

# Distribusi Serotipe Dengue Di Surabaya Tahun 2021

*by Aryati Aryati*

---

**Submission date:** 19-Jul-2021 12:05PM (UTC+0800)

**Submission ID:** 1621395313

**File name:** Distribusi\_Serotipe\_Dengue\_Di\_Surabaya\_Tahun\_2021.pdf (924.72K)

**Word count:** 2543

**Character count:** 14943

## 8 **DISTRIBUSI SEROTIPE DENGUE DI SURABAYA TAHUN 2012**

*(Dengue Serotype Distribution in Surabaya in the Year 2012)*

Aryati<sup>1,2</sup>, Puspa Wardhani<sup>1,2</sup>, Benediktus Yohan<sup>3</sup>, Eduardus Bimo Aksono H<sup>2</sup>, R. Tedjo Sasmono<sup>3</sup>

### ABSTRACT

The characteristics of epidemic dengue often presented as periods of hyperendemicity or as the co-circulation of multiple dengue serotypes. Surabaya is an endemic city for Dengue virus (DENV) transmission. Previous study of DENV distribution in 2008-2009 revealed the predominance of DENV-2. DENV serotypes distribution is known to be dynamic and serotype predominance may change through time. This study aims to determine and follow the circulation of DENV serotype in Surabaya in 2012. We recruited 154 dengue-suspected patients attending Dr. Soetomo Hospital during February until August 2012. Dengue cases were confirmed by IgG and IgM serology tests and NS1 antigen detection. Serologically-positive samples were further analyzed using two-steps reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and viruses were isolated by propagation in C6/36 mosquito cell line. Seventy one cases (46.1%) were detected as DENV positive infection. Serotyping revealed that 61 samples have monotypic infection with one of all four of DENV serotypes and 10 samples have mix-infections. Overall serotyping result observed the predominance of DENV-1 (60.56%). Our result revealed the circulation of all four serotypes of DENV and the presence of serotype exchange in Surabaya in 2012. Annual change of predominant serotype and the presence of multiple infections may play an important role in the transmission of dengue infection. This information is valuable to dengue surveillance in the region. Therefore, the laboratory diagnosis of DENV serotype should be routinely performed to follow the dynamic of dengue disease.

**Key words:** Dengue, serotypes, Surabaya, 2012

### ABSTRAK

Ciri epidemiologis penyebaran penyakit dengue sering ditandai dengan terjadinya hiperendemisitas atau kemunculan beragam serotipe dengue secara bersamaan. Surabaya merupakan kota endemis untuk infeksi virus dengue. Penelitian terdahulu pada tahun 2005-2009 menunjukkan dominasi virus dengue DEN-2. Dominasi serotipe virus dengue di suatu tempat adalah dinamis dan pergantian dominasi terjadi sepanjang waktu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menentukan peredaran serotipe dengue di Surabaya pada tahun 2012. Sejumlah 154 sampel demam dengue (DD) dan demam berdarah dengue (DBD) dikumpulkan mulai bulan Februari sampai Agustus 2012 di RSUD Dr Soetomo Surabaya. Kasus dengue dideteksi secara serologi dengan pemeriksaan antibodi IgG dan IgM antidengue dan antigen NS1 ELISA dari Panbio. Sampel hasil positif dilanjutkan dianalisa dengan reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) untuk menentukan serotipe dengue. Sampel tersebut juga dikultur untuk mengisolasi virus di sel nyamuk C6/36. Dari sampel yang diperiksa, didapatkan sebanyak 71 sampel (46,10%) positif. Dari 71 sampel, 61 di antaranya terinfeksi serotipe tunggal dengan berbagai serotipe yang berbeda namun didominasi oleh DEN-1. Sedangkan 10 sampel terdeteksi dengan infeksi ganda. Hasil serotyping menunjukkan terjadinya pergeseran serotipe virus dengue. Keseluruhan hasil di atas menunjukkan bahwa keempat serotipe virus dengue dijumpai di Surabaya. Perubahan dominasi serotipe serta keberadaan infeksi ganda setiap tahun memegang peran penting dari penyebaran infeksi. Keterangan ini sangat bermanfaat untuk tatanan dan diagnosis laboratorik serotipe dengue sehingga distribusi serotipe tersebut sebaiknya diteliti secara berkala.

**Kata kunci:** Dengue, serotipe, Surabaya, 2012

### PENDAHULUAN

Selama beberapa dasawarsa, infeksi virus dengue merupakan salah satu penyebab utama kesakitan dan kematian di negara tropis dan subtropis di seluruh dunia. Virus dengue yang merupakan anggota famili *Flaviviridae*, beredar dalam empat (4) macam serotipe yang berbeda yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4.

Keempat serotipe ini dapat menyebabkan infeksi primer maupun sekunder. Infeksi primer dapat menyebabkan manifestasi demam dengue (DD), sedangkan infeksi sekunder dapat mengancam jiwa dengan manifestasi demam berdarah dengue (DBD) dengan gejala syok demamnya.<sup>1</sup> Di Indonesia pada tahun 2007 dilaporkan terdapat 150.000 kasus yang merupakan laporan kasus tertinggi dibandingkan dengan tahun sebelumnya.

<sup>1</sup> Bagian Patologi Klinik FK Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya. E-mail: dr\_aryati@yahoo.com

<sup>2</sup> Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya

<sup>3</sup> Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69 Jakarta 10430

Angka kejadian DBD di Jawa Timur tahun 2008 sebanyak 16.589 kasus dengan akibat 165 orang meninggal, sedangkan di Surabaya sebanyak 2.145 kasus yang berakibat 10 orang meninggal.<sup>2</sup>

Pendekatan epidemiologi molekuler banyak dikembangkan untuk mencari berbagai faktor yang diperkirakan menjadi penyebab terkait peningkatan prevalensi infeksi virus dengue di dunia. Penentuan serotipe menunjukkan adanya ragam genetik yang berbeda di dalamnya. Sekuensing virus dengue dapat mengungkap adanya ragam galur di dalam serotipe yang digolongkan ke dalam kelompok yang berbeda secara genetik yang disebut genotipe. Perbedaan nukleotida menyebabkan ragam dalam sifat biologis dan antigenitasnya.<sup>3,4</sup>

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui dan melihat gambaran serotipe yang beredar di Surabaya. Dengan mengetahui serotipe apa saja yang beredar dapat dibandingkan dengan telitian terdahulu, sehingga dapat diperkirakan ada/tidak ada-nya pergeseran serotipe virus dengue di Surabaya.

## METODE

### Pengambilan sampel dan pemeriksaan laboratorium

Pengambilan sampel DD dan DBD dilakukan di Unit Pelaksana Fungsional (UPF) Ilmu Kesehatan Anak dan UPF Ilmu Penyakit Dalam di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya mulai bulan Februari hingga Agustus 2012. Diagnosis DD dan DBD ditetapkan berdasarkan patokan diagnosis WHO 1997.<sup>1</sup> Pemeriksaan serologis dilakukan terhadap sampel serum menggunakan uji *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk mendeteksi keberadaan IgM dan IgG spesifik dengue (*Focus Diagnostic*) serta deteksi antigen NS1 dengue (Panbio). Pasien dengan serum sampel positif terhadap salah satu dari uji di atas diminta untuk berpartisipasi dalam penelitian setelah memberikan persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*). Pemeriksaan serologis dilakukan di Laboratorium Dengue *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, sedangkan pemeriksaan secara molekuler dan isolasi virus menggunakan metode kultur dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.

### Ekstraksi *Ribonucleic Acid* (RNA) virus dengue

RNA virus dengue diekstraksi dari sampel serum atau supernatan kultur virus menggunakan perangkat ekstraksi QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) dengan cara kerja sesuai petunjuk dari pembuat kit.

12

### Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) untuk deteksi dan penentuan serotipe virus dengue

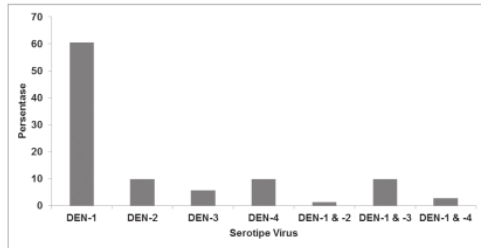
Pemeriksaan RT-PCR ditujukan untuk mendeteksi keberadaan asam nukleat virus dengue dalam sampel serta menentukan serotipe virus dengue yang dikenal dengan istilah *serotyping*. Deteksi dan *serotyping* virus dengue dilakukan menggunakan metode RT-PCR dua langkah dan primer spesifik dengue yang dimodifikasi dari metode Lanciotti, dkk. (1992) dan Harris, dkk. (1998).<sup>5,6</sup> RNA virus dengue merupakan RNA untai tunggal *positive-sense*. Pada langkah pertama dari reaksi RT-PCR, RNA hasil ekstraksi akan diubah menjadi *complementary Deoxyribonucleic Acid* (cDNA) menggunakan enzim *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) dan primer D2 yang menarget sekuen genom virus yang lestari/*conserved* untuk keempat serotipe. Pada langkah kedua, cDNA yang terbentuk akan menjadi cetakan pada reaksi PCR untuk deteksi virus dengue menggunakan enzim *Taq Polymerase* (Roche) dan sepasang primer D1 dan D2. Reaksi positif ditandai dengan keberadaan pita DNA berukuran 511 bp pada elektroforesis gel agarosa. Sampel dengan reaksi PCR positif kemudian dianalisis lebih lanjut untuk penentuan serotipe menggunakan metode *multiplex-nested* PCR. Pada reaksi ini digunakan primer *forward* D1 dan empat primer *reverse* yang spesifik untuk empat serotipe virus dengue, yaitu TS1, TS2, TS3, dan DEN4. Penentuan serotipe virus dengue dilakukan berdasarkan ukuran pita DNA yang terbentuk setelah visualisasi pada elektroforesis gel agarosa, yaitu 482 bp untuk DEN-1, 119 bp untuk DEN-2, 290 bp untuk DEN-3, dan 389 bp untuk DEN-4.<sup>5,6</sup> Pada pelaksanaan reaksi deteksi dan penentuan serotipe, selalu disertakan pembandingan positif untuk setiap serotipe berupa RNA yang diekstraksi dari supernatan kultur virus referensi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

RT-PCR untuk deteksi dengue dilakukan pada 154 sampel penderita infeksi virus dengue yang diambil dari penderita di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Menggunakan metode tersebut, diperoleh sebanyak 71 sampel positif (46,1%). Di antara 71 sampel yang positif, 61 sampel terinfeksi virus dengue serotipe tunggal yang terdiri dari berbagai serotipe DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. Sedangkan 10 sampel terinfeksi oleh serotipe ganda, yaitu di dalam satu sampel terdapat gabungan serotipe virus yang terdeteksi, yaitu DEN-1 dan DEN-2, DEN-1 dan DEN-3, serta DEN-1 dan DEN-4. Pola serotipe virus dengue yang bersirkulasi di Surabaya dapat dilihat di Tabel 1.

**Tabel 1.** Pola serotipe virus dengue di Surabaya tahun 2012 ditentukan dengan RT-PCR

Daerah	Jumlah	Hasil PCR +	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1 & -2	DEN-1 & -3	DEN-1 & -4
Surabaya	154	71 (46,10%)	43 (60,56%)	7 (9,86%)	4 (5,63%)	7 (9,86%)	1 (1,41%)	7 (9,86%)	2 (2,82%)



**Gambar 1.** Persentase sebaran serotipe virus dengue di Surabaya pada tahun 2012 yang didominasi oleh DEN-1 sebanyak 60,56% (43/71), diikuti DEN-2 dan DEN-4 sama jumlahnya sebanyak 9,86% (7/71) dan DEN-3 sebanyak 5,63% (4/71). D1/D3 sebanyak 9,86% (7/71), diikuti D1/D4 sebanyak 2,82% (2/71) dan D1/D2 sebanyak 1,41% (1/71)

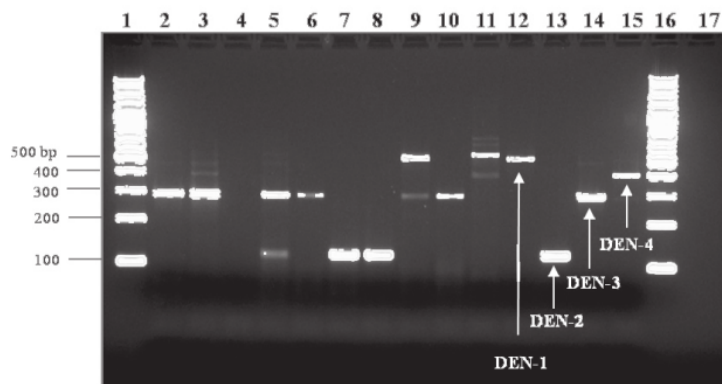
Perwakilan hasil RT-PCR *serotyping* dengue dari sampel penderita yang terinfeksi virus terkait dapat dilihat di Gambar 2.

Persentase serotipe virus dengue di Surabaya tahun 2012 yang didapat pada penelitian ini didominasi oleh DEN-1 sebanyak 60,56% (43/71), diikuti DEN-2 dan DEN-4 yang sama jumlahnya sebanyak 9,86% (7/71) dan DEN-3 sebanyak 5,63% (4/71). Infeksi ganda DEN-

1/DEN-3 dijumpai sebanyak 9,86% (7/71), diikuti DEN-1/DEN-4 sebanyak 2,82% (2/71) dan DEN-1/DEN-2 sebanyak 1,41% (1/71) (Table 1).

Infeksi virus dengue menyebabkan berbagai tingkatan manifestasi klinis yang berbeda, yaitu tidak bergejala, demam dengue (DD), demam berdarah dengue (DBD) dengan segala komplikasi perdarahan, ensefalopati maupun gangguan faal hati yang berat. Hal ini diduga berkaitan dengan teori *Antibody Dependent Enhancement* (ADE) maupun teori virulensi yang masih banyak dianut sampai saat ini. Kesakitan penyakit DBD menyebar di berbagai negara tropis dan subtropis.<sup>1</sup> Di setiap negara, serotipe yang dominan berbeda-beda.

Menurut Messer,<sup>7</sup> dalam dua dasawarsa di Sri Lanka, Afrika Timur dan Amerika Latin wabah DBD yang terjadi disebabkan oleh serotipe DEN-3, sub tipe III. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa evolusi dan transpor virus dengue yang terjadi menyebabkan wabah ini berasal dari daratan India. Wabah di Srilanka pada tahun 1989 ini bernasab dengan ragam baru yang timbul dari DEN-3 sub tipe III yang menyebar ke Afrika dan dari Afrika ke Amerika Latin pada pertengahan tahun 1990. Pada mulanya DEN-3 sub tipe III menyebabkan penyakit yang ringan, tetapi dalam keadaan terwabah, secara genetik terjadi



**Gambar 2.** Perwakilan hasil PCR serotyping dengue. Lajur 1 dan 16 diisi oleh petanda DNA 100 bp ladder (Vivantis), lajur 2-11 berisi sampel penderita yang dibaca serotipenya diurutkan berdasarkan pita pembandingan positif lajur 12-15 untuk DEN-1 (482 bp), DEN-2 (119 bp), DEN-3 (290 bp), dan DEN-4 (389 bp). Lajur 17 berisi pembandingan negatif. Contoh hasil *serotyping* PCR dengan infeksi ganda dapat diamati pada lajur 5 dan 9.

perubahan manifestasi klinis yang menunjukkan ada peran genetik virus di DBD. Di Thailand dilaporkan terdapat tiga (3) sub tipe DEN-2 yang didasarkan dalam perbedaan asam amino dari prM, NS1, NS2A, NS3, NS5. Infeksi sekunder sub tipe I yang dapat mengakibatkan Sindrom Syok Dengue (SSD) sedangkan infeksi sekunder sub tipe II menyebabkan DBD. Namun, infeksi primernya menyebabkan demam dengue saja. Infeksi sub tipe III mengakibatkan demam dengue. Hal ini menunjukkan bahwa serotipe dan sub tipe virus demam dengue dapat menentukan virulensi virus demam dengue.<sup>8</sup>

Infeksi sekunder dengan serotipe yang berbeda dapat memberikan manifestasi yang lebih berat. Demikian juga infeksi yang disebabkan oleh dua macam serotipe atau lebih di dalam satu individu (infeksi ganda) dikatakan dapat memberikan sumbangan dalam keparahan infeksi.<sup>9</sup> Namun, juga terdapat pertentangan, terdapat kasus dengan manifestasi ringan yang terjadi di infeksi dengan serotipe ganda di Brazil.<sup>10</sup> Pada penelitian ini terdapat 10 sampel dari 10 penderita yang mengalami infeksi serotipe ganda, yaitu tiga (3) sampel dari penderita demam dengue dan tujuh (7) sampel merupakan demam berdarah dengue (tidak dipublikasikan). Dalam hal ini dibuktikan bahwa untuk menentukan keparahan, tidak cukup hanya dengan menentukan serotipenya tetapi juga infeksi ganda.

Menurut Aryati,<sup>11</sup> di Indonesia didapatkan dominasi serotipe DEN-2 yang diikuti DEN-3. Demikian juga di Surabaya ditemukan saat pengumpulan sampel pada tahun 2005, juga didominasi serotipe DEN-2 (80%) yang diikuti DEN-3 (16%), dan hanya terdapat satu (1) DEN-4 (4%) serta tidak ada satupun DEN-1. Di Surabaya pada tahun 2008–2009 juga didominasi oleh DEN-2 sebesar 52%.<sup>12</sup> Berbeda dengan penelitian saat ini di Surabaya yang didominasi oleh DEN-1 sebanyak 60,56% diikuti oleh DEN-2 dan DEN-4 masing-masing sebanyak 9,86% dan terakhir DEN-3 sebanyak 5,63%.

## SIMPULAN DAN SARAN

Dalam telitian ini tampaknya mulai ada pergeseran serotipe virus dengue di Surabaya yang pada tahun 2003–2005 yang didominasi oleh DEN-2 diikuti oleh DEN-3. Kemudian pada tahun 2008–2009 didominasi oleh DEN-2 diikuti oleh DEN-1, sedangkan pada tahun 2012 didominasi oleh DEN-1. Hal ini menunjukkan terdapat pergeseran peredaran serotipe yang diakibatkan karena adanya transport patogen yang kemungkinan disebabkan oleh intensifnya peredaran

virus dengue antar kota ataupun di dalam kota sendiri. Dengan adanya informasi pergeseran serotipe ini, preklinik harus lebih berhati-hati akan bahaya infeksi sekunder oleh serotipe yang berbeda karena dapat menyebabkan manifestasi penyakit yang lebih berat.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui Dana Sinas 2012 dengan No. Pendaftaran RT-2012-655.

## DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2<sup>nd</sup> Ed. Geneva. 1997; 1–84.
2. Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur. Situasi penyakit DBD Propinsi Jatim dan kebijakan program P2 DBD. Dinkes Prop Jatim, Surabaya. 2008; 4–9.
3. Anoop M, Issac A, Mathew T, Philip S, Kareem NA, Unnikrishnan R, Sreekumar E. Genetic characterization of dengue virus serotypes causing concurrent infection in an outbreak in Ernakulam, Kerala, South India. *Indian J Exp Biol*. 2010; 48: 849–57.
4. Salda LTD, Parquet MDC, Matias RR, Natividad FF, Kobayashi N, Morita K. Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: genotype shift and local evolution. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 73(4): 796–802.
5. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(3): 545–51.
6. Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(9): 2634–9.
7. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(7): 800–9.
8. Igarashi A. Current problems and future challenge of dengue virus infection with special reference to the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *International Seminar on Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever*. October. TDC. Surabaya, Airlangga University, 1999; 6–9.
9. Sarkar A, Taraphdar D, and Chatterjee S. Molecular typing of dengue virus circulating in Kolkata, India in 2010. *J Trop Med*. 2012; 2012: 960329.
10. Fatima Z, Idrees M, Bajwa MA, Tahir Z, Ullah O, Zia MQ, et al. Serotype and genotype analysis of dengue virus by sequencing followed by phylogenetic analysis using samples from three mini outbreaks-2007–2009 in Pakistan. *BMC Microbiol*. 2011; 11: 200.
11. Aryati, Soetjipto, Hariadhi S, Rantam F, Soegijanto S. Profil serotipe virus dengue di Indonesia tahun 2003–2005. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia (MKTI)*. 2006; 17(1): 72–80.
12. Aryati, Wardhani P. Profil Virus Dengue di Surabaya Tahun 2008–2009 (Dengue Virus Profile in Surabaya From 2008–2009). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory (IJCP & ML)*. 2010; 17(1): 21–24.

# Distribusi Serotipe Dengue Di Surabaya Tahun 2021

## ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

12%

INTERNET SOURCES

9%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1	<b>Bajyantimala Mishra. "Clinical applicability of single-tube multiplex reverse-transcriptase PCR in dengue virus diagnosis and serotyping", Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2011</b> Publication	1%
2	<b>apps.who.int</b> Internet Source	1%
3	<b>www.researchgate.net</b> Internet Source	1%
4	<b>medpub.litbang.pertanian.go.id</b> Internet Source	1%
5	<b>www.pediatrik.com</b> Internet Source	1%
6	<b>www.scribd.com</b> Internet Source	1%
7	<b>interesjournals.org</b> Internet Source	1%
8	<b>www.penelitian.unair.ac.id</b> Internet Source	

1 %

9

Nurul Handayani. "INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK DI BLU PROF. DR. R. D KANDOU MANADO PERIODE JULI 2011 SAMPAI JUNI 2012", Jurnal e-Biomedik, 2014

Publication

1 %

10

[docobook.com](http://docobook.com)

Internet Source

1 %

11

[pt.scribd.com](http://pt.scribd.com)

Internet Source

1 %

12

[idalailyichsanty.wordpress.com](http://idalailyichsanty.wordpress.com)

Internet Source

1 %

13

[123dok.com](http://123dok.com)

Internet Source

1 %

14

[ijconline.id](http://ijconline.id)

Internet Source

<1 %

15

[journal.ipb.ac.id](http://journal.ipb.ac.id)

Internet Source

<1 %

16

[ritacuitcuit.blogspot.com](http://ritacuitcuit.blogspot.com)

Internet Source

<1 %

17

Izabela A. Rodenhuis-Zybert, Jan Wilschut, Jolanda M. Smit. "Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity", Cellular and Molecular Life Sciences, 2010

Publication

<1 %

---

18	<a href="http://agenpusatalamat.blogspot.com">agenpusatalamat.blogspot.com</a> Internet Source	<1 %
19	Mayer F. Wowor. "DETEKSI DINI DEMAM BERDARAH DENGUE DENGAN PEMERIKSAAN ANTIGEN NS1", JURNAL BIOMEDIK (JBM), 2013 Publication	<1 %
20	<a href="http://de.scribd.com">de.scribd.com</a> Internet Source	<1 %
21	<a href="http://id.123dok.com">id.123dok.com</a> Internet Source	<1 %
22	<a href="http://parasitesandvectors.biomedcentral.com">parasitesandvectors.biomedcentral.com</a> Internet Source	<1 %
23	<a href="http://zombiedoc.com">zombiedoc.com</a> Internet Source	<1 %

---

Exclude quotes      On

Exclude matches      Off

Exclude bibliography      On



# Distribusi Serotipe Dengue Di Surabaya Tahun 2021

---

GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/100**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---