit. *Experimental and therapeutic medicine*. 15(3): 2719-2726. doi: 10.3892/etm.2018.5775.

Lui, G., Wong, C. K., Ip, M., Chu, Y. J., Yung, I. M., Cheung, C. S., et al. 2016. HMGB1/RAGE Signaling and Pro-Inflammatory Cytokine Responses in Non-HIV Adults with Active Pulmonary Tuberculosis. *PLoS one*. 11(7): e0159132. doi: 10.1371/journal.pone

Madiyono B.Sastroasmoro S,Budiman I. 2014. Perkiraan besar sampel .Dalam: Sastroasmoro S dan Ismael S(penyunting). Dasar-dasar metodologi penelitian klinis.Jakarta: CV Sagung Seto: 352-386.

Magna M., Pisetsky D. S. 2014. The Role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and Autoimmune Diseases. *Mol Med*. The Feinstein institute for Medical Research. 20: 138-46.

Magrys, A., Paluch-Oles, J., Koziol-Montewka, M., Zaborowski, T., Milanowski, J., Maciejewska, B. 2013. Evaluation of High Mobility Group Box 1 Protein Concentration in Serum of Patient with M.tuberculosis Infection. *Journal of Molecular and Cellular Immunology*.42: Issue 1.

Nicod, L. P. 2007. Immunology of Tuberculosis. *Swiss Med Wkly*. Swiss. 137: 357-62.

Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., Ghosh, S. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*. 12 (8): 695–708.

Orme, I.M., Mc Murray, D.N., Beliste, J. T. 2001. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol*. 9: 115-8.

Park J. S., Svetkauskaite D., He Q., Kim JY., Strassheim D., Ishizaka A., et al. 2004. Involvement of Toll like Receptors 2 and 4 in cellular activation by High mobility Group Box 1 Protein. *J. Biol. Chem*. The American Societyfor Biochemistry andMolecular Biology. 279(9): 7370-76. DOI: 10. 1074/jbc.M306793200.

Park J. S., Gamboni-Robertson F., He Q., Svetkauskaite D., He Q., Kim JY., et al. 2006. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol*. The American Physiological Society. 290: C917-23. DOI: 10.1152/ajpcell.00401.2005.

Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2011. Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan Tuberkulosis di Indonesia. Jakarta. PDPI: 1-55.



Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. 2016. Pedoman Tatalaksana Infeksi TB laten. Jakarta. PDPI: 1-28.

- Portou, M. J., Baker, D., Abraham, D., Tsui, J. 2015. The Innate Immune system, toll like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascular Pharmacology*. Elsevier. 71: 31-6.
- Russel, D.G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis. *Nat Rev Microbiol*. 5: 39-49. DOI: 10.1038/nrmicro1538
- Sharma SK., Mohanan S., Sharma A. 2012. Relevance of Latent TB Infection in Area High TB Prevalence. *Chest*. 142(3): 761-73.
- Shaler, C. R., Horvath, C. N., Jeyanathan, M., Xing, Z. 2013. Within the Enemy's Camp: contribution of granuloma to the dissemination, persistence and transmission Mycobacterium tuberculosis. *Frontiers in Immunology*. 4(30): 2-6.
- Sirait, N., Parwati, I., Dewi, N. S., Suraya, N. 2013. Validitas Metode Polymerase Chain Reaction GeneXpert MTB/RIF pada bahan pemeriksaan sputum untuk mendiagnosis Multidrug Resistant Tuberculosis. *Bandung: MKB*; 45(4): 234-240.
- Subowo. 2014. Respon imun dan interaksi sel-sel imunokompeten. Dalam : *Imunobiologi Edisi 3*. Sagung Seto. Jakarta: 115-361.
- Suhail A. Pathogenesis, Immunology and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis Infection. 2011. *Clinical developmental Immunology*. India. 2011: 1-11. doi:10.1155/2011/814943
- Suharti, N. 2010. *Imunologi tuberkulosis dan aplikasi diagnostiknya*. Majalah Kedokteran Andalas. Padang; 27 (2): 42-47.
- Suprabhat, M., Karmakar, S., Sinha Babu, S. P. 2016. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis*. 20(2): 193-204.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C.W., Farkas, A., Loughran, P., et al. 2010. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 190: 881-92.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Ogata, A., Kishimoto T. A. 2014. New era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Seminars in Immunology*. 26: 88–96.
- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., Van der Meer, J. W. M. 2002. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*. 5: 294-309.

- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. 1999. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 285: 248-251
- Wikanningtyas, T. A., Hatta, M., Massi, M. N., Pratiwi, I., Fachri, M., Santoso, S. S., et al. 2018. Diagnosis Spectrum of Pulmonary Tuberculosis at Islam Hospital Sukapura, Jakarta, Indonesia: A Retrospective study of 317 Cases. *J. Med. Sci.* 18(3): 143-148.
- World Health Organization (WHO). 2011. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2011. Use of tuberculosis interferon gamma release assay (IGRAs) in Low and middle income countries. Policy Statement 2011. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2015. *Global Tuberculosis Report 2015*. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2014. *Global Tuberculosis Report 2014*. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2018. *Global Tuberculosis Report 2017*. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2015. Guideline on Management of Latent Tuberculosis Infection. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2015. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control. Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2011. Use of tuberculosis interferon gamma release assay (IGRAs) in Low and middle income countries. Policy Statement 2011. Geneva.
- Wu, C., Sun, H., Wang, H., Chi, J., Liu, Q., Guo, H., et al. 2012. Evaluation of high mobility group box 1 protein as a presurgical diagnostic marker reflecting the severity of acute appendicitis. *Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 20(61): 1-6.
- Yajima T., Yagihashi A., Kameshima, H., Kobayashi, D., Furuya, D., Hirata, K., et al. 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.
- Yang, H., Tracey, K. J. 2010. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 1799(1): 149-156.

- Yanai, H., Ban, T., Taniguchi, T. 2011. Essential role of high-mobility group box proteins in nucleic acid-mediated innate immune responses. *Journal of Internal Medicine*. 270: 301- 8. DOI: 10. 1111/j.1365-2796.2011.02433.x
- Yu, Y., Tang, D., Kang, R. 2015, Oxidative stress-mediated HMGB1 biology., *Frontiers in Physiology*. Florida.6(93): 1-6.
- Zeng, J.C., Xiang, W.Y., Lin, D.Z., Zhang, J. A., Liu, G. B., Kong, B., et al., 2015. Elevated HMGB1-related interleukin-6 is associated with dynamic responses of monocytes in patients with active pulmonary tuberculosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(2): 1341-53.

Lampiran 1. Persetujuan Etik

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS HASANUDDIN FAKULTAS KEDOKTERAN RSPTN UNIVERSITAS HASANUDDIN RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu JL PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245. Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, SpGK TELP. 081241850658, 0411 5780103, Fax : 0411-581431			
REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK			
Nomor : 1007 / H4.B.4.5.31 / PP36-KOMETIK / 2017			
Tanggal: 27 November 2017			
Dengan ini Menyatakan bahwa Protokol dan Dokumen yang Berhubungan Dengan Protokol berikut ini telah mendapatkan Persetujuan Etik :			
No Protokol	UH17010820	No Sponsor	
Peneliti Utama	dr.Tri Ariguntar W,Sp.PK	Sponsor	Pribadi
Judul Peneliti	Imunopatogenesis Tuberkulosis Paru : Analisis Peran Ekspresi mRNA Gen High- Mobility Group Box 1 (HMGB-1), Soluble Protein HMGB 1,Toll Like Receptor 4 (TLR 4) dan Interleukin 6 (IL 6)		
No Versi Protokol	2	Tanggal Versi	17 November 2017
No Versi PSP	2	Tanggal Versi	17 November 2017
Tempat Penelitian	RSI Cempaka Putih, RSI Sukapura dan RSI Pondok Kopi Jakarta		
Dokumen Lain			
Jenis Review	<input type="checkbox"/> Exempted <input checked="" type="checkbox"/> Expedited <input type="checkbox"/> Fullboard Tanggal	Masa Berlaku 27 November 2017 sampai 27 November 2018	Frekuensi review lanjutan
Ketua Komisi Etik Penelitian	Nama Prof.Dr.dr. Suryani M.Sc.,Sp.GK (K)	Tanda tangan 	Tanggal
Sekretaris Komisi Etik Penelitian	Nama dr. Agussalim M.Med.,Ph.D.,Sp.GK (K)	Tanda tangan 	Tanggal

Kewajiban Peneliti Utama:

- Menyerahkan Amandemen Protokol untuk persetujuan sebelum di implementasikan
- Menyerahkan Laporan SAE ke Komisi Etik dalam 24 jam dan dilengkapi dalam 7 hari dan Laporan SUSAR dalam 72 jam setelah Peneliti Utama menerima laporan
- Menyerahkan Laporan Kemajuan (progress report) setiap 6 bulan untuk penelitian resiko tinggi dan setiap setahun untuk penelitian resiko rendah
- Menyerahkan laporan akhir setelah Penelitian berakhir
- Melaporkan penyimpangan dari prokol yang disetujui (protocol deviation / violation)
- Mematuhi semua peraturan yang ditentukan

No	Kode	Sex	Umur (thn)	Pddk	Pekerjiaan	BB (Kg)	TB (M)	IMT	Diagnosis	Tes HIV	GD (mg/dL)	BTA	GenXpert	Radiologi (Foto Thoraks)	Kadar HMGB1 serum (pg/mL)	Kadar IL6 serum (pg/mL)	Kadar TLR 4 (ng/mL)	Ekspresi gen mRNA HMGB1 (kopi/uL)	Lama Kontak (tahun)
1	(RA)	P	38	SLTA	Wiraswasta	53	1,53	22,64	TB aktif	Negatif	102	1+/1+/1+		TB aktif	1332	24,758	9,562	10,948 ± 0,211	
2	(AW)	L	24	S1	Karyawan Swasta	35	1,63	13,17	TB aktif	Negatif	98	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB Paru Dupleks	1187	23,213	10,992	11,884 ± 0,080	
3	(MAR)	L	55	SLTP	Wiraswasta	65	1,77	20,75	TB aktif	Negatif	105	2+/2+/2+		TB Paru Dupleks	1151	26,132	10,206	11,172 ± 0,098	
4	(MUB)	L	24	SLTA	Karyawan Swasta	68	1,65	24,98	TB aktif	Negatif	99	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB Paru Dextra	1245	23,9	11,207	12,586 ± 0,550	
5	(RY)	L	34	SD	Karyawan Swasta	48	1,76	15,50	TB aktif	Negatif	113	1+/1+/1+		TB Paru Dupleks	1183	22,698	9,848	10,662 ± 0,240	
6	(KH)	P	50	Tidak Sekolah	IRT	62	1,52	26,84	TB aktif	Negatif	90	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB aktif	1393	22,354	10,492	11,731 ± 0,114	
7	(ATH)	L	19	SLTA	Mahasiswa	38	1,6	14,84	TB aktif	Negatif	110	1+/1+/1+		TB Paru Dupleks	1361	24,415	11,135	11,480 ± 0,049	

8	(MY)	L	58	SLTA	Buruh	60	1,65	22,04	TB aktif	Negatif	108	1+/1+/1+		TB Paru Dextra	1350	25,789	11,493	13,047 ± 0,116
9	(YD)	L	28	SLTA	Karyawan Swasta	62	1,65	22,77	TB aktif	Negatif	104	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB aktif	1131	24,587	9,49	11,865 ± 0,191
10	(MHN)	L	55	SLTP	Wiraswasta	58	1,7	20,07	TB aktif	Negatif	120	2+/2+/2+		TB Paru Dupleks	1307	25,96	10,063	12,754 ± 0,197
11	(AK)	L	18	SLTA	Pelajar	38	12,00	16,89	TB aktif	Negatif	100	3+/3+/3+		TB aktif	1248	25,102	11,421	10,275 ± 0,105
12	(ISH)	P	29	S2	Dosen	49	1,63	18,44	TB aktif	Negatif	96	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB aktif	1106	22,183	9,347	10,317 ± 0,226
13	(BS)	L	43	D3	Pegawai Swasta	68	1,75	22,20	TB aktif	Negatif	117	1+/1+/1+		TB aktif	1154	22,869	10,849	12,039 ± 0,239
14	(MA)	L	22	SLTA	Mahasiswa	52	1,7	17,99	TB aktif	Negatif	98	(-/-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB Paru Dextra	1070	26,476	10,349	10,945 ± 0,211
15	(IS)	L	56	SLTA	Pengamen	36	1,7	12,46	TB aktif	Negatif	110	3+/3+/3+		TB Paru milier bilateral	1162	22,526	9,705	12,922 ± 0,136
16	(HR)	L	36	SLTA	Satpol PP	72	1,73	24,06	TB aktif	Negatif	103	2+/2+/2+		TB aktif	1135	26,304	11,35	11,176 ± 0,098

17	(RK)	P	33	SLTA	IRT	43	1,58	17,22	TB aktif	Negatif	90	(-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB aktif	1329	25,617	10,778	10,583 ± 0,055
18	(CH)	L	37	SLTA	Wiraswasta	58	1,7	20,07	TB aktif	Negatif	102	2+/2+/2+	Gen Expert MTB detected medium, Rif resistance not detected	TB Paru Sinistra	1087	24,93	9,419	11,655 ± 0,240
19	(SDL)	L	25	SLTA	Karyawan Swasta	50	1,66	18,14	TB aktif	Negatif	95	(+8/+8/+8)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB Paru Dextra	1345	23,556	9,92	10,899 ± 0,223
20	(MJ)	L	50	SD	Pedagang	48	1,62	18,29	TB aktif	Negatif	100	(-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB Paru Dupleks	1232	25,274	10,563	11,473 ± 0,049
21	(INW)	L	54	SLTP	Wiraswasta	65	1,7	22,49	TB aktif	Negatif	94	2+/2+/2+		TB Paru Sinistra	1167	23,385	10,921	11,036 ± 0,116
22	(FZ)	P	21	SLTA	Karyawan swasta	45	1,65	16,53	TB aktif	Negatif	110	(-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB Paru Dextra	1442	25,445	10,277	11,857 ± 0,191

23	(ASP)	L	22	SLTA	Swasta	45	1,63	16,94	TB aktif	Negatif	88	(-/-)	Gen Expert MTB detected low, Rif resistance not detected	TB Paru Dupleks	1280	24,072	10,635	12,748 ± 0,197	
24	(JPY)	L	56	SLTA	Wiraswasta	40	1,6	15,63	TB aktif	Negatif	114	(-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB Paru Dupleks	1296	23,728	11,278	10,269 ± 0,105	
25	MSH	L	57	SMP	Buruh	55	1,65	20,20	TB aktif	Negatif	116	(3+/2+/2+)		TB Paru Dupleks	1103	23,041	9,633	10,309 ± 0,226	
26	(SHT)	L	46	SLTA	Peg Swasta	65	1,68	23,03	TB aktif	Negatif	110	(-/-)	Gen Expert MTB detected very low, Rif resistance not detected	TB aktif + Efusi Pleura	1312	24,243	10,134	12,035 ± 0,239	
27	(HLS)	P	50	D3	Perawat	78	1,55	32,47	TB Laten	Negatif	92	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	76,354	4,604	1,051	9,871 ± 0,147	24
28	(EL)	P	47	D3	Perawat	58	1,55	24,14	TB Laten	Negatif	88	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	239,171	2,737	1,772	7,926 ± 0,136	27
29	(MS)	L	46	SLTA	Admin Laboratorium	73	1,64	27,14	TB Laten	Negatif	100	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	150,362	1,55	0,257	8,173 ± 0,098	23
30	(RH)	P	37	D3	Perawat	65	1,58	26,04	TB Laten	Negatif	112	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	194,766	3,925	0,69	8,593 ± 0,055	15

31	(SR)	P	46	S1	Perawat	75	1,68	26,57	TB Laten	Negatif	87	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	327,98	5,452	0,835	7,658 ± 0,240	23
32	(DM)	P	29	S1	Dokter	55	1,58	22,03	TB Laten	Negatif	90	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	51,191	3,246	1,556	8,893 ± 0,223	4
33	(STS)	P	33	D3	Perawat	52	1,63	19,57	TB Laten	Negatif	97	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	224,369	2,059	0,474	6,483 ± 0,049	11
34	(AW)	L	25	D3	Perawat	80	1,72	27,04	TB Laten	Negatif	102	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	283,575	5,113	1,267	9,042 ± 0,116	4
35	(LT)	P	53	D3	Perawat	70	1,57	28,40	TB Laten	Negatif	100	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	108,917	2,398	0,041	8,862 ± 0,191	30
36	(SY)	P	55	D3	Perawat	80	1,56	32,87	TB Laten	Negatif	95	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	372,385	1,21	0,185	7,753 ± 0,197	30
37	(FC)	L	33	S2	Dokter	98	1,65	36,00	TB Laten	Negatif	86	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	298,377	5,622	1,7	9,285 ± 0,105	4
38	(LL)	P	29	D3	Perawat	60	1,56	24,65	TB Laten	Negatif	89	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	342,782	4,264	0,546	9,111 ± 0,150	3
39	(FJ)	P	22	D3	Perawat	42	1,52	18,18	TB Laten	Negatif	92	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	17,148	1,719	1,195	8,039 ± 0,239	1
40	(KF)	L	23	D3	Perawat	46	1,65	16,90	TB Laten	Negatif	115	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	209,568	4,434	0,113	8,943 ± 0,211	2
41	(SR)	P	27	D3	Perawat	70	1,6	27,34	TB Laten	Negatif	86	tdk diperiksa	IGRA Positif	Normal	120,759	3,077	1,412	7,925 ± 0,136	5

42	(WA)	P	27	D3	Perawat	52	1,55	21,64	TB Laten	Negatif	98	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	165,163	4,095	1,845	8,173 ± 0,098	12
43	(SRS)	P	33	D3	Perawat	67	1,65	24,61	TB Laten	Negatif	103	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	61,552	2,907	0,762	8,584 ± 0,055	8
44	(FT)	P	27	D3	Perawat	87	1,5	38,67	TB Laten	Negatif	110	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	357,583	3,586	0,33	8,664 ± 0,240	3
45	(STR)	P	43	D3	Perawat	49	1,55	20,40	TB Laten	Negatif	89	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	268,774	5,282	1,628	8,892 ± 0,223	21
46	(NKS)	P	39	D3	Analisis	65	1,55	27,06	TB Laten	Negatif	93	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	91,155	1,041	0,402	9,475 ± 0,049	18
47	(MSI)	P	33	D3	Perawat	75	1,55	31,22	TB Laten	Negatif	99	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	179,965	3,755	1,484	8,036 ± 0,116	5
48	(FDT)	P	27	D3	Perawat	78	1,62	29,72	TB Laten	Negatif	85	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	105,957	2,228	0,979	6,857 ± 0,191	4
49	(ER)	P	55	D3	Perawat	65	1,56	26,71	TB Laten	Negatif	104	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	135,56	4,773	0,618	7,750 ± 0,197	25
50	(LY)	P	29	D3	Perawat	54	1,6	21,09	TB Laten	Negatif	88	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	46,751	1,38	1,34	9,271 ± 0,105	6
51	(EU)	P	41	SLTA	CS	80	13,55	32,05	TB Laten	Negatif	90	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	31,949	4,943	0,907	8,345 ± 0,226	2
52	(PWH)	P	35	D3	Analisis	45	1,5	20,00	TB Laten	Negatif	94	tdk diperik sa	IGRA Positif	Normal	313,179	2,568	1,123	8,012 ± 0,239	16