

LAPORAN
Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Batch II
Tahun Anggaran 2009



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Tema : Gizi dan Penyakit Tropis

**PENINGKATAN EFEKTIFITAS VAKSIN DEMAM
BERDARAH DENGUE BERDASAR ANALISIS INTERAKSI
MOLEKULER ANTIGEN NS-1 DENGAN HLA-DR PADA
POPULASI DI JAWA TIMUR**

**Dr. Susilowati Andajani dr MS
Dr. F.M.Judajana, dr., Sp.PK (K)
Indah Nuraini SKM**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen
Pendidikan Nasional, sesuai dengan surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah
Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Nomor : 300/SP2H/PP/DP2M/VII/2009, tanggal 30 Juni 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2009**

10KA
KK
LP.175/10
And
P

LAPORAN

HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH II TAHUN ANGGARAN: 2009

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	. ii
PRAKATA.....	.iii
DAFTAR ISI.....	.iv
DAFTAR TABEL.....	.v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
I. PENDAHULUAN.....	1
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 1.....	4
IV. METODE PENELITIAN.....	5
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	11
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	15
DAFTAR PUSTAKA.....	16
LAMPIRAN.....	17
B. DAFTAR ARTIKEL ILMIAH	
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN.	

HALAMAN PENGESAHAN

1. Peningkatan Efektifitas Vaksin Demam Berdarah Dengue Berdasar Interaksi Molekuler Antigen NS-1 dengan HLA-DR Pada Populasi di Jawa Timur

2. Ketua Peneliti :
- a. Nama Lengkap : Dr. Susilowati Andajani dr MS
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 131 290 051
- d. Pangkat / Golongan / Jabatan : IV A/Lektor Kepala
- e. Bidang Keahlian : Kesehatan Masyarakat & Kedokteran Pencegahan
- f. Fakultas / Jurusan / Puslit : Kedokteran
- g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

NO	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS / JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dr.Susilowati Andajani dr. MS	Epidemiologi/ I Kesehatan Masy	Kedokteran	Univ.Airlangga
2	Dr.F.M.Judajana dr. SpPK (K)	Imunogenetik Patologi Klinik	Kedokteran	Univ.Airlangga
3	Indah Nuraini SKM	Bio Molekuler	Kedokteran	Univ.Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : ..2 (dua).... tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp..100.000.000,-.....
- c. Biaya yang disetujui tahun ke 1 : Rp....81.000.000,-.....



Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran

Prof.Dr. Mohamad Amin dr. SpP (K)
NIP. 130 617 186

Surabaya, 14 Desember 2009
Ketua Peneliti,

Dr.Susilowati Andajani dr MS
NIP 131 290 051

Mengetahui



Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA.,drh
NIP 131 837 004

RINGKASAN DAN SUMARRY

Pada dekade terakhir masyarakat Indonesia terjadi pemaparan sakit Demam Berdarah Dengue sangat memprihatinkan serta berpotensi memberikan kontribusi meningkatnya angka kematian di Indonesia, Di Jawa Timur angka kejadian sakit DBD pada tahun 2006 sebesar 56,28 per 100.000 penduduk, sedangkan di Surabaya terdapat 149 penderita per 100.000 penduduk.

Kejadian sakit DBD tersebut memberikan problema kesehatan masyarakat pada segala tingkatan umur karena masih kesulitan untuk menegakan diagnostik dini dan serta belum ditemukannya metode prevensi yang tepat sasaran.

Berbagai upaya strategi pencegahan telah dilakukan untuk mengatasinya disertai peningkatan kemampuan cara diagnosis dini serta perbaikan cara pengobatan, namun masalah kesehatan tersebut belum dapat diatasi secara memuaskan. Hal tersebut karena belum tuntasnya pemahaman patogenesis Demam Dengue / Demam Berdarah Dengue.

Interaksi berbagai faktor internal seperti sistem genetik, sistem imun, serta faktor lingkungan memberikan kontribusi utama pada pemahaman patogenesis Demam Berdarah Dengue (DBD) / Demam Dengue (DD) melalui penelitian yang telah dilakukan

Konsep utama pencegahan yang sedang dupayakan dan upaya sintesis vaksin mendekati penyelesaiannya berdasarkan strain virus Dengue (DEN -1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) yang dominan terlibat dalam manifestasi penyakit suatu area, dan diperlukan konsep pola imunogenetik antara lain HLA-A, -B pada host sebagai faktor determinan yang potensial dan diperhitungkan dalam rekayasa keunggulan suatu vaksin yang akan disintesis/ diproduksi.

Fokus penelitian ini untuk mengidentifikasi molekul HLA -DR, yang termasuk ruang lingkup gen yang mengendalikan sistem imun pada hospes (host) dan mampu bereksresi sebagai *susceptibility gene* yang mempunyai korelasi / asosiasi yang bermakna dengan terjadinya DBD/DD pada host. Sasaran penelitian adalah populasi penderita DBD/DD di Jawa Timur dan jumlah sampel yang akan diteliti sebanyak 20 sampel darah penderita, dan 6 penderita yang diteliti tersebut pernah menderita DD/DBD sebelumnya (infeksi DD yang berulang)

Metode pemeriksaan sistem HLA-DR dengan uji *DNA typing- PCR* dan hasilnya dianalisis dengan software dari Invitrogen..Hasil deteksi gene tersebut akan analisis selanjutnya dengan metode *chi-square* koreksi dari *Yate's*. Nilai peluang seseorang untuk mendapatkan penyakit DD/DBD dinyatakan dengan menguji *resiko relatif* dengan rumus dari *Wolf's*.

Hasil penelitian adalah jenis HLA-DRB1*12,-DRB1*03 dan HLA-DRB4*01,-DRB3*01, Hla-DQB1*03, DQB1*05 yang spesifik dan mempunyai hubungan yang bermakna dengan kejadian sakit DD/DBD pada populasi Indonesia di Jawa Timur. Hasil identifikasi gen HLA yang secara statistik mempunyai asosiasi dengan kejadian sakit DD/DBD dapat dimanfaatkan sebagai faktor determinan yang potensial perlu diperhitungkan dalam strategi rekayasa vaksin DD/DBD untuk mendapatkan efektifitas yang tinggi pada populasi di Jawa Timur.

Hasil identifikasi HLA pada penderita DD/DBD dan dilanjutkan penelitian sejenis pada seluruh area di Indonesia sebagai suatu sistem imunogenetik yang mengendalikan pola respon imun tubuh hospes(host) akan memberikan kepastian kompatibilitas bagi vaksin yang akan diberikan sebagai salah satu pencegahan yang tepat sasaran.

PRAKATA

Penyakit infeksi yang terpapar dimasyarakat tetap merupakan problematik utama kesehatan masyarakat serta memerlukan perhatian yang serius berbasis hasil penelitian yang sistematis dan mendapatkan solusi yang tepat guna.

Seperti diketahui solusi problematik penyakit infeksi yang mewabah kembali di Indonesia dan lazim disebut *emerging and reemerging infectious diseases*, jelas memerlukan upaya menemukan kendala yang berpengaruh dominan terjadinya proses kejadian sakit .

Keterkaitan antara berbagai kendala (multifaktorial) sebagai dasar utama penyimpangan reaksi timbulnya penyakit infeksi, seharusnya menjadi fokus penelitian yang perlu diidentifikasi secara absah

Implementasi hasil upaya penelitian dalam penyakit infeksi diharapkan sesuai dengan prioritas yang termaktub dalam strategi pembangunan Nasional, misalnya wabah Demam Berdarah Dengue yang mengakibatkan angka kejadian mortalitas yang demikian tinggi di Indonesia.

Program penelitian ini berfokus pada analisis sistem imunogenetik yang terkait dengan kejadian sakit DD/DBD yang akan memberikan manfaat kontrol bagi biokompatibilitas dari vaksin yang harus disintesis (produksi) secara mandiri. Karena konsep dasar produksi vaksin yang efektif, seharusnya berdasar strain virus DD/DBD yang karakteristik didapat dan hidup diarea tersebut serta pola sistem HLA yang spesifik terdapat pada populasi yang akan divaksinasi.

DAFTAR ISI

I.	PENDAHULUAN.....	1
II.	TINJAUAN PUSTAKA.....	2
III.	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 1.....	4
IV.	METODE PENELITIAN.....	5
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	11
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	15
	DAFTAR PUSTAKA.....	16
	LAMPIRAN.....	17

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Distribusi dan frekuensi alel/gen HLA-DRB* pada DD/DBD..... 13

Tabel 2. Distribusi dan frekuensi alel/gen HLA-DQB* pada DD/DBD..... 14

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema Respon Imun Spesifik.....	3
Gambar 2. Hasil Elektrophoresis (IA-1).....	12
Gambar 3. Hasil Elektrophoresis (IA-2).....	13
Gambar 4. Hasil Elektrophoresis (IA-3).....	13
Gambar 5. Hasil Elektrophoresis (IA-4).....	13

PENDAHULUAN

Angka kejadian sakit Demam Berdarah Dengue menunjukkan peningkatan yang potensial memberikan kontribusi meningkatnya angka kematian di Indonesia, Di Jawa Timur angka kejadian sakit DBD pada tahun 2006 sebesar 56,28 per 100.000 penduduk, sedangkan di Surabaya terdapat 149 penderita per 100.000 penduduk.

Berbagai upaya strategi pencegahan telah dilakukan untuk mengatasinya disertai peningkatan kemampuan cara diagnosis dini serta perbaikan cara pengobatan, namun masalah kesehatan tersebut belum dapat diatasi secara memuaskan. Hal tersebut karena belum tuntasnya pemahaman patogenesis Demam Dengue / Demam Berdarah Dengue.

Interaksi berbagai faktor internal seperti sistem genetik, sistem imun, serta faktor lingkungan memberikan kontribusi utama pada pemahaman patogenesis Demam Berdarah Dengue (DBD) / Demam Dengue (DD) melalui penelitian yang telah dilakukan

Konsep utama pencegahan yang sedang dipayakan dan mendekati penyelesaiannya adalah suatu vaksin Dengue berdasarkan strain virus Dengue (DEN -1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) yang dominan terlibat dalam manifestasi penyakit suatu area, namun masih diperlukan konsep pola imunogenetik antara lain HLA DR pada host sebagai faktor determinan yang potensial dan diperhitungkan dalam rekayasa keunggulan suatu vaksin yang akan disintesis/ diproduksi.

Fokus penelitian ini untuk mengeksplorasi jenis molekul HLA DR sebagai ekspresi *susceptibility gene* yang mempunyai korelasi / asosiasi yang bermakna dengan terjadinya DBD/DD pada host. Sasaran penelitian adalah populasi penderita DBD/DD di Jawa Timur dan jumlah sampel yang akan diteliti sebanyak 30 sampel darah penderita.

1.1. Rumusan Masalah Penelitian :

1. Adakah jenis HLA DR yang mempunyai hubungan bermakna dengan kerentanan DD/DBD pada seseorang Indonesia di Jawa Timur ?
2. Bagaimana tingkat kemaknaan identifikasi pola HLA kelas I yang protektif pada populasi sehat/normal Indonesia di Jawa Timur ?

TINJAUAN PUSTAKA

Imunopatogenesis dan faktor determinan

Interaksi mikroorganisme dengan manusia sebagai hospes merupakan proses yang dinamik berdasarkan suatu respon imun pada tubuh hospes dan melibatkan berbagai faktor determinan khususnya dengan sistem inflamasi yang berperan sangat penting dalam proses eliminasi mikroorganisme penyebab (Rote NS, 2006)

Imunopatogenesis suatu kejadian penyakit infeksi yang tergolong "*emergene and reemergence*" mempunyai tahapan proses yang mirip namun berbeda dalam intensitas dan potensi respon imun yang ditimbulkan, baik pada imunitas alami (*innate immunity*) atau sekarang disebut *less specific immunity* maupun imunitas adaptif (*acquired immunity / more specific immunity*) (Janeway, 2008).

Struktur dan karakteristik komponen antigenik suatu substansi penyebab kejadian infeksi (viral, bacterial, parasit, jamur) serta pola imunogenetik pada hospes memegang peranan penting terhadap proses imun yang terjadi baik imunitas alami atau adaptif, yang akan berpengaruh terhadap besarnya intensitas dan potensi respon imun yang terjadi.

Adanya mutasi mikroorganisme penyebab (virus, bacteria, jamur, parasite) meng akibatkan perbedaan derajat virulensi dan pola transmisinya yang menimbulkan "*new antigen*" bagi hospes, sehingga terjadi stimulasi system imun hospes yang karakteristik berbeda dalam imunopatogenesis terkait dengan kepekaan pada hospes.

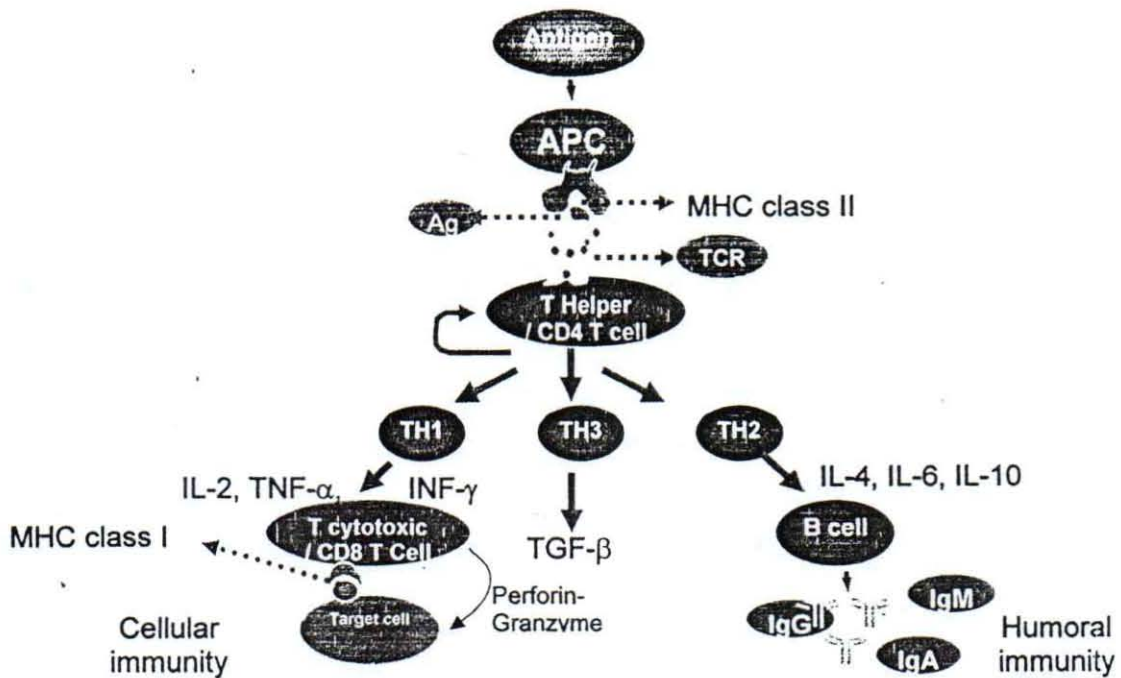
Respon Imun.

Pemahaman terhadap **ketepatan mengenali substansi antigen** merupakan awal yang penting dalam rangkaian proses imun selanjutnya ditinjau secara molekuler maupun seluler dan bermanfaat untuk identifikasi substansi biologik yang dominant terlibat pada setiap tahap proses kejadian sakit atau disebut "*stage of disease process*".

Garis besar rentetan rangkaian respon imun adaptif pada *re-emerging diseases* meliputi (Janeway, 2008)

1. Pengenalan *mutated antigen* oleh sel yang berperan sebagai *Antigen Processing Cell (APC)*
2. Presentasi *mutated antigen* pada permukaan APC oleh sistem MHC/ HLA kelas II dan berinteraksi dengan reseptor sel *T helper (TCR)*, yang lasim disebut interaksi trimolekuler

3. Hasil interaksi trimolekuler tersebut menentukan jenis antigen sebagai *self* atau *non self*
4. Analisis komposisi, potensi substansi yang telah dikonfirmasi sebagai antigen *self/non-self* yang menentukan besarnya intensitas koordinasi respon imun yang dilaksanakan oleh sel *TH* atau *CD4Tcell*
5. Proses eliminasi *mutated antigen intracellular* dengan jalur imunitas seluler melalui interaksi molekul TCR pada *CD8Tcell* dengan system MHC / HLA kelas I pada sel target
6. Proses netralisasi *mutated antigen extra cellular* dengan jalur imunitas humoral melalui immunoglobulin yang dihasilkan oleh limfosit B.



Gambar 1. Skema respon imun spesifik (Judajana, 2003)

Keterangan singkatan:

Ag : antigen, Ig : immunoglobulin, APC : antigen presenting and processing cell, TCR : T cell receptor, HLA : Human leukocyte Antigen, MHC :Major Histocompatibility Complex, IL : interleukin, TNF- α : Tumor Necrotic alfa, IFN- γ : gama interferon; TGF β : Tumor Growth Factor beta, B cell : Lymphocyte B, T cell : lymphocyte T

Berdasarkan skema tersebut, semua komponen imun atau molekul yang terlibat dalam respon imun yang spesifik (molekul HLA , TCR, Interleukin, reseptor sitokin, imunoglobulin) mempunyai kendali genetik dan disebut sebagai *immunogenetic*.

Defisiensi salah satu imunogenetik (*TCR gene*) akan berdampak terganggunya aktifitas koordinasi imun yang dijalankan oleh oleh limposit TH (*CD4T cell*), demikian pula bila terdapat defisiensi pada sistem imunogenetik lainnya, misalnya *HLA /MHC gene, interleukin gene, receptor cytokine gene dan imunoglobulin gene*.

Lasimnya semua antigen mengalami proses di APC namun terdapat komposisi komponen mikroorganisme yang karakteristik yang disebut *super antigen* ternyata tidak diproses pada APC namun langsung terlibat dalam reaksi tri molekuler kompleks untuk menentukan spesifisitas antigen tersebut sebagai *self* atau *non self antigen*.

Tujuan Dan Manfaat Penelitian

Tujuan Umum

Mendapatkan pola gen HLA DR yang mempunyai asosiasi dengan infeksi Demam Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur

Tujuan Khusus

Menentukan substansi yang dominant terlibat dalam interaksi antara HLA-antigen virus Dengue dan molekul TCR pada penderita Demam Berdarah Dengue dengan :

- 1 .Identifikasi HLA DR yang terkait nilai kerentanan terhadap Demam Berdarah Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur
2. Identifikasi HLA DR yang terkait nilai protektif terhadap Demam Berdarah Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur

Manfaat /Urgensi dan Keutamaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat :

1. Identifikasi individu yang mempunyai resiko menderita infeksi Demam Dengue (predisposisi genetik) yang bermanfaat sebagai kontrol biologik konsep rekayasa vaksin yang tepat guna.

2. Mendapatkan gambaran yang lebih jelas, tepat dan rinci tentang konsep etiopatogenesis Demam Dengue ditinjau dari pendekatan imunogenetik yang dapat diharapkan bermanfaat untuk salah satu cara pengobatan dimasa mendatang dengan mendaya gunakan aktifitas imunitas seluler dan humoral yang lebih efisien
3. Pendayagunaan imunogenetika sebagai ilmu dasar sebagai salah satu cara pendekatan untuk strategi diagnosis dini pada hospes terhadap invasi virus dengue melalui jenis substansi HLA kelas 1 yang dominan berperan dalam patogenesis

Sasaran / Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah semua penderita Demam Berdarah Dengue di Poli Rawat Jalan / Rawat Inap Penyakit Dalam dan Anak RSUD Dr. Soetomo yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Penelitian ini berpusat di RSUD Dr. Soetomo sebagai tempat pemilihan sampel dan pengambilan darah serta di Instalasi Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo, LPT / Institut Tropical Disease Universitas Airlangga sebagai tempat pemrosesan dan pemeriksaan sampel.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan bentuk penelitian observasional eksploratif dan berada dalam lingkup penelitian genetik. Sasaran penelitian adalah penderita Demam Berdarah Dengue yang memenuhi kriteria penerimaan sampel dan sebagai kontrol adalah orang Indonesia yang sehat serta tidak pernah menderita Demam Berdarah Dengue tersebut

Sampel penelitian yang dijalankan adalah *purposive sampling (non random)* pada populasi yang memenuhi kriteria penerimaan sampel (*inclusion criteria*) yang ditetapkan dan penderita menetap di Jawa Timur .

SASARAN LUARAN TAHUN 2009- 2010

Mendapatkan asosiasi antara HLA DR dengan manifestasi klinis Demam Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur. Makna asosiasi adalah peluang seseorang untuk mendapatkan Demam Dengue dengan spesifisitas HLA yang tertentu.

Penelitian pada tahap ini bertujuan menetapkan jenis substansi HLA kelas I yang berasosiasi dengan kejadian sakit DD/DBD dengan melakukan:

1. *Penetapan manifestasi klinis penderita DBD*
2. *Pemeriksaan HLA DR dengan teknik mikrolimpositotoksisitas pada penderita DBD*
3. *Penetapan HLA DR dengan teknik mikrolimpositotoksisitas untuk mendapatkan pola genetika populasi normal yang diteliti*
4. *Analisis Statistik*

1. Penetapan manifestasi klinis DBD

a. Sampel

Pengambilan sampel penelitian secara purposiv (non random). Besarnya sampel dalam penelitian ini ditentukan dengan rumus

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Perhitungan berdasarkan selang kepercayaan alfa 5%. Perbedaan estimasi prevalensi 6% dan proporsi DD 0.15 dan dari hasil perhitungan tersebut diharapkan minimal 36 penderita DD yang akan diteliti, sedangkan untuk penelitian genetika populasi yang sehat sudah dilakukan sebelumnya

b. Kriteria penerimaan sampel adalah :

Penderita DD dan DBD berdasarkan modifikasi kriteria WHO (1997)

Kadar Klinis Demam Dengue dan Demam Berdarah Dengue

- Demam tinggi mendadak 2 -5 hari, tanpa sebab yang jelas
- Adanya manifestasi perdarahan termasuk uji tourniquet positif
Ptechia, echimosis, perdarahan gusi, hematemesis/melena
- Pembesaran hepar (hepatomegali)
- Tanda syok, nadi lemah, penyempitan pulse pressure, hipotensi
Akral dingin, kulit lembab dan pasien tampak gelisah

Kriteria Laboratoris :

- Trombositopenia (kurang dari 100.000/mm³)

- Hemokonsentrasi / peningkatan nilai hematokrit 20% atau lebih
Diagnosis ditegakan bila terdapat 2 (dua) atau lebih gejala klinik disertai trombositopenia dan hemokonsentrasi (WHO, 2000 ; WHO 2003). Diagnosis pasti ditegakakan dengan uji imuno-serologis (IgM DHV, IgG DHV) deteksi virus Dengue (NS1Antigen) atau isolasi virus Dengue.

Kriteria Inklusi :1. Penderita Demam Dengue / DBD

2. Penderita populasi Indonesia di Jawa Timur

3. Tidak menderita infeksi virus lainnya pada saat pengambilan sampel

Sampel tersebut diperoleh dari Departemen Penyakit Dalam Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi dan Departemen Kesehatan Anak R.S.Dr. Soetomo Surabaya, dan jumlah darah yang diambil dari setiap sampel antara 5 – 10 ml.

Untuk setiap sampel yang diperoleh akan diambil sebagai kontrol (pembanding) adalah orang Indonesia yang sehat dengan jenis kelamin, umur dan suku bangsa yang sesuai dengan kriteria Antropometrik

Garis Besar Langkah Pemeriksaan Laboratorium:

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan PureLink™ *Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA.*

- 200 µl sampel darah disentrifus.
- Menyiapkan lisat menggunakan *buffer digestion*, yaitu pelet di *distilled water* dan tambahkan 20 µl proteinase K.
- Tambahkan buffer lisis/binding dan ethanol ke dalam lisat.
- Tambahkan 20 µl RNase A ke dalam sampel, divortex dan inkubasi pada suhu kamar selama 2 menit.
- Tambahkan 200 µl PureLink™ *Genomic lysis/ binding buffer* dan vortex untuk mendapatkan larutan homogen.
- Inkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit.
- Masukkan sampel ke dalam kolom spin PureLink™

- Bilas kolom dengan 500 µl buffer pencuci 1. sentrifus pada 10.000 x g. selama 1 menit.
- Bilas kolom dengan 500 µl buffer pencuci 2. sentrifus pada kecepatan maksimum selama 3 menit pada suhu kamar.
- Elusi DNA dengan 200 µl PureLink™ Genomic elution buffer. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Sentrifus dengan kecepatan maksimum selama 1 menit pada suhu kamar.
- Hasil DNA dapat disimpan 4°C

Pemeriksaan Penentuan gen HLA

- Menyiapkan sampel sejumlah aliquot untuk PCR buffer diteteskan pada semua sumuran (96 sumuran).
- Tambahkan DNA taq polimerase serta sejumlah air pada setiap sumuran. Dimana volume DNA yang dicampurkan sekitar 75 – 100 nano gram/liter.
- Volume akhir antara DNA dan air pada sumuran 2,8 perbandingannya adalah 44. pada sumuran no 9-12 jumlah volume 49 µl. Pada sumuran 13-16 volume 68 µl. Pada sumuran 17-24 volume 85 µl. Pada sumuran 25-32 volume 114 µl. Pada sumuran 33-40 volume 142 µl. Pada sumuran 41-44 volume 156 µl. Pada sumuran 45-48 volume 170 µl. Pada sumuran 49-96 volume 348 µl.
- Seluruh sumuran ditutup dengan *sealed tray* dan diatasnya ditempatkan *Heat Equalizing Block*.
- Kemudian dimasukkan dalam Perkin Elmer dengan SSP UniTray®.

Penetapan dengan Gel Elektroforesis

- menggunakan *high quality agarose*, yang mempunyai kemampuan meresolving 50-5000 pasang basa fragmen DNA.
- Invitrogen™ DNA grade agarose (kode produk #75000500) bekerja baik pada 2%.
- Menyiapkan gel pada 0,5X TBE buffer. Setelah didinginkan pada 60°C tambahkan 2 µl dari 10 mg/ml ethidium bromide untuk setiap 100 ml agarose solution dan mix well.

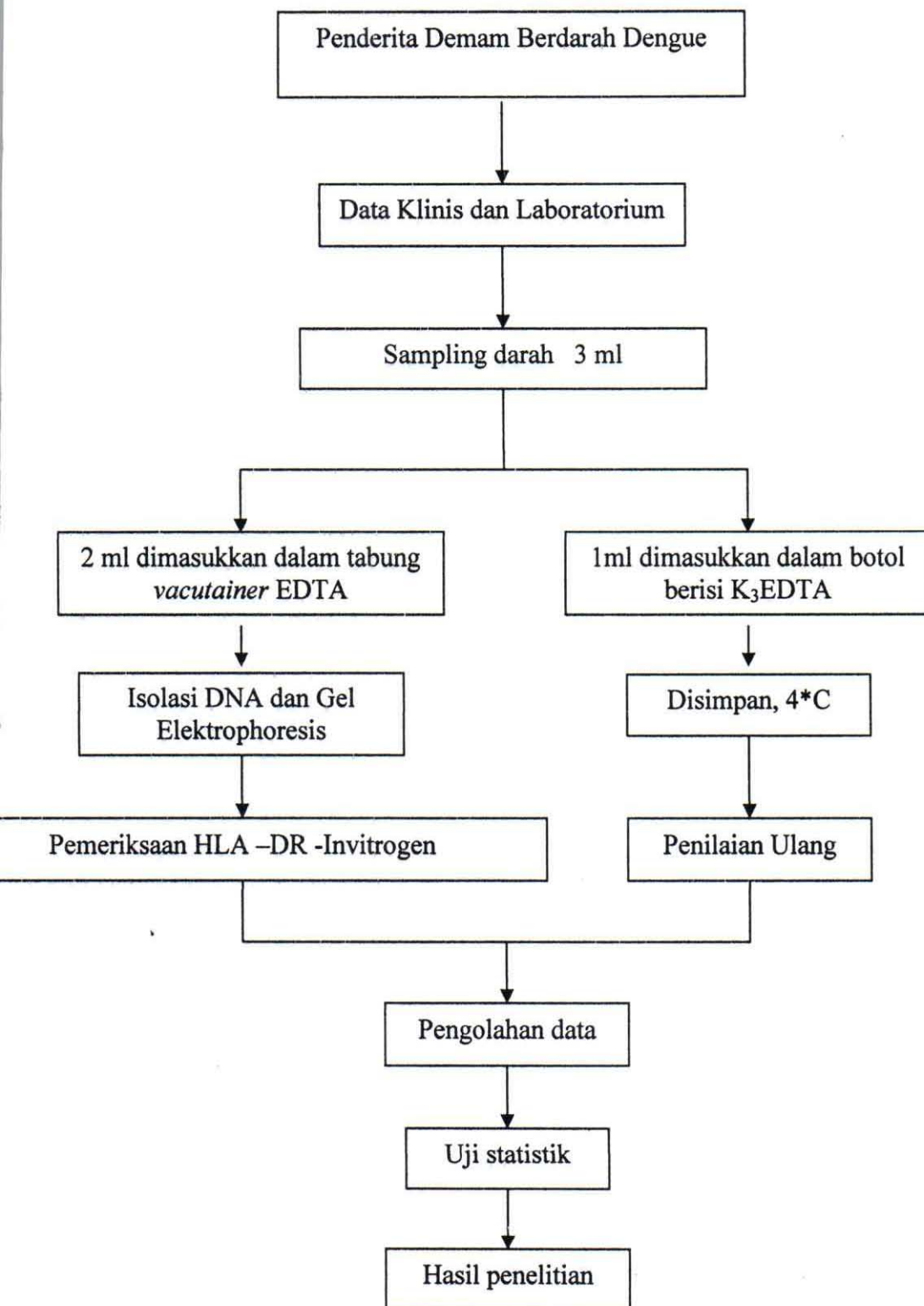
- Gunakan 0,5X TBE buffer pada *gel chamber* sebagai running buffer.
- Isolat DNA diteteskan pada sumuran pada gel elektroforeses
- Gel dapat dijalankan atau *running* pada 10 volt per sentimeter gel panjangnya.

Analisis dengan Soft ware

*** Interpretasi Gel Documentation**

- Tujuannya untuk memeriksa positive lane.
- Primer yang dipakai antara 50 pasang basa dan 100 pasang basa.
- Kemudian tandai positive lane pada kertas kerja (Worksheet)
- Analisis akhir untuk menentukan spesifisitas alel HLA dengan menggunakan software yang disediakan khusus dari Invitrogen Genomic HLA

Alur Penelitian (Kerangka Operasional Penelitian)



HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Uraian Tahap penelitian yang telah dilakukan :

- Sampling darah penderita Demam dengue : 20 penderita sesuai dengan kriteria klinis dan laboratories pada populasi di Jawa Timur baik dari RS Dr.Sutomo,
- Variasi umur penderita Demam Berdarah Dengue yang diteliti berkisar dari bayi 8 bulan – manusia dewasa 32 tahun, dan lama menderita Demam (suspect DB) sekitar 3 sampai 5 hari dan pengambilan sampel pada sasaran yang diteliti pada hari ketiga
- Setelah pemeriksaan Klinis pada semua penderita dilakukan pemeriksaan skreening laboratorium diawali dari pengujian Darah Lengkap termasuk hitung trombosit, NS 1 Antigen. Pemeriksaan Laboratorium untuk menegakkan diagnosis DBD sesuai dengan kriteria laboratorium pada DBD (Hb, PCV, Hitung Lekosit dan Hitung Trombosit)
- Persiapan bahan / reagen laboratorium , desain operasional dan konsultasi deteksi / analisis Molekuler Sistem HLA yang lebih efisien di laboratorium *Stem Cell and Cancer Institut* , Jakarta
- Persiapan instrumen laboratorium telah dikerjakan dengan kalibrasi sesuai dengan standarisasi pada setiap alat/instrumen laboratorium

Uraian Tahap proses pemeriksaan Sistem HLA

1. Hasil Isolasi DNA

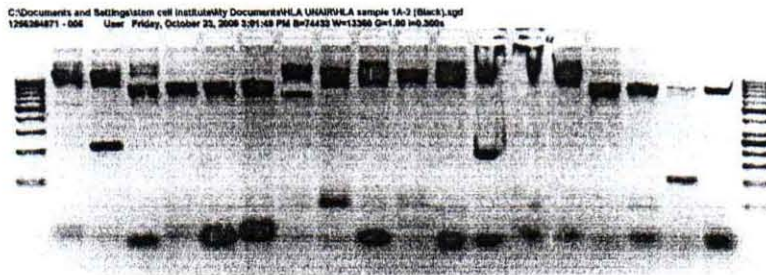
- Sampling darah yang dilakukan sejumlah 2 -3 ml dan ditampung dengan Vacutainer yang mengandung antikogulan EDTA dari BD
- Isolasi DNA dengan Pure Link* Genomic DNA dari Invitrogen pada semua sampel tersebut dengan hasil kemurnian DNA sekitar 1,7 – 1,9 dan jumlah yang direkomendasikan berkisar 75 – 125 ng/ μ L (sampel DNA yang telah diisolasi sebanyak 22)
- Deteksi kemurnian DNA pada sampel darah pada penelitian ini untuk pemeriksaan sistem HLA diperlukan kemurnian yang tinggi (1,7). dari sampel yang tersedia (22)

- Hasil kemurnian DNA isolasi yang dilakukan yang tidak diperiksa sebanyak 2 sampel, karena kemurnian yang rendah 1,1 dan 1,2.

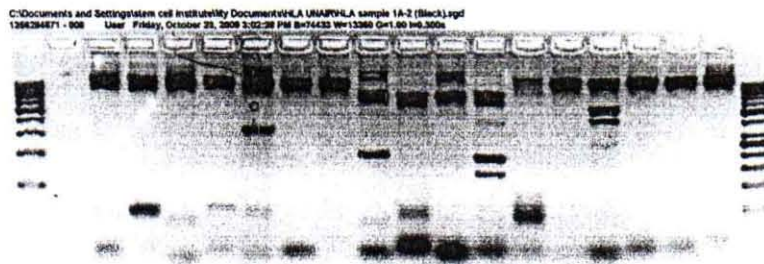
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Deteksi HLA dengan PCR

- Hasil isolat DNA dideteksi jenis alel dengan meneteskan pada tray yang spesial dari Introgen (SSP UniTray) yang pada setiap sumurannya (96 sumuran) telah terpapar primer yang spesifik terhadap jenis alel tertentu. Kemudian dilakukan pemrosesan PCR – dengan memakai alat dari Perkin Elmer.
- Hasil PCR setiap sampel akan terekspresi melalui tahapan pemaparan pada gel Elektrophoresis dan akan terlihat gambaran yang dapat dinilai dengan Marker Ladder 50 dan 100 base pairs, sbb :



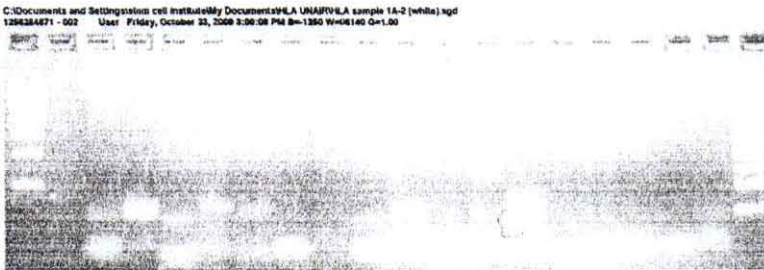
Gambar2. Hasil Elektrophoresis (IA-1)



Gambar 3. Hasil Elektrophoresis (IA-2)



Gambar 4. Hasil Elektrophoresis (IA-3)



Gambar 5. Hasil Elektrophoresis (IA-4)

- Tahap analisis hasil pemeriksaan HLA DRB1* dan HLA DQB1* dengan Software SSP UniTray * dari Invitrogen dengan hasil sbb :

Table 1
L Distribusi dan Asosiasi HLA-DRB1 *, DRB3*, DRB84 pada Penderita Demam Berdarah Dengue

Alleles	DF n = 16		DHF n = 4		Controls n = 34	
	GF		GF		GF	
HLA-DRB1*03	14	0,434	19	0,593	28	0,418
HLA-DRB1*12	8	0,282	6	0,187	6	0,077
HLA-DRB1*13	2	0,078	5	0,156	12	0,176
HLA-DRB1*14	4	0,156	2	0,063	4	0,058
HLA DRB1*15	2	0,078	0	0,000	4	0,058
HLA DRB1*10	1	0,039	0	0,000	1	0,017
HLA DRB1*07	2	0,078	0	0,000	10	0,147
HLA DRB3*01	10	0,334	0	0,000	28	0,318
HLA DRB4*01	7	0,217	0	0,000	7	0,102

Table 2 Distribusi dan Asosiasi HLA-DQB1 * pada Penderita Demam Berdarah Dengue



L

Alleles	DF		DHF		Controls	
	n = 16	GF	n = 4	GF	n = 34	GF
HLA-DQB1*02	5	0,108	3	0,593	42	0,617
HLA-DQB1*03	12	0,322	1	0,187	10	0,147
HLA-DQB1*04	5	0,108	1	0,063	12	0,176
HLA-DQB1*05	8	0,242	2	0,126	4	0,058
HLA-DQB1*06	5	0,108	0	0,000	2	0,029

Kesimpulan :

1. Terdapat asosiasi positif pada HLA DRB1*12 dengan frekuensi gen yang tinggi pada populasi Demam Dengue dibandingkan frekuensi gen di populasi normal/ orang sehat yang tidak pernah sakit DD
2. Terdapat asosiasi positif pada HLA B1*03 dengan frekuensi gen yang cukup tinggi sesuai frekuensi gen yang ada pada populasi normal / sehat yang tidak pernah sakit DD
3. Terdapat asosiasi positif pada HLA DRB4*01 dengan frekuensi gen yang tinggi pada populasi Demam Dengue dibandingkan frekuensi gen yang terdapat dipopulasi normal/sehat tidak pernah sakit DD
4. Terdapat asosiasi positif pada HLA DRB3*01 dengan frekuensi gen yang cukup tinggi sesuai dengan frekuensi gen yang terdapat pada populasi normal/sehat tidak pernah menderita DD
5. Terdapat asosiasi positif pada HLA DQB1*03 dengan frekuensi gen yang tinggi pada populasi Demam Dengue dibandingkan frekuensi gen yang terdapat dipopulasi normal/sehat tidak pernah sakit DD
6. Terdapat asosiasi positif pada HLA DQB1*05 dengan frekuensi gen yang lebih tinggi dibandingkan dengan frekuensi gen yang terdapat pada populasi normal/sehat tidak pernah menderita DD
7. Tereksresi alel yang homosigot dari pasangan gen yang berasosiasi dengan kepekaan /susceptibility terhadap DD

SARAN

Diperlukan penelitian lanjutan untuk menemukan asosiasi antara tipe virus DHF(DEN2,)yang berasosiasi dengan HLA DP yang harus dibuktikan mempunyai asosiasi yang kuat dan terlibat dalam patogenesis DD/DBD

Daftar Pustaka :

1. **Lezama JAF, Ramos C ,Zuniga J, Juarez`Palma L (2009)** HLA class I and II polymorphism in Mexican Mestizo patients with Dengue fever. *Acta Tropica* 112, pp 193 -197
2. **Janeway. (2008)** Basic Concept in Immunology. In : *Immunobiology*. Seventh Edit. Edited by. K. Murphy Travers. Published by Garland science, New York USA, p1 -38.
3. **Judajana. (2003)**. Imunogenetika dan respon imun. In : *Gangguan system imun mukosa intestinal*. Second Edit. Edited by Pitono Suparto, Subijanto M S, Suhartono TP, FM Judajana . Gideon Printing, Surabaya .p 1 -11
4. **Judajana. (2003)**. A new dimension of immunopathogenesis on emerging and reemerging infectious disease. *Seminar Tropical Disease on emerging and reemerging infectious disease*, Surabaya , Juli 2008
5. **Ohsitani H, Kamgaki T,Suzuki A (2008)**. Major issues and challenges of influenza pandemic preparedness in developing countries. *Emerg Infect Dis*. June 2008. p 1 - 8
6. **Siera B, Alegre R, Perez AB, Garcia G, Ramirez Ks (2007)**. HLA A,-B and – DRB1 allele frequency in Cuban individual with antecedents of Dengue disease. *Human Immunology* ,vol 68, p 531 -540
7. **Stephens HAF, Klaytong R, Sirikong M (2009)**. HLA –A and –B allele associations with secondary Dengue virus infections correlate with disease severity in etnic Thais. *Tissue Antigens*, vol 60, p 309 – 318
8. **Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, Hsu YM, (2009)**. HLA Class I (A,B) and class II (DRB1,DQA1, DQB1) alleles and haplotypes in the ethnic Han from the Southern China. *Tissue Antigens*, vol 70, p 455 - 463

9. **Rote NS, Huether SE (2006).**Infection. In Pathophysiology, the biologic basis for disease in adult and children. Edited by K L Mc Cance, S E Huether. Published by Elsevier Mosby Inc. St.Louis, USA, p 293-308

**SISTEMATIKA LAPORAN EKSEKUTIF
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS
NASIONAL BATCH II
TAHUN ANGGARAN: 2009**

Judul : Peningkatan Efektifitas Vaksin Demam Berdarah Dengue berdasarkan interaksi Molekuler Antigen NS-1 dengan HLA DR pada Populasi di Jawa Timur

**Oleh
Dr. Susilowati Andajani dr MS
Dr. F.M.Judajana, dr., Sp.PK (K)
Indah Nuraini SKM**

I. PERMASALAHAN DAN TUJUAN PENELITIAN

MASALAH :

1. Belum adanya vaksin Demam Dengue/Demam Berdarah Dengue yang tepat guna dan tepat sasaran bagi program pencegahan pada populasi di Jawa Timur, yang seharusnya berbasis pola imunogenetika (sistem HLA)
2. Adakah jenis spesifisitas alel/gen HLA DR yang mempunyai hubungan bermakna dengan kerentanan DD/DBD pada seseorang Indonesia di Jawa Timur ?
3. Bagaimana tingkat kemaknaan identifikasi pola HLA-DR yang protektif pada populasi sehat/normal Indonesia di Jawa Timur ?

Tujuan Umum

Mendapatkan pola gen HLA-DR yang mempunyai asosiasi dengan infeksi Demam Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur

Tujuan Khusus

Menentukan substansi yang dominant terlibat dalam interaksi antara HLA-antigen virus Dengue dan molekul TCR pada penderita Demam Berdarah Dengue dengan :

1. Identifikasi HLA- DR yang terkait nilai kerentanan terhadap Demam Berdarah Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur
2. Identifikasi HLA-DR yang terkait nilai protektif terhadap Demam Berdarah Dengue pada populasi Indonesia di Jawa Timur

II. INOVASI IPTEKS

Ditemukannya hasil penelitian : HLA--DRB1*12,-DRB1*03 dan HLA-DRB4*01,-DRB3*01, Hla-DQB1*03, DQB1*05 yang berasosiasi dengan kejadian sakit Demam Dengue/Demam Berdarah Dengue memberikan manfaat sebagai faktor determinan yang potensial diperhitungkan dalam strategi rekayasa vaksin DD/DBD

Temuan penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai substansi biologik yang dominan terlibat dan determinan keberhasilan suatu program vaksin Demam Berdarah Dengue yang sedang dalam proses penelitian

III. KONTRIBUSI TERHADAP PEMBANGUNAN

1. Hasil penelitian ini memberikan kontribusi konsep substansi biologik sebagai determinan yang harus diperhitungkan untuk produksi vaksin Demam Dengue/Demam Berdarah Dengue sebagai upaya pencegahan dan kemandirian anak bangsa bagi solusi problem Kesehatan Masyarakat
2. Nilai tambah bagi efektifitas program pencegahan penyakit yang mampu memberikan kontribusi positif bagi proses suatu pembangunan yang berkesinambungan
3. Publikasi artikel ilmiah yang diterbitkan dalam Jurnal Nasional dan Internasional yang akan mengangkat harkat dan reputasi Indonesia dalam bidang pengembangan ilmu

IV. MANFAAT BAGI INSTITUSI

1. Keterlibatan unit penelitian di Universitas Airlangga dalam pelaksanaan penelitian dan penerapan /implemtasi hasil penelitian yaitu : Unit Demam Berdarah pada Institut Tropical Disease- Univ.Airlangga
2. Keterlibatan mahasiswa S2 FK Unair: Indah Nuraini SKM
3. Kerjasama penelitian dengan Stem Cell and Cancer Institut di Jakarta
4. Implementasi hasil penelitian bagi substansi kuliah untuk program S1,S2, dan S3 berupa konsep HLA dan Demam Berdarah Dengue.

V. PUBLIKASI ILMIAH

1. Konsep paper akan dikirimkan pada Majalah : Clinical Pathology and Clinical Laboratory , pada edisi Maret 2010.
2. Presentasi simposium Penyakit Infeksi, June 2010
3. Poster Section pada pertemuan Litbangkes pada program vaksinasi