



Otovaksin sebagai terapi alternatif infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Autovaccine as an alternative therapy for Mycobacterium tuberculosis infection in Rat (Rattus norvegicus)

Praseno¹, Nurrokhman¹, Istiana Fiatiningsih²

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta

²Student S1 Faculty of Medicine GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta

KEYWORDS *M. tuberculosis; autogenous vaccine; Rattus norvegicus; alternative medicine*

ABSTRACT *Tuberculosis (TB) is still an important public health problem, especially in developing countries such as Indonesia. Efforts have been made to overcome the problem, however, number of cases is still high. This is due to various factors which might affect the development of the disease. Increasing number of resistant strains against antimycobacterial drugs is one of the major factors. Therefore, alternative method to control TB is needed.*

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of autogenous vaccine on healing process of infection caused by Mycobacterium tuberculosis in rats. Eighteen Wistar rats (Rattus norvegicus) were infected with 10⁹ colony forming unit of M. tuberculosis subcutaneously. One week after infection, the rats were divided randomly into 2 groups, first group were treated with autogenous vaccine and the other were left untreated (control group). Autogenous vaccine was given subcutaneously with the dose of 10⁸ cfu/0,1 ml every 7 days 3 times. Subcutaneous nodules were evaluated every 3 days and weight gain was evaluated 3 times. Laboratory examinations were done, including acid fast bacilli stain, histopathological feature and serologic test.

The result showed that recovery of subcutaneous nodules in autovaccine treated group of rats was faster than that of untreated control group. Acid fast bacilli staining showed that the number of micobacteria found in the lung, liver, spleen and kidney of autovaccine treated group were much lower than those found in the control group. Histopathology features showed that lymphocytes infiltration in the lung and other organs was heavier in the control group than that of treated group. In conclusion, animal study on rats showed that autogenous vaccine had effective therapeutic effect on healing process for M. tuberculosis infection.

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit yang sudah dikenal sejak dahulu kala (Tanjung dan Puteh, 1997). Hal ini terbukti dari beberapa mumi di Mesir yang menunjukkan tanda-tanda infeksi tuberkulosis paru selama hidup mereka (Braunwald, 1999). Walaupun sudah lama ditemukan, penyakit ini masih tetap merupakan masalah utama kesehatan masyarakat, terutama di negara-negara yang sedang berkembang (WHO, 1974). Penelitian WHO menyatakan bahwa sekitar 1,9 milyar penduduk dunia telah menderita TB, ini berarti kira-kira sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Sarah dan WHO, 1998). Di Asia Tenggara, data WHO menunjukkan bahwa TB membunuh sekitar 2000 jiwa setiap hari dan sekitar 40 persen kasus TB dunia berada di kawasan ini, sedangkan Indonesia merupakan negara dengan populasi penderita TB terbanyak ke tiga setelah Cina

dan India (WHO, 2004). Bahkan untuk negara-negara maju sekalipun, yang pada mulanya kasus TB telah menurun, belakangan ini meningkat sehingga TB disebut sebagai *reemerging disease* (Sumanto, 2004).

Permasalahan usaha pemberantasan TB semakin kompleks karena waktu pengobatan yang cukup lama dan biaya mahal, ketidakteraturan berobat, putus berobat, kombinasi obat yang kurang memadai dan kombinasi yang berlebihan. Kasus TB yang sering kambuh menyebabkan timbulnya strain

Correspondence:

Dr. Praseno, SpMK., Department of Mycrobiology, Faculty of Medicine GADJAH MADA UNIVERSITY, Yogyakarta, Jalan Kesehatan, Sekip, Yogyakarta 55281, Telephone 0274-902458, Facsimile 0274-581876.

yang resisten terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) (Tulak, 1997). Resistensi ganda terhadap OAT, terutama rifampisin dan isoniazid, menambah masalah pengendalian TB dan peningkatan strain mikobakteria yang memiliki resistensi ganda ini telah menjadi masalah program pengendalian TB di seluruh dunia (WHO, 2004).

Ide pengembangan pengobatan alternatif untuk mengatasi kegagalan pengobatan TB terhadap OAT mulai dipikirkan. Salah satu alternatif tersebut adalah dengan cara meningkatkan aktivitas sistem imun melalui pemberian otovaksin. Otovaksin merupakan vaksin yang dibuat dari bakteri yang diisolasi dari pasien dan diberikan sebagai terapi pada pasien yang sama (Lennet, *et al*, 1980). Otovaksin ini akan menginduksi sistem imun secara spesifik terhadap bakteri yang menginfeksi, disamping dapat mengatasi kasus resistensi *M. tuberculosis* terhadap OAT. Otovaksin juga diharapkan dapat memperpendek waktu pengobatan. Meskipun demikian terapi dengan otovaksin ini tidak disarankan untuk mengganti obat anti tuberkulosis yang ada. Otovaksin mungkin dapat menjadi pendamping OAT untuk lebih mempercepat penyembuhan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek otovaksin sebagai terapi alternatif dalam proses penyembuhan infeksi *M. tuberculosis* pada tikus.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bakteri dan otovaksin: Isolat *M. tuberculosis* yang diperoleh dari pasien dibiakkan pada medium Loewenstein-Jensen dan diinkubasikan pada temperatur 37° C. Setelah kira-kira 3 minggu, koloni dipanen dan disuspensikan dalam NaCl fisiologis hingga diperoleh suspensi yang homogen dengan cara penambahan butiran kaca dan pengocokan dengan *flash mixer*. Suspensi kemudian disentrifus. Endapan kuman yang diperoleh diresuspensikan dengan NaCl sehingga didapatkan kepadatan kuman kira-kira 10⁹cfu/0,3 ml. Sebagian suspensi digunakan untuk menginfeksi, dan sisanya digunakan sebagai otovaksin. Otovaksin dibuat dengan penambahan formalin pada suspensi kuman sampai konsentrasi akhir 10%, setelah 24 jam suspensi kuman dicuci kemudian diresuspensi dengan NaCl fisiologis sampai kepadatan 10⁸ cfu/0,1 ml.

Tikus: Digunakan 18 ekor tikus Wistar spesies *Rattus norvegicus* dengan berat badan 150-250 gram berumur 2½-3 bulan.

Infeksi: Semua tikus dicukur bulunya pada punggung bagian belakang sehingga kulit terlihat

jas. Masing-masing tikus diinfeksi dengan suspensi *M. tuberculosis* 10⁹ cfu/0,3 ml secara subkutan pada punggung tersebut.

Terapi: Terapi dimulai 1 minggu setelah infeksi. Tikus yang terinfeksi dibagi menjadi 2 kelompok; kelompok I mendapat terapi otovaksin, kelompok II tidak diterapi dan berlaku sebagai kelompok kontrol. Otovaksin diberikan dengan dosis 10⁸ cfu/0,1 ml secara subkutan setiap 7 hari sekali sebanyak 3 kali pemberian.

Evaluasi: Pengamatan terhadap nodul subkutan dilakukan setiap 3 hari sekali dan dicatat sampai hilangnya nodul. Berat badan dievaluasi sebanyak 3 kali setelah terapi. Pembedahan dilakukan dalam 3 tahap evaluasi. Setiap tahap pembedahan dilakukan (1) pemeriksaan BTA untuk masing-masing organ paru, hepar, dan lien-ginjal, (2) pemeriksaan serologi. Sedangkan pemeriksaan histopatologi dilakukan pada tahap evaluasi akhir terhadap organ paru dan hepar.

HASIL

Pengamatan nodul subkutan

Nodul subkutan kelompok kontrol dan kelompok otovaksin dievaluasi secara bertahap hingga nodul akhirnya menghilang (tidak teraba). Rata-rata hilangnya nodul subkutan pada tiap kelompok dapat dilihat pada Tabel 1.

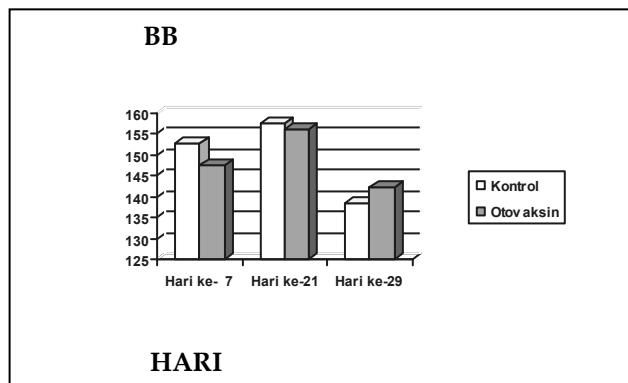
Hasil pengamatan menunjukkan nodul subkutan pada kedua kelompok telah timbul pada hari ke-4 setelah infeksi. Kemudian nodul ini akan mengecil, semakin berkurang setiap hari dan akhirnya menghilang. Kelompok otovaksin menunjukkan proses penyembuhan nodul lebih cepat dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok otovaksin nodul mulai menghilang pada hari ke-15 dan kelompok kontrol pada hari ke-21. Secara keseluruhan, rata-rata hari hilangnya nodul kelompok otovaksin (25,33 hari) juga relatif lebih cepat dibandingkan kelompok kontrol (27,11 hari). Berdasarkan analisis statistik menggunakan *student t test* perbedaan lama waktu penyembuhan ini tidak bermakna.

Tabel 1. Lama hilangnya nodul subkutan

Hari ke	Jumlah nodul subkutan yang hilang	
	Kontrol	Otovaksin
15		1
18	-	-
21	2	1
24	2	2
27	1	3
30	2	2
33	2	
Rata-rata(hari)	27,11	25,33

Pengamatan berat badan (BB)

Pengukuran berat badan dilakukan 3 kali evaluasi, yaitu hari ke-7, 21, dan 29 setelah infeksi. Rata-rata BB tiap kelompok dapat dilihat pada Gambar 1. Dari pengamatan diagram dapat dilihat bahwa kelompok kontrol dan otovaksin tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Kedua kelompok mula-mula mengalami peningkatan BB kemudian mengalami penurunan BB. Pada evaluasi pertama kelompok otovaksin memiliki rata-rata BB (149,54 g) lebih rendah dari kelompok kontrol (152,86 g). Kemudian pada evaluasi II kelompok otovaksin menunjukkan peningkatan berat badan (8,09 g) lebih besar dari kontrol (4,42 g). Dan pada evaluasi III, penurunan BB kelompok kontrol (18,61) lebih besar dari kelompok otovaksin (13,02 g).



Gambar 1. Diagram Rata-rata Berat Badan Tikus yang Terinfeksi *M. tuberculosis*

Berat badan tikus yang diinfeksi pada kedua kelompok mula-mula mengalami peningkatan berat badan kemudian pada evaluasi ketiga mengalami penurunan berat badan.

Pemeriksaan BTA

Pemeriksaan BTA dilakukan secara bertahap, yaitu pada hari ke-25, 60, dan 72 setelah infeksi untuk mengevaluasi proses perjalanan infeksi. Kemudian dari hasil evaluasi tersebut, dilakukan pemeriksaan

rinci pada hari ke-72. Hasil pemeriksaan BTA pada hari ke-72 dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata Hitung BTA per 100 Sel pada Evaluasi Pemeriksaan Hari ke-72 Organ Paru, Hepar, Lien-Ginjal

Kelompok	Paru	Hepar	Lien-Ginjal
Kontrol n=3	GF : 40,67 U : 10	GF : 31 U : 0	GF : 17,67 U : 1
Otovaksin n=3	GF : 21,67 U : 0	GF : 19 U : 0	GF : 25,33 U : 0

Keterangan : GF=Granuler-Fragmen; U=Utuh

Pemeriksaan histopatologi

Pemeriksaan histopatologi dilakukan pada hari ke-72 setelah infeksi pada organ paru dan hepar. Data hasil pemeriksaan histologis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan histopatologi organ paru dan hepar hari ke-72 setelah infeksi

Organ	Kelompok	Lim-fosit	Tuber-kel	Lang-hans	Hiali-nisasi
Paru	Kontrol	++++	++++	+	+++
	Otovaksin	++	++	+	++
Hepar	Kontrol	++	+	-	+
	Otovaksin	+	-	-	+

Keterangan :

- ++++ = jumlah limfosit yang menginfiltrasi jaringan sangat banyak.
- +++ = jumlah limfosit yang menginfiltrasi banyak
- ++ = jumlah limfosit sedang
- + = jumlah limfosit sedikit.

Pemeriksaan serologi

Evaluasi pemeriksaan serologi dilakukan pada hari ke-25, 60, dan 72 setelah infeksi. Tabel rata-rata titer antibodi terhadap TB dapat dilihat pada Tabel 5. Titer antibodi kelompok kontrol sangat rendah dibandingkan otovaksin. Pada evaluasi hari ke-25 dan 60, titer antibodi kelompok otovaksin menunjukkan nilai titer yang cukup tinggi dibanding kontrol. Sedangkan pada hari ke-72, titer antibodi kelompok otovaksin mengalami penurunan hingga setara titer antibodi kontrol.

Tabel 5. Rata-rata titer antibodi terhadap *M. tuberculosis* hari ke-25, 60, dan 72 setelah infeksi

Kelompok	Rata-rata Titer Antibodi		
	Hari ke-25	Hari ke-60	Hari ke-72
Kontrol	1/20	1/10	1/10
Otovaksin	1/640	1/640	1/10

PEMBAHASAN

Respon penderita tuberkulosis terhadap basil tuberkulosis mempunyai spektrum yang luas. Pada penderita dengan ketahanan tubuh normal, respon ketahanan tubuhnya sempurna, terjadilah respon berupa radang granulomatosis di mana hampir semua kuman TB dapat dilokalisir, difagosit dan akhirnya dieliminasi. Sebaliknya pada penderita yang tidak mempunyai ketahanan tubuh, atau yang mengalami gangguan hambatan pengangkutan ketahanan tubuh, atau yang mengalami penekanan ketahanan tubuh mengakibatkan makrofag tidak berdaya memusnahkan kuman secara tuntas (Kabat, 2000), sehingga timbul manifestasi klinis. Kunci yang menjadi patogenesis *M. tuberculosis* adalah kemampuannya dalam menghindari mekanisme pertahanan tubuh hospes antara lain proses antimikrobal oleh makrofag dan respon hipersensitivitas tipe lambat/*elayed Type Hypersensitivity* serta mampu bereplikasi intraseluler sehingga sistem imun tubuh tidak mudah terstimulasi untuk mengeliminasi basil tersebut (Boyd, 1995). Keadaan ini tercermin dengan banyaknya basil-basil TB dalam tuberkel yang tidak secara lengkap tereliminasi sehingga basil tersebut dapat hidup di dalam makrofag dan siap reaktivasi kembali apabila imunitas tubuh buruk. Oleh karena itu, diperlukan induksi terhadap sistem imun tubuh agar meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag secara efektif dalam mengeliminasi basil TB dan juga respon imun humoral dan seluler lainnya.

Otovaksin sebagai salah satu alternatif yang digunakan dalam menginduksi sistem imun secara spesifik. Otovaksin akan memberikan sifat antigenik spesifik seperti basil TB yang menginfeksi dan akan membangkitkan imunitas yang efektif sehingga terbentuk antibodi, yang cukup berpotensi pada imunitas humoral atau menginduksi imunitas seluler yang poten, dan sel-sel memori (Subowo, 1993).

Pada penelitian ini efek otovaksin telah ditunjukkan dengan penyembuhan nodul subkutan pada tikus yang lebih cepat dari pada kelompok kontrol. Reaksi hipersensitivitas lambat pada kulit dimulai dengan kontak individu terhadap basil TB. Limfosit T CD4⁺ akan mengenali antigen basil TB yang berasosiasi dengan molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II pada permukaan makrofag yang menelan mikobakteria tersebut. Sensitisasi sel T CD4⁺ akan menyebabkan pelepasan limfokin yang berfungsi sebagai faktor aktivasi makrofag dan faktor kemotaktik terhadap sel-sel netrofil, monosit dan sel radang lain untuk mengeliminasi basil TB.

Meskipun terjadi peningkatan dan penurunan berat badan pada kedua kelompok tikus, tetapi tampaknya tidak terdapat perbedaan yang berarti di antara kelompok kontrol dan otovaksin. Alasan mengapa tidak terdapat perbedaan yang berarti ini tidak jelas, mungkin karena tikus masih relatif muda dan sedang dalam masa pertumbuhan. Penelitian Di RS Dr. Sardjito menunjukkan juga tidak terdapat perbedaan bermakna dari pengaruh pengobatan terhadap peningkatan berat badan penderita TB pada anak (Fitriyati, 1998).

Distribusi BTA pada paru, hati, lien dan ginjal memperlihatkan jumlah BTA yang lebih dominan pada paru. Hal ini disebabkan paru merupakan organ utama untuk penyebaran basil TB secara limfohematogen (Setyawan, 1998). Bentuk BTA yang berupa fragmen kemungkinan merupakan hasil proses fagositosis dan destruksi bakteri oleh sistem imun.

Rata-rata hitung BTA kelompok otovaksin yang lebih sedikit dibanding kontrol dan tidak ditemukannya basil TB utuh pada kelompok otovaksin menunjukkan derajat penyembuhan/eliminasi basil TB yang lebih baik.

Gambaran histopatologi organ paru kelompok otovaksin menunjukkan jumlah limfosit, tuberkel dan hialinisasi/fibrosis yang lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol. Tuberkulosis merupakan penyakit radang granulomatosa kronik. Suatu granuloma secara mikroskopik terdiri dari timbunan histiosit yang kemudian berubah menjadi sel-sel epiteloid yang dikelilingi oleh limfosit dan sel plasma. Sel Langhans sering dijumpai di bagian tepi dan merupakan persatuan beberapa sel epiteloid (Asalgaff, 1995). Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan proses penyembuhan yang lebih nyata dibanding kelompok kontrol. Dari gambaran histopatologi kedua kelompok tikus tidak ditemukan nekrosis perkejuan di tengah fokus lesi. Hal ini kemungkinan karena proses infeksi yang belum berlangsung cukup lama. Gambaran radang granulomatosa pada hepar menunjukkan derajat infeksi yang lebih ringan dari pada paru, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok otovaksin.

Pemeriksaan serologi menunjukkan bahwa titer antibodi meningkat hanya pada awal proses infeksi. Pada proses selanjutnya titer antibodi menurun pada kedua kelompok tikus. Pada penyakit tuberkulosis sistem imunitas seluler lebih berperan dalam mengeliminasi bakteri penyebab (Handayani, 2000). Produksi antibodi spesifik tampaknya hanya berlangsung singkat dan kemungkinan perannya dalam proses penyembuhan sangat minimal. Hal ini menjadi alasan bahwa pemeriksaan serologi untuk

TB memiliki sensitivitas yang rendah dan umumnya tidak dipakai untuk menunjang diagnosis (Rintiswati dkk, 1997). Pemeriksaan serologi untuk TB umumnya hanya memberi hasil positif untuk kasus-kasus TB yang sangat aktif (Andriasari, dkk., 2000). Hal ini mungkin disebabkan oleh banyaknya bakteri yang terdapat ekstraselular sehingga sistem imun terpapar dengan *M. tuberculosis* secara lebih intensif.

Keuntungan otovaksin adalah frekuensi pemberian yang lebih jarang, sedangkan kerugiannya adalah bahwa perlu waktu cukup lama untuk mengisolasi dan menumbuhkan bakteri untuk preparasi otovaksin sehingga mulainya terapi tertunda.

KESIMPULAN

Otovaksin menunjukkan efek terapi terhadap infeksi *M. tuberculosis* pada tikus yang ditunjukkan dengan gambaran proses penyembuhan infeksi yang lebih cepat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat FK UGM yang telah mendanai penelitian serta kepada Bagian Mikrobiologi FK UGM yang telah memberi kesempatan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

KEPUSTAKAAN

Alsagaff JH, Sandika W (editor). 1995. Sistem Pernapasan: Tuberculosis. *Buku Ajar Patologi II*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Andriasari DS, Sutoyo DSK, Ikhsan M, Jusuf A, Mangunegoro H, Ariawan I, Mulyati D 2000. Peran Uji Serologis ELISA Kp 90 M. tuberculosis terhadap IgA dalam Diagnosis dan Evaluasi Respon Pengobatan TB Paru di RSUP Persahabatan. *Jurnal Respirologi Indonesia*.; 20(4):138-144
- Boyd RF 1995. *Basic Medical Microbiology*. 5th Edition. Little, Brown, and Company (Inc). USA.
- Braunwald 1999 *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th Edition. Vol. 1. The Mc Graw Hill Company, Inc.
- Fitriyati Y 1998. *Pengaruh Pengobatan terhadap Peningkatan Berat Badan pada Penderita Tuberculosis Anak di RS Dr Sardjito*. Laporan Skripsi FK-UGM.
- Handayani S 2002. Respon Imunitas Seluler pada Infeksi Tuberculosis Paru. *Cermin Dunia Kedokteran*.; 137:33-6
- Kabat 2000. Immunopatogenesis Tuberculosis Milier. *Jurnal Respirologi Indonesia*.;20(4):161-6
- Lennet EH, Ballos A, Hausler WJ, Shadomi HJ 1980. *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd ed. Washington.
- Rintiswati N, Praseno, Saleh S 1997. Pemeriksaan Serologik Menggunakan Antigen Lipoarabinomannan untuk Diagnosis TB Paru. *Berkala Ilmu Kedokteran*.; 29(3):114-8
- Setyawan S 1998. Penyakit Infeksi: Tuberculosis. *Patologi*. Bagian Patologi Anatomi FK UI.
- Sarah H 1998. WHO. Zona Panas Tuberculosis. *Medika*.; 1:68
- Subowo 1993. Imunoterapi. *Imunologi Klinik*. Penerbit Angkasa Bandung.
- Sumanto S 2004. Deteksi M. Tuberculosis yang Resisten Obat Menggunakan Metode Molekuler. *Majalah Kedokteran Atmajaya*, 3(2):117.
- Tanjung A, Puteh AG 1997. Masalah Resistensi Kuman Tuberculosis Paru Beberapa Hal yang Perlu Mendapat Perhatian. *Berkala Ilmu Kedokteran*.;20(2):123-9
- Tulak A 1997. Peranan Ofloksasin pada Pengobatan Multi Drug Resistant TBC (MDR-TB). *Jurnal Respirologi Indonesia*.;17(1):59-63
- WHO 1974. *WHO Expert Committee on Tuberculosis*. Ninth Report. Geneva.
- WHO 2004. Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance-DRS. Annual Report No. 3. WHO. Geneva.