

**PENGARUH PEMBERIAN VAKSIN BCG SECARA ORAL DAN  
INTRAKUTAN TERHADAP KOMPONEN SELULER DAN HUMORAL  
PADA  
*Rattus norvegicus* GALUR WISTAR**

**Netti Suhari, Andani Eka Putra**

Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

**ABSTRAK**

Vaksinasi BCG merupakan metoda pencegahan infeksi *M. tuberculosis* dengan rentang efektivitas antara 0 – 80%. Vaksin ini bekerja dengan menginduksi sistem imunitas seluler, terutama sel limfosit T. Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi efektivitas vaksin, seperti bahan dasar, rute pemberian, penyimpanan dan lain sebagainya.

Penelitian ini dilakukan terhadap *Rattus norvegicus* galur Wistar dan bertujuan untuk menilai pengaruh rute vaksinasi BCG, per oral dan intrakutan terhadap imunitas seluler dan humoral, yang meliputi pembentukan antibodi, konsentrasi sel limfosit B, T dan penilaian kemampuan makrofag.

Pada penelitian ini didapatkan kadar antibodi kelompok intrakutan pada hari ke-10 adalah OD  $1.714 \pm 0.124$ , sedangkan kelompok oral adalah  $1.256 \pm 0.243$  dan pada kontrol kadar antibodi adalah  $0.975 \pm 0.253$  ( $p < 0.05$ ). Jumlah limfosit B pada kelompok intrakutan adalah  $4.5 \times 10^3$  sel/ml, kelompok oral  $2.6 \times 10^3$  sel/ml dan kontrol  $2.2 \times 10^3$  sel/ml ( $p < 0.05$ ). Jumlah limfosit T kelompok intrakutan adalah  $3.8 \times 10^4$  sel/ml sedangkan pada kelompok oral dan kontrol, masing-masing adalah  $1.1 \times 10^4$  sel/ml dan  $0.8 \times 10^4$  sel/ml ( $p < 0.05$ ). Kemampuan fagositosis makrofag intrakutan adalah  $62.5 \pm 6.8$  lebih tinggi dibanding kelompok oral  $48.7 \pm 5.8$  dan kontrol  $35.6 \pm 4.4$  ( $p < 0.05$ ). Fenomena yang sama ditemukan pada hari ke-20. Namun demikian tidak ditemukan perbedaan konsentrasi seluruh variabel seluler dan humoral antara hari ke-10 dan 20 ( $p > 0.05$ ).

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa vaksinasi BCG akan meningkatkan respon imunitas seluler dan humoral dan rute vaksinasi intrakutan lebih baik dibanding per oral ditinjau dari aspek respon imun.

**Kata kunci : Vaksinasi BCG, seluler, humoral, makrofag**

## PENDAHULUAN

Bacille Calmette-Guérin (BCG) merupakan vaksin yang umum digunakan untuk penyakit tuberkulosis, mulai dikembangkan pada tahun 1906 oleh Albert Calmette dan Camilla Guerin. Vaksin ini dibuat dari *Mycobacterium Bovis* yang dilemahkan dan pertama kali diberikan secara oral pada tahun 1921 pada bayi yang baru lahir dengan ibu yang meninggal akibat TB Paru. Dalam perkembangannya, vaksin ini mampu melindungi bayi hingga dewasa. Dalam rangka pencegahan terhadap penyakit tuberkulosis, WHO merekomendasikan pemberian vaksin BCG yang diberikan saat lahir atau beberapa saat setelah lahir. Pada tahun 2002, imunisasi BCG telah dilakukan lebih dari 90% negara di dunia. Diperkirakan 100.5 juta anak (76%) dari total 132.8 juta anak telah mendapatkan imunisasi BCG ((Doherti & Andersen, 2005; Murray *et al.*, 2006; Brennan, 2005; Gray, 2004) .

Hingga saat ini diperkirakan terdapat 8 juta kasus baru tuberkulosis dan 2 – 3 juta diantaranya akan menyebabkan kematian, diperkirakan sepertiga dari populasi dunia sudah diinfeksi oleh *Mycobacterium tuberculosis*, kuman penyebab tuberkulosis, walaupun tidak semua individu yang diinfeksi akan menunjukkan perkembangan penyakit. Sekitar 90-95% individu yang terinfeksi terlihat tidak menunjukkan perkembangan penyakit sepanjang hidupnya. Di kawasan Asia Tenggara, data WHO menunjukkan bahwa tuberkulosis membunuh 2000 jiwa tiap harinya atau sekitar 40% dari kasus Tuberkulosis di dunia, dalam hal ini Indonesia menduduki urutan ke-3 setelah India dan Cina. Indonesia merupakan negara dengan kasus TB terbesar ketiga di dunia, dengan 539.000 kasus baru dan 101.000 kematian tiap tahunnya. Insiden kasus Basil Tahan Asam (BTA) positif diperkirakan 110 per 100.000 penduduk (WHO, 2005; Depkes RI, 2006).

Efektivitas proteksi vaksin BCG bervariasi antara 0 – 80%. Pola proteksi seperti ini menunjukkan bahwa vaksin ini masih mempunyai banyak kelemahan, dan dibutuhkan perbaikan segera, namun permasalahan utama adalah masih sedikitnya informasi tentang mekanisme proteksi terhadap tuberkulosis. Perkembangan imunologi yang masih dipegang hingga saat sekarang ini adalah adanya respon imun seluler yang diperantarai oleh Interferon (IFN)  $\gamma$  dan Interleukin 2 (IL-2) yang dihasilkan oleh sel CD4<sup>+</sup> Limfosit T, baik pada hewan model maupun pada manusia. Dalam proses selanjutnya, IFN  $\gamma$  ini akan mengaktifasi makrofag.

Sebaliknya, peran sel T CD8 masih belum banyak diketahui (gambar 4), hal yang jelas adalah adanya antigen *M. tuberculosis* pada sitoplasma APC akan dipresentasikan melalui jalur MHC kelas I pada sel T CD8. Dalam hal ini antigen difragmentasi oleh proteasome menjadi peptida-peptida dan selanjutnya ditranspor ke dalam RE. Disini peptida berikatan dengan MHC kelas I, membentuk kompleks dan ditranspor ke permukaan sel untuk dipresentasikan. Mekanisme ini dapat dihambat oleh *Brefeldin A*, sebagai inhibitor transpor RE – Apparatus golgi (Canaday *et al.*, 1999).

Pada makrofag, *Mycobacterium* yang berada di dalam fagosom tidak dipecah menjadi peptida, dalam hal ini adanya antigen terlarut di dalam

sitoplasma menyebabkan induksi MHC klas I, sehingga pada keadaan ini tidak terdapat peran proteasome dan sirkulasi RE. Ini merupakan salah satu mekanisme alternatif dalam presentasi antigen pada MHC klas I (Canaday *et al.*, 1999).

Peranan antibodi terhadap infeksi *M. tuberculosis* secara umum sangat kecil, mengingat infeksi bakteri ini bersifat intraseluler sehingga fungsi opsonin, netralisasi atau aktivasi komplemen yang umumnya diperantarai oleh antibodi terhadap bakteri ekstraseluler atau toksin menjadi sulit dilakukan. Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa antibodi dapat meningkatkan kemampuan fungsional makrofag dalam membunuh bakteri *M. tuberculosis*. Dalam perkembangannya, penelitian antibodi lebih banyak ditujukan untuk kepentingan diagnostik (Bothamley, 1995; Daniel & Debanc, 1987).

Berkaitan dengan latar belakang di atas, dilakukan penelitian secara *in vivo* dengan menggunakan binatang percobaan untuk melihat sejauh mana pengaruh rute pemberian vaksin BCG terhadap sistem imunitas humoral, seluler dan aktivitas fungsional makrofag. Rute pemberian pada penelitian ini dibedakan atas pemberian vaksin BCG secara intrakutan dan oral.

#### **Rumusan Masalah**

BCG merupakan merupakan bahan protektif yang diberikan pada anak untuk mencegah terhadinya infeksi *M. Tuberculosis*. Mekanisme kerja bahan ini adalah melalui sistem imunitas seluler dan humoral, walaupun secara konseptual imunitas seluler dianggap lebih berperan.  $CD4^+$  dan  $CD8^+$  limfosit T merupakan sel-sel imunitas seluler yang dianggap berperan besar dalam pencegahan infeksi *M. Tuberculosis*.

Hal yang menjadi permasalahan pada penelitian ini adalah

- Bagaimana pengaruh pemberian vaksin BCG per oral terhadap perkembangan sel limfosit T, limfosit B, produksi antibodi dan kemampuan makrofag
- Bagaimana pengaruh pemberian vaksin BCG secara intrakutan terhadap perkembangan sel limfosit T, limfosit B, produksi antibodi dan kemampuan makrofag
- Manakah rute pemberian vaksin BCG yang lebih baik, oral atau intrakutan terhadap sistem imunitas tubuh

#### **Hipotesis penelitian**

Pada penelitian ini terdapat 2 (dua) hipotesis, yaitu terdapat pengaruh vaksin BCG terhadap peningkatan respon imunitas seluler dan humoral dan pemberian vaksin BCG intrakutan lebih baik dibanding oral ditinjau dari aspek selular dan humoral.

## Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh rute pemberian vaksin BCG secara oral dan intrakutan terhadap sistem imunitas tubuh

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan dengan menggunakan desain *post test only control group design* yang dilaksanakan di bagian mikrobiologi FK.Unand selama 4 (empat) bulan, pada bulan Mei – Agustus 2008.

## Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah tikus jantan galur wistar, sehat, umur  $\pm$  4 bulan dengan berat badan 180 – 220 gr yang dibagi atas 3 (tiga) kelompok dengan masing-masing 10 ekor tikus .

Kelompok I (K-1).	: Kontrol
Kelompok II (K-2)	: Perlakuan dengan BCG secara intrakutan 100 ul
Kelompok III (K-3)	: Perlakuan dengan BCG secara oral 100 ul

## Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah sentrifus, konikal, Mikroskop, bilik hitung, mikropipet, plat Elisa, Elisa Reader, objek glass, larutan Ficoll – Isopaque, Buffer Posfat, darah tikus, tikus galur wistar, monoklonal antibodi terhadap CD4 dan CD8, larutan PBS,.

## Cara Kerja

### Persiapan hewan Coba dan vaksinasi

Penelitian ini menggunakan tikus putih jantan galur wistar sebanyak 30 ekor yang terlebih dahulu telah diadaptasikan selama 5 hari. Tikus dikelompokkan secara acak ke dalam 3 (tiga) kelompok, tiap kelompok terdiri dari 10 (sepuluh) ekor tikus. Pemberian makanan dan minuman sesuai kebutuhan. Dua puluh ekor tikus diberikan vaksinasi dengan vaksin BCG dengan dosis 100 ul, yang terdiri dari 10 ekor per oral dan 10 ekor secara intrakutan pada paha belakang bagian dalam.

### Pemeriksaan limfosit B dan T

Campuran darah dengan antikoagulan (50 unit/ml heparin) sebanyak 2.5 atau 5 ml, defibrinasi dengan penambahan glass beads dan dikocok beberapa menit. Sampel disentrifus dengan kecepatan 1300 rpm, 15 menit dan diambil buffy coat. Setelah itu dimasukkan dalam tabung dan diencerkan dengan PBS 1 : 1. Setelah itu disapkan percoll gradient (dencerkan percoll 100% menjadi 85%, 75%, 50% dan 40%). Dimasukkan percoll gradient pada tabung reaksi 15 ml secara beturut-turut, masing-masing lapis 2 ml konsentrasi 100%, 85%, 75%, 50% dan 40%).Masukan lapisan buffy coat dengan pelan pada gradient tersebut, sentrifus 1300 rpm selama 15 menit. Lalu dikumpulkan lapisan tipis sel B pada interfase

85/75%. Dicuci 2 x dengan PBS, sentrifus 800 g dan 400 g pada pencucian terakhir. Ditentukan konsentrasi sel B. Kemudian dilakukan cara yang sama untuk sel T pada interfase 85/100%.

### **Isolasi makrofag intraperitoneal**

#### **Cara Kerja**

5 ml cairan RPMI dingin disuntikkan secara intraperitoneal, ditunggu 3 – 5 menit. Diaspirasi cairan yang ada dengan menggunakan spuit injeksi, diupayakan mencit dalam posisi miring sehingga pengambilan cairan lebih mudah dilakukan. Aspirat yang didapat dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifus pada 1200 rpm, 4°C, selama 10 menit. Supernatatan dibuang dan tambahkan 3 ml medium RPMI Komplit pada pellet yang didapatkan jumlah sel yang didapat dihitung dengan menggunakan hemositometer, diresuspensi hingga didapatkan kepadatan  $2.5 \times 10^6$  sel/ml. Suspensi sel yang didapat dikultur pada sumuran microplate 24 yang telah diberi coverslip bulat, setiap sumuran 200 ul ( $5 \times 10^5$  sel/ml). Diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 37°C selama 30 menit kemudian ditambahkan medium RPMI komplit 1 ml/sumuran. Inkubasi dilanjutkan hingga 24 jam

#### **Pemeriksaan antibodi**

Menggunakan ELISA terhadap serum dari semua kelompok tikus (intrakutan, oral dan kontrol), yang dilakukan pada hari ke-10 dan 20. Sumur pada plat ELISA dilapisi dengan 100 µl antigen (PPD). Konsentrasi larutan yang digunakan adalah 2 – 10 µl/ml dalam 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5. Plat diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 40C. Plat dicuci sebanyak 3 kali dengan 0,15 M NaCl, 0,02 M NaHPO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20, pH 7,2 (PBS-T) yang khusus digunakan sebagai larutan pencuci dalam ELISA. Sebanyak 100 µl sampel antibodi yang diencerkan 200 kali yang telah dilarutkan dalam PBS-T ditambahkan ke setiap lubang dari plat yang dibuat duplo. Plat diinkubasikan selama satu sampai dua jam pada suhu ruangan di atas *shaker*. Plat dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS-T. Sebanyak 100 µl antibodi yang telah dilabel (*IgG conjugate HRP, rabbit anti-rat*) dimasukkan ke dalam lubang plat dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu ruangan di atas *shaker* dan ditambahkan substrat peroksidase, ABTS, dan sitrat buffer. Plat dibaca dengan *ELISA Reader* panjang gelombang 415 nm.

#### **Uji fagositosis**

##### **Cara Kerja**

Makrofag yang sudah dikultur dicuci di dalam plat kultur 24 sumuran dengan RPMI 2 x (konsentrasi makrofag adalah  $1 \times 10^6$  sel/sumuran). Ditambahkan suspensi *M. tuberculosis* dalam PBS sebanyak 1 ml dengan kepadatan  $2.5 \times 10^7$  sel/ml (sehingga didapatkan perbandingan makrofag dan bakteri 1 : 25). Dilakukan prosedur yang sama terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Uji dilakukan masing-masing 3 sumuran untuk setiap makrofag (triplo). Inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>, 37°C selama 30 menit. Dicuci coverslip dengan PBS 3 kali untuk

membuang bakteri yang tidak terfagosit. Dikeringkan pada suhu ruangan. Difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Dibuang metanol dan ditunggu sampai kering. Dilakukan pewarnaan dengan giemsa 20% selama 30 menit. Dicuci dengan aquadest. Lalu diangkat dari sumuran dan dikeringkan pada suhu ruangan. Diperiksa dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Dihitung persentase fagositosis per 200 makrofag dan jumlah rata-rata bakteri intrasitoplasmik per 50 makrofag.

#### **Pengumpulan dan analisa data**

Hasil yang didapat dianalisa dengan menggunakan program SPSS 11.0. Evaluasi awal dan akhir menggunakan t test berpasangan dan perbandingan antara CD4 dan CD8 dilakukan dengan independent t test.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

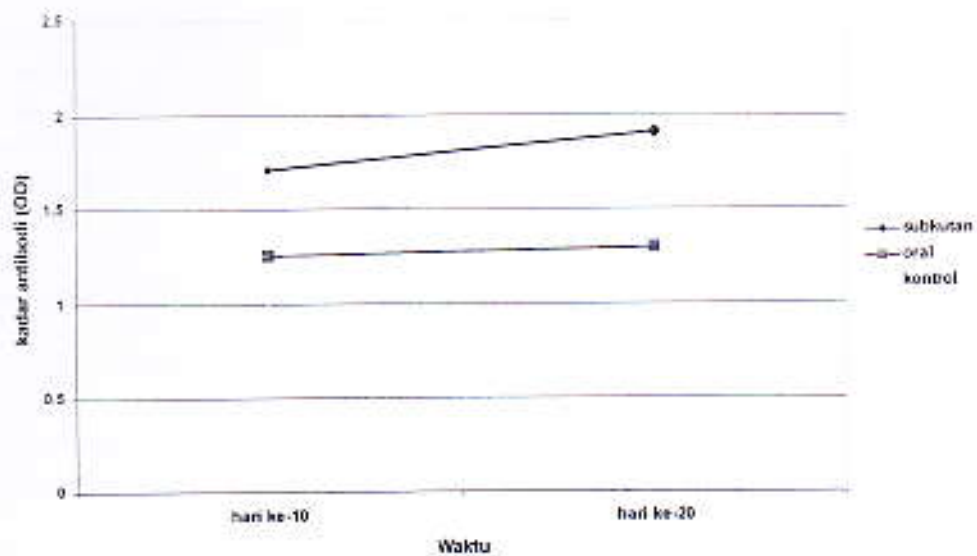
### **Hasil**

Penelitian dilaksanakan dari Mei – Agustus 2008 terhadap 30 ekor tikus putih, *Rattus norvegicus* galur wistar. Seluruh tikus adalah betina dengan berat rata-rata  $175.4 \pm 11.8$  gram. Hewan coba ditempatkan dalam 3 (tiga) kandang terpisah untuk masing-masing kelompok, yaitu kelompok intrakutan, oral dan kontrol. Makanan dan minuman diberikan sesuai kebutuhan. Tidak ada hewan coba yang mati saat penelitian atau memperlihatkan tanda-tanda sakit.

#### *Respon imunitas humoral*

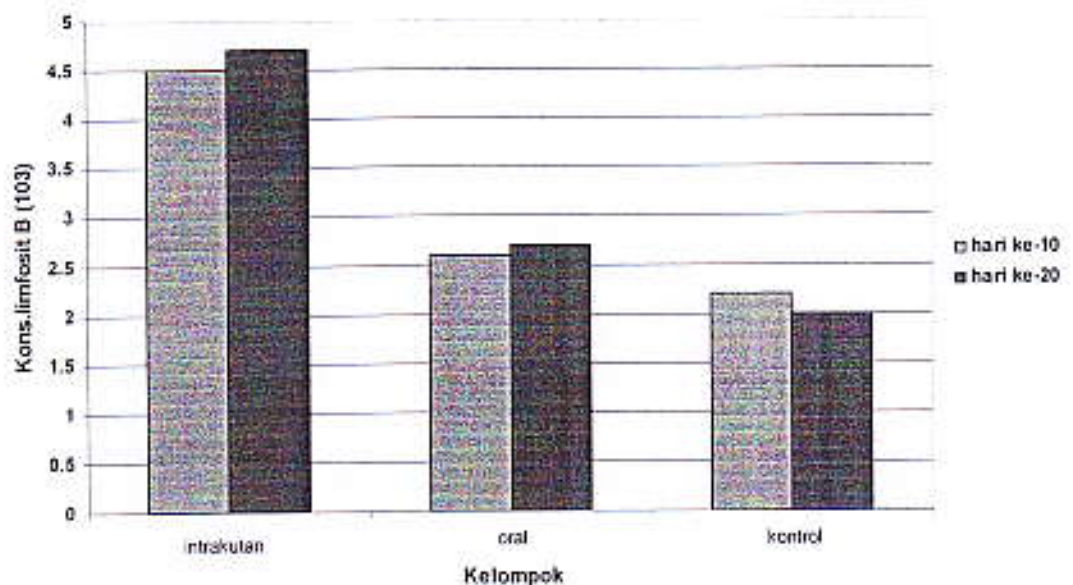
Penilaian respon imun humoral didasarkan pada pembentukan antibodi, dalam hal ini konsentrasi Imunoglobulin G dan jumlah isolasi sel limfosit B dari hewan coba. Pada penelitian ini ditemukan pada hari ke-10 paska vaksinasi rerata kadar antibodi dari kelompok yang diberikan vaksin BCG secara intrakutan adalah  $OD\ 1.714 \pm 0.124$ , sedangkan kelompok oral adalah  $1.256 \pm 0.243$  dan pada kontrol kadar antibodi adalah  $0.975 \pm 0.253$ . Secara statistik ditemukan perbedaan kadar ketiga kelompok ( $p < 0.05$ ). Perbedaan terbesar ditemukan antara kelompok intrakutan dengan oral dan kontrol ( $p < 0.05$ ), sedangkan pada kelompok oral dan kontrol tidak ditemukan perbedaan yang bermakna ( $p > 0.05$ ). (Gambar 5.1).

Pada hari ke-20 rerata antibodi pada kelompok BCG intrakutan meningkat menjadi  $1.912 \pm 0.325$ , namun demikian secara statistik perbedaan ini tidak bermakna ( $p > 0.05$ ). Keadaan yang hampir sama juga ditemukan pada kelompok BCG oral, dimana kadar meningkat menjadi  $1.293 \pm 0.144$  ( $p > 0.05$ ) (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. Kadar antibodi (IgG) (OD) dari ketiga kelompok hewan coba ( $p = 0.000$ ). Pemberian melalui intrakutan memperlihatkan kadar yang lebih tinggi dibanding oral ( $p=0.006$ ) dan kontrol ( $p = 0.000$ ). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara pemberian oral dengan kelompok kontrol ( $p = 0.081$ ).

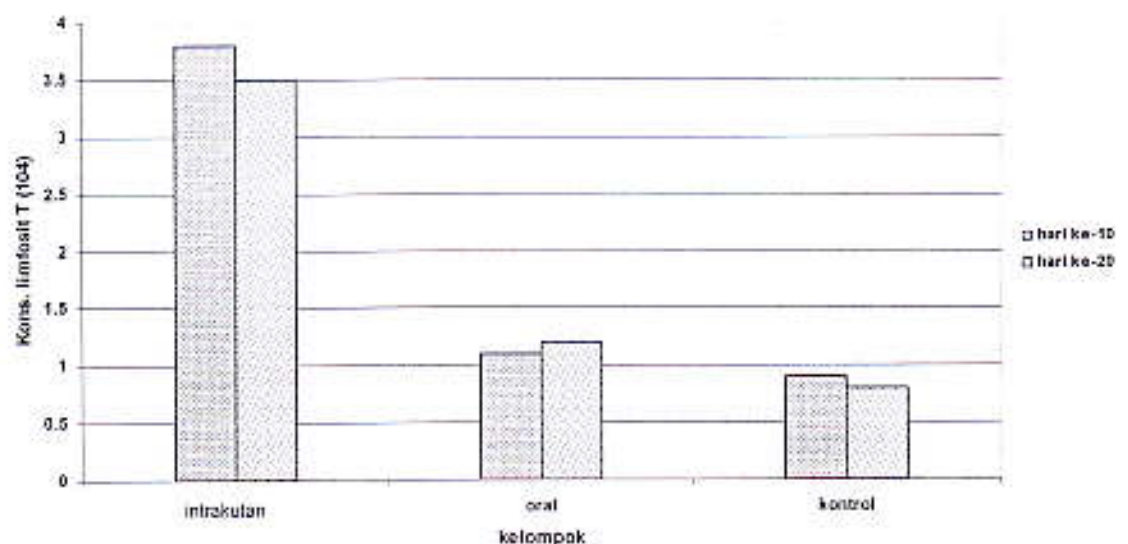
Analisis dengan ficoll gradient hari ke-10 memperlihatkan bahwa konsentrasi sel Limfosit B tertinggi ditemukan pada kelompok intrakutan, yaitu  $4.5 \times 10^3$  sel/ml. Jumlah ini berbeda secara bermakna dengan yang ditemukan pada pada kelompok oral,  $2.6 \times 10^3$  sel/ml dan kontrol  $2.2 \times 10^3$  sel/ml. Pada pemeriksaan hari ke-20 tidak ditemukan perubahan konsentrasi limfosit B dibandingkan dengan hari ke-10, baik pada kelompok oral dan intrakutan (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Konsentrasi limfosit B dari ketiga kelompok hewan coba ( $p = 0.000$ ). Pemberian melalui intrakutan memperlihatkan kadar yang lebih tinggi dibanding oral ( $p=0.000$ ) dan kontrol ( $p = 0.000$ ). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara pemberian oral dengan kelompok kontrol ( $p = 0.137$ ). Tidak terdapat perbedaan konsentrasi limfosit B antara hari ke-10 dan 20 pada ketiga kelompok ( $p > 0.05$ ).

### Respon imunitas seluler

Isolasi sel limfosit T dilakukan dengan ficoll gradient pada interfase 85/100%. Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi limfosit T pada kelompok hewan coba yang mendapatkan vaksin BCG secara intrakutan lebih besar dibanding dengan kelompok oral dan kontrol. Pada kelompok intrakutan didapatkan konsentrasi limfosit T  $3.8 \times 10^4$  sel/ml sedangkan pada kelompok oral dan kontrol, masing-masing adalah  $1.1 \times 10^4$  sel/ml dan  $0.8$  sel/ml. Analisis statistik dengan one way Anova memperlihatkan bahwa ditemukan perbedaan yang signifikan antara konsentrasi limfosit T pada kelompok intrakutan dengan kelompok oral ( $p < 0.05$ ) dan kontrol ( $p < 0.05$ ), namun tidak ada perbedaan antara kelompok oral dengan kontrol ( $p > 0.05$ ). (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Konsentrasi limfosit T dari ketiga kelompok hewan coba ( $p = 0.000$ ). Pemberian melalui intrakutan memperlihatkan kadar yang lebih tinggi dibanding oral ( $p=0.000$ ) dan kontrol ( $p = 0.000$ ). Tidak ada perbedaan yang bermakna antara pemberian oral dengan kelompok kontrol ( $p = 0.385$ ). Tidak ditemukan perbedaan konsentrasi limfosit T pada hari ke-10 dan ke-20 pada ketiga kelompok.

### Respon makrofag

Respon makrofag didasarkan pada kemampuan fagositosis dan jumlah partikel lateks yang difagosit oleh makrofag. Pada penelitian ini didapatkan kemampuan fagositosis makrofag yang diisolasi dari intraperitoneal ketiga kelompok berbeda secara bermakna, baik pada minggu ke-10 maupun ke-20 ( $p < 0.05$ ). Kemampuan fagositosis makrofag kelompok intrakutan adalah  $62.5 \pm 6.8$  lebih tinggi dibanding kelompok oral  $48.7 \pm 5.8$  dan kontrol  $35.6 \pm 4.4$  pada



minggu ke-10 dan pada minggu ke-20 meningkat menjadi  $67.8 \pm 10.8$  pada intrakutan,  $55.3 \pm 7.2$  oral dan  $34.7$  pada kelompok kontrol. Namun demikian tidak ditemukan perbedaan yang bermakna antara kemampuan fagosit makrofag hari ke-10 dengan ke-20 pada kelompok intrakutan dan oral ( $p > 0.05$ ).

Rerata jumlah partikel lateks yang difagosit oleh makrofag ketiga kelompok juga tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0.05$ ). Pada kelompok intrakutan ditemukan jumlah partikel yang difagosit adalah  $6.3 \pm 1.4$ , kelompok oral adalah  $5.6 \pm 2.1$  dan kontrol  $4.7 \pm 2.3$ . (tabel 4.1).

**Tabel 4.1. Rerata kemampuan fagositosis makrofag dan jumlah partikel lateks yang difagosit oleh makrofag pada kelompok intrakutan, oral dan kontrol.**

Kelompok	Fagositosis (%)		Jumlah fagosit	
	Hari ke-10	Hari ke-20	Hari ke-10	Hari ke-20
Intrakutan	$62.5 \pm 6.8$	$67.8 \pm 10.8$	$6.3 \pm 1.4$	$6.2 \pm 1.5$
Oral	$48.7 \pm 5.8$	$55.3 \pm 7.2$	$5.6 \pm 2.1$	$5.3 \pm 1.7$
Kontrol	$35.6 \pm 4.4$	$34.7 \pm 5.1$	$4.7 \pm 2.3$	$4.2 \pm 2.5$

### Pembahasan

Penelitian ini pada dasarnya untuk membandingkan pengaruh vaksinasi BCG terhadap tikus putih *Rattus Norvegicus* galur Wistar dari aspek imunologis, yaitu komponen imunitas humoral, seluler dan fungsi makrofag. Komponen humoral dinilai berdasarkan konsentrasi limfosit B dan kadar antibodi dalam bentuk OD, komponen seluler dalam bentuk jumlah limfosit T dan fungsi makrofag didasarkan pada kemampuan fagositosis makrofag.

Peranan antibodi terhadap infeksi *M. tuberculosis* masih belum banyak diketahui, pemahaman yang diterima saat ini bahwa antibodi menggambarkan tingkat daya tahan seseorang terhadap Tuberkulosis dan dijadikan sebagai salah satu sarana diagnostik Tuberkulosis (Daniel & Debane, 1987; Bothamley, 1995; Singh et al., 2003).

Pada penelitian ini terlihat bahwa hewan coba yang mendapat vaksin BCG intrakutan mempunyai kadar antibodi yang lebih tinggi terhadap PPD *M. tuberculosis* dibandingkan dengan vaksin yang diberikan secara oral ( $p < 0.05$ ). Sebaliknya hampir tidak ditemukan perbedaan kadar antibodi hewan coba yang mendapat vaksinasi BCG oral dengan kelompok kontrol. Keadaan ini kemungkinan berkaitan dengan 2 (dua) hal, yaitu pertama adanya kerusakan vaksin saat melewati saluran cerna sehingga induksi sistem imun lebih kecil, kedua berkaitan dengan antibodi yang terbentuk pada pemberian vaksin per oral lebih dominan pada mukosa yang terdapat di dalam darah.

Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa hampir tidak ditemukan perubahan OD antibodi antara hari ke-10 dan ke-20 post vaksinasi, baik secara oral maupun intrakutan. Keadaan ini berkaitan dengan periode aktivasi sistem imunitas adaptif yang terjadi pada hari ke-7 dan setelah hari ke-15 biasanya pembentukan antibodi mulai menunjukkan penurunan. Hal ini menyebabkan pemeriksaan antibodi hari ke-20 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding hari ke-10, walaupun kadar hari ke-20 lebih tinggi pada kedua metode vaksinasi.

Pada penelitian ini ditemukan jumlah sel Limfosit T terlihat lebih tinggi dibanding sel limfosit B, baik pada hari ke-10 maupun hari ke-20 ( $p < 0.05$ ). Hal ini terlihat berkorelasi dengan banyak penelitian lain yang menjelaskan bahwa pada bakteri intraseluler, seperti *M. tuberculosis*, peranan sel limfosit T, terutama subtipe sel Th akan menunjukkan pola yang lebih dominan. Sel T selanjutnya berdiferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2. Sitokin Th1, seperti IFN- $\gamma$  akan menginduksi aktivasi makrofag. Peranan sel limfosit B yang berakhir dengan pembentukan antibodi umumnya lebih berperan pada bakteri ekstraseluler atau toksin. Antibodi dapat bekerja melalui berbagai mekanisme seperti netralisasi, opsonisasi, aktivasi komplemen, dan ADCC (antibody dependent cell mediated cytotoxicity) (Kauffman, 2002; Cowley & Elkins, 2003).

Jumlah sel limfosit T pada hari ke-20 post vaksinasi secara umum memperlihatkan peningkatan, namun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan limfosit T yang ditemukan pada hari ke-10 ( $p > 0.05$ ). Keadaan ini diduga berkaitan dengan periodisasi perkembangan sistem imunitas adaptif, dimana terjadi peningkatan yang cepat hingga hari ke-15 selanjutnya berkembang lebih lambat.

Pemeriksaan makrofag hari ke-10 dan 20 pada dasarnya menggambarkan makrofag yang sudah teraktivasi oleh sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1. Makrofag ini akan aktif untuk membunuh basil tuberkulosis melalui peningkatan kemampuan fagositosis produksi ROI, RNI dan mekanisme apoptosis (van Crovel et al., 2000; Choi et al., Collazo et al., 1998; Cowley et al., 2003).

Pada penelitian ini terlihat peningkatan aktivitas makrofag hari ke-20 dibanding hari ke-10 pada hewan coba yang mendapat vaksin BCG baik secara intrakutan maupun oral, walaupun secara statistik peningkatan tersebut tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0.05$ ). Pola peningkatan makrofag ini pada dasarnya hampir sama dengan pola peningkatan sel limfosit T, dimana subtipe sel Th1 akan menghasilkan sitokin aktivasi makrofag.

Secara keseluruhan dapat dilihat bahwa pemberian vaksin BCG secara intrakutan terlihat lebih baik dibanding dengan pemberian per oral berdasarkan produksi antibodi, aktivitas limfosit B, aktivitas limfosit T dan kemampuan fagositosis makrofag. Fenomena ini pada dasarnya sedikit berbeda dengan teori imunitas mukosa yang dikembangkan oleh beberapa peneliti akhir-akhir ini. Chen dkk (2004) dan Williams dkk (2000) memperlihatkan induksi mukosa pada pemberian vaksin BCG akan memberikan efek proteksi yang lebih baik dibanding dengan pemberian secara intrakutan (Chen et al., 2004; Williams et al., 2000).

Sejumlah Mitrucker dkk (2007) memperlihatkan bahwa pemberian vaksin BCG secara intragastrik (ig) memberikan efek proteksi yang lebih baik terhadap infeksi *M. tuberculosis* pada paru, limfa dan hati dibandingkan pemberian secara intravena (iv) dilihat dari aspek pertumbuhan bakteri dan produksi IFN- $\gamma$ . Perbedaan penelitian ini dengan Mitrucker kemungkinan terkait dengan cara pemberian vaksin BCG, dimana Mitrucker memberikan langsung dengan sonde sebaliknya penelitian ini hanya memberikan per oral biasa disamping hewan coba yang juga berbeda (Mitrucker et al., 2007)

### **Kesimpulan**

Pada penelitian ini dapat disarankan hal berikut :

1. Pemberian vaksin BCG secara oral akan meningkatkan respon imunitas tubuh dilihat dari aspek sel limfosit B, T, pembentukan antibodi dan kemampuan makrofag
2. Pemberian vaksin BCG secara intrakutan akan meningkatkan respon imunitas tubuh dilihat dari aspek sel limfosit B, T, pembentukan antibodi dan kemampuan makrofag
3. Pemberian vaksin BCG secara intrakutan lebih baik dibanding pemberian per oral ditinjau dari respon imunitas tubuh

### **Saran**

Pada penelitian ini kami sarankan hal berikut, yaitu :

1. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh rute vaksinasi terhadap respon imunitas tubuh dan pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* dengan sampel yang lebih besar
2. Perlu dilakukan kajian yang membandingkan vaksinasi BCG dengan vaksin sub unit atau vaksin lain terhadap *M. tuberculosis* secara in vivo.

## DAFTAR PUSTAKA

- Boom, H.W., 2007. New TB vaccines: is there a requirement for CD8<sup>+</sup> T cells?. *The J.Clin.Invest.* 117 : 2092 – 4.
- Bothamley, L. Tuberculin testing before BCG vaccination. *BMJ.* 2003 :327 : 923-4.
- Bothamley, G.H. 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J Suppl.* 95 : 676s-688s.
- Brennan, M., 2005. The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis.* 8 : 7 – 12.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D and Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis complex*. *PNAS.* 99 : 3684–3689
- Canaday, D.H., Ziebold, C., Noss, E.H., Chervenak, K.A., Harding, C.V., and Boom, W.H., 1999. Activation of Human CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> Cells by *Mycobacterium tuberculosis* Via an Alternate Class I MHC Antigen-Processing Pathway. *J. Immunol.* 162: 372–379
- Chen, L., Wang, L., Zganiacz, A and Xing, Z., 2004. Single Intranasal Mucosal *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination Confers Improved Protection Compared to Subcutaneous Vaccination against Pulmonary Tuberculosis. *Infect.Immun.* 72 : 238–246.
- Choi, H.S., Rai, P.R., Chu, H.W., Cool, C and Chan, E.D., 2002. Analysis of Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Expression in Human Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166 : 178–186
- Collazo, E.L., Hortelano, S., Rojas, A and Bosca, L., 1998. Triggering of Peritoneal Macrophages with IFN- $\alpha/\beta$  Attenuates the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Through a Decrease in NF- $\kappa$ B Activation. *The J. Immunol.* 160: 2889–2895
- Cowley, S.C and Elkins, K.E., 2003. CD4<sup>+</sup> T Cells Mediate IFN- $\gamma$  Independent Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection Both In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* 171: 4689–4699
- Daniel TM dan Debanne SM. 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* 135: 1137-51
- Departemen Kesehatan RI., 2006. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis di Indonesia. Depkes RI.Jakarta.
- Doherti, M.T and Andersen, P., 2005. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress. *Clin.Microbiol. Rev.* 18 (4) : 687–702
- Gray, J.W., 2004. Childhood tuberculosis and its early diagnosis. *Clin. Biochem.* 37: 450 – 455.
- Gold, J.A., Hoshino, Y., Tanaka, N., Rom, W.N., Raju, B., Condos, R and Weiden, M.D., 2004. Surfactant Protein A Modulates the Inflammatory Response in Macrophages during Tuberculosis. *Infect. Immun.* 72: 645 – 650.
- Jawetz, Mednic, JL. Adelberg, EA. 2002. Review medical microbiologi kedokteran. EGC. Jakarta. .

- Kaufman, S.H.E., 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann.Rheum. Dis.* 61 (2) : 54 – 8.
- Kipnis, A.P.J., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, G.M., Diefenbach, A., Raulet, D.H., Turner, J dan Orme, I.M., 2003. NK Cells Respond to Pulmonary Infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but Play a Minimal Role in Protection. *The J. Immunol.* 171: 6039–6045
- Lazarevic, V and Flynn, J.A., 2002. CD8<sup>+</sup> T Cells in Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 1116–1121
- Martin, C., 2005. The dream of a vaccine against Tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J.* 26: 162–167
- Mittrucker, H.W., Steinhoff, U., Kohler, A., Krause, M., Lazar, D., Mex, P., Miekley, D and Kaufmann, S.H.E., 2007. Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *PNAS.* 104: 12434 – 12439
- Murray, R.A., Mansoor, N., Harbacheuski, R., Soler, J., Davids, V., Soares, A., Hawkridge, A., Hussey, G.D., Maecker, H., Kaplan, G and Hanekom, W.A., 2006. Bacillus Calmette Guerin Vaccination of Human Newborns Induces a Specific, Functional CD8<sup>+</sup> T Cell Response. *J. Immunol.* 177: 5647–5651.
- Robinson, N., Wolke, M., Ernestus, K and Plum, G., 2007. *Mycobacterial* Gene Involved in Synthesis of an Outer Cell Envelope Lipid Is a Key Factor in Prevention of Fagosome Maturation. *Infect. Immun.* 75: 581–591.
- Sambandamurthy, V.K., Derrick, S.C., Jalapathy, K.V., Chen, B., Russell, R.G., Morris, S.L and Jacobs Jr, W.R., 2005. Long-Term Protection against Tuberculosis following Vaccination with a Severely Attenuated Double Lysine and Pantothenate Auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. immun.* 73: 1196–1203.
- Singh, K.K., Dong, Y., Hinds, L., 2003. Combined use of serum and urinary antibody for diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* : 188: 371-7
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H.M and Meer, J.W.M, 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin.Microbiol. Rev.* 15: 294 – 309.
- Williams, A., Davies, A., Marsh, P.D., Chambers, M.A and Hewinson, R.G., 2000. Comparison of the Protective Efficacy of Bacille Calmette-Gue'rin Vaccination against Aerosol Challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* *Clin Infect Dis.* 30 (suppl): S299 – S301.
- WHO., 2005. Global Tuberculosis Control; Surveillance, Planning, Financing. WHO. Geneva.