

A

LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL
DALAM RANGKA PUBLIKASI INTERNASIONAL

BATCH II



**PROFIL GENETIK DAN MANIFESTASI KLINIK
DEMAM BERDARAH DENGUE ANAK
DI INDONESIA**

Peneliti :

Prof. Dr. Ismoedijanto, dr., SpA(K), DTM&H
Dominicus Husada, dr., SpA, MCTM (TP)

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian
Untuk Publikasi Internasional Batch II nomor : 651/SP2H/PP/DP2M/VII/2009,
tanggal 30 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
2009

KKA
KK
LP-16816
16m
P

LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL
DALAM RANGKA PUBLIKASI INTERNASIONAL



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PROFIL GENETIK DAN MANIFESTASI KLINIK
DEMAM BERDARAH DENGUE ANAK
DI INDONESIA**

Peneliti :
Prof. Dr. Ismoedijanto, dr., SpA(K), DTM&H
Dominicus Husada, dr., SpA, MCTM (TP)

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian
Untuk Publikasi Internasional Batch II nomor : 651/SP2H/PP/DP2M/VII/2009,
tanggal 30 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA
2009

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Profil Genetik dan Manifestasi Klinik Demam Berdarah Dengue Anak di Indonesia
2. Ketua Peneliti :
 - a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Ismoedijanto, dr., SpA(K), DTM&H
 - b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
 - c. NIP :
 - d. Jabatan Struktural : -
 - e. Jabatan Fungsional : Guru Besar Ilmu Kesehatan Anak
 - f. Fakultas / Jurusan : Fakultas Kedokteran/Bagian Ilmu Kesehatan Anak
 - g. Pusat Penelitian : Tropical Disease Center
 - h. Alamat : Jl. Prof. Dr. Moestopo 6-8, Surabaya
 - i. Telepon / Faks : 5501697 / 5501748
 - j. Alamat Rumah : Jl. Mulyosari Timur 75, Surabaya
 - k. Telepon/Faks/E-mail : 08123238854
3. Mitra Kerjasama Internasional :
Nama : Prof. Hayashi, PhD
Institusi : Kobe University, Jepang
4. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun
5. Pembiayaan
Jumlah biaya yang dibutuhkan : Rp. 2.000.000.000
Jumlah biaya yang disediakan oleh mitra : Rp.

Jumlah biaya yang diajukan ke Dikti : Rp. 300.000.000
Jumlah biaya yang disetujui DIKTI : Rp. 30.000.000

Surabaya, 10 Desember 2009

Mengetahui

Ketua ITD

Ketua Peneliti,

Dr. Nasronudin, dr., SpPD(KPTI)

Prof. Dr. Ismoedijanto, dr., SpA(K), DTM&H

NIP. 140159 073

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA, drh.

NIP. 131037 004

RINGKASAN

Penyakit infeksi virus dengue merupakan masalah besar di negara tropis termasuk Indonesia karena masih tingginya angka kesakitan dan kematian. Faktor yang mempengaruhi patogenesis penyakit antara lain adalah respon imun, faktor virus dengue sendiri, serta faktor genetik penderita. Berbagai penelitian untuk mengungkapkan faktor-faktor tersebut telah dipublikasi. Sekalipun demikian data dari Indonesia, terutama yang menyangkut profil genetik penderita, masih sangat kurang.

Sebagian besar laporan penelitian mengenai aspek genetik penderita infeksi virus dengue mengenai gen Human Leucocyte Antigen (HLA). Hingga saat ini belum didapatkan pola yang seragam dari hasil penelitian-penelitian tersebut sehingga dibutuhkan lebih banyak data untuk menarik kesimpulan yang lebih baik.

Penelitian ini berupaya mulai membuka jalan untuk memetakan bukan saja jenis virus dengue di Indonesia, namun juga memetakan jenis HLA yang rentan infeksi virus dengue dan selanjutnya akan menuju ke arah lokasi genetik yang berpengaruh pada derajat beratnya penyakit. Selain itu juga dicari jalan pintas untuk mencari HLA mana yang *bersifat protektif baik menurunkan suseptibilitas maupun menurunkan derajat beratnya penyakit*. Dengan memetakan mana yang rentan atau protektif dan mana yang berpengaruh pada beratnya penyakit, selain sebagai alat diagnostik, juga sebagai alat pemantau respon imun terhadap vaksin, sehingga tidak hanya mengandalkan seroepidemiologik survey atau randomized clinical trials yang menelan biaya yang besar. Dengan mendapatkan adanya frekuensi HLA-DR yang banyak pada penderita dengan infeksi virus dengue, vaksin envelope bisa di uji manfaatnya lewat prose seluler yang akan lebih bermanfaat di banding serologik. Harapannya ke depan juga adalah merangkai besaran komponen virus, komponen genetik penderita dan respon imun yang terjadi, agar dapat membuat gambaran utuh patogenesis penyakit dengue dan dapat digunakan untuk memahami mekanisme penyebaran penyakit dan berkembangnya densitas dan severitas penyakit dengue di Indonesia, yang berbeda dengan negara lain.

SUMMARY

Dengue infection becomes mayor public health problem in Indonesia and in all tropic countries with a high morbidity and mortality. Genetic properties which influence the susceptibility and the severity of the clinical picture of dengue infection is mandatory. Most of the publications were through analysis of HLA, but most of the data is still conflicting. Pathogenesis of dengue infection is influenced by host presenting as immune responds, genetic properties, viral components and environment. Many had been published, but the data available from Indonesia is limited. Indonesia, which pose a very important location for dengue virus, presumed to have the position of the origin or aggravate the viral mutation to cause a more severe clinical manifestation. There were two main influence of HLA on the clinical manifestation of the disease, one to the susceptibility to the dengue virus infection and the other is severity of disease related with influence to the Antibody Dependent Enhancement mechanism.

Our research through HLA was only the first step to mapped up the susceptibility factors to further research of the clinical severity. There are ten clinical sample of susupected dengue viral infection were collected. Nine were serologically positive. There were seven HLA-DR found in these clinical sample, one HLA-DQ and other two were inconclusive. Different classes of HLA, alleles should be search to corelate this factors and the development of severity or shock syndrome. A deeper insight on HLA-DR will be of benefit to look the component which boost the protective immune responds and to develop a method to analyze the responds to vaccine.

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur pada Tuhan yang maha Esa, kami merampungkan bagian permulaan dari penelitian genetik penderita infeksi virus dengue di Surabaya.

Penelitian jangka panjang yang di rencanakan multi tahun dengan harapan mendapatkan sampel klinik pada musim infeksi dengue belum dapat sepenuhnya terlaksana. Penelitian ini baru merupakan penelitian pendahuluan yang pertama, yang berkaitan dengan jenis HLA pada penderita infeksi dengue. Deteksi jenis HLA pada penderita dengue dengan pemeriksaan *immunohistochemistry* dari bahan limfosit menunjukkan adanya HLA-DR yang akan merupakan arah penelitian berikutnya. Dari sampel yang terkumpul, tujuh menunjukkan dominasi HLA-DR , satu sample menunjukkan dominasi HLA-DQ, sedang dua sample tidak jelas.

Dana yang sangat terbatas, keterlambatan pendanaan menyebabkan waktu penelitian yang sangat sempit dan sampel klinik yang sangat terbatas.

Harapan kami pendanaan akan diteruskan sampai rencana sesuai dengan proposal penelitian semula, yaitu sampai pada analisis komponen genetik mana yang menyebabkan pekanya anak terhadap infeksi dengue dan lebih lanjut lagi komponen yang berpengaruh pada severitas klinik penyakit infeksi dengue dan juga membuka adanya lokasi genetic yang resisten terhadap infeksi maupun terhadap proses antibodi dependent enhancement pada penderita infeksi dengue.

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Identitas dan Pengesahan	i
A. Laporan Hasil Penelitian	
Ringkasan dan Summary	ii
Prakata	iii
Daftar Isi	iv
Daftar Tabel	v
I. Pendahuluan	1
II. Tinjauan Pustaka	3
III. Tujuan dan Manfaat Penelitian Tahun ke-1	8
IV. Metode Penelitian	9
V. Hasil dan Pembahasan	12
VI. Kesimpulan dan Saran	24
Daftar Pustaka	25

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Alela HLA yang berhubungan dengan proteksi terhadap DBD	6
2. Alela HLA yang berhubungan dengan suseptibilitas terhadap DBD	7
3. Hasil pemeriksaan serologik, klasifikasi klinik dan HLA	13
4. Data HLA hasil penelitian	14
5. Tampilan gejala klinik dan laboratorik pada penderita infeksi virus dengue pada sampel	18

BAB I PENDAHULUAN

Latar Belakang

Infeksi Dengue saat ini merupakan penyakit infeksi yang menjadi endemik di dunia, terutama di Afrika, Amerika, Asia Tenggara dan Pasifik. Badan dunia WHO memperkirakan sekitar 100 milyar kasus baru terjadi setiap tahun, dengan angka kejadian Demam Berdarah Dengue sekitar 250.000-500.000 dan angka kematian mencapai 24.000 kasus. (Rigau-Perez et al. 1998; Guha-Sapir dan Schimer 2005). Angka kejadian di Jawa Timur pada tahun 2008 mencapai 16.589 kasus dengan 165 penderita meninggal (Data Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur).

Manifestasi klinik infeksi virus dengue bervariasi mulai dari asimtomatis hingga 4 derajat keparahan yaitu : undifferentiated fever, demam dengue, demam berdarah dengue, dan dengue shock syndrome. (Guzman dan Kouri 2002)

Berbagai faktor memegang peran dalam infeksi virus dengue, terutama imunopatologi, faktor virus dengue, dan genetik penderita. (Suharti et al. 2003; Wagenaar et al. 2004; Chaturvedi et al. 2006; Halstead 2007; Pang et al. 2007; Lan et al 2008; Coffey et al 2009; Swaminathan dan Khanna 2009)

Kontribusi faktor genetik terhadap penyakit infeksi pada manusia telah diteliti sejak 50 tahun yang lalu. Penelitian efek penetrasi tinggi dari mutasi gen tunggal menemukan bahwa mekanisme molekuler yang ditimbulkannya meningkatkan resiko terjadinya penyakit infeksi yang spesifik. Sekalipun demikian, pada studi di populasi, varian genetik yang mempengaruhi suseptibilitas host terhadap berbagai penyakit infeksi tidak dengan mudah ditemukan. (Davila dan Hibberd 2009)

Penelitian-penelitian di bidang genetik penderita infeksi virus dengue telah dilakukan di berbagai tempat seperti Vietnam (Loke et al 2001; Lan et al 2008), Thailand (Matthew et al 1998; Gagnon et al 2001; Stephens et al 2002; Vejbaesya et al 2009), India (Soundravally dan Hoti 2007), Kuba (Sierra et al 2007), dan Taiwan (Chen et al 2009). Para peneliti meyakini bahwa ada hubungan antara kondisi genetik dengan tingkat keparahan penyakit sekalipun data yang diperoleh belum menunjukkan hasil yang seragam. Semakin banyak data didapat dari berbagai negara akan semakin lengkap gambaran pengaruh faktor genetik terhadap derajat penyakit. (Tan dan Alonso 2009)

Sebagai negara endemis untuk infeksi virus dengue, Indonesia masih membutuhkan banyak penelitian menyangkut penyakit tersebut. Data studi genetik dari anak Indonesia adalah salah satu hal penting yang hingga saat ini belum didapatkan.

Diantara semua studi, gen Human Leucocyte Antigen (HLA) adalah yang paling intensif diteliti. Hampir semua penelitian yang dikutip di atas menjadikan gen HLA sebagai objek. Gen lain yang juga diduga berhubungan dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue adalah gen Vbeta reseptor sel T, gen reseptor vitamin D, dan gen antagonis reseptor IL-1 (IL-1RA). (Gagnon et al 2001; Loke et al 2002)

Rekam Jejak dan Peta Jalan

Rekam jejak

Kontribusi faktor genetik pada infeksi telah dikenal sejak 50 tahun yang lalu, namun hasil masih meragukan bahkan sering kontradiktif. Penelitian tentang komponen genetik yang berkaitan dengan suatu infeksi di Indonesia masih langka, pada infeksi virus dengue belum pernah dilakukan.

Peta jalan

Infeksi virus akan melewati MHC kelas 1 dan berkaitan dengan komponen HLA. Populasi dengan dan tanpa infeksi dengue akan diperiksa secara seksama, termasuk berat ringannya penyakit dan dilanjutkan dengan konfirmasi serologic. Kumpulan sample dari penderita ini diperiksa HLA mana yang dominan dan juga dilakukan sequencing dari HLA penderita tersebut untuk mencari lokasi yang sesuai dengan suseptibilitas dan resistensi baik infeksi virus denguenya maupun severitas klinik yang terjadi.

BAB II STUDI PUSTAKA

Human Leucocyte Antigen (HLA)

Sistem HLA adalah sekelompok gen yang berlokasi pada kromosom 6 yang mengkode protein-protein penyaji antigen di permukaan sel. Sistem ini merupakan bagian penting dari Major Histocompatibility Complex (MHC). HLA-A, -B, -C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQB1, -DRA, dan -DRB1 adalah gen-gen yang paling banyak diteliti selama ini. (Chaturvedi et al 2006)

HLA dapat diklasifikasikan menjadi MHC kelas I, II, dan III. Sebagai tambahan, HLA-DM dan HLA-DO berperan penting menyajikan peptide antigenik yang dihasilkan dari organisme patogen kepada molekul HLA dari Antigen Presenting Cells (APC). Protein-protein yang dikode oleh HLA berada di permukaan semua sel berinti dan trombosit. HLA juga digunakan oleh sel-sel system imun untuk membedakan antigen asing. Protein yang dihasilkan di dalam sebagian besar sel akan dipajang pada antigen-antigen HLA (terutama MHC kelas I) pada permukaan sel. Sel yang terinfeksi kemudian dikenali dan dihancurkan oleh komponen system imun. (Cooke dan Hill 2001)

Sejumlah penelitian kemudian melihat variasi pada gen HLA dan mengaitkannya dengan keparahan infeksi virus dengue. Hanya sedikit yang diketahui tentang peran HLA-A dan HLA-B dalam menentukan resistensi, kepekaan, maupun keparahan infeksi virus akut. (Chaturvedi et al 2006)

Virus dengue, seperti juga anggota famili Flaviviridae lainnya, meningkatkan ekspresi molekul HLA kelas I dan II pada sel terinfeksi. Respon imun yang dikendalikan HLA ini kemungkinan bertanggung jawab terhadap imunopatologi infeksi virus dengue. (King dan Kesson 2003).

Studi Genetik di India

Soundravally dan Hoti, di tahun 2007, meneliti polimorfisme gen TAP1, HPA1, dan HPA2 dari 100 subjek sehat, 91 DD, 75 DBD, dan 32 DSS. Hasil penelitian menunjukkan frekuensi valine pada TAP1 333 dan HPA 1b pada HPA1 meningkat pada DBD dan DSS. Frekuensi genotipe TAP1 333 ILE/VAL jauh lebih tinggi pada kelompok DBD dibandingkan DD dan kontrol. Sejumlah besar penderita DBD menunjukkan

genotipe HPA1a/1° dan HPA2a/2b. Penderita DSS lebih banyak yang heterozigot pada HPA1 dibandingkan DBD.(Soundravally dan Hoti 2007)

Studi Genetik di Kuba

Sierra dan kawan-kawan pada tahun 2007 meneliti 120 penderita yang mengalami DD atau DBD selama wabah dengue 2 pada tahun 1997 di Santiago de Cuba. Polimorfisme pada lokus HLA kelas I berhubungan bermakna dengan suseptibilitas terhadap DBD. Polimorfisme HLA-DRB1 berhubungan dengan proteksi.(Sierra et al 2007)

Studi Genetik di Thailand

Stephens dan kawan-kawan pada tahun 2002 melakukan penelitian case-control terhadap 263 orang Thai yang terinfeksi virus dengue. Hasil penelitian menunjukkan bahwa HLA kelas I berhubungan dengan infeksi sekunder tapi tidak pada infeksi primer. HLA-A*0203 berhubungan dengan DD ringan tanpa memperdulikan serotipe virus dengue pada infeksi yang kedua. Sebaliknya, HLA-A*0207 berhubungan dengan derajat sakit yang lebih parah, pada serotipe DEN-1 dan 2 saja. HLA-B*51 berhubungan dengan DBD pada infeksi sekunder. HLA-B44, B62, B76, dan B77 bersifat protektif pada infeksi sekunder.(Stephens et al 2002)

Vejbaesya dan kawan-kawan pada tahun 2009 meneliti varian polimorfisme gen TNF dan LTA dari 435 etnis Thai. Polimorfisme TNF-238° yang menandai haplotipe LTA-3 dan TNF-4 ditemukan lebih banyak pada kelompok infeksi sekunder yang menjadi DBD dibandingkan infeksi sekunder yang menjadi demam dengue. Haplotipe LTA-3 berhubungan dengan produksi intraselular LT-alpha dan TNF-alpha selama fase viremia akut. Dua haplotipe MHC yang mengandung TNF-4 dan LTA-3 serta HLA-B48, HLA-B57, dan HLA-DPB1*0501 dijumpai hanya pada penderita DBD sekunder.(Vejbaesya et al 2009)

Studi Genetik di Taiwan

Chen dan kawan-kawan meneliti polimorfisme CTLA-4 dan TGFbeta1 pada tahun 2009. Peningkatan frekuensi TGFbeta1 -509 CC lebih nampak pada kelompok DBD dibandingkan DD. Kehadiran polimorfisme alela CTLA-4 +49 G dan TGFbeta1 -509 CC meningkatkan suseptibilitas DBD, resiko DBD, dan viral load secara bermakna.(Chen et al 2009)

Studi Genetik di Vietnam

Loke dan kawan-kawan pada tahun 2001 mempublikasi hasil penelitian terhadap penderita DBD di Vietnam. Variasi genetik HLA kelas I adalah faktor resiko terjadinya DBD. Respon sel T CD8 diinduksi oleh infeksi virus dengue alami. Pada penderita DBD dijumpai frekuensi yang tinggi dari limfosit T CD8 yang berputar yang mengenali baik epitope virus yang spesifik serotipe tertentu maupun yang berupa reaksi silang. (Loke et al 2001)

Lan dan kawan-kawan di Vietnam Selatan pada tahun 2008 melakukan penelitian terhadap 211 penderita DBD, 418 penderita DSS, dan 450 populasi anak sehat. Lan menemukan bahwa untuk HLA kelas I, frekuensi HLA-A*24 dengan histidin pada kodon 70 lebih tinggi pada kelompok DBD dan DSS dibandingkan kelompok normal. Pada HLA kelas II, frekuensi HLA-DRB1*0901 lebih rendah secara bermakna pada kelompok infeksi sekunder yang menjadi DSS. (Lan et al 2008)

HLA dan Demam Dengue

Peningkatan ekspresi molekul HLA kelas I dan II pada permukaan sel yang terinfeksi telah banyak diteliti. Ada kemungkinan tingkat respon imun yang muncul terhadap peptida virus yang disajikan oleh molekul HLA bertanggung jawab terhadap imunopatologi infeksi virus dengue. (King dan Kesson 2003) Tabel 1 menunjukkan alela HLA yang berhubungan dengan proteksi terhadap demam berdarah dengue. Alela tersebut ditemukan pada penderita demam dengue tapi tidak pada demam berdarah dengue.

Penelitian Polizel dan kawan-kawan pada tahun 2004 menemukan hasil yang berbeda. Penelitian tersebut membuktikan bahwa tidak ada hubungan antara 55 antigen HLA kelas I dengan keparahan penyakit yang ditemukan pada ras Kaukasia di Brazil yang menderita demam dengue. Hubungan negatif dengan HLA kelas I pada penelitian itu mungkin disebabkan oleh perbedaan etnis di populasi atau perbedaan serotipe virus dengue yang menjadi mayoritas di tempat tersebut. (dikutip dari Chaturvedi et al 2006)

HLA kelas II, yang terdiri dari HLA-D, -DR, -DP, dan -DQ, terdistribusi pada sel B, makrofag, sel dendritik, sel Langerhan, dan sel T yang teraktivasi. Data dari Mexico menunjukkan bahwa individu dengan HLA-DR4 homozygous mempunyai kemungkinan mengalami DBD sebesar 11,6 kali lebih rendah dibandingkan mereka yang tidak mempunyai. (LaFleur et al 2002). Penelitian Loke dan kawan-kawan di Vietnam

menemukan tidak adanya hubungan antara HLA-DRB1 dengan keparahan penyakit.(Loke et al 2001)

Tabel 1. Alela HLA yang berhubungan dengan proteksi terhadap demam berdarah dengue

Kelas	Alela	Populasi	Referensi
HLA kelas I	A*0203	Thai	Stephens et al 2002
	A29	Cuban	Paradoa Perez et al 1987
	A33	Vietnamese	Loke et al 2001
	B13	Thai	Chiewsilp et al 1981
	B14	Cubans	Paradoa Perez et al 1987
	B44	Thai	Stephens et al 2002
	B52	Thai	Stephens et al 2002
	B62	Thai	Stephens et al 2002
	B76	Thai	Stephens et al 2002
	B77	Thai	Stephens et al 2002
HLA kelas II	DRB1*04	Mexicans	La Fleur et al 2002

Dikutip dari : Chaturvedi et al 2006

HLA dan Demam Berdarah Dengue

Polimorfisme gen daerah HLA kelas I berhubungan juga dengan suseptibilitas penyakit. Tabel 2 menggambarkan antigen HLA termaksud. Penelitian pertama mengenai hal ini ditulis oleh Chiewsilp et al pada tahun 1981 berdasarkan hasil studi di Thailand.

Aktivasi limfosit T pada infeksi virus dengue juga berhubungan dengan patogenesis demam berdarah dengue. Gagnon et al 2001 menemukan di Thailand bahwa perbedaan aktivasi sel T pada demam berdarah dengue dan demam dengue lebih bersifat kuantitatif dan bahwa sel T diaktifkan oleh antigen konvensional dan bukan superantigen dari virus.(Gagnon et al 2001)

Gen pada daerah kelas III mengkode sejumlah protein, termasuk protein pada komplemen (C4A, C4B, C2, dan Bf), TNF-alfa dan beta, dan heat-stroke proteins.(Cooke dan Hill 2001)

Tabel 2. Alela HLA yang berhubungan dengan suseptibilitas demam berdarah dengue

Kelas	Alela	Populasi	Referensi
HLA kelas I	A1 A2 A*0207 A24 B blank B46 B51	Cuban Thai Thai Vietnamese Thai/Cubans Thai Thai	Paradoa Perez et al 1987 Stephens et al 2002 Stephens et al 2002 Loke et al 2001 Chiewsilp et al 1981 Paradoa Perez et al 1987 Stephens et al 2002 Stephens et al 2002
HLA kelas II	DQ1 DR1 ?	Brazil Brazil	Polizel et al 2004 Polizel et al 2004
HLA kelas III	TNF-alfa-308°	Venezuela	Fernandez-Mestre et al 2004

Dikutip dari : Chaturvedi et al 2006

Gen non-HLA

Sejumlah faktor genetik lain berpotensi mempengaruhi derajat keparahan infeksi virus dengue, seperti Vitamin D receptor (VDR), Fcgamma receptor II (FcγRII), IL-4, IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), dan mannose-binding lectin (MBL). Diantara mereka, alela T pada posisi 352 gen VDR berhubungan dengan resistensi terhadap DBD di Vietnam, seperti juga homozygot dari varian arginine pada posisi 131 gen FcγRII. Sebagai tambahan, alela G pada posisi 336 DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) juga dilaporkan protektif terhadap demam dengue di Thailand.(Loke at al 2002; Lan et al 2008)

Gagnon dan kawan-kawan pada tahun 2001 meneliti 13 penderita DBD dan 13 penderita DD pada anak di Thailand. Penelitian ini menemukan bahwa signifikansi perbedaan penggunaan gen Vbeta antara DBD dan DD tidak terlalu nyata. Kemungkinan perbedaan aktivasi sel T pada DBD dan DD lebih bersifat kuantitatif dan bukan kualitatif. Kesimpulan lain adalah bahwa sel T diaktifkan oleh antigen-antigen konvensional dan bukan superantigen dari virus.(Gagnon et al 2001)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE-1

A. Tujuan

Umum : Penelitian ini bertujuan memperoleh data profil genetik penderita demam berdarah dengue anak

Khusus :

1. Memperoleh data genetik permulaan keiompok penderita infeksi virus dengue anak.
2. *Membandingkan data genetik kelompok dengue dengan populasi anak sehat*
3. *Memperoleh data gen yang bersifat protektif.*
4. *Memperoleh data gen yang bersifat memperberat penyakit.*
5. *Meneliti kesesuaian profil genetik dengan manifestasi klinik infeksi virus dengue*

B. Manfaat

1. Data profil genetik akan memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai patogenesis infeksi virus dengue, terutama di Indonesia.
2. Data tersebut juga dapat digunakan untuk studi lanjutan dalam aspek terapi dan pengembangan alat diagnostik maupun prevensi (vaksin)

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Cross sectional – observasional.

B. Populasi dan Sampel

Populasi : Seluruh penderita dengan infeksi virus dengue anak di RS Dr. Soetomo Surabaya.

Sampel : 10 penderita infeksi virus dengue anak yang memenuhi kriteria inklusi.

C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi :

- Usia 1 – 15 tahun
- Diagnosis infeksi virus dengue ditegakkan berdasarkan penilaian klinis dan laboratoris
- Orang tua menandatangani *informed consent*

Kriteria Eksklusi :

- Dalam kondisi *moribund*
- Mempunyai penyakit penyerta yang berat lainnya seperti keganasan

D. Lokasi, Waktu dan Pentahapan

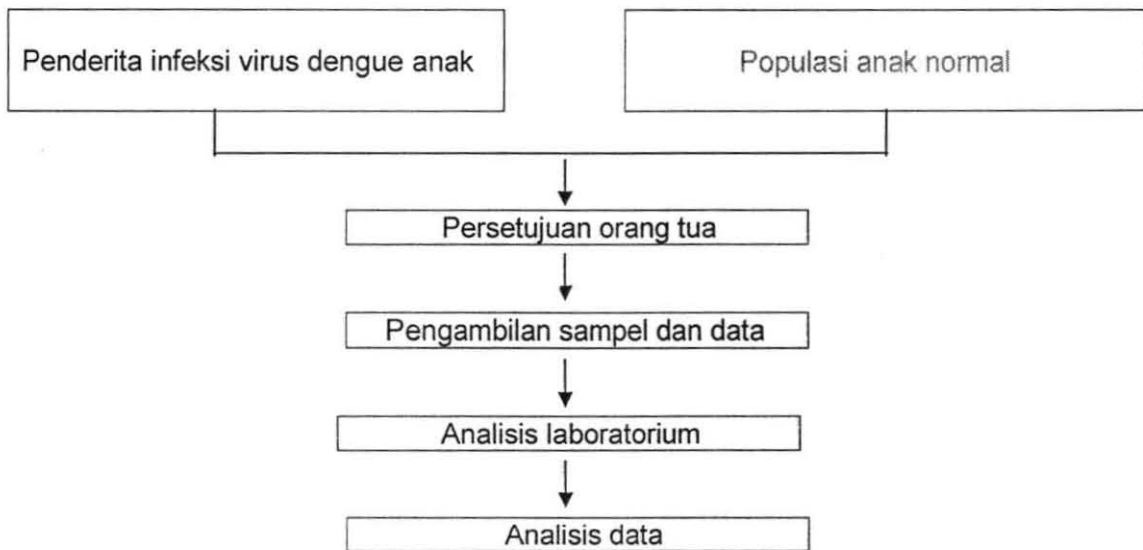
Lokasi : RS Dr. Soetomo Surabaya dan Tropical Disease Center

Waktu : Oktober 2009 – November 2011

Pentahapan :

WAKTU	FASE	KETERANGAN
Oktober 2009 – November 2009	Tahap I : pengambilan sampel klinik Memantapkan proses Laboratorium Analisis Data Penulisan Laporan	Rencana minimal diperoleh 10 sampel uji sepanjang 2 bulan pertama
Juli 2010 – Juli 2011	Tahap II : Pengambilan 200 sampel uji dan 100 sampel populasi anak normal Proses Laboratorium. Analisis Data Penulisan Laporan	Rencana minimal diperoleh 300 sampel uji sepanjang 12 bulan kedua

E. Alur Penelitian



F. Cara Kerja Analisis HLA

Penelitian ini menggunakan metode imunositokimia HLA (untuk jenis sampel PBMCs). Prosedur kerja dibagi dalam 2 tahap yaitu :

1. Pemrosesan darah penderita hingga menjadi PBMC

- Darah 5 cc + PBS 5 cc dicampur pelan-pelan
- Disiapkan conical tube 15 ml yang telah diisi 5 ml vicol histopach
- Dimasukkan campuran darah ke dalam conical tube yang berisi vicol lewat dinding
- Sentrifugasi 30 menit, 1700 rpm, 4 derajat Celsius
- Diambil bagian cincin dan dimasukkan ke dalam tube baru
- Ditambahkan PBS ke dalam tube yang berisi cairan PBMC 10 cc
- Digoyang pelan-pelan supaya tercampur
- Sentrifugasi 1700 rpm selama 5 menit
- Supernatan dibuang
- Ditambahkan PBS lagi sebanyak 10 cc,
- Diulangi lagi proses sentrifugasi 1700 rpm selama 5 menit
- Supernatan dibuang lagi
- Ditambahkan 1 cc cell bunker dan diresuspensi
- Disimpan pada suhu minus 80 derajat Celcius

2. Analisis HLA hingga menjadi PBMC

- 1 cc PBMCs ditambahkan dengan 4 cc PBS
- Sentrifugasi 1600 rpm selama 10 menit
- Pellet + 100 mikro liter MEM
- Inkubasi pada suhu 37 derajat Celsius selama 1 jam
- Fiksasi dengan metanol dingin minus 20 derajat Celcius, 10 menit
- Ditambahkan FCS 1%
- Direaksikan dengan AB HLA DQ₁, DR₁, DR₂
- Ditutup dengan cover glass dan diinkubasi pada suhu 37 derajat Celcius selama 1 jam

G. Analisis Data

Analisis statistik menggunakan SPSS 15.

Analisis data akan menghasilkan :

- Data deskriptif (rerata, standar deviasi, modus, distribusi frekuensi)
- Perbandingan dengan data populasi anak normal dengan menggunakan odds ratio (OR)

Semua perhitungan akan menggunakan $p < 0,05$ dengan 95% confidence interval.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Secara umum di dapatkan gambaran hasil yang diharapkan akan menjadi acuan jalan penelitian berikutnya. Pemeriksaan HLA dari sampel darah anak populasi normal belum dilakukan akibat keterbatasan dana dan waktu.

Penderita yang di jadikan sample telah di periksa secara klinik dan mempunyai gambaran kiinik yang "*full blown*" untuk infeksi virus dengue. Semua penderita menunjukkan gejala klinik yang jelas. Pemeriksaan laboratoriu dilakukan bukan saja untuk kepentingan pengotan penderita namun juga untuk mendukung diagnosa infeksi dengue, termasuk melakukan pemeriksaan laboratorik untuk menyingkirkan adanya penyakit lain, baik sebagai diagnosis banding maupun sebagai penyakit penyerta (sering terjadi *dual infection* pada penderita klinis dengue). Setelah dipastikan penderita menderita infeksi virus dengue

secara klinik dan laboratorik, diperiksa serologinya dengan HI dan dilanjutkan dengan pengamatan dan klasifikasi severitas. Penentuan severitas di lakukan setelah penderita keluar rumah sakit. Hasil penelitian meliputi: diagnosis klinik, , severitas, laboratorik serologik dan jenis HLA.

a. Hasil pemeriksaan serologik

Pemeriksaan serologik dilakukan sebagai penyaring dan penentu dilakukannya pemeriksaan HLA. Selain kriteria klinis , peneliti juga memastikan bahwa sampel klinik yang diperiksa adalah kasus infeksi virus dengue yang dikuatkan dengan hasil laboratorik. Pemeriksaan cepat seperti pemeriksaan NS-1 atau pemeriksaan dengan Dengue blot atau cara lain tidak dilakukan. Pemeriksaan serologik dilakukan dengan metode haemagglutinaion-inhibition dengan mengukur kadar antibodi IgG dan IgM anti dengue yang telah menjadi standar pemeriksaan di Surabaya.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan serologik, klasifikasi klinik dan HLA

No	Nama	Hasil Serologik	Klasifikasi Kasus	Jenis HLA
1	MDoS	pos	DF	DR
2	End	pos	DHF	DQ
3	DewN	pos	DF	DR
4	DwiA	pos	DSS	INCONCLUSIVE
5	HanD	pos	DSS	DR
6	RudL	pos	DF	DR
7	ZaF	pos	DF	INCONCLUSIVE
8	FaD	pos	DHF	DR
9	Fah	pos	DF	DR
10	F	neg	DHF	DR

Secara garis besar di dapatkan adanya hubungan secara kasar antara variabel utama yang menjadi perhatian peneliti, yaitu jenis HLA dengan yang positif dengue. Semua sampel klinik yang di periksa menunjukkan tampilan klinik sesuai kriteria klinik WHO 1997 baik mengenai demam berdarah dengue maupun demam dengue. Pemeriksaan dan tampilan klinik ini diperkuat dengan pemeriksaan serologik HI, IgG dan IgM yang masih merupakan salah satu standar yang dianut banyak peneliti. Hampir semua sampel menunjukkan hasil positif, kecuali satu sampel yang menunjukkan hasil negatif, meskipun penderita secara klinik merupakan kasus yang *full blown*. Pemeriksaan yang dilakukan secara klinik menyimpulkan tidak semua klasifikasi secara WHO menunjukkan kepastian klinik yang baik. Penentuan klasifikasi setelah penderita keluar dari rumah sakit mempunyai kelemahan pada adanya intervensi yang dilakukan sehingga anak menjadi tidak semakin berat, namun juga dapat dijadikan acuan karena menunjukkan jenis perlakuan yang dianggap merupakan tindakan mengatasi severitas.

b. Hasil pemeriksaan HLA

Dari 10 sampel yang ada diperoleh hasil seperti yang tercantum pada tabel 4.

21112
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Tabel 4. Data HLA Hasil Penelitian

NO	NAMA	SEX	HASIL	KETERANGAN
1	ZaF	Perempuan	Inconclusive	Sampel no 1 tidak dapat disimpulkan
2	HanD	Laki	Dominan DR-HLA	
3	RudL	Laki	Dominan DR-HLA	
4	MDoS	Laki	Dominan DR-HLA	
5	DewN	Perempuan	Dominan DR-HLA	
6	End	Perempuan	Tidak jelas, DQ+	Sampel no 6 kemungkinan dominan DQ
7	FaD	Perempuan	Dominan DR-HLA	
8	Fah	Laki	Dominan DR-HLA	
9	F	Laki	Dominan DR-HLA	
10	DewA	perempuan	inconclusive	Sampel 10 tak dapat disimpulkan

Sampel nomor 2,3,4, dan 9 menunjukkan DR-HLA yang positif sejumlah sekurang-kurangnya 70%. Sampel nomor 6 adalah satu-satunya yang menunjukkan dominasi DQ sekalipun gambaran yang dihasilkan tidak begitu nyata. Dua sampel nomor 1 dan nomor 10 tidak dapat disimpulkan hasilnya secara pasti. Dari 10 sampel klinik yang dikumpulkan, didapatkan tujuh sampel menunjukkan hasil HLA-DR yang jelas, satu sampel hasilnya HLA-DQ, sedang dua sampel hasilnya tidak dapat disimpulkan. Semua pemeriksaan dilakukan di Tropical Disease Centre, dengan metode yang sudah ditulis diatas.

c. Hasil pemeriksaan klinik

i. Diagnosis dan diagnosis banding

Sampel darah diambil dari penderita infeksi virus dengue berobat di RS Dr Sutomo, baik yang ke Poli Anak Instalasi Rawat Jalan, Instalasi Rawat Inap, dan Instalasi Gawat Darurat. Penderita yang memenuhi syarat inklusi akan diikuti selama perawatan. Penderita akan mendapat pemeriksaan khusus untuk memastikan diganosisnya dan dilakukan pemeriksaan terhadap adanya infeksi salurah kencing, demam tifoid, radang

telinga dan adanya infeksi non bakterial yang mungkin terjadi pada penderita. Juga diperhatikan adanya kriteria eksklusi yang tertulis di metodologi.

ii. Klasifikasi severitas

Selain menentukan klasifikasi jenis infeksi virus dengue secara klinis, pemeriksaan perlu dilanjutkan untuk menilai severitas dari infeksi tersebut dengan dua metode.

- Metode pertama adalah metode severitas demam berdarah dengue yang diputuskan secara konsensus oleh para ahli, yang dikenal sebagai *klasifikasi WHO*, yaitu demam dengue (bila ada gejala klinik **tanpa** adanya kebocoran plasma), demam berdarah dengue bila ada kebocoran plasma. Demam berdarah dengue dibagi menjadi 4 kelas severitas, yaitu grade 1 bila ada perembesan plasma tanpa disertai perdarahan spontan, grade 2 bila ada perdarahan spontan, grade 3 bila mulai ada gangguan sirkulasi darah, grade 4 bila sudah jelas adanya kegagalan sirkulasi. Inti dari severitas metode lama ini terutama bertumpu pada besaran perembesan plasma dan hanya mengklasifikasi demam berdarah dengue saja. Tidak menyertakan unusual manifestation dan demam dengue yang bisa menjadi berat.
- Pada tahun 2009 WHO menganjurkan klasifikasi baru yaitu *klasifikasi biner*, yaitu grade ringan dan berat. Grade berat bilamana ada perdarahan hebat, kegagalan sirkulasi dan keterlibatan organ pada infeksi dengue. Klas ringan bila hanya didapatkan tanda demam dengue, namun sebagian dari penderita ini akan disertai tanda klinik yang harus diwaspadai, yaitu adanya nyeri perut atau kelunakan palpasi abdomen, muntah berat, lethargi, pembesaran hepar melebihi 2 cm, perdarahan mukosa, laboratorium berupa peningkatan hematokrit dengan penurunan trombosit. *Warning sign* ini akan merupakan penunjuk klinik kearah memberatnya severitas klinik. Khusus pada dengue berat, kebocoran plasma berat dibagi menjadi klas dengan kebocoran yang berat yang menyebabkan shock, las dengan akumulasi cairan disertai dengan distres nafas, adanya keterlibatan organ involvement yaitu pada hepar: adanya kadar AST/ALT tinggi melebihi 1000, gangguan susunan saraf pusat berupa gangguan kesadaran, jantung (adanya kardiomiopati) dan organ lain.

Hasil penentuan severitas adalah: dua penderita grade berat oleh karena adanya syok (dengue shock syndrome) dan dua dengan demam berdarah dengue yang disertai akumulasi cairan yang banyak dan keterlibatan organ lain, sedang keenam penderita

lain termasuk ringan. Dua penderita demam berdarah dengue yang digolongkan berat mendapat pengawasan dan pengobatan yang optimal sehingga tidak menjadi lebih berat.

iii. Pemeriksaan laboratorik

Pada penderita dalam penelitian ini dilakukan juga pemeriksaan laboratorium yang diperlukan untuk menentukan jenis perawatan yang diperlukan, misalnya pemeriksaan untuk mendeteksi adanya kebocoran plasma atau adanya perdarahan baik dipermukaan maupun di organ dalam. Pemeriksaan lain yang diperlukan adalah adanya keterlibatan organ lain misalnya ginjal, jantung ataupun susunan saraf pusat. serta adanya kemungkinan kelebihan atau kekurangan cairan intravaskuler atau adanya perubahan elektrolit serum yang akan menimbulkan perubahan-perubahan faal klinik. Pemeriksaan penunjang lain yang perlu dilakukan adalah pemeriksaan foto thorax baik dari AP – lateral maupun dengan RLAD, untuk mendeteksi adanya efusi pleura, adanya pneumonia, adanya kardiomegali ataupun melakukan pemeriksaan USG abdomen – thorax untuk melihat adanya efusi pleura, apendisitis atau adanya cairan asites.

1. Tampilan umum

Secara umum tampilan klinik secara rinci adalah

- Semua anak disertai demam, semua anak merasa sakit otot dan nyeri, sedangkan demam tinggi (>39) pada 6 penderita .
- Semua tidak mengalami kejang namun semua mengalami skin-flush, ada 3 anak yang merasa batuk pilek dan 3 anak merasa sesak
- Untuk rash yang umumnya oleh awam dianggap sebagai petanda utama, ternyata *petechial rash* hanya terdapat pada 3 anak pada masa kritis, *erythematous rash (non petechial)* pada 2 anak dan *rash* konvalesen hanya pada 5 anak.
- Semua anak merasa mual dan malas makan dan nyeri tekan abdomen (hanya 1 penderita tidak merasa), namun semua anak tidak merasa nyeri abdomen yang menetap, atau muntah terus-menerus, bahkan hanya 4 yang menunjukkan pembesaran hati diatas 2 cm.
- Adanya kebocoran plasma yang berat terdapat pada dua anak dengan disertai sesak, akumulasi cairan dan kegagalan sirkulasi. Dua anak dengan akumulasi cairan jaringan yang banyak tanpa

distress nafas dengan keterlibatan fungsi hati, Terdapat 5 anak dengan perembesan plasma, dua diantaranya dengan grade berat dan syok, sedang 5 anak lain tidak mengalami perembesan plasma dan di klasifikasikan ringan .

- Pemeriksaan serologi dengan HI menghasilkan kombinasi IgG dan IgM yang positif pada 9 anak, satu anak menghasilkan hasil negatif, meskipun secara klinik anak menunjukkan gejala klinik demam berdarah dengue.

2. Tampilan pemeriksaan penunjang dan laboratorik

Pemeriksaan radiologi menghasilkan adanya efusi pleura pada penderita dengan perembesan plasma, baik dengan foto polos maupun RLAD atau USG abdomen. Pada 5 anak ditemukan adanya efusi pleura, baik pada foto polos maupun pada foto RLAD.

Hitung lekosit darah menunjukkan penurunan pada 7 anak (dibawah 5000), sedang trombosit yang menurun dibawah 100 terdapat pada 7 anak.

Semua tampilan klinik dan hasil laboratorium tertera pada tabel 5.

Tabel 5 . Tampilan gejala klinik dan laboratorik pada penderita infeksi virus dengue pada sampel.

GEJALA/LAB	Doni	Endah	Dewi	Dwi Ayu	Handika	Rudi	Zahra	Fadiyatun	Fahri	Firli
Usia	11 th	9 th	10 th	7 th	1,5 th	14 th	3,5 th	7 th	2 th	7th
Mulai Gejala (demam)	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya
Temperatur maksimal	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Ya	Tidak	Tidak
Sakit dan nyeri	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya
Batuk dan pilek	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Sesak	Tidak	Ya	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Kejang	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
<i>Petechial "rash"</i> (selama fase kritis)	ya	ya	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
<i>Erythematous rash</i> (<i>Non-petechial</i>) pada fase demam)	Tidak	Tidak	ya	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
<i>Rash:</i> "white islands in a sea of red" (<i>Herman-Sign</i>) selama masa konvalesens	Tidak	ya	Tidak	ya	ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
<i>Skin flush</i>	Tidak	ya	ya	ya	ya	Ya	ya	ya	Tidak	Tidak
Nafsu makan menurun, mual	Ya	Ya	Tidak	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya	Ya

Nyeri tekan abdomen	Ya	Ya	Tidak	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Nyeri abdomen berat persisten	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Muntah persisten	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Pembesaran hepar >2cm	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Akumulasi cairan tanpa distress napas	Tidak	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Akumulasi cairan dengan distress napas	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Letargi, gelisah	Tidak	Ya	Tidak	Ya	ya	Tidak	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Syok	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Tes torniket positif	Ya	Ya	Ya	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Perdarahan mukosa	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Ya	Ya	Tidak
Perdarahan berat	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
SSP: penurunan kesadaran (GCS/BCS)	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Keterlibatan berat organ jantung atau organ lain	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak	Tidak
Tekanan darah sistolik minimal	100	100	110	100	80	130	100	100	100	100

Tekanan darah diastolik yang bersangkutan	70	60	70	70	Palpasi	80	70	70	70	60
Frekuensi denyut jantung maksimal	88	94	115	100	136	104	110	108	100	114
Ultrasonografi Abdomen	Tidak			Ya			Tidak			
Foto Thorax AP efusi	Tidak	Ya	Tidak	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Ya	Tidak	ya
Foto Thorax Lat.D.Kanan efusi	Tidak	Ya	tidak	Ya	Ya	Tidak	Tidak	Ya	tidak	ya
Hitung Lekosit	5180	3200	7500	7500	4500	2000	3300	6500	9700	10100
Hitung Platelet	102.000	22.000	117000	110000	30.000	95.000	123.000	14.000	64.000	90.000
HCT	36,6%	40%	37,2%	44,6%	46,4%	37,7%	34,9%	32,4%	35,2%	46,5%
Klasifikasi Revisi	DF	DHF	DF	DSS	DSS	DF	DF	DHF	DF	DF
Laboratoris dengue	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Negatif
HLA	DR	DQ	DR	INCLS	DR	DR	INCLS	DR	DR	DR

Pembahasan

- **Umum**

Secara umum sangat berat menulis laporan penelitian, yang akhirnya hanya mampu sampai pada penelitian pendahuluan. Penelitian multi tahun dengan pendanaan yang cukup ternyata tidak dapat dilakukan dengan tuntas. Persiapan klinik yang terinci, termasuk dengan menggunakan dua metode untuk menetapkan severitas klinis dan pemeriksaan penunjang yang lengkap tidak dapat meliputi sampel yang banyak karena keterbatasan dana dan waktu. Ini terutama mengingat penyakit demam berdarah dengue yang meskipun sudah endemik namun masih mengenal musim, yaitu puncaknya pada permulaan musim hujan dan pada akhir musim hujan.

- **HLA-susceptibilitas penyakit**

Sistem HLA adalah sekelompok gen yang berlokasi pada kromosom 6 yang mengkode protein-protein penyaji antigen di permukaan sel. Sistem ini merupakan bagian penting dari Major Histocompatibility Complex (MHC). HLA-A, -B, -C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQB1, -DRA, dan -DRB1 adalah gen-gen yang paling banyak diteliti selama ini. (Chaturvedi et al 2006)

Virus dengue, seperti juga anggota famili Flaviviridae lainnya, meningkatkan ekspresi molekul HLA kelas I dan II pada sel terinfeksi. Respon imun yang dikendalikan HLA ini kemungkinan bertanggung jawab terhadap imunopatologi infeksi virus dengue. (King dan Kesson 2003).

Polimorfisme gen daerah HLA kelas I atau kelas II berhubungan juga dengan susceptibilitas penyakit. Penelitian pertama mengenai hal ini ditulis oleh Chewsilp et al pada tahun 1981 berdasarkan hasil studi di Thailand.

Aktivasi limfosit T pada infeksi virus dengue juga berhubungan dengan patogenesis demam berdarah dengue. Gagnon et al 2001 menemukan di Thailand bahwa perbedaan aktivasi sel T pada demam berdarah dengue dan demam dengue lebih bersifat kuantitatif dan bahwa sel T diaktifkan oleh antigen konvensional dan bukan superantigen dari virus. (Gagnon et al 2001).

Dari tabel 2, didapatkan bahwa kerentanan (susceptibility) dapat di ekspresikan pada HLA kelas I atau II atau kelas III. Penelitian ini dimulai dengan HLA kelas II karena hanya ada informasi adanya kelas ini di Amerika Serikat dan tidak pernah ada publikasi yang berasal dari daerah Asia. Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa sebagian besar penderita dengan klinik infeksi virus dengue menunjukkan

hasil HLA DR yang merupakan HLA kelas II dan hanya satu yang menunjukkan adanya HLA-DQ. Penemuan Polizel 2004 di Brasil ternyata mirip dengan apa yang ditemukan peneliti di Surabaya. Hasil ini menunjukkan adanya kecenderungan kerentanan terekspresi pada HLA II juga, setelah banyaknya informasi dari Asia mengenai banyaknya kerentanan terekspresi pada HLA I.

Gen pada daerah kelas III mengkode sejumlah protein, termasuk protein pada komplemen (C4A, C4B, C2, dan Bf), TNF-alfa dan beta, dan heat-shock proteins.(Cooke dan Hill 2001) Penelitian tentang HLA kelas III ini belum bisa dilaksanakan sesuai dengan protokol yang diajukan.

- **HLA –severitas klinik**

Sejumlah penelitian kemudian melihat variasi pada gen HLA dan mengaitkannya dengan keparahan infeksi virus dengue. Hanya sedikit yang diketahui tentang peran HLA-A dan HLA-B dalam menentukan resistensi, kepekaan, maupun keparahan infeksi virus akut.(Chaturvedi et al 2006)

Sierra dan kawan-kawan pada tahun 2007 meneliti 120 penderita yang mengalami DD atau DBD selama wabah dengue 2 pada tahun 1997 di Santiago de Cuba. Polimorfisme pada lokus HLA kelas I berhubungan bermakna dengan suseptibilitas terhadap DBD. Polimorfisme HLA-DRB1 berhubungan dengan proteksi.(Sierra et al 2007). Peningkatan ekspresi molekul HLA kelas I dan II pada permukaan sel yang terinfeksi telah banyak diteliti. Ada kemungkinan tingkat respon imun yang muncul terhadap peptida virus yang disajikan oleh molekul HLA bertanggung jawab terhadap imunopatologi infeksi virus dengue.(King dan Kesson 2003)

Penelitian Polizel dan kawan-kawan pada tahun 2004 menemukan hasil yang berbeda. Penelitian tersebut membuktikan bahwa tidak ada hubungan antara 55 antigen HLA kelas I dengan keparahan penyakit yang ditemukan pada ras Kaukasia di Brazil yang menderita demam dengue. Hubungan negatif dengan HLA kelas I pada penelitian itu mungkin disebabkan oleh perbedaan etnis di populasi atau perbedaan serotipe virus dengue yang menjadi mayoritas di tempat tersebut.(dikutip dari Chaturvedi et al 2006)

HLA kelas II, yang terdiri dari HLA-D, -DR, -DP, dan -DQ, terdistribusi pada sel B, makrofag, sel dendritik, sel Langerhan, dan sel T yang teraktivasi. Data dari Mexico menunjukkan bahwa individu dengan HLA-DR4 homozygous mempunyai

kemungkinan mengalami DBD sebesar 11,6 kali lebih rendah dibandingkan mereka yang tidak mempunyai. (LaFleur et al 2002).

Penelitian Loke dan kawan-kawan di Vietnam menemukan *tidak adanya* hubungan antara HLA-DRB1 dengan keparahan penyakit. (Loke et al 2001).

Penelitian di Vietnam ini diteruskan oleh kelompok peneliti Vietnam yang berkolaborasi dengan kelompok Jepang (Nguyen Thi Phuong Lan, Mihoko Kikuchi, Vu Thi Que Huong dkk, 2008) yang mendapatkan adanya HLA klas I mempunyai pengaruh pada severitas sedangkan HLA klas II (HLA-DRB1*0901) bersifat melindungi kejadian infeksi sekunder pada anak sehingga tidak terjadi shock. Wagenar, Mairuhu, van Gorp, 2004, juga menyimpulkan HLA klas I menunjukkan adanya suseptibilitas namun HLA klas II mencegah terjadinya severitas klinik. Protein envelope (E) bertanggung jawab pada cara virus masuk ke dalam sel. Determinan imunologik dari protein ini di proses dan di presentasikan pada HLA klas II antigen. HLA-DRB1*04 diduga memaparkan antigen virus ini ke limfosit CD4 yang akan meneruskan ke arah terjadinya respon imun yang efektif, yang dapat mencegah seorang anak terjangkit infeksi virus dengue. Hal ini meskipun bertentangan dngan hasil dari Loke, 2001, namun merupakan jalur pendukung untuk pengembangan metode penilai respon seluler resipien setelah mendapat vaksin dengue

- **Pemeriksaan yang menunjang penelitian vaksin envelope**

Keterbatasan penelitian sangat dirasakan oleh karena:

- i. Dana cair pada akhir masa penelitian : dana cair dua bulan sebelum laporan akhir harus diselesaikan
- ii. Dana yang diusulkan dilakuakn secara multi tahun dengan biaya sekitar 300 juta rupiah hanya disetujui setahun /dua bulan dengan jumlah dana 30 juta rupiah sebelum dipotong pajak, fee institusi dll

Rencana untuk eksplorasi HLA – klas II , terutama HLA –DR yang protektif untuk menunjang pengembangan vaksin envelope belum bisa dilakukan secara tuntas.

71117
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Setelah penelitian permulaan ini peneliti menyimpulkan:

HLA yang dominan pada penderita infeksi dengue adalah HLA-DR dan jenis HLA yang ditemukan belum menunjukkan adanya hubungan dengan severitas klinik

Saran

Melakukan penelitian lanjutan dengan melakukan jenis HLA dan sequencing sehingga dapat dikenali lokasi suseptibilitas maupun resistensi terhadap infeksi dan severitas penyakit pada penderita anak di Surabaya.

DAFTAR PUSTAKA

Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. 2006. Macrophage and dengue virus; friends or foe? *Indian J Med Res*; 124: 23-40.

Chen RF, Wang L, Cheng JT, et al. 2009. Combination of CTL-4 and TGFbeta1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol*; 131 (3): 404-9.

Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, et al. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect*; 11 (2): 143-56.

Cooke GS, Hill AV. 2001. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet*; 2: 967-77.

Davila S, Hibberd M. 2009. Genome-wide association studies are coming for human infectious diseases. *Genome Med*; 1 (2): 19.

Gagnon SJ, Leporati A, Green S, et al. 2001. T cell receptor VB gene usage in Thai children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*; 64: 41-8.

Guha-Sapir D, Schimer B. 2005. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*; 2(1).

Guzman MG, Kouri G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Inf Dis*; 2: 33-42.

Halstead SB. 2007. Dengue. *Lancet*; 370: 1644-52.

King NJC, Kesson AM. 2003. Interaction of flavivirus with cells of the vertebrate host and decoy of the immune response. *Immunol Cell Biol*; 81: 207-16.

LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, et al. 2002. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*; 63: 1039-44.

Lan NTP, Kikuchi M, Huong VTQ, et al. 2008. Protective and enhancing HLA alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for severe forms of dengue virus infection, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome. *PLOS Negl Trop Dis*; 2 (10): e304.

Loke H, Bethell DB, Phuong CX, et al. 2001. Strong HLA class I – restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis*; 184 (11): 1369-73.

Loke H, Bethell D, Phuong CXT, et al. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam; evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and Fc gamma receptor lia genes. *Am J Trop Med Hyg*; 67: 102-6.

Mathew A, Kurane I, Green S, et al. 1998. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol*; 72 (5): 3999-4004.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immun Cell Biol*; 85: 43-5.

Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*; 352: 971-7.

Sierra B, Alegre R, Perez AB, et al. 2007. HLA-A, B, C, and DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease; advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol*; 68 (6): 531-40.

Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, et al. 2002. HLA-A and -E allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*; 60 (4): 309-18.

Soundravally R, Hoti SL. 2007. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol*; 68 (12): 973-9.

Suharti C, van Gorp EC, Dolmans WM, et al. 2003. Cytokine patterns during dengue shock syndrome. *Eur Cytokine Netw*; 14: 172-7.

Swaminathan S, Khanna N. 2009. Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. *Curr Mol Med*; 9 (2): 152-73.

Tan GK, Alonso S. 2009. Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state of the art. *Curr Op Infect Dis*; 22 (3): 302-8.

Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, et al. 2009. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis*; 199 (10): 1442-8.

Wagenaar JFP, Mairuhu ATA, van Gorp ECM. 2004. Genetic influences on dengue virus infections. *Dengue Bulletin*; 28: 126-34.