

LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER  
MENUJU DOKTOR SARJANA UNGGUL  
(PMDSU)



15

HUBUNGAN VARIAN GEN NSP4 DENGAN MANIFESTASI KLINIK HOST  
PENDERITA INFEKSI ROTAVIRUS PADA PASIEN GASTROENTERITIS ANAK  
DI LAMPUNG

TAHUN KE - 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

PROF. SOETJIPTO, DR., M.S., PH.D  
DR. JUNIASTUTI, DR., M.KES  
ELSA FITRIANA, S.KEB., BD. M. KED. TROP

0017025004  
0024067104  
011617017349

DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018

LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN PROGRAM PENDIDIKAN MAGISTER  
MENUJU DOKTOR SARJANA UNGGUL  
(PMDSU)

KEA  
kek  
LP 17/19  
Soe  
h



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

HUBUNGAN VARIAN GEN NSP4 DENGAN MANIFESTASI KLINIK HOST  
PENDERITA INFEKSI ROTAVIRUS PADA PASIEN GASTROENTERITIS ANAK  
DI LAMPUNG

TAHUN KE - 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

PROF. SOETJIPTO, DR., M.S., PH.D

0017025004

DR. JUNIASTUTI, DR., M.KES

0024067104

ELSA FITRIANA, S.KEB., BD. M. KED. TROP

011617017349

DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018

Judul : HUBUNGAN VARIAN GEN NSP4 DENGAN  
MANIFESTASI KLINIK HOST PENDERITA INFEKSI  
ROTAVIRUS PADA PASIEN GASTROENTERITIS  
ANAK DI LAMPUNG

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0017025004  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Ilmu Kedokteran  
Nomor HP : 08165416908  
Alamat surel (e-mail) : soetjiptojtbr@sby.centrin.net.id



**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. Juniastuti, dr., M.Kes.  
NIDN : 0024067104  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : Elsa Fitriana., S. Keb., Bd. M. Ked. Trop  
NIDN :  
Perguruan Tinggi :

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra : Intitute of Tropical Disease  
Alamat : Universitas Airlangga, Surabaya  
Penanggung Jawab : Prof. Maria Lucia Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 0  
Biaya Keseluruhan : Rp 0

Mengetahui,  
Dekan



(Prof. Soetjo, Sp. U (K))  
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018  
Ketua,

(Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D)  
NIP/NIK 195002171978031002

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M. Si, Ph. D.)  
NIP/NIK 196705071991021001

## RINGKASAN

*Hubungan varian gen NSP4 dengan manifestasi klinik host penderita infeksi Rotavirus**pada pasien gastroenteritis anak di Lampung.*

Menurut Harvey (2005) dan Wapnir (2000) diare merupakan salah satu penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas anak-anak di negara-negara berkembang (Soegijanto *et al.*, 2010). Riskesdas tahun 2013 menyatakan bahwa Lampung memiliki *period prevalence* diare sebesar 3,7 dimana *period prevalence* untuk Indonesia sebesar 7,0. Data terakhir menunjukkan penemuan kasus diare menurut provinsi tahun 2014, Provinsi Lampung berada pada posisi ke sembilan dengan jumlah 174.735 kasus, dimana hanya 57% saja diare yang tertangani (Kemenkes, 2015).

Diare oleh virus merupakan penyebab utama infeksi diare akut pada bayi dan anak-anak (Svraka *et al.*, 2007; Chhabra *et al.*, 2013). NSP4 merupakan gen enterotoksin virus puratif pertama yang diketahui (Ball *et al.*, 1996). NSP4 atau NSP4 aktif yang berbentuk peptida, menginduksi diare pada neonatus tikus melalui aktivasi saluran anion membran plasma  $CA^{2+}$  dependen yang berbeda dari CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) (Estes *et al.*, 2007).

Deteksi Rotavirus dapat dilakukan secara serologis dan genetik. Data insiden diare Rotavirus yang belum ada di Lampung menjadi dasar diperlukannya pemeriksaan Rotavirus. Berikutnya adalah pemeriksaan molekuler untuk melihat sirkulasi genotipe dari Rotavirus sehingga dapat memberikan sumbangan data sebagai pertimbangan pemberlakuan program vaksinasi Rotavirus di Lampung. Selain itu, pemeriksaan yang dilakukan pada gen NSP4 dapat memberikan kontribusi dalam penelitian dasar untuk pengembangan vaksin.

Desain penelitian adalah *cross sectional*. Penelitian dilakukan di RSUD Abdul Moeleok Lampung, RSUD Dadi Tjokrodipo Bandar Lampung, Puskesmas Panjang Bandar Lampung, Puskesmas Pasar Ambon, dan Puskesmas Segala Mider Bandar Lampung, dan laboratorium *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga. Proses penelitian dimulai dari bulan Mei 2016 – Desember 2018. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah feses dari seluruh pasien yang menderita diare selama penelitian (September-Desember 2016).

Sampel berupa feses akan di tes dengan menggunakan rapid test. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan *genotyping* dengan *semi nested-PCR* dan sekuensing. Gen yang akan diperiksa adalah VP7 sebagai genotipe Rotavirus dan gen NSP4 sebagai enterotoxin. Data untuk manifestasi klinik diperoleh dengan cara wawancara terhadap orang tua atau wali dari pasien. Analisis hubungan antara VP7 dan NSP4 dengan manifestasi klinik dilakukan dengan bantuan aplikasi statistik.

Hasil dari penelitian ini dapat berupa data insiden dan informasi terbaru mengenai Rotavirus. Luaran dari penelitian ini berupa persebaran genotipe Rotavirus serta keilmuan terbaru mengenai diare oleh Rotavirus untuk pengembangan NSP4 sebagai salah satu kandidat vaksin. Hasil penelitian ini sangat bermanfaat bagi tenaga kesehatan dengan menjadi acuan bagi pemberian terapi yang sesuai.



Selama pengumpulan sampel yang dilakukan dari September-Desember 2016 didapatkan 39 sampel dengan 32 (82,5%) sampel positif terinfeksi Rotavirus,. Usia kurang dari 2 tahun adalah usia dominan yang menderita diare dengan persentase sejumlah 75%. Rasio antara pasien laki-laki dan perempuan adalah 4 : 3. Seluruh pasien (100%) belum pernah ada yang mendapatkan imunisasi Rotavirus. Seluruh genotipe pada sampel positif Rotavirus adalah genotipe G3 *equine-like*. Genotipe NSP4 yang sudah teridentifikasi adalah genotipe E2 (54%). Penelitian ini menemukan varian pada NSP4 pada asam amino ke 72 dimana asam amino isoleusin disubstitusi oleh asam amino valin. Tidak terdapat hubungan antara genotipe VP7 G3 *equine-like* dengan derajat keparahan pasien diare akut. Tidak terdapat hubungan antara varian gen NSP4 dengan manifestasi klinik berupa derajat keparahan pasien diare akut. Genotipe G3 *Equine-like* ini merupakan genotipe yang baru ditemukan di Indonesia.

## PRAKATA

Puji syukur penulis sampaikan kepada Allah swt atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga laporan akhir penelitian ini berhasil diselesaikan. Materi yang dipilih dalam penelitian ialah Rotavirus dengan judul Hubungan Varian Gen NSP4 dengan Manifestasi Klinik Host Penderita Infeksi Rotavirus pada Pasien Gastroenteritis Anak di Lampung. Penelitian dilaksanakan dari Mei 2016 -Desember 2018 dan masih dalam proses pelaksanaan hingga saat ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pihak Kemenristekdikti yang telah mendanai penelitian ini, kemudian kepada Prof. Soetjipto selaku promotor yang selalu membimbing dan Dr. Juniastuti selaku co-promotor yang memberikan arahan sehingga laporan ini dapat selesai tepat waktu. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada tempat penelitian, antara lain RSUD Abdoel Mocloek Bandar Lampung, RSUD Tjokrodipo Bandar Lampung, Puskesmas Rawat Inap Panjang Bandar Lampung kepada *Institute of Tropical Disease*, Universitas Airlangga beserta staf yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga penulis berikan kepada para pasien dan orang tua pasien yang telah bersedia menjadi bagian dari penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam laporan ini, maka dari itu diharapkan saran dan kritik yang membangun agar laporan berikutnya dapat lebih baik lagi. Semoga laporan ini memberikan manfaat kepada pembaca.

Terima kasih.

Penulis

## DAFTAR ISI

Sampul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Ringkasan.....	iii
Prakata.....	iv
Daftar Isi.....	v
Daftar Tabel.....	vii
Daftar Gambar.....	viii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Urgensi Penelitian.....	2
1.5 Target Temuan.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Diare.....	5
2.2 Rotavirus.....	6
2.3 Perkembangan Penelitian.....	8
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
3.1 Tujuan penelitian.....	9
3.2 Urgensi Penelitian.....	9
3.3 Manfaat.....	9
BAB IV METODE PENELITIAN.....	10
4.1 Waktu Dan Tempat Penelitian.....	10
4.2 Sampel Dan Populasi.....	10
4.3 Pemeriksaan Antigen Rotavirus.....	10
4.4 Deteksi Genetik Rotavirus.....	10
4.5 Isolasi RNA.....	11
4.6 RT-PCR.....	11
4.7 Amplifikasi DNA.....	11
4.8 Deteksi Produk PCR Dengan Elektroforesis.....	12
4.9 Sekuensing.....	12
4.10 Manifestasi Klinik Diare.....	12
4.11 Analisa Sstatistik.....	12
BAB V HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	13
5.1 Hasil Penelitian.....	13
5.2 Luaran yang Dicapai.....	22
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	25
6. 1Simpulan.....	25



6. 2Saran ..... 25

**DAFTAR PUSTAKA**



**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabel 2.1 Mekanisme Diare.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabel 5.1 Karakteristik Pasien Berdasarkan Tempat Pengambilan Sampel, Jenis Kelamin, Usia, Dan Status Imunisasi Rotavirus Di Provinsi Lampung Bulan September-Desember 2016.....</b>	<b>13</b>
<b>Tabel 5.2 Manifestasi Klinik Pasien Di Provinsi Lampung Bulan September-Desember 2016 .....</b>	<b>14</b>
<b>Tabel 5.3 Distribusi Genotipe Rotavirus Di Lampung Bulan September-Desember 2016.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabel 5.4 Disain Primer Untuk Pemeriksaan Genotipe Belum Teridentifikasi .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabel 5.5 Disain Primer Untuk Pemeriksaan Gen NSP4 .....</b>	<b>16</b>
<b>Tabel 6.1 Rencana Kegiatan Dan Target Capaian Untuk Proses Penelitian Tahun 2018 .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabel 6.2 Rancangan Waktu Pelaksanaan Penelitian Tahun 2018 .....</b>	<b>24</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1 Perbandingan Hasil Pemeriksaan Immunokromatografi Dan RT-PCR Pada Sampel Dari Provinsi Lampung Bulan September-Desember 2016 .....	15
Gambar 5.2 Hasil Pemeriksaan Gen NSP4 Pada Sampel Provinsi Lampung Bulan September-Desember 2016 (A, B, C) .....	19
Gambar 5.3 Pohon Filogenik Gen VP7 Rotavirus Pada Sampel L02, L09, Dan L17 Dengan Strain Rotavirus Dan Strain Vaksin Rotateq. Rotavirus Nomenklatur Mencakup <i>Genebank Accession Number</i> , Grup Rotavirus, Spesies Asal Dari Isolasi, Genotipe Untuk Genom Segmen 9 Dan 4 Berdasarkan Grup Klasifikasi Rotavirus .....	20
Gambar 5.4 Multiple alignment asam amino pada gen NSP4 pada sampel anak dengan gastroenteritis di Lampung.....	21

## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1 Latar belakang

Harvey (2005) dan Wapnir (2000) menyatakan bahwa diare merupakan salah satu penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas anak-anak di negara-negara berkembang. Diare menyebabkan sekitar 2 juta kematian setiap tahunnya pada anak-anak usia < 5 tahun, yakni sekitar 20% dari angka kematian total. Soeparto *et al* (2004) menyatakan bahwa diperkirakan bahwa setiap anak pada kelompok umur ini rata-rata mengalami lebih dari satu kali kejadian setiap tahunnya, sebagian (1-2%) mengalami dehidrasi dan 50-60% akan meninggal bila tidak mendapatkan pertolongan segera (Soegijanto *et al.*, 2010).

Provinsi Lampung memiliki *period prevalence* diare sebesar 3,7. *Period prevalence* tersebut lebih rendah dibandingkan dengan *period prevalence* diare Indonesia dengan nilai 7,0. Angka kejadian diare per tahun 2014 berjumlah 174.735 kasus di Provinsi Lampung, namun hanya 57% yang tertangani oleh tenaga kesehatan. Provinsi Lampung menjadi salah satu tempat terjadi KLB diare pada tahun 2014 dengan CFR sejumlah 100%. (Kemenkes, 2015).

Rotavirus adalah penyebab utama diare akut pada anak < 5 tahun dan dikaitkan dengan 450.000 angka kematian di dunia (Tate *et al.*, 2012). Rotavirus ini dapat dideteksi dengan pemeriksaan imunofluoresensi, ELISA, dan mikroskop elektron imun (MEI) (Brooks *et al.*, 2013). Rotavirus menginfeksi sel pada vili usus halus (mukosa lambung dan kolon tidak terinfeksi). Virus ini berkembang biak di dalam sitoplasma enterosit dan merusak mekanisme transportnya. NSP4 adalah protein pada Rotavirus yang merupakan enterotoksin virus dan memicu sekresi dengan mencetuskan jalur transduksi sinyal sel yang rusak yang dapat meluruh ke dalam lumen usus dan melepaskan sejumlah besar virus di dalam feses (sampai  $10^{12}$  partikel/gram feses). Diare yang disebabkan oleh Rotavirus terjadi akibat gangguan absorpsi natrium dan glukosa karena sel yang rusak pada vili digantikan oleh sel kriptas imatur yang tidak dapat menjalankan fungsi absorpsi. Fungsi normal memerlukan waktu 3-8 minggu untuk pulih kembali (Brooks *et al.*, 2010).

Sampai saat ini belum ada data mengenai insiden diare karena Rotavirus di Lampung serta data penelitian mengenai gen pengkode protein NSP4 di Indonesia. Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kasus diare dan

genotipe Rotavirus di Lampung serta analisa gen NSP4 yang mampu memberikan kontribusi dalam diagnosa terhadap diare dan informasi terbaru untuk pengembangan kandidat keterbaharuan vaksin.

## **1.2 Rumusan masalah**

- 1.2.1.** Berapa insiden gastroenteritis anak yang disebabkan oleh Rotavirus di Lampung?
- 1.2.2.** Apa sajakah faktor penyebab infeksi Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak di Lampung?
- 1.2.3.** Ada berapakah genotipe VP7 dan NSP4 Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak di Lampung?
- 1.2.4.** Apakah ada hubungan gen NSP4 Rotavirus dengan manifestasi klinik pasien gastroenteritis anak?

## **1.3 Tujuan penelitian**

### **1.3.1. Tujuan khusus**

- 1) Mengetahui jumlah insiden gastroenteritis anak yang disebabkan oleh Rotavirus di Lampung
- 2) Mengetahui faktor penyebab infeksi Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak di Lampung
- 3) Mengetahui genotipe VP7 dan NSP4 Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak di Lampung
- 4) Menganalisis hubungan gen NSP4 Rotavirus dengan manifestasi klinik pasien gastroenteritis anak

## **1.4 Urgensi penelitian**

Kasus diare masih menjadi satu dari 3 kasus utama morbiditas dan mortalitas anak di Indonesia. Pemerintah telah berupaya menangani kasus tersebut dengan berbagai program, namun angka kesakitan dan kematian akibat diare belum juga menunjukkan perubahan yang signifikan. Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam penanganan kasus diare pada anak dan memberikan kontribusi dalam pengembangan keterbaharuan vaksin yang lebih komprehensif dan kompetitif.

### 1.5 Target temuan

Penelitian ini menargetkan beberapa hal, antar lain :

- 1) Adanya data mengenai kasus diare Rotavirus untuk Provinsi Lampung.
- 2) Adanya data mengenai genotipe Rotavirus di Provinsi Lampung.
- 3) Adanya dasar penegakan diagnosa bagi pasien diare infeksi Rotavirus berdasarkan manifestasi klinik.
- 4) Adanya informasi biologi molekuler Rotavirus terkait gen VP4, VP7, dan NSP4 yang diharapkan dapat menjadi kandidat keterbaharuan pengembangan vaksin.

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			TS <sup>1)</sup>	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah <sup>2)</sup>	Internasional Bereputasi	Draft	submitted	Accepted
		Nasional Terakreditasi	Draft	submitted	Accepted
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Nasional	draft	Sudah dilaksanakan	sudah dilaksanakan
		Internasional	draft	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
3	Pembicara utama ( <i>Invited Speaker</i> ) dalam temu ilmiah	Nasional	draft	draft	draft
		Internasional	draft	draft	draft
4		Patent	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Patent sederhana	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Hak cipta	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Merek dagang	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Rahasia dagang	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Desain Produk Industri	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Indikasi Geografis	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	tidak ada	tidak ada	tidak ada

5	Teknologi tepat guna <sup>6)</sup>		tidak ada	tidak ada	tidak ada
6	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>7)</sup>		tidak ada	tidak ada	tidak ada
7	Buku Ajar (ISBN) <sup>8)</sup>		tidak ada	tidak ada	tidak ada
8	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>9)</sup>		1	1	1

**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**



**2.1 Diare**

**2.1.1. Patofisiologi**

Tabel 2.1 Mekanisme diare

No	Mekanisme primer	Defek	Pemeriksaan tinja	Contoh	Keterangan
1	Sekretorik	Penurunan absorpsi, peningkatan sekresi; transport elektrolit	Encer, osmolalitas normal; $\text{osmol} = 2x (\text{Na}^+ + \text{K}^+)$	Kolera, <i>E. Coli</i> toksigenik; karsinoid, VIP, neurobalstoma, diare klorida kongenital, <i>Clostridium difficile</i> , kriptosporosis (AIDS)	Menetap selama puasa; malabsorpsi garam empedu juga dapat meningkatkan sekresi air; tidak ada leukosit pada tinja
2	Osmotik	Maldigesti, defek transportasi, penelanan zat terlarut yang tidak dapat diserap	Encer, asam, dan mereduksi bahan; peningkatan osmolalitas; $\text{osmol} > 2x (\text{Na}^+ + \text{K}^+)$	Defisiensi laktase, malabsorpsi glukosa-galaktosa-laktulosa, laktulosa, penyalahgunaan laksatif	Hentikan dengan puasa; hidrogen pernafasan meningkat disertai malabsorpsi karbohidrat; tidak ada leukosit pada tinja
3	Peningkatan motilitas	Penurunan waktu transit	Bentuk tinja lembek atau normal, dirangsang oleh reflek gastrokolik	<i>Irritabel bowel syndrome</i> , tirotoksikosis, <i>postvagotomy dumping syndrome</i>	Infeksi juga dapat meningkatkan motilitas
4	Penurunan motilitas	Defek pada unit neuromuskular stasis (pertumbuhan bakteri berlebihan)	Bentuk tinja lembek sampai normal	Pseudoobstruksi, lengkung buntu	Kemungkinan pertumbuhan bakteri berlebihan
5	Penurunan luas permukaan (motilitas, osmotik)	Penurunan kapasitas fungsional	Cair	<i>Shortbowel syndrome</i> , penyakit seliak, enteris Rotavirus	Mungkin memerlukan diet elemental ditambah alimentasi parenteral
6	Invasi mukosa	Peradangan, penurunan	Darah dan peningkatan	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> ,	Disentri = darah, mukus, dan

		reabsorpsi kolon, peningkatan motilitas	leukosit dalam tinja	<i>amebiasis, yersinia, Campylobacter</i>	leukosit.
--	--	---	----------------------	---	-----------

(Behrman *et al.*, 2000)

### 2.1.2. Penyebab spesifik diare infeksius

Virus yang dihubungkan dengan gastroenteritis pada bayi adalah Rotavirus, Kalsivirus, Adenovirus enterik, Astrovirus, dan anggota agen Norwalk (Norovirus). Rotavirus merupakan penyebab diare yang paling sering selama musim dingin. Infeksi primer oleh Rotavirus pada bayi dapat menyebabkan penyakit sedang sampai berat, sedangkan reinfeksi pada remaja menyebabkan penyakit ringan. Rotavirus menginvasi epitel usus kecil bagian atas; pada kasus yang berat dapat meluas ke seluruh usus kecil dan kolon, menyebabkan kerusakan villosa, defisiensi disakarida sekunder sementara, dan peradangan lamina propria. Muntah dapat berlangsung selama 3-4 hari, dan diare dapat berlangsung selama 7-19 hari; dehidrasi terjadi pada pasien yang lebih muda (Behrman *et al.*, 2010).

## 2.2 Rotavirus

### 2.2.1. Morfologi

Rotavirus dibawah mikroskop elektronik konvensional merupakan partikel berukuran 70 nm dengan struktur ikosahedral berlapis (Akusjärvi *et al.*, 2002). Virion tidak berselubung. *Virus like-particle* yang tidak memiliki kapsid luar berdiameter 50-60 nm. *Double layered-particle virus* merupakan bentuk virus yang infeksius. Genom Rotavirus mengandung 11 segmen. Inti virion mengandung beberapa enzim yang diperlukan untuk proses transkripsi dan *capping* RNA virus. Rotavirus stabil terhadap panas hingga 50°C, pada rentang pH 3,0-9,0, serta terhadap pelarut lemak, seperti eter dan kloroform, tetapi virus tidak aktif dengan klorin, fenol, dan etanol 95% (Brooks *et al.*, 2013).

### 2.2.2. Protein struktural dan nostruktural virus

Rotavirus mengkode 6 protein struktural (ditandai dengan VP dan diikuti nomor) dan 6 protein nostruktural (ditandai dengan NSP dan diikuti nomor). Gen yang mengkode tugas protein ini ditentukan asalnya dengan strain Rotavirus, contohnya pada strain SA11 monyet, yang dapat dengan mudah dikultur secara invitro.



Trimers VP4 membentuk *spike* protein pada permukaan virion (Estes *et al.*, 2007). Berdasarkan data struktural yang menunjukkan bahwa terdapat interaksi VP4 dengan VP7 dan VP6, interaksi ini ditunjukkan pada perakitan VP4 mendahului VP7, namun hipotesis ini telah ditentang oleh data lainnya (strategi replikasi). VP4 diperlihatkan sebagai protein perlekatan virus baik secara *in vivo* dan *in vitro* dan menjadi faktor pertumbuhan virus *in vitro* dan virulensi virus *in vivo* (Estes *et al.*, 2007). Terapi tripsin Rotavirus memotong VP4 menjadi VP8 (*amino-terminal*) dan protein VP5 dan meningkatkan infektivitas virus secara *in vitro* (Estes *et al.*, 2007).

VP7 dapat dikode melalui segmen gen 7,8, dan 9 tergantung pada strain virus (Estes *et al.*, 2007). VP7 adalah penyusun utama lapisan luar Rotavirus, dan target tipe spesifik, sama seperti heterotipe, menetralkan antibodi. 3 region utama antigenik (region A, B, dan C) sudah diidentifikasi pada VP7 dengan menggunakan Monoklonal antibodi murine. Region ini dapat menjadi target spesifik antibodi *cross-reactive* dan serotipe spesifik (Estes *et al.*, 2007). VP7 merupakan glikoprotein dengan 3 cis potensial untuk N glikosilasi yang digunakan secara variabel tergantung dari strain virus. Glikosilasi VP7 dapat mempengaruhi antigenitasnya. Retensi VP7 dalam retikulum endoplasma dibantu oleh sinyal sekuens peptida, sama seperti protein sisa yang lain (Estes *et al.*, 2007).

Kapasitas NSP4 untuk mengikat DLP dan VP4 kemungkinan memainkan peranan penting dalam morfogenesis virus. NSP4 adalah reseptor intraseluler yang mengizinkan DLP masuk ke dalam RE dan merupakan pemain kunci dalam regulasi kalsium intraseluler selama infeksi Rotavirus (Estes *et al.*, 2007). NSP4 merupakan enterotoksin virus puratif pertama yang diketahui (Ball *et al.*, 1996). NSP4 atau NSP4 aktif yang berbentuk peptida, menginduksi diare pada tikus neonatus melalui aktivasi saluran anion membran plasma  $CA^{2+}$  dependen berbeda dari CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) (Estes *et al.*, 2007).

### 2.2.3. Manifestasi Klinik dan Diagnostik

Gejala khas dari diare Rotavirus meliputi diare cair, demam, nyeri abdomen, dan muntah sehingga menyebabkan dehidrasi. Pasien dengan kasus ringan mengalami gejala 3-8 hari lalu pulih sempurna. Ekskresi virus di dalam feses bertahan selama 50 hari setelah awitan diare. Terjadi infeksi asimtomatik disertai serokonversi.

Diagnosis laboratorium berdasarkan pada pembuktian adanya virus di dalam feses yang dikumpulkan pada awal fase penyakit dan peningkatan titer antibodi.

Virus di dalam feses dibuktikan melalui *enzyme immunoassays* (EIA) atau IEM. Uji EIA lebih sensitif daripada IEM. Peentuan genotipe asam nukleat Rotavirus dari spesimen feses melalui *polymerase chain reaction* (PCR) merupakan deteksi yang paling sensitif. Uji serologi dapat dipergunakan untuk mendeteksi peningkatan titier antibodi, terutama ELISA (Brooks *et al.*, 2010). Sebagian besar *human* Rotavirus grup A dapat diperoleh jika sebelumnya sudah diberi enzim proteolitik tripsin. Enzim ini membelah protein kapsid bagian luar sehingga memudahkan terjadinya pelepasan selaput pembungkus.

Menurut Busc *et al* (2001), Fernandes *et al* (2000), Ibrahim dan Sunderland (1990), Lipson *et al* (1989), dan Marshal *et al* (2003) beberapa teknik sudah dikembangkan untuk deteksi Rotavirus. Survey Rotavirus pertama, deteksi antigen pertama diperlihatkan oleh *electronic microscopy* (EM), kemudian beberapa teknik dikembangkan seperti *poliacralamide gel electroforesis* (PAGE), *radioimmunoassay* (RIA), *reserve passive hemagglutination* (RPH), *immunoenzimatic assays* (EIA), *latex agglutination test* (LAT) dan sebagainya, dan yang terbaru adalah *reserve transcription polimerase chain reaction* (RT-PCR) dan *immunochromatography* (IMC) (Ferreira *et al.*, 2006).

### 2.3 Perkembangan penelitian

Sampai saat ini perkembangan penelitian pada tahap pemeriksaan biologi molekuler gen VP4 dan NSP4. Data manifestasi klinik telah didapatkan dari wawancara dengan orang tua atau pun wali dari pasien saat pengumpulan sampel. Dengan ditemukannya genotipe baru yaitu genotipe G3 *Equine-like*, maka terdapat penambahan rancangan primer untuk deteksi genotipe tersebut. Target kebaruan utama dalam penelitian ini antara lain data pertama mengenai insiden kejadian diare Rotavirus di Provinsi Lampung, penyebaran genotipe Rotavirus di Provinsi Lampung, dan kelimuan terbaru mengenai hubungan varian gen NSP4 dengan manifestasi klinik host penderita diare.

**BAB 3****TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1 Tujuan penelitian**

1. Mengetahui jumlah insiden gastroenteritis anak yang disebabkan oleh Rotavirus di Lampung
2. Mengetahui faktor penyebab infeksi Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak yang di Lampung
3. Mengetahui genotipe gen VP7, VP4, dan NSP4 Rotavirus pada pasien gastroenteritis anak di Lampung
4. Menganalisis hubungan gen NSP4 Rotavirus dengan manifestasi klinik pasien gastroenteritis anak

**3.2 Urgensi penelitian**

Kasus diare anak yang terjadi di Indonesia masih menjadi salah satu dari 3 kasus utama. Pemerintah telah berupaya menangani kasus tersebut dengan berbagai program, namun angka kesakitan dan kematian akibat diare belum juga menunjukkan perubahan yang signifikan. Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan solusi dalam penanganan kasus diare pada anak dan memberikan kontribusi dalam pengembangan keterbaharuan vaksin yang lebih komprehensif dan kompetitif.

**3.3 Manfaat****Teoritis**

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi dibidang keilmuan biologi molekuler Rotavirus.

**Praktis**

Hasil penelitian ini mampu memberikan kontribusi dalam penegakan diagnosa pada diare Rotavirus dan data mengenai infeksi Rotavirus di Provinsi Lampung.



## BAB IV METODE PENELITIAN



### 4.1 Waktu dan tempat penelitian

Desain penelitian adalah *cross sectional*.

Penelitian dilakukan di RSUD Abdul Moeloek Lampung, RSUD Ahmad Dadi Tjokrodipo Bandar Lampung, Puskesmas Panjang, dan laboratorium *Institute of Tropical Disease Centre* (ITD) Universitas Airlangga. Proses penelitian dimulai dari bulan Mei 2016 – Desember 2018. Pengumpulan sampel dilakukan pada bulan September- Desember 2016 dan Juni-Juli 2018 di RSUD Abdul Moeloek Lampung, RSUD Ahmad Dadi Tjokrodipo Bandar Lampung, Puskesmas Pasar Ambon, Puskesmas Segala Mider, dan Puskesmas Panjang.

### 4.2 Sampel dan populasi

Populasi penelitian ini adalah seluruh pasien diare bayi usia 1 bulan sampai anak usia 60 bulan di tempat penelitian. Cara pengambilan sampel dilakukan dengan cara *consecutive sampling*. Sampel penelitian adalah semua pasien diare usia 1 bulan hingga usia 60 bulan yang dirawat selama bulan September - Desember 2016 di tempat penelitian dan terlibat dalam penelitian tersebut. Estimasi sampel minimal berjumlah 38 orang.

Sampel feses diambil dari pasien dengan menggunakan *rectal cup*. Stool sampel disimpan pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ . Sampel dikirim menggunakan *ice box* ke ITD Universitas Airlangga.

### 4.3 Pemeriksaan antigen Rotavirus

Sampel berupa feses yang sudah diencerkan dengan PBS akan di tes dengan menggunakan *rapid test* Dipstick 'Eiken' Rota.

### 4.4 Deteksi genetik Rotavirus

Genom RNA Rotavirus diekstraksi terlebih dahulu dari supernatan suspensi feses 10% dengan menggunakan QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, USA). Presensi Rotavirus group A pada spesimen feses dideteksi dengan RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) (Yan *et al.*, 2004). Sampel dengan hasil positif selanjutnya akan dianalisis untuk genotipe G dan P dengan PCR menggunakan primer

yang telah ditetapkan oleh WHO tahun 2009, sedangkan identifikasi genotype gen NSP4 menggunakan metode sekucensing dengan primer dari penelitian sebelumnya (Banyai et al., 2009).

#### 4.5 Isolasi RNA

Ekstraksi produk menggunakan Kit komersial QIAmap *Mini Kit* (Qiagen, Inc. Cat no.51340). sejumlah 20  $\mu$ l QIAGEN protease ditambahkan ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l sampel, 200  $\mu$ l buffer AL kemudian dicampur dengan menggunakan vortex selama 15 detik, setelah itu di inkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit dan selanjutnya di *spin down*. Berikutnya tambahkan 200  $\mu$ l etanol 100% ke dalam tabung dan campurkan dengan divortex selama 15 detik dan *spin down*. Pindahkan hasil *solution* tersebut ke dalam QIAamp *spin collum* kemudian *centifuge collum* pada 8000rpm selama 1 menit dan buang semua filtrat yang ada di tabung 1,5 ml. Selanjutnya tambahkan 500  $\mu$ l buffer A W1, 500  $\mu$ l A W2, 40  $\mu$ l EA atau DW kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Jika DNA sudah tertampung selanjutnya simpan pada suhu -20°C.

#### 4.6 Ekstraksi cDNA

Ekstraksi cDNA menggunakan *Superscript III Platinum Taqmix* kit (Invitrogen, USA). Proses ekstraksi dimulai dengan campuran 8  $\mu$ l RNA dengan 1  $\mu$ l random primer dan 2  $\mu$ l dNTP. Campuran bahan diinkubasi pada suhu 97°C selama 5 menit. Selanjutnya di *icing* dalam *ice box*. Setelah itu ditambahkan dengan 1  $\mu$ l Superscript III dan 8  $\mu$ l 2x Rxn mix. Bahan tersebut di PCR 1 siklus dengan suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 60 menit, dan 70°C selama 15 menit.

#### 4.7 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dimulai dengan campuran *Toptaq PCR master mix* 9  $\mu$ l (Qiagen), tambahkan primer (F) dan (R) masing-masing 1 $\mu$ l, sampel DNA 3  $\mu$ l, dan *Distilled water* sampai campuran 20  $\mu$ l.

Gen VP7 di amplifikasi dengan primer Beg9 dan End9 (Gouvea et al., 1990), sedangkan gen VP4 sebagian dihasilkan oleh Con3 dan Con2 primer (WHO, 2009). Gen NSP4 di amplifikasi menggunakan primer yang telah dirancang oleh peneliti.

#### 4.8 Deteksi produk PCR dengan elektroforesis

Proses elektroforesis dimulai dengan pembuatan gel agarose 2% yang telah mengandung ethidium bromide dan kemudian diletakkan dalam elektroforesis gel *apparatus* dan ditambahkan TBE buffer 1x hingga gel terendam semua. Produk PCR sebanyak 5 µl diambil dan dicampur secara *gently pipetting* dengan 10x *loading buffer* sebanyak 1,5 µl yang telah ditetaskan di atas parafilm. Masing-masing (2 dan 3) dimasukkan ke dalam slot gel. Elektroforesis gel *apparatus* ditutup dan dijalankan dengan 100 volt selama kurang lebih 30 menit, selanjutnya dilihat di bawah sinar ultraviolet *short wave*. Kemudian hasil yang tampak didokumentasikan dengan gel doc/transilluminator.

#### 4.9 Sekuensing

Sekuens nukleotida strain Rotavirus yang terdeskripsi terakhir dalam database GenBank. Nomor *accession* antara lain : VP7 (GU288621–GU288626, EU791924); VP4 (GU288627–GU288635, EU791922); NSP4 (GU288642–GU288650, EU791925).

#### 4.10 Manifestasi klinik diare

Tingkat keparahan diare dihubungkan dengan manifestasi klinik seperti muntah, frekuensi diare, peningkatan suhu tubuh, kebutuhan cairan intravena karena dehidrasi, kebutuhan rawat inap, dan durasi sakit diare. Diagnosis keparahan diare ditegakkan saat dilakukan penelitian. Keparahannya diare ditentukan dengan menggunakan scoring yang didesain oleh Ruuska dan Vesikari (1990).

#### 4.11 Analisa statistik

Variabel bebas adalah gen NSP4, VP7, dan VP4. Variabel terikat adalah manifestasi klinik pada pasien diare Rotavirus. Analisis asam amino gen disajikan menggunakan multiple alignment dan filogenik dengan bantuan aplikasi Mega6 dan Bioedit.

Data akan disajikan dalam bentuk diagram. Analisis hubungan variabel bebas yaitu gen NSP4 dengan masing-masing variabel independen, yaitu keparahan penyakit diare, lamanya diare, frekuensi diare/24 jam, durasi muntah, frekuensi muntah/24 jam, suhu badan, dehidrasi, terapi rehidrasi melalui minum, rawat inap menggunakan uji kai kuadrat (*chi square*).

**BAB V**  
**HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI**

**5.1 Hasil Penelitian**

**5.1.1 Karakteristik subyek penelitian**

Tabel 5.1 Karakteristik pasien berdasarkan tempat pengambilan sampel, jenis kelamin, usia, dan status imunisasi Rotavirus di Provinsi Lampung bulan September-Desember 2016

	Positif	%	Negatif	%	Total
Tempat					
PKMP	14	35.00	5	12.50	19
RSAM	5	12.50	1	2.50	6
RSUD	14	35.00	1	2.50	15
Total	33	82.50	7	17.50	40
Jenis kelamin					
Laki-laki	20	50.00	4	10.00	24
Perempuan	13	32.50	3	7.50	16
Total	33	82.50	7	17.50	40
Usia					
0-28 hari	0	0.00	0	0.00	0
1-6 bln	6	15.00	4	10.00	10
6-11 bln	9	22.50	1	2.50	10
12-23 bln	10	25.00	1	2.50	11
24-35 bln	5	12.50	1	2.50	6
36-47 bln	1	2.50	0	0.00	1
48-59 bln	2	5.00	0	0.00	2
Total	33	82.50	7	17.50	40
Status imunisasi Rotavirus					
Sudah divaksin	0	0	0	0	0
Belum divaksin	33	82.50	7	17.50	40
Total	33	82.50	7	17.50	40



## 5.1.2 Manifestasi klinik

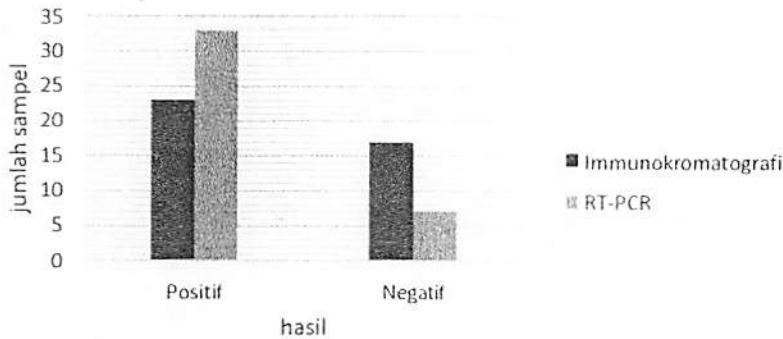
Tabel 5.2 Manifestasi klinik pasien di Provinsi Lampung bulan September-Desember 2016

Manifestasi klinik	positif	%	negatif	%	Total
<b>Durasi diare</b>					
0 jam	0	0	0	0.00	0
1-96 jam	7	17.5	5	12.50	12
97-120 jam	4	10	0	0.00	4
> 121 jam	22	55	2	5.00	24
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>82.5</b>	<b>7</b>	<b>17.50</b>	<b>40</b>
<b>Frekuensi diare</b>					
0 kali	0	0	0	0.00	0
1-3 kali	5	12.5	0	0.00	5
4-5 kali	7	17.5	2	5.00	9
> 6 kali	21	52.5	5	12.50	26
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>82.5</b>	<b>7</b>	<b>17.50</b>	<b>40</b>
<b>Durasi vomit</b>					
0 jam	9	22.5	3	7.50	12
1-24 jam	9	22.5	2	5.00	11
25-48 jam	2	5	0	0.00	2
> 49 jam	13	32.5	2	5.00	15
<b>Tot</b>	<b>33</b>	<b>82.5</b>	<b>7</b>	<b>17.50</b>	<b>40</b>
<b>frekuensi vomit</b>					
0 kali	7	17.5	3	7.50	10
1 kali	2	5	1	2.50	3
2-4 kali	13	32.5	0	0.00	13
> 5 kali	11	27.5	3	7.50	14
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>82.5</b>	<b>7</b>	<b>17.50</b>	<b>40</b>
<b>Suhu</b>					
37	2	5.00	1	2.50	3
37,1-38,4	17	42.50	3	7.50	20
38,5-38,9	10	25.00	1	2.50	11
> 39	5	12.50	1	2.50	6
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>85.00</b>	<b>6</b>	<b>15.00</b>	<b>40</b>
<b>Dehidrasi</b>					
tanpa dehidrasi	2	5.00	0	0.00	2
Ringan	4	10.00	1	2.50	5
Sedang	20	50.00	4	10.00	24
Berat	9	22.50	0	0.00	9



Total	35	87.50	5	12.50	40
Terapi					
tidak terapi	0	0.00	0	0.00	0
IV	0	0.00	0	0.00	0
MRS	33	82.50	7	17.50	40
Total	33	82.50	7	17.50	40

5.1.3 Identifikasi virus



Gambar 5.1. Perbandingan hasil pemeriksaan immunokromatografi dan RT-PCR pada sampel dari Provinsi Lampung bulan September-Desember 2016

5.1.4 Identifikasi genotipe

Tabel 5.3 Distribusi genotipe Rotavirus di Lampung September-Desember 2016

	G belum diidentifikasi	G1	G2	G3	G4	G6	G8	G9	G10	G12	G14	G25	GNTP	Total
P belum diidentifikasi	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	33
P[1]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[5]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[7]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[9]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[10]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[11]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P[14]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PNTP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	33

\*GNTP : G Non-typeable; \*PNTP : P Non-typeable

Tabel 5.4 Disain primer untuk pemeriksaan genotipe belum teridentifikasi

No	Nama primer	Urutan nukleotida	Posisi nukleotida	Panjang nukleotida (bp)	Target gen
1	EQG3FWD*	5'-CTG CAT ACG CTA ATT CTA CAC ACA AGG-3'	nt 242-266	544 bp	Equine-like G3
2	EQG3REV*	5'-GAT CGT ACA AGT AGC CGT AGT AAC-3'	nt 786-763		
3	Bcg9**	5'-GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G-3'	nt 1-28	1062 bp	VP7
4	End9**	5'-GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG-3'	nt 1062-1036		
5	RVG9**	5'-GGT CAC ATC ATA CAA TTC T-3'	nt 1062-1044		
6	Forward con3**	5'-TGG CTT CGC TCA TTT ATA GAC A-3'	nt 11-32	876 bp	VP4
7	Reverse con2**	5'-ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC-3'	nt 868-887		
8	pNCDV**	5'-CGA ACG CGG GGG TGG TAG TTG-3'	nt 269-289	622 bp atau 530 bp	P[1]
9	pUK**	5'-GCC AGG TGT CGC ATC AGA G-3'	nt 336-354	555 bp atau 463 bp	P[5]
10	pGott**	5'-GCT TCA ACG TCC TTT AAC ATC AG-3'	nt 465-487	423 bp atau 331 bp	P[6]
11	pOSU**	5'-CTT TAT CGG TGG AGA ATA CGT CAC-3'	nt 389-412	502 bp atau 410 bp	P[7]
12	ND2**	5'-AGC GAA CTC ACC AAT CTG-3'	nt 116-133	314 bp atau 222 bp	P[11]
13	SE-1**	5'-CTC TGC TAC TCT ACC TAT TTG-3'	nt 271-291	546 bp atau 414 bp	P[14]

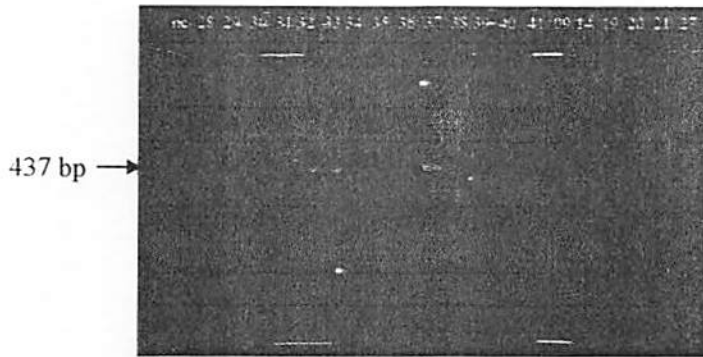
\*(Cowley *et al.*, 2016)

\*\*(WHO, 2009)

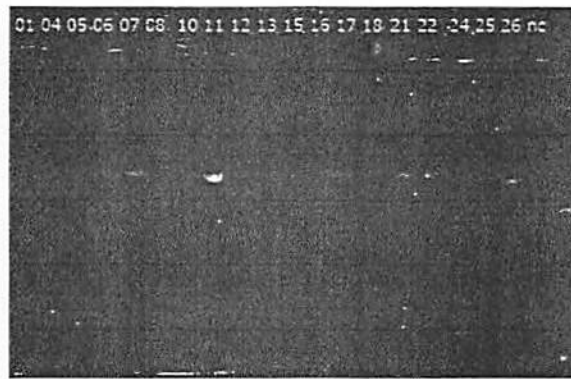
### 5.15 Identifikasi gen NSP4 Rotavirus

Tabel 5. 5 Disain primer untuk pemeriksaan gen NSP4

Nama primer	Urutan nukleotida	Posisi	Panjang nukleotida
NSP4-F	5'- AGA GAG CGC GTG CGG AAA GA -3'	nt 77-116	437 bp
NSP4-R	5'-GCG CGA CCA TTC CTT CCA TT-3'	nt 524-485	



(a)



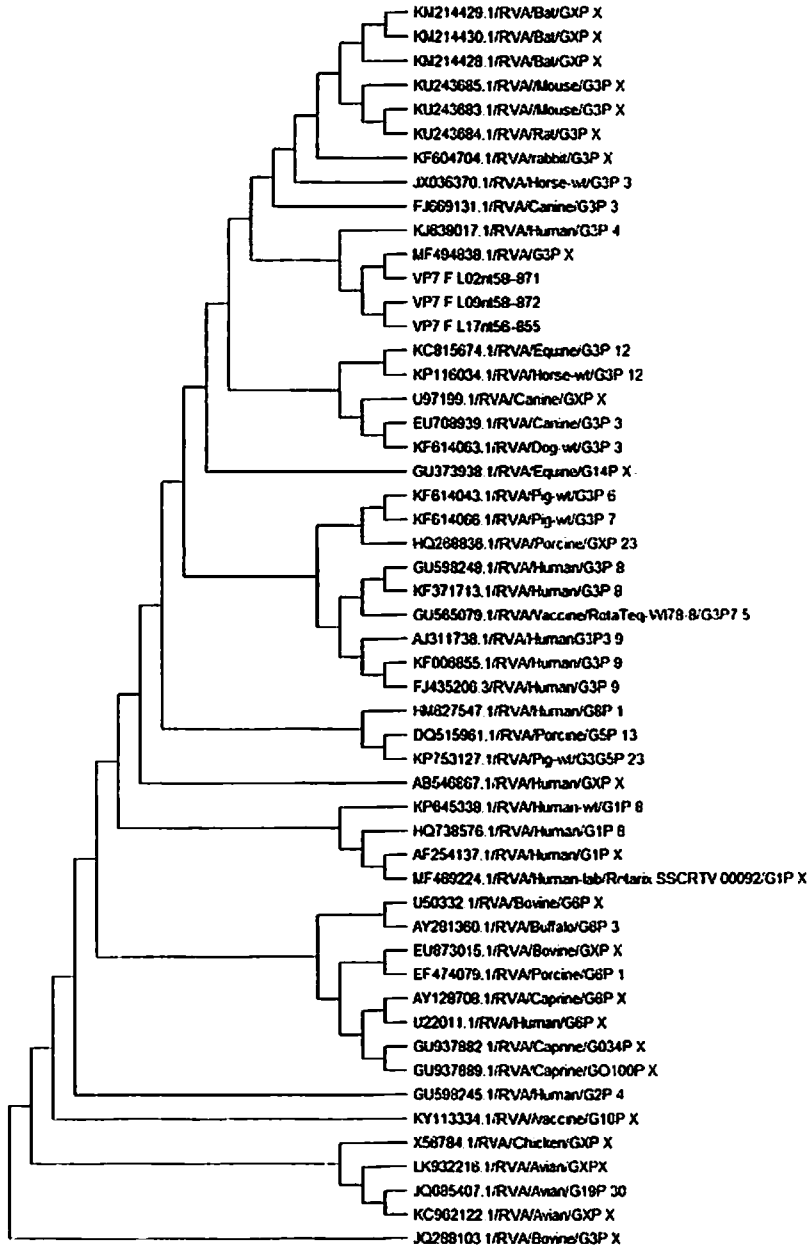
(b)



(c)

Gambar 5.2 Hasil pemeriksaan gen NSP4 pada sampel Provinsi Lampung bulan September-Desember 2016 (a, b, c)

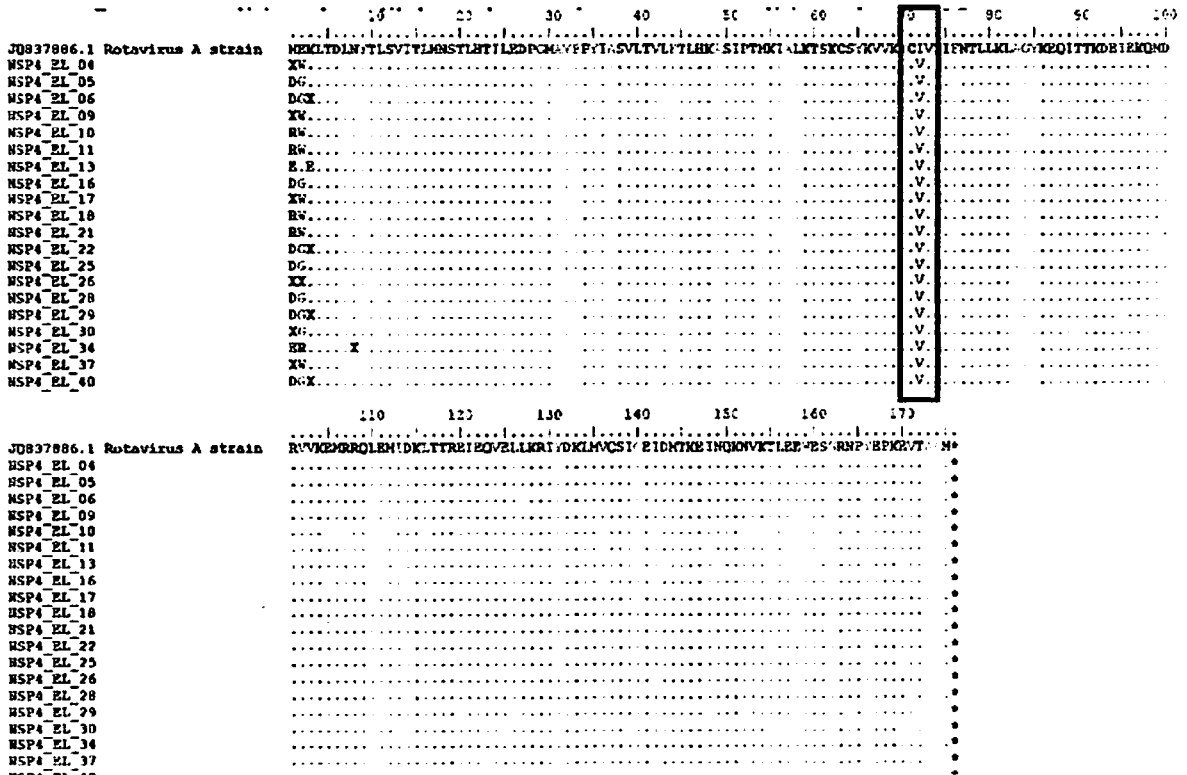
516 Analisis genotipe



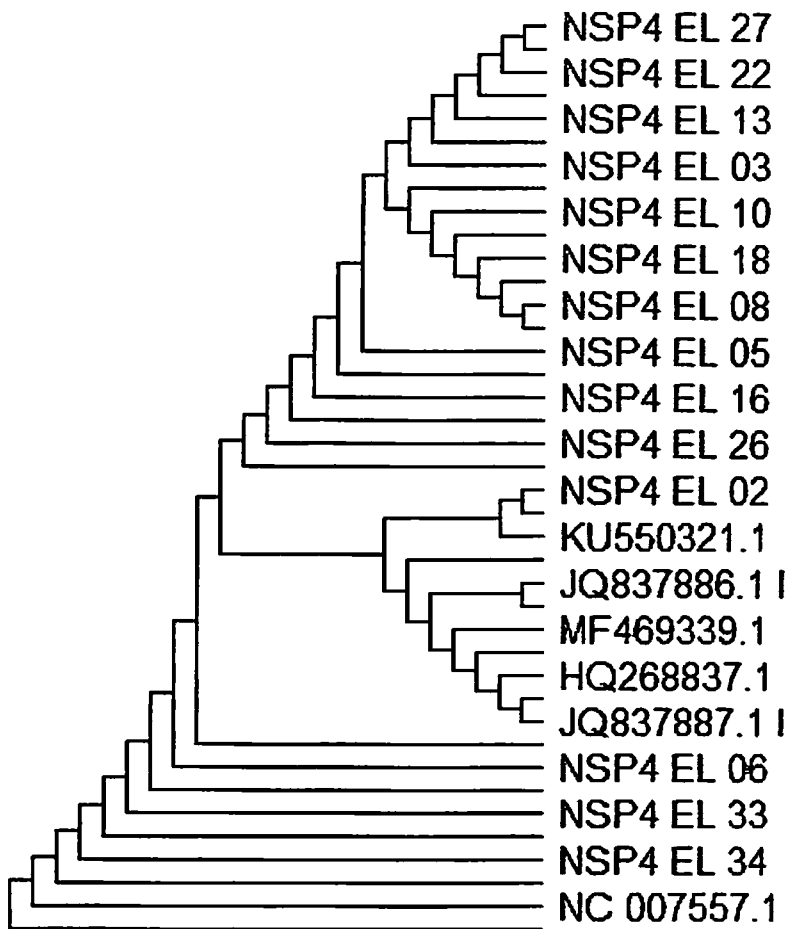
Gambar 5.3 Pohon filogenik gen VP7 Rotavirus pada sampel L02, L09, dan L17 dengan strain Rotavirus dan strain vaksin Rotateq. Rotavirus

nomenklatur mencakup *Genebank accession 21 number*, grup Rotavirus, spesies asal dari isolasi, genotipe untuk genom segmen 9 dan 4 berdasarkan grup klasifikasi Rotavirus.

**5.1.7 Analisis gen NSP4**



Gambar 5.4. *Multiple alignment* asam amino pada gen NSP4 pada sampel anak dengan gastroenteritis di Bandar Lampung



Gambar 5.5. Pohon filogenik genotipe NSP4 Rotavirus pada sampel dengan genotipe NSP4 Rotavirus lain. Rotavirus nomenklatur mencakup *Genebank accession 5 number*.

## 5.2 Luaran yang Dicapai

### Luaran yang telah dicapai

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian
1	Publikasi ilmiah <sup>2)</sup>	Internasional Bereputasi	Publikasi
		Nasional Terakreditasi	-
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Nasional	Sudah
		Internasional	Sudah
3	Pembicara utama ( <i>Invited Speaker</i> ) dalam temu ilmiah	Nasional	Draft
		Internasional	Draft
4		Paten	tidak ada
		Paten sederhana	Draft
		Hak cipta	tidak ada
		Merek dagang	tidak ada
		Rahasia dagang	tidak ada
		Desain Produk Industri	tidak ada
		Indikasi Geografis	tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	tidak ada
5	Teknologi tepat guna <sup>6)</sup>	Perlindungan topografi sirkuit terpadu	tidak ada
			tidak ada
6	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial <sup>7)</sup>		tidak ada
7	Buku Ajar (ISBN) <sup>8)</sup>		tidak ada
8	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>9)</sup>		1

## BAB 6

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Simpulan

1. 54 sampel (60%) positif terinfeksi Rotavirus dengan pemeriksaan imunokromatografi.
2. Usia paling dominan yang terinfeksi adalah usia < 2 tahun sejumlah 30 pasien. Rasio antara laki-laki dan perempuan adalah 4:3. Seluruh pasien (100%) belum pernah mendapatkan imunisasi Rotavirus sebelumnya.
3. 28 sampel (51,8%) memiliki genotipe VP7 G3 *Equine-like*
4. 28 sampel (51,8%) memiliki genotipe VP4 P[8]
5. 33 sampel (66%) memiliki genotipe NSP4 E2, sedangkan 26 (48,2%) sampel positif yang lain belum teridentifikasi genotipe dari Rotavirus tersebut.
6. Terjadi perubahan asam amino NSP4 dimana asam amino isoleusin disubstitusikan dengan asam amino valin pada titik ke 72.
7. Tidak terdapat hubungan antara genotipe VP7 G3 *equine-like* dengan derajat keparahan pasien diare aku.
8. Tidak terdapat hubungan antara varian genotipe NSP4 E2 dengan manifestasi klinik berupa derajat keparahan pasien diare aku.

#### 6.2 Saran

Pemeriksaan dilanjutkan untuk identifikasi sampel lain yang belum teridentifikasi serta uji statistik pada gen NSP4 dengan manifestasi klinik.





## DAFTAR PUSTAKA

- Akusjärvi, Goran, Anderson, David A, Anderson, Larry J, Atmar, Robert L, Beaulieu, Brian L, Bellini, William J *et al.* 2002. *Clinical Virology 2nd edition*. ASM Press : Washington DC.
- Ball, J. M., P. Tian. C. Q., Y. Zeng, A. P. Morris, dan M. K. Estes. 1996. Age-Dependent Diarrhea Induced By A Rotavirus Nonstructural Glycoprotein. *Science* 272; 101-104.
- Behrman ER, Klegman RM. 2010. *Nelson Essentials of Pediatrics Ed 4*. Buku Kedokteran EGC; Jakarta.
- Brooks, Geo F, Carroll, Karen C, Butel, Janet S, Morse, Stephen A, Moetzner, Timothy A. 2010. *Jawetz, Melnick, & Adelberg Medical Mikrobiologi 25<sup>th</sup> edition*. The McGraw-Hill Education and EGC medical Publisher. US.
- Brooks, Geo F, Carroll, Karen C, Butel, Janet S, Morse, Stephen A, Moetzner, Timothy A. 2010. *Jawetz, Melnick, & Adelberg Medical Mikrobiologi 25<sup>th</sup> edition*. The McGraw-Hill Education and EGC medical Publisher; US.
- Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. 2016. Emergence of a Novel equine-like G3P[8]. *J of Virology* 97; 403-410.
- Estes, M. K., dan A. Z. Kapikian. 2007. *Rotaviruses, p. 1917-1974. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Straus (ed.), Fields Virology, 5th ed., vol. 2*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Ferreira TL, Becho MC, Bernardo AR, *et al.* 2006. Performance of a Latex Agglutination Test in The Diagnosis of Acute Gastroenteritis by Rotavirus. *Brazilian Journal of Microbiology* 37; 587-589.
- Soegijanto, Soegeng. 2010. *Kumpulan Makalah Penyakit Tropis Dan Infeksi Di Indonesia Jilid 8*. Pusat penerbitan dan Percetakan Unair (AUP); Surabaya.
- Svraka S.S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmas, M. 2007. Etiological Role Of Viruses In Outbreaks Of Acute Gastroenteritis In Netherland From 1994 Through 2005. *J. Clin. Microbiol* 45; 1389-1394.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D. 2012. 2008 Estimate Of Worldwide Rotavirus Associated Mortality In Children Younger Than 5 Years Before The Introduction Of Universal Rotavirus Vaccination Programmes: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Lancet. Infect. Dis* 12; 136-141.
- Kemenkes RI. 2015. *Data dan Informasi tahun 2014 (Profil Kesehatan Indonesia)*. Kemenkes RI; Jakarta.
- Kemenkes RI. 2011. *Profil Kesehatan Provinsi Lampung tahun 2012*. Kemenkes RI; Jakarta.



- Yan, H., Nguyen, T. A., Phan, T. G., Okitsu, S., Li, Y., Ushijima, H. 2004. Development of RT-multiplex PCR assay for detection of adenovirus and group A and C rotaviruses in diarrheal fecal specimens from children in China. *Kansenshogoku Zasshi* 78; 699-709.
- Logan, Catriona., O'Leary, John J., O'Sullivan, Niamh. 2006. Real-Time Reverse Transcription-PCR For Detection Of Rotavirus And Adenovirus As Causative Agents Of Acute Viral Gastroenteritis In Children. *J. Clinical Microbiology* vol 44 (9) ; 3189-3195.
- Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B., Fang, Z.Y., 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28; 276-282.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Yagy, F., Okitsu, S., Ushijima, H., 2006a. Molecular characterization of a rare G3P[3] human rotavirus reassortant strain reveals evidence for multiple human-animal interspecies transmissions. *J. Med. Virol* 78; 986-994.
- Kudo, S., Zhou, Y., Cao, X.R., Yamanishi, S., Nakata, S., Ushijima, H., 2001. Molecular characterization in the VP7, VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 4 (G4) isolated in Japan and Kenya. *Microbiol Immunol.* 45; 167-171.
- WHO (World Health Organization). 2009. *Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods*. WHO; Geneva.

**DETECTION OF HIGH FREQUENCY AND CLINICAL FACTORS OF DIARRHEA  
CAUSED BY ROTAVIRUSES AMONG CHILDREN UNDER FIVE YEARS OLD: CROSS-  
SECTIONAL STUDY IN 2016 AND 2018 IN LAMPUNG, INDONESIA**

**Elsa Fitriana<sup>1</sup>, Dyni Arieta Ningrum<sup>2</sup>, Devi Oktafiani<sup>1</sup>, Ni Luh Ayu Megasari<sup>1</sup>, Atikah<sup>3</sup>,  
Kwartanti A Jannatin<sup>4</sup>, Rury Mega Wahyuni<sup>5</sup>, Laura Navika Yamani<sup>5</sup>, Zayyin Dinana<sup>5</sup>, Takako  
Utsumi<sup>8,9</sup>, Maria Inge Lucida<sup>5,7</sup>, Juniastuti<sup>5,7</sup>, Ikuo Shoji<sup>8,9</sup>, Soetjipto<sup>\*5,6</sup>**

**<sup>1</sup> The doctoral program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;**

**<sup>2</sup>Primary Health Care Panjang, Lampung, Indonesia;**

**<sup>3</sup>Graha Husada Hospital, Bandar Lampung;**

**<sup>4</sup>Midwife of Nusantara Sehat program, Mesuji, Lampung;**

**<sup>5</sup>Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;**

**<sup>6</sup> Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga,  
Surabaya, Indonesia;**

**<sup>7</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya,  
Indonesia;**

**<sup>8</sup>Indonesia-Japan Collaborative Research Center for Emerging and Re-emerging Infectious  
Diseases, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;**

**<sup>9</sup> Centre for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe,  
Japan**

**\*Correspondence :**

**Prof. Soetjipto**

**Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Jawa Timur 60115**

**031-5033726**

[soetjipto@sbv.ccntrin.net.id](mailto:soetjipto@sbv.ccntrin.net.id)

## **Abstract**

Diarrheal disease is one of the leading cause of deaths among children under five years old. Nearly one out of five child deaths, about 1.5 million each year, is due to diarrhea. Rotavirus is the leading cause of severe acute diarrhea in children throughout developed and developing countries. Forty samples were collected from children under five years old who were hospitalized at Primary Health Care Panjang, Tjokrodipo General Hospital and Abdoel Moeloek General Hospital in Bandar Lampung, Indonesia from September to December 2016. Amplification DNA for VP7 gene was carried out with Master Mix kit (Qiagen USA) using consensus forward primer. Age, sex, and Rotavirus vaccination data were collected by interview with parents or caretaker of patients. Eighty-two point five (82.5) percent of the total sample by PCR technique was proven to be Rotavirus infectious case. There are fifty (50%) male and thirty-two point five (32.5%) female patients. 75% of total patients belong to age group of 6-24 months. All patients (100%) have never been vaccinated with Rotavirus vaccine. Rotavirus infection was the common cause of most cases of acute diarrhea among children under five years old in Lampung, Indonesia in the year 2016. Introduction of Rotavirus vaccination is suggested to prevent diarrhea caused by Rotavirus.

**Keywords:** Rotavirus, diarrhea, Lampung, Indonesia

## **Introduction**

Diarrheal disease is one of the biggest leading causes of death in children under five years old (CDC, 2013). Rotavirus is the important cause of severe acute diarrhea in children all through both developed and developing countries. Rotavirus is the main cause of acute diarrhea in both developed and developing countries. Rotavirus is estimated to cause 528,000 death in the year 2000 and of 215,000 in the year 2013 all over the world (Tate *et al*, 2016). Most children under the age of five experienced the rotavirus infection. One out of five patients

visited a medical clinic, one out of 65 of patients was hospitalized and nearly one out of 293 died of rotavirus. The mortality rate for children under the age of 5 in Africa and South Asia reached more than 80% (Parashar et al, 2003).

Some previous studies reported that the rotavirus infection in Indonesia varied between 38 and 61% and the majority of infected children were under 2 years old (Putnam et al, 2007; Soenarto et al, 1981; Ofoyo et al, 2002; Soenarto et al, 2009; Radji et al, 2010). In Indonesia, Rotavirus is the major causative viral infection responsible for diarrheal disease in children (52%) (Nirvati et al, 2016). Furthermore, Lampung province is a region with the extraordinary condition of diarrhea in Indonesia in the year 2014 (Indonesia Health Ministry, 2015) and 2015 (Indonesia Health Ministry, 2016) and there was no data on diarrheal rotavirus case found in this province.

Moreover, to reduce the case of Rotavirus infections, Rotavirus vaccines have been developed and introduced for routine immunization in several countries in the Americas and Europe. In a projected birth cohort study of 4.2 million children conducted for 5 years, routine rotavirus vaccine program could potentially prevent the occurrence of 488,547 cases of diarrhea treated outpatient, 176,375 hospitalizations, and 8148 deaths (Wilopo et al, 2009). In Indonesia, the lack of data on rotavirus cases has led to the poor prioritization of Rotavirus vaccines as a prevention strategy. Then, to prove the incidence of Rotavirus infection and motivate a regulation about the introduction of Rotavirus vaccine in Lampung, Indonesia, this study determines diarrheal incidence caused by Rotavirus infection among children under five years old.

### **Materials and Methods**

Forty stool samples were collected from the inpatients' children who presented a diarrheal syndrome under five years old at Primary Health Care Panjang, Tjokrodipo General Hospital, and Abdoel Moeloek General Hospital in Lampung from September to December 2016. The

stool samples were sent to the Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga, Surabaya for further analysis.

Extraction and purification of viral RNA from 10% fecal suspensions in phosphate-buffered saline was done by QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. The extracted RNA was used for a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using Superscript platinum III kits (Invitrogen, USA). Amplification DNA for VP7 gene was carried out with Master Mix kit (Qiagen USA) using a consensus forward primer VP7F (5'-ATGTATGGTATTGAATATAACCAC-3') and a reverse primer VP7R (5'-AACTTGCCACCATTTTTTCC-3') (WHO, 2009). The nucleotides length was 881 bp.

Age, sex, and Rotavirus vaccination data were collected by interview with parents or caretaker of patients.

This study was approved by the Ethics Committee of Teaching Hospital of Airlangga University. Informed consent was obtained from parents or caretakers of eligible children before enrollment in this study.

## Results

A total of 40 stool samples were collected from children inpatients under 5 years old with diarrhea. 33 stools (82.5%) out of the total 40 stools were positively infected by rotavirus.

Table 1. comparison of the results obtained by ICT and PCR

		immunochromatography		Total
		Positive	Negative	
PCR	Positive	26	7	33
	Negative	0	7	7
total		26	14	40

**Table 2. Proportional distribution of age, sex, and Rotavirus vaccination in diarrhea patient with Rotavirus infection in Lampung, Indonesia September-December 2016**

Characteristic	Number of patients enrolled (n = 40)			
	Number of patients with Rotavirus-positive		Number of patient with Rotavirus-negative	
	Number	%	Number	%
<b>Sex</b>				
Male	20	50	4	10
Female	13	32.5	3	7.5
Total	33	82.5	7	17.5
<b>Age</b>				
0-28 days	0	0	0	0
1-6 months	6	15	4	10
6-11 months	9	22.5	1	2.5
12-23 months	10	25	1	0
24-35 months	5	12.5	1	2.5
36-47 months	1	2.5	0	0
48 -59 months	2	5	0	0
Total	32	82.5	7	17.5
<b>Vaccination</b>				
Vaccine	0	0	0	0
No-vaccine	33	82.5	7	17.5
Total	33	82.5	7	17.5

## Discussion

In this study, there are two different tests to detect rotavirus i.e., ICT and PCR. Twenty-six stool samples (78%) out of thirty-three stools were rotavirus positive by ICT. ICT Sensitivities and specificities were 75% and 95% for rotavirus (Weitzel et al, 2007). Other studies which evaluated the reliability of rotavirus by using ICT in developing country reported that the sensitivity and specificity by ICT reached the values of 70,5% and 95%, which is different from the PCR result. (Bulotsky et al, 2005). In contrast to classical detection methods for viral stool pathogens, such as electron microscopy, enzyme immune assay (EIA) or PCR, ICT can be carried out with less laboratory equipment, therefore it is suitable for tropical regions.

This was the first study about Rotavirus in Lampung, Indonesia. Rotavirus appeared as 82.5% of the total of 40 children inpatients with acute diarrhea. Rotavirus remains a major cause of acute diarrhea in children and previous studies in Indonesia showed that the incidence of Rotavirus infection as a cause of acute diarrhea in children (Hernawati *et al*, 2016). In comparison with other studies in Jakarta, Palembang, Bandung, Yogyakarta, Denpasar, Mataram, and Surabaya with incidences of Rotavirus infection of 67%, 64%, 51%, 39%, 61%, 65%(Soenarto *et al.*, 2009), 40% (Sudarmo *et al*, 2015) respectively, Lampung (82,5%) had the highest incidence. Patients with acute diarrhea caused by Rotavirus infection tended to have more severe clinical symptoms, so they were more likely to be hospitalized.

In this study, the majority (77%) of all cases of Rotavirus disease occurred in children aged < 2 years and 45% in male patients. The predominant patient age group Rotavirus positive was 6-24 months, similar to many other studies in Indonesia. This can be explained by the fact that at the age of < 6 months, maternal antibodies have a protective effect, while at the age >23 months it may have developed natural immunity due to recurrent Rotavirus infections. The lifespan of infection is in the first year of life(Bresee *et al*, 2005). The age distribution of children with Rotavirus infection in our study is consistent with European studies that showing the peak of infection in the first two years of life (Standaert *et al*, 2008) and other study in



some provinces in Indonesia (Nirwati *et al*, 2016; Socnarto *et al*, 2009; Sudarmo *et al*, 2015).

This study found that male patients proved a higher rotavirus infection (61%) than female (39%). These results were similar to another finding in Nigeria that males were twice as susceptible as females (Junaid *et al*, 2011). Furthermore, this virus affected males patient predominantly (Nguyen *et al*, 2004). However, other results found that there was no association between gender and rotavirus infection (Ibrahim *et al*, 2015; Manjula, 2013).

These samples were collected during September-December 2016 which was the transition season. Indonesia is a tropical country with the dry season (April-September or May-October) when the average rainfall decreases, and wet season (October-march or November-April) (Ministry of Environment of Indonesian Republic, 2007). Unlike many bacteriological agents causing diarrhea, Rotavirus occurs in both four-season countries and tropical areas. Rotavirus infections will occur year-round reaching its peak and onwards, despite the dry and the wet season (Prasetyo *et al*, 2015). Rotavirus infection is a common disease in children, regardless of the level of prevailing hygiene or the quality of food and water.

Although Indonesia had a trial Rotavirus vaccine in Yogyakarta Indonesia in 2013 and performed good result in decreasing of Rotavirus cases, other regions did not have regulation for this program yet. Studies have shown that Rotavirus vaccines are low cost yet is effective and are projected to have a large impact to reduce severe Rotavirus gastroenteritis cases in Indonesia (Suwantika *et al*, 2013).

Overall, our results highlight the high case of diarrhea caused by rotavirus in Lampung, Indonesia. Finally, raising community awareness about Rotavirus infection and introduction of Rotavirus vaccines will be important in accelerating the primary strategies to reduce the number of cases. Recent qualitative research has shown a low awareness of Rotavirus disease among policymakers, health care practitioners, and the community in Indonesia. This study suggests that health education is the goal for both medical and nonmedical communities in

order to increase awareness about the danger of Rotavirus infection and to garner big support from these groups.

### **Acknowledgment**

We thank the Ministry of Research, Technology and Higher Education, the Republic of Indonesia for granting this study with a provision. We are grateful to all staff and healthcare in Primary Health Care Rawat Inap Panjang, Bandar Lampung, Abdoel Moeck Hospital Bandar Lampung, and Tjokrodipo Hospital Bandar Lampung.

### **References**

- Bresec J, Hummelman E, Nelson A, Glass R. Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines. *Infectious Disease* 2005; 195: S1-S5.
- Bulotsky M, TC Masti, A Gil et al. Abstr. 45<sup>th</sup> Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. Abstr 2005; D-1662.
- CDC. Global Diarrhea Burden. 2013. Centers for Disease Control and Prevention.
- Ibrahim SB, El-Bialy AA, Mohammed MS, El-Sheikh AO, Elhewala A, Bahgat S. Detection of Rotavirus in Children with Acute Gastroenteritis in Zagazig University Hospitals in Egypt. *Electronic Physician* 2015; 7; 1227-1233.
- Indonesia Health Ministry. Indonesia Health Profile 2014. 2015. Jakarta.
- Indonesia Health Ministry. Indonesia Health Profile 2015. 2016. Jakarta.
- Junaid S, Umeh C, Olabode AO, and Banda JM. The incidence of Rotavirus Infection in Children with Gastroenteritis Attending Jos University Teaching Hospital, Nigeria. *Virology* 2011; 8: 233-240.
- Manjula G. Comparison of Immunochromatography with RT-PCR for Detection of Rotavirus in Fecal samples. *International Journal of Scientific Research* 2013; 2; 479-481.
- Nirwati H, Wibawa T, Aman AT, Wahab A, and Soenarto Y. Detection of Group A Rotavirus

Strains Circulating Among Children with Acute Diarrhea in Indonesia. *SpringerPlus* 2016; 5(97); 1-6. Available from: URL: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-1724-5> [cited 20180520].

Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C and Weintraub A. Diarrhea Caused by Rotavirus in Children Less than 5 Years of Age in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5745-5750.

Ofoyo BA, Subekti D, Tjaniadi P et al. enteropathogens Associated with Acute Diarrhea in Community and Hospitals Patients in Jakarta, Indonesia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34; 139-146.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 565-572.

Prasetyo D, Ermaya Y, Martiza I, and Yati S. Correlation between climate variations and Rotavirus diarrhea in under-five children in Bandung. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015; 5(11); 908-911.

Putnam SD, Sedyaningsih ER, Listiyaningsih E et al. Group A Rotavirus-Associated Diarrhea in Children Seeking Treatment in Indonesia. *J Clin Virol* 2007; 40; 289-294.

Radji M, Putnam SD, Malik A, Hurisma R, Listiyaningsih E. molecular Characterization of Human Group A Rotavirus from Stool Samples in Young Children with Diarrhea in Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2010; 41(2); 341-346.

Seale H, Sitaresmi MN Atthobari J et al. Knowledge, and Attitudes Towards Rotavirus Diarrhea and The Vaccine Amongst Healthcare Providers in Yogyakarta Indonesia. *BMC Health Services Research* 2015; 15; 528.

Soenarto Y, Sebodo T, Ridho R et al. Acute Diarrhea and Rotavirus Infection in Newborn Babies and Children in Yogyakarta, Indonesia, From June 1978 to June 1979. *J Clin Microbiol* 1981; 14; 123-129.

- Soenarto Y, Aman AT, Bakri A et al. Burden of Severe Rotavirus Diarrhea in Indonesia. *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 200(s1); S188–S194.
- Standaert B, Harlin O, Desselberger U. the Financial Burden of Rotavirus Disease in Four Countries of The European Union. *Pediatr Infect Disease J* 2008; 27; S20-S7.
- Sudarmo SM, Shigemura K, Atthiyah AF et al. Genotyping and Clinical Factors in Pediatric Diarrhea Caused Rotaviruses: One-year Surveillance in Surabaya, Indonesia. *Gut Pathogens* 2015; 7 Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365806/> [cited 2018 05 20].
- Suwantika AA, Tu HAT, Postma MJ. OCst-effectiveness of Rotavirus Immunization in Indonesia: Taking Breastfeeding Patterns Into Account. *Vaccine* 2013; 31: 3300-3307.
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C et al. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children < 5 years of Age, 2000-2013. *Clinical Infectious Disease* 2016; 62: S96-S105.
- Weitzel T, Reither K, Mockenhaupt FP et al. Field Evaluation of a Rota- and Adenovirus Immunochromatographic Assay Using Stool Samples from Children with Acute Diarrhea in Ghana. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (8): 2695-2697.
- WHO. Manual of Rotavirus Detection and Characterization Methods. *Biologicals* 2009: 143.

## DETECTION OF HUMAN HERPESVIRUS-8 ANTIGEN IN HIV-INFECTED PATIENTS IN EAST JAVA, INDONESIA

Devi Oktafiani<sup>1\*</sup>, Ni Luh Ayu Megasari<sup>1</sup>, Elsa Fitriana<sup>1</sup>, Nasronudin<sup>2</sup>, Maria Inge Lusida<sup>3,4</sup>, Soetjipto<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Doctoral Degree Program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; <sup>2</sup>Universitas Airlangga Hospital, Surabaya, Indonesia; <sup>3</sup>Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; <sup>4</sup>Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; <sup>5</sup>Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

\*Corresponding Author's E-mail: [devi.oktafiani-2015@fk.unair.ac.id](mailto:devi.oktafiani-2015@fk.unair.ac.id)**Article History**

Received: March. 17, 2017

Revised Received: Dec. 13, 2017

Accepted: Dec. 13, 2017

Published Online: June. 18, 2018

**Abstract**

**Background:** Co-infection of human herpesvirus-8 (HHV-8) in HIV-positive people might cause Kaposi's sarcoma. Early detection of HHV-8 may prevent the onset of clinical manifestations. In Indonesia, detection of HHV-8 antigen in HIV-positive patients has yet to be reported. The intention of this research was to examine the presence of HHV-8 antigen in HIV-positive patients in East Java, Indonesia.

**Material and Methods:** 103 serum samples were collected from HIV-positive patients in Surabaya and Tulungagung, East Java, Indonesia. Serums were then tested for the presence of HHV-8 antigen by using sandwich ELISA.

**Results:** Human Herpesvirus-8 antigen was detected in 15 samples (14.5%). The presence of HHV-8 infection in HIV-positive patients did not present differently in males and females and among different age groups. Human immunodeficiency virus-positive serum samples were collected from 23 homosexual men, 25 intravenous drug users (IVDUs) and 52 heterosexuals. In the male homosexual group, HHV-8 antigen was detected in 21.7% (5/23) of the samples, while in the intravenous drug user group (IVDUs), 16% (4/25) of the samples were found to have HHV-8 antigen.

**Conclusion:** This research found the presence of HHV-8 antigen in 14.5% of patients in East Java, Indonesia. It is recommended that patients with a positive result should receive further examination to detect any clinical manifestations related to HHV-8 infection, especially in the form of Kaposi's sarcoma lesions, so that the illness can be appropriately managed.

**Key Words:** HHV-8 antigen, HIV-positive, East Java, Indonesia.

**Introduction**

The human immunodeficiency virus (HIV) primarily attacks T helper (CD4+) lymphocytes. The human immunodeficiency virus (HIV) infection causes the immune system to weaken, so that the host becomes more susceptible to various infections and malignancies (Grant et al., 2005). One common co-infection found in people living with HIV/AIDS is a herpesvirus infection, including herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1, HSV-2), varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), herpesviruses 6 and 7, and human herpesvirus 8 (HHV-8 or Kaposi sarcoma-associated herpesvirus [KSHV]) (Brooks et al., 2013). HHV-8 infection in HIV/AIDS patients may cause Kaposi's Sarcoma (Dourminishev et al., 2003). Kaposi's sarcoma is a tumor developed from cells on lymph nodes or in blood vessels, and can also develop in other parts of the body (Dourminishev et al., 2003).

HHV-8 or KSHV, the only known human herpesvirus (rhadinovirus), is the most recently discovered tumor virus (Viejo-Borbolla et al., 2003). HHV-8 has a diameter of 140 nm and a genome of between approximately 125 kb (Burbelo et al., 2015), 165 kb (Brooks et al., 2013) and 170 kb (Russo et al., 1996). The virus has a double stranded linear DNA and icosahedral capsid envelope (Viejo-Borbolla et al., 2003). It is covered by a tegument containing protein, and closed during

budding of the cell. The membrane is derived from outer envelope of lipid membrane from various host and specific virus glycoprotein (Swaminathan, 2003).

Kaposi's sarcoma is more prevalent in immunosuppressed patients than healthy people. It often occurs in people with Jewish, Mediterranean, African, and Middle Eastern origins. Sero-epidemiological evidence of HHV-8 infection can be used to reflect the epidemiology of Kaposi's sarcoma (Grulich et al., 2001). Ablashi and colleagues' research reports that in 1999, seropositive prevalence of HHV-8 infection in general population of USA, Northern Europe, and Asia was only around zero to five percent; this was also the case in a seroepidemiological study in Malaysia, Hong Kong, and Sri Lanka where the seroprevalence of HHV-8 was found to be around 3,7%. However, a higher prevalence was found in Southern Europe, around five to ten percent. (Ablashi et al., 1999). There has been no data regarding viremia detection using ELISA method and no epidemiological reporting on the prevalence of HHV-8 infection in Indonesia. The aim of this study was to correct this omission with an examination of the presence of HHV-8 antigen in HIV-positive patients in East Java, Indonesia.

## Materials and Methods

This study was approved by the Ethics Committee of Universitas Airlangga Hospital. A hundred and three serum samples were collected from HIV-positive patients in Universitas Airlangga Hospital, Surabaya and Dokter Iskak Tulungagung General Hospital, East Java, Indonesia. The inclusions criteria are positive HIV infected with naïve or treated with antiretroviral, all age (in this case 7-5 years old, and the mean age is 37 years old). Exclusion criteria in this study were patients who did not agree to follow the study. Informed consent was obtained from each patient prior to sample collection. Patients were also asked to complete a questionnaire to provide general information and the possible route of transmission. The patients were then subjected to an HHV-8 antigen test using sandwich ELISA (Abbexa, Cambridge, UK), according to manufacturer instructions. Data obtained were analyzed using statistical software (SPSS version 21.0).

## Results

HIV-positive patients involved in this study comprised of 64 males and 39 females, with a mean age of 37 years (range 7-64 years). This research showed that 15 of 103 samples (14.56%) were found to be HHV-8 antigen positive. In regards to patients' gender, ten men (15.6%) and five women (12.8%) tested positive. The presence of HHV-8 antigen did not show any significant differences in age ( $p=0.05$ ) and gender ( $p=0.78$ ). HHV-8 infection in homosexual men was 21.7%, while 16% intravenous drug users (IVDUs) were positive.

**Table 1.** Determinants of HHV-8 infection in HIV positive patients

Characteristic	N	HHV-8 positive N (%)	P value $p < 0,05$ , S (Significant), NS (Not Significant)
<b>Age group (years)</b>			
A: $\leq 30$	31	4 (12,9%)	$p = 0,5$ (NS)
B: 31-40	35	7 (20%)	
C: $>40$	37	4 (10,8%)	
<b>Sex</b>			
Male	64	10 (15,6%)	$p = 0,78$ (NS)
Female	39	5 (12,8%)	
<b>Sexual orientation</b>			
Homo/bisexual	25	4 (16%)	$p = 0,5$ (NS)
Heterosexual	78	11 (14,1%)	
<b>Marital status</b>			
Married	68	10 (15,6%)	$p = 0,6$ (NS)
Not married	35	5 (12,8%)	

## Discussion

The results of the study conducted in East Java, Indonesia are an interesting comparison with other studies around the world. It must be reiterated here that the participants in the study were not screened for Kaposi sarcoma and the ELISA method was not used to collect the data regarding HHV-8 viremia. While the presence of HHV-8 antigen was detected in 14.56% of HIV-positive patients in East Java, Indonesia, previous studies in Xinjiang, China (Zhang et al., 2012), Nigeria (Ogoina et al., 2011) and Cameroon (Mbondji-Wonje et al., 2013) showed a greater prevalence, that is

31.2%, 62% and 70% respectively. Human herpesvirus 8 antigen was detected in 21.7% HIV-positive homosexual men. A study in Thailand reported the presence of HHV-8 lytic antigen in 12% HIV-positive homosexual men, 16% heterosexual men, and 9% IVDUs (Ayuthaya et al., 2002). HHV-8 without KS in serum samples are detected 4% and AIDS-KS are 42.8% in Brazil (Machado et al., 2016). Detection of herpes virus DNA in lymphocytes could possibly represent latent infection, while detectable DNA in serum or plasma is usually associated with disease (Polstra et al., 2003). In HIV-positive patients without Kaposi Sarcoma, 4% were positive using PCR method. These patients certainly present a higher risk of developing AIDS-KS (Machado et al., 2016).

Kaposi's sarcoma was the most common neoplasm found in patients infected with HIV. Kaposi's sarcoma is a tumor of blood vessels, which appears as lesions on the skin, and then spreads to other organs. It is noted here that there has been a decrease in the incidence of Kaposi's with other opportunistic illnesses, since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) (Jacobson et al., 1999). This downward trend is most likely due to secondary effects of antiretroviral therapy on the immune system (Cattelan et al., 2001 dan De Milito et al., 1999) rather than direct effect to HHV-8 (Kedes dan Ganem, 1997). A study utilizing polymerase chain reaction (PCR) demonstrated that HHV-8 was detected in more than 90% of Kaposi's sarcoma lesions (Mendez et al., 1998). Prospective studies indicated that the detection of HHV-8 could predict the development of Kaposi's sarcoma in asymptomatic subjects (Whitby et al., 1995 dan Moore et al., 1996). Several studies using different serological tests found that almost 100% patients with different clinical forms of Kaposi's sarcoma had a high titer of the HHV-8 antibody, which had been detected before the appearance of clinical lesions of Kaposi's sarcoma (Whitby et al., 1995; Gao et al., 1996 dan Moore et al., 1996). Current evidence suggests that HHV-8 infection is a prerequisite in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma, but factors relating to the host immuno-deficiency may greatly increase the incidence of Kaposi's sarcoma among subjects infected with HHV-8.

The presence of HHV-8 infection in HIV-positive patients is possibly related to the risk of developing opportunistic diseases, including Kaposi's sarcoma (classic, AIDS-related KS, endemic and iatrogenic) and other proliferative diseases, such as primary effusion lymphoma and multicentric Castleman disease. Among immuno-competent people, only a small proportion of HHV-8 infections develop into Kaposi sarcoma. Various tests have detected HHV-8 antibodies in the majority of asymptomatic individuals with increased tumor risk, including HIV-positive homosexual men (Martin et al., 1998), adults from Italy and various regions of sub-Saharan Africa (Sitas et al., 1999; Calabro et al., 1998), and some low risk people, such as blood donors from the UK, USA, and Jamaica (Simpson et al., 1996; Engels et al., 1999).

## Conclusion

The presence of HHV-8 antigen was found in 14.5% of the HIV-positive patients who participated in this study which is the first of its kind in Indonesia. Based on these results found in patients in East Java, further investigations should be conducted on patients living with HIV. This would assist with early detection and subsequent management of any clinical manifestations related to HHV-8 infection, especially in the form of Kaposi's sarcoma lesion.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements:** Thanks to LSM Mahameru, KDS Couple Community, and all the colleagues who have helped in this study.

## References

1. Ablashi, D., Chatlynne, L., Cooper, H., Thomas, D., Yadav, M., Norhanom, A.W., Chandana, A.K., Churdboonchart, V., Kulpradist, S.A., Patnaik, M., Liegmann, K., Masood, R., Reitz, M., Cleghorn, F., Manns, A., Levine, P.H., Rabkin, C., Biggar, R., Jensen, F., Gill, P., Jack, N., Edwards, J., Whitman, J., Boshoff, C (1999). Seroprevalence of human herpesvirus-8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. *British Journal of Cancer*. 81: 893-897.
2. Ayuthaya, P.I.N., Katano, H., Inagi, R., Auwanit, W., Sata, T., Kurata, T., and Yamanishi, K. (2002). The seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in the Thai population. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 33 (2): 297-305
3. Brooks, G.F., Carol, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A. (2013). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology: Twenty-six Edition* ed. USA: McGraw Hill, p.467-488
4. Calabro, M.L., Sheldon, J., Favero, A., Simpson, G.R., Fiore, R., Gomes, E., Angarano, G., Chieco-Bianchi, L. and Schulz, T.F. (1998). Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *Journal of Human Virology*, 1: 207-213

5. Cattelan, A., Calabro, M., Gasperini, P., Aversa, S., Zanchetta, M., Meneghetti, F., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L. (2001). Acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma regression after highly active antiretroviral therapy: biologic correlates of clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 28:44-49.
6. De Milito, A., Catucci, M., Venturi, G., Romano, L., Incandela, L., Valensin, P.E., Zazzi, M. (1999). Antiretroviral therapy with protease inhibitors in human immunodeficiency virus type 1- and human herpesvirus 8-coinfected patients. *Journal of Medical Virology*. 1999;57:140-144.
7. Engels, EA, Eastman, H., Ablashi, DV, Wilks, RJ, Braham, J, and Manns, A. (1999). Risk of transfusion-associated transmission of human herpesvirus 8. *Journal of the National Cancer Institute*. 91, 1773-1775
8. Gao, SJ, Kingsley, L., Li, M., Zheng, W., Parravicini, C., Ziegler, J., Newton, R., Rinaldo, C.R., Saah, A., Phair J, Detels, R, Chang, Y, Moore, P.S. (1996). KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nature Medicine* 2:925-928
9. Grulich, A., Rawlinson, W.D., Cunningham, P. (2001). Human herpesvirus 8: a newly described sexually transmissible infection. *Venereology* 14, 174-180
10. Jacobson, L.P., Yamashita, T.E., Detels, R., Margolick, J.B., Chmiel, J.S., Kingsley, L.A., Melnick, S., Mulnoz, A. (1999). Impact of potent antiretroviral therapy on the incidence of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphomas among HIV-1- infected individuals. Multicenter AIDS Cohort Study. *Journal of Acquire Immune Deficiency Syndrome*;21(Suppl 1):S34-41.
11. Kedes, D.H. and Ganem, D. (1997). Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. *The Journal of Clinical Investigation*; 99:2082-2086.
12. Machado, I., Farias, K., Pereira, M., Freitas, P., Fonseca, B. (2016). Human herpesvirus 8 (HHV-8) detected by nested polymerase chain reaction (PCR) in HIV patients with or without Kaposi's sarcoma. An analytic cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*. 2016; 134(3):187-192
13. Martin, J.N., Ganem, D.E., Osmond, D.H., Page-Shafer, KA, Macrae, D. and Kedes, D.H. (1998). Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *The New England Journal of Medicine*; 338, 948-954
14. Mbondji-Wonje, C., Ragupathy, V., Lee, S., Wood, O., Awazi, B., and Hewlett, I.K. (2013). Seroprevalence of Human Herpesvirus-8 in HIV-1 Infected and Uninfected Individuals in Cameroon. *Viruses* 2013, 5, 2253-2259
15. Mendez, J.C., Procop, G.W., Espy, M.J., Paya, C.V., Smith, T.F. (1998). Detection and semiquantitative analysis of human herpesvirus 8 DNA in specimens from patients with Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinical Microbiology*; 36:2220-2222
16. Moore, P.S., Kingsley, L.A., Holmberg, S.D., Spira, T., Gupta, P., Hoover, D.R., Parry, J.P., Conley, L.J., Jaffe, H.W., Chang, Y. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 10:175-180
17. Ogoina, D., Onyemelukwe, G., Musa, B.O., Babadoko, A. (2011). Seroprevalence and determinants of human herpes virus 8 infection in adult Nigerians with and without HIV-1 infection. *African Health Sciences* 2011; 11(2): 158 - 162
18. Polstra, A.M., Van Den Burg R., Goudsmit, J., Cornelissen, M. (2003). Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(12):5488-5491.
19. Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M-C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y., and Moore, P.S. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (25), 14862-14867.
20. Simpson, G.R., Schulz, T.F., Whitby, D., Cook, P.M., Boshoff, C., Rainbow, L., Howard, M.R., Gao, Shou-Jiang., Bohenzky, R.A., Simmonds, P., Lee, C., Ruitter, A., Hatzakis, A., Tedder, R.S., Weller, I., Weiss, R.A., Moore, S. (1996). Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet*, 349, 1133-1138
21. Sitas, F., Carrara, H., Beral, V., Newton, R., Reeves, G., Bull, D., Jentsch, U., Pacella-Norman, R., Bourboulia, D., Whitby, D., Boshoff, C. and Weiss, R. (1999). Antibodies against human herpesvirus 8 in black South African patients with cancer. *The New England Journal of Medicine*; 340, 1863-1871
22. Swaminathan, S. (2003). Molecular biology of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Seminars in Hematology*; 40, 107-115.
23. Viejo-Borbolla, A., Ottinger, M., Schulz, T.F. (2003). Human herpesvirus 8: Biology and role in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma and other AIDS-related malignancies. *Current HIV/AIDS Reports*. 5, 169-175.
24. Whitby, D., Howard, M.R., Tenant-Flowers, M., Brink, N.S., Copas, A., Boshoff, C., Hatzioannou, T., Suggett, F.E., Aldam, D.M., Denton, A.S. (1995). Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 346:799-802
25. Zhang, T., Shao, X., Chen, Y., Minhas, V., Wood, C., and He, N. (2012). Human Herpesvirus 8 Seroprevalence, China, *Virology Papers*. Paper 238.