

Bidang Ilmu Kedokteran

LAPORAN

**Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I
(Klaster Gizi & Kesehatan)
Tahun Anggaran 2009**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

JUDUL

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN
POLIMORFISME CD209 DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN
TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE PADA BEBERAPA RAS
DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN MODEL
MEKANISME INFEKSI**

PENANGGUNG JAWAB PROGRAM

Retno Bijanti, M.S.,Drh
Dr. Eduardus Bimo Aksono H, M.Kes.,Drh

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional, Sesuai dengan
Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Nomor : 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2009

Bidang Ilmu Kedokteran

LAPORAN
Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I
(Klaster Gizi & Kesehatan)
Tahun Anggaran 2009



KKC
KK
LP. 127/10
Bij
K

FFIK
FFIK
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

JUDUL

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN
POLIMORFISME CD209 DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN
TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE PADA BEBERAPA RAS
DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN MODEL
MEKANISME INFEKSI**

PENANGGUNG JAWAB PROGRAM

Retno Bijanti, M.S.,Drh
Dr. Eduardus Bimo Aksono H, M.Kes.,Drh

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi
Departemen Pendidikan Nasional, Sesuai dengan
Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
Nomor : 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2009

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL :

KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209 DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN MODEL MEKANISME INFEKSI

2. Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Retno Bijanti, M.S., Drh
b. Jenis Kelamin : Perempuan
c. NIP : 130934630
d. Pangkat/Golongan : Pembina / IVa
e. Jabatan : Lektor Kepala
f. Bidang Keahlian : Biologi Molekuler
g. Fakultas/Jurusan/Puslit : Kedokteran Hewan / -/ Institute of Tropical Disease Unair
h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

NO.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Retno Bijanti, Drh., M.S	Patologi Klinik	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2.	Dr. E. Bimo Aksono H, Drh., M.Kes.	Biologi Molekuler	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 (satu) tahun
b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-
b. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 82.000.000,-

Surabaya, 16 Nopember 2009

Ketua Peneliti



Retno Bijanti, M.S., Drh
NIP. 130934630

Mengetahui,

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair



Prof. Dr. Bambang Sektiari L., Drh., DEA

NIP. 131837004

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209
DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE
PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN
MODEL MEKANISME INFEKSI**

(Retno Bijanti * and E. Bimo Aksono H *, 24 halaman, 2009)

RINGKASAN

Infeksi virus dengue sebagai penyebab DBD telah menjadi masalah kesehatan yang serius di banyak negara-negara tropis dan subtropis, karena peningkatan jumlah pasien, penyebaran daerah yang terkena wabah dan manifestasi klinis berat yaitu demam berdarah dengue (DBD) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Pada insiden penyakit DBD diduga ada korelasi antara strain dan genetik, Hal ini disebabkan akhir-akhir ini ada kecenderungan untuk agen penyebab DBD berbeda di setiap daerah. Selain faktor genetik juga diduga dipengaruhi oleh faktor-faktor geografis, faktor demografi serta faktor genetik dari Hospes. Sakuntabhai *et al* (2005) melaporkan bahwa alel 336G dan 332G pada gen CD209 dari host memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap infeksi virus dengue DBD. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk memetakan genetik berbasis alel 332G dan 336G dari gen CD209 pada beberapa etnis di Indonesia. Hal ini terkait dengan kerentanan terhadap infeksi virus dengue sebagai penyebab DBD.

Penelitian ini dirancang dalam dua tahap, yaitu tahap pertama merupakan tahap identifikasi pasien DBD terhadap strain virus dengue dengan PCR; tahap kedua merupakan tahap isolasi dan identifikasi gen CD209 berbasis 332G dan 336G alel di host dengan PCR dan sequencing.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa profil SNP dari gen CD209 dalam etnis Jawa dan Madura etnis (alel 332A dan 336A), sedangkan di Papua yang berbeda etnis (alel 332G dan 336G). Ini tampaknya juga terkait dengan tingkat kejadian dan pola demam berdarah di Papua yang memiliki strain berbeda dari yang ditemukan di Jawa dan Madura. Hasil ini dapat digunakan sebagai dasar untuk kebijakan bahwa penanganan DBD wilayah di Papua berbeda dibandingkan di wilayah Jawa dan Madura.

Kata Kunci : Virus Dengue; CD209; Alel 332; Alel 336; Gen Polimorphism

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai
Prioritas Nasional Batch I (Klaster Gizi & Kesehatan)
Nomor 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009 Tanggal 30 Juli 2009

**MOLECULAR GENE MUTATIONS CHARACTERIZATION of CD209
POLYMORPHISMS IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO DENGUE
VIRUS INFECTION IN SOME ETHNICS IN INDONESIA AS A MECHANISM
TO FIND MODEL INFECTIONS**

(Retno Bijanti * and E. Bimo Aksono H *, 24 pages, 2009)

SUMMARY

Dengue virus infection as a cause of DHF has become a serious health problem in many tropical and subtropical countries, because of the increased number of patients, the spread of plague-affected areas, and severe clinical manifestations of a state of emergency that is Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS). DHF incidence of disease is suspected there is a correlation between strains and genetics, but these days there is a tendency to cause DHF agents differ in each region. This is the possibility of geographic factors, demographic factors, also in addition to genetic factors from host. Sakuntabhai *et al* (2005) reported that compared to the 336G and 332G alleles in the CD209 gene in the host provides protective against dengue virus infection in DHF. Therefore this study aims to map-based genetic 332G and 336G alleles of CD209 gene in some ethnics in Indonesia is associated with susceptibility to dengue virus infection as the cause of DHF.

This study was designed in two phases: the first stage of DHF patients and identification of dengue virus strains by PCR; the second stage of isolation and identification of CD209 gene-based 332G and 336G alleles in the host by PCR and sequencing.

There is a common SNP profiles of the CD209 gene in the Javanese ethnics and Madurese ethnics (332A and 336A alleles), whereas in different Papua ethnics (332G and 336G alleles). This also seems related to the incidence rate and pattern of dengue in Papua strains different from those found in Java and Madura. These results can be used as the basis for the policy that the handling of dengue different areas in Papua than in the areas of Java and Madura

Key words : Dengue Virus, CD209, 332 and 336 Alleless, Polymorphisms gene

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Kegiatan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai
Prioritas Nasional Batch I (Klaster Gizi & Kesehatan)
Nomor 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009 Tanggal 30 Juli 2009

PRAKATA

Pertama-tama kami panjatkan puji syukur ke Hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas perkenannya maka laporan hibah kompetitif penelitian sesuai prioritas nasional Batch I tahun anggaran 2009 kami tentang “KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209 DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN MODEL MEKANISME INFEKSI” dapat kami selesaikan.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Ditjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penyakit Tropis (Institute of Tropical Disease) Universitas Airlangga atas kesempatan dan perkenannya sehingga penelitian kami dapat berlangsung dengan lancar. Demikian juga ucapan terima kasih, kami sampaikan kepada analis LPT Unair yang telah banyak memberikan tenaga, saran, dan pengetahuan untuk kelancaran penelitian ini

Kami menyadari bahwa laporan ini masih banyak kekurangannya, kritik dan saran sangat kami harapkan demi peningkatan kualitas dari laporan kami. Selain itu besar harapan kami, laporan ini dapat memberikan tambahan pengetahuan dan informasi bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Surabaya, 16 Nopember 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
SUMMARY	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Demam Berdarah Dengue dan Problem Nasional	7
2.2 Patogenesis Demam Berdarah Dengue	8
2.3 Penegakkan Diagnosis Demam Berdarah Dengue	9
2.4 Gen Polimorfisme dan CD209 Terhadap Demam Berdarah Dengue	11
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	14
3.1 Tujuan	14
3.2 Manfaat	14
BAB 4. METODE PENELITIAN	15
4.1 Sampel Darah	15
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	15
4.3 Pemeriksaan RNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Strain	15
4.4 Pemeriksaan DNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Gen CD209	16
4.5 Pemeriksaan Gen CD209 dengan Analisis Hasil Sekuensing	17
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
5.1 Prodil Penderita dan Identifikasi Strain Berbasis PCR	18
5.2 Hasil PCR dan Analisis Gen CD209	19
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	28
LAPORAN EKSEKUTIF	
ARTIKEL	

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 5.1. Data sampel yang digunakan dalam penelitian	18

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 5.1. Hasil PCR terhadap gen CD209 sejumlah 452 bp	21
Gambar 5.2. Hasil <i>multialignment</i> sampel ras jawa, ras Madura dan ras Papua berbasis alel 336 dan alel 332	22
Gambar 5.3. Hasil sekuensing gen CD209 sejumlah 452 bp	23

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. BAGAN ALIR PENELITIAN	28
Lampiran 2. CONTOH DAFTAR PARTICIPANTS	29
Lampiran 3. CONTOH HASIL PEMERIKSAAN PCR DAN STRAIN	30

BAB. 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Di Indonesia Penyakit *dengue haemorrhagic fever* (DHF) pertama kali ditemukan pada tahun 1968 di Surabaya dan sekarang menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia bahkan angka kejadian sakit infeksi virus dengue meningkat baik kualitas maupun kuantitas (Soegijanto, 2006). Di setiap negara penyakit DHF mempunyai manifestasi klinik yang berbeda. Demam Berdarah Dengue (DBD) atau *Dengue Haemorrhagic Fever* (DHF) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus dengue famili *Flaviviridae*, dengan genusnya adalah *flavivirus*. Virus ini mempunyai empat serotipe yang dikenal dengan DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Selama ini secara klinik mempunyai tingkatan manifestasi yang berbeda, tergantung dari serotipe virus dengue. Morbiditas penyakit DHF menyebar di negara-negara tropis dan subtropis (Aryati dkk, 2006).

Indonesia dalam peta wabah demam berdarah dengue ada di posisi yang memprihatinkan. Dalam jumlah angka kesakitan (*morbidity rate*) dan kematian (*mortality rate*) demam berdarah dengue di kawasan Asia Tenggara, selama kurun waktu 1985-2004, Indonesia berada di urutan kedua terbesar setelah Thailand. Selama tahun 1985-2004, di Indonesia tercatat angka penderita demam berdarah dengue terendah 10.362 pada tahun 1989 dan tertinggi 72.133 orang pada tahun 1998, dengan angka kematian terendah 422 orang pada tahun 1999 dan tertinggi 1.527 pada tahun 1988 (Soegijanto, 2006)

Di negara-negara di wilayah tropis, demam berdarah dengue umumnya meningkat pada musim penghujan di mana banyak terdapat genangan air bersih yang menjadi tempat berkembang biak nyamuk *Aedes aegypty* (Suroso, 1999). Demikian juga di daerah perkotaan, umumnya wabah demam berdarah kembali meningkat menjelang awal musim kemarau (Suroso, 1999).

Infeksi virus dengue telah menjadi masalah kesehatan yang serius pada banyak negara tropis dan subtropis, karena adanya peningkatan jumlah penderita, meluasnya daerah yang terkena wabah, dan manifestasi klinis berat yang merupakan keadaan darurat

yaitu *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Antara tahun 1975 dan 1995, DHF terdeteksi keberadaannya di 102 negara di dari lima wilayah WHO yaitu : 20 negara di Afrika, 42 negara di Amerika, 7 negara di Asia Tenggara, 4 negara di Mediterania Timur dan 29 negara di Pasifik Barat. Seluruh wilayah tropis di dunia saat ini telah menjadi hiperendemis dengan ke-empat serotipe virus secara bersama-sama di wilayah Amerika, Asia Pasifik dan Afrika. Indonesia, Myanmar, Thailand masuk kategori A yaitu : KLB/wabah siklis terulang pada jangka waktu antara 3 sampai 5 tahun. Menyebarkan sampai daerah pedesaan, sirkulasi serotipe virus beragam (WHO, 2000).

Pada tahun 2005, jumlah kasus demam berdarah dengue di seluruh Indonesia sampai dengan Februari 2005 sebanyak 5.064 kasus dengan 113 kematian. Di 6 provinsi yaitu DKI Jakarta, Jawa Barat, Sulawesi Selatan, Kalimantan Timur, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur dilaporkan terjadi peningkatan kasus yang diwaspadai sebagai Kejadian Luar Biasa (KLB) demam berdarah dengue. Artinya, jumlah kasusnya sudah dua kali lipat atau lebih dari bulan yang sama pada tahun lalu dan atau angka kematiannya lebih dari 1% (Soegijanto, 2006)

1.2 Rumusan Masalah

Timbulnya penyakit DHF ditengarai adanya korelasi antara strain dan genetik, tetapi akhir-akhir ini ada tendensi agen penyebab DHF disetiap daerah berbeda. Hal ini kemungkinan adanya faktor geografik, selain faktor genetik dari hospesnya. Selain itu berdasarkan macam manifestasi klinik yang timbul dan tatalaksana DHF secara konvensional sudah berubah. Infeksi virus Dengue telah menjadi masalah kesehatan yang serius pada banyak negara tropis dan sub tropis (Hariadhi dan Soegijanto, 2006).

Dalam upaya pengendalian wabah demam berdarah dengue, dibandingkan negara lainnya di Asia Tenggara, Indonesia termasuk salah satu negara yang masih mengalami masalah. Indonesia memang sangat jauh tertinggal bila dibandingkan Singapura, yang sejak awal dekade 1980an dapat dikatakan telah berhasil memberantas wabah penyakit demam berdarah dengue (Suroso, 1999).

Penanganan secara cepat wabah penyakit demam berdarah dengue di Indonesia setiap tahunnya selalu menjadi masalah karena pemerintah dinilai oleh masyarakat

lamban menanganinya. Pemberantasannya dari tahun ke tahun belum berhasil secara keseluruhan (Suharti, 2001).

Penelitian terhadap epidemi Dengue di Nicaragua tahun 1998, menyimpulkan bahwa epidemiologi Dengue dapat berbeda tergantung pada daerah geografi dan serotipe virusnya. Untuk menegakkan diagnosa infeksi virus Dengue diperlukan dua kriteria yaitu kriteria klinik dan kriteria laboratorium (WHO, 1997).

Pengembangan teknologi laboratorium untuk mendiagnosa infeksi virus Dengue terus berlanjut hingga sensitivitas dan spesifitasnya menjadi lebih bagus dengan waktu yang cepat pula. Ada 4 jenis pemeriksaan laboratorium yang digunakan yaitu : uji serologi, isolasi virus, deteksi antigen dan deteksi RNA/DNA menggunakan tehnik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Aryati dkk, 2006). Wabah Dengue yang baru terjadi di Bangladesh yang diidentifikasi dengan PCR ternyata DEN-3 yang dominan. Sedangkan wabah di Salta Argentina pada tahun 1997 ditemukan bahwa serotipe DEN-2 yang menyebabkan transmisi. Sistem *surveillance* Dengue di Nicaragua pada bulan Juli hingga Desember 1998 mengambil sampel dari beberapa rumah sakit dan pusat kesehatan (*Health Center*) yang terdapat pada berbagai lokasi menghasilkan temuan 87% *Dengue Fever*, 7% *Dengue Haemorrhagic Fever*, 3% *Dengue Shock Syndrome*. DEN-3 paling dominan, DEN-2 paling sedikit. Disimpulkan bahwa epidemiologi Dengue dapat berbeda tergantung pada wilayah geografi dan serotipe virusnya (Suroso, 1999).

Virus dengue merupakan virus RNA untai tunggal, genus flavivirus, terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, 2, 3 dan 4. Struktur antigen ke-4 serotipe ini sangat mirip satu dengan yang lain, namun antibodi terhadap masing-masing serotipe tidak dapat saling memberikan perlindungan silang.. Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antar serotipe, tetapi juga didalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen codon, variasi diantara serotipe dapat mencapai 2,6-1,0 % pada tingkat nukleotida dan 1,3-7,7 % untuk tingkat protein (Blacksell *et al*, 2008). Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya. Virus Dengue yang genomnya mempunyai berat molekul 11 Kilobase tersusun dari protein struktural dan non-struktural. Protein struktural yang terdiri dari *protein envelope* (E), protein pre-membran (prM) dan *protein core* (C) merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein non-struktural

merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1 dan NS-5. Dalam merangsang pembentukan antibodi diantara protein struktural, urutan imunogenitas tertinggi adalah protein E, kemudian diikuti protein prM dan C. Adapun pada protein non-struktural yang paling berperan adalah protein NS-1 (Leitmeyer, 1999, Aryati dkk, 2006)..

Vektor dari virus Dengue ditularkan dari orang ke orang melalui gigitan nyamuk *Aedes* (*Ae.*) dari *subgenus Stegomyia*. *Ae. aegypti* merupakan vektor epidemi yang paling utama, namun spesies lain seperti *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, anggota dari *Ae. Scutellaris complex*, dan *Ae. (Finlaya) niveus* juga dianggap sebagai vektor sekunder. Kecuali *Ae. aegypti* semuanya mempunyai daerah distribusi geografis sendiri-sendiri yang terbatas. Meskipun mereka merupakan host yang sangat baik untuk virus Dengue, biasanya mereka merupakan vektor epidemi yang kurang efisien dibanding *Ae. aegypti*. (WHO, 2000) .

Manifestasi klinis infeksi virus Dengue pada manusia sangat bervariasi. Spektrum variasinya begitu luas, mulai dari asimtomatik, demam ringan yang tidak spesifik, Demam Dengue, Demam Berdarah Dengue, hingga yang paling berat yaitu *Dengue Shock Syndrome* (DSS), (Soegijanto, 2006). Diagnosis Demam Berdarah Dengue ditegakkan berdasarkan kriteria diagnosis menurut WHO tahun 1997, terdiri dari kriteria klinis dan laboratoris. Penggunaan kriteria ini dimaksudkan untuk mengurangi diagnosis yang berlebihan (*overdiagnosis*) (WHO, 1997).

Patogenesis dan patofisiologi dari DHF belum sepenuhnya dipahami, namun terdapat dua perubahan patofisiologis yang menyolok, yaitu meningkatnya permeabilitas kapiler yang mengakibatkan bocornya plasma, hipovolemia dan terjadinya syok. Pada DHF terdapat kejadian unik yaitu terjadinya kebocoran plasma ke dalam rongga pleura dan rongga peritoneal. Kebocoran plasma terjadi singkat (24-48 jam). Hemostasis abnormal yang disebabkan oleh vaskulopati, trombositopeni dan koagulopati, mendahului terjadinya manifestasi perdarahan. Aktivasi sistem komplemen selalu dijumpai pada pasien DHF. Kadar C3 dan C5 rendah, sedangkan C3a serta C5a meningkat. Mekanisme aktivasi komplemen tersebut belum diketahui. Adanya kompleks imun telah dilaporkan pada DHF, namun demikian peran kompleks antigen-antibodi sebagai penyebab aktivasi komplemen pada DHF belum terbukti. Selama ini diduga bahwa derajat keparahan penyakit DHF dibandingkan dengan penyakit lain dijelaskan dengan adanya pemacuan

dari multiplikasi virus di dalam makrofag oleh antibodi heterotipik sebagai akibat infeksi Dengue sebelumnya. Namun demikian, terdapat bukti bahwa faktor virus serta respons imun *cell-mediated* terlibat juga dalam patogenesis DHF. (WHO, 2000). Bahkan saat ini ada kecenderungan terjadi pergeseran umur penderita dari anak ke dewasa serta perubahan degradasi stadium berturut-turut pada penderita dewasa. Di sisi lain hingga saat ini belum optimalnya kit diagnostik untuk rapid test DHF dan vaksin untuk terapi DKF di Indonesia sebagai upaya mengantisipasi kejadian luar biasa (KLB).

Salah satu upaya mengungkap mekanisme infeksi virus dengue adalah mempelajari karakter DC-SIGN (*dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin*) yang dikode oleh gen CD209 pada kromosom 19p13.3 (Tailleux *et al*, 2003). Ternyata merupakan suatu *C-type lectins* yang berperan terhadap ekspresi subset dari sel dendritik (DC's) dan *alveolar macrophage*. DC-SIGN juga dapat mengikat berbagai macam ligands (Gordon, 2002), ligan endogenous termasuk sel endotel melalui ICAM-2, limfosit-T melalui ICAM-3, neutrofil melalui MAC-1 dan berbagai struktur glikosilasi endogenous termasuk ligands exogenous yang terdapat pada *M. Tbc*, *M. Leprae*, *BCG*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *HIV-1*, *HIV-2*, *SIV-1*, virus dengue, *virus Ebola*, *Cytomegalovirus*, virus Hepatitis C (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

Pada *M. Tbc*, maka DC-SIGN merupakan reseptor *M. Tbc* yang mempengaruhi subset sel imun demikian juga mempengaruhi dengan menekan peran dari TLR sehingga mempengaruhi keseimbangan Th1/Th2 yang berakibat penurunan respon imun (Geijtenbeek *et al*, 2000; Geijtenbeek *et al* 2003; Van Kooyk and Geijtenbeek 2003).

Adapun peran DC-SIGN pada DHF dikemukakan oleh Sakuntabhai *et al* (2005) yang menunjukkan bahwa alel 336G pada gen CD209 lebih memberikan sistem pertahanan yang lebih kuat dibandingkan alel 336A demikian juga alel 332G dibandingkan 332A (Kashima *et al*, 2009)

Lembaga penyakit tropis Universitas Airlangga memiliki roadmap penelitian DHF karena didukung oleh sejumlah *block grant* maupun hibah baik yang dibiayai oleh pemerintah Indonesia (Hibah Bersaing, RUT, Hibah Pasca, RISBIN dll) maupun pemerintah Jepang antara lain melalui proyek CRC-ERID (*Collaborative Research Centre-Emerging and Re-emerging Diseases*). Adapun penelitian tersebut antara lain

pemetaan genotipe /typing DHF dari beberapa isolat di Indonesia, karakterisasi protein (antigenik dan imunogenik) sebagai kandidat vaksin dan kit diagnostik, karakterisasi molekul kinetik DHF pada sel endotel .

BAB. 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Demam Berdarah Dengue dan Problem Nasional

Infeksi virus dengue telah menjadi masalah kesehatan yang serius pada banyak negara tropis dan subtropis, karena adanya peningkatan jumlah penderita, meluasnya daerah yang terkena wabah, dan manifestasi klinis berat yang merupakan keadaan darurat yaitu *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Antara tahun 1975 dan 1995, DHF terdeteksi keberadaannya di 102 negara di dari lima wilayah WHO yaitu : 20 negara di Afrika, 42 negara di Amerika, 7 negara di Asia Tenggara, 4 negara di Mediterania Timur dan 29 negara di Pasifik Barat. Seluruh wilayah tropis di dunia saat ini telah menjadi hiperendemis dengan ke-empat serotipe virus secara bersama-sama di wilayah Amerika, Asia Pasifik dan Afrika. Indonesia, Myanmar, Thailand masuk kategori A yaitu : KLB/wabah siklis terulang pada jangka waktu antara 3 sampai 5 tahun. Menyebarkan sampai daerah pedesaan, sirkulasi serotipe virus beragam (WHO, 2000). Banyaknya penderita DHF disebabkan masyarakat yang kurang memperhatikan kebersihan lingkungan dan gerakan pemberantasan sarang nyamuk (PSN). Karena itu, perlu penggalakan gerakan PSN melalui tiga M, yakni menguras bak mandi dan penampungan air seminggu sekali, mengubur benda bekas yang berisi genangan air, dan menambur zat abate pada tempat penampungan air untuk membunuh jentik nyamuk. Disamping itu, banyaknya penderita DHF yang meninggal dunia, disebabkan karena saat memeriksakan ke RS keadaan pasien sudah pada stadium akhir yakni parah dan syok akibat.

Kejadian penyakit DHF semakin tahun semakin meningkat dengan manifestasi klinis yang berbeda mulai dari yang ringan sampai berat. Manifestasi klinis berat yang merupakan keadaan darurat yang dikenal dengan *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Manifestasi klinis infeksi virus Dengue termasuk didalamnya Demam Berdarah Dengue sangat bervariasi, mulai dari asimtomatik, demam ringan yang tidak spesifik, Demam Dengue, Demam Berdarah Dengue, hingga yang paling berat yaitu *Dengue Shock Syndrome* (DSS) (Aryati dkk, 2006).

Dalam praktek sehari-hari, pada saat pertama kali penderita masuk rumah sakit tidaklah mudah untuk memprediksikan apakah penderita Demam Dengue tersebut akan bermanifestasi menjadi ringan atau berat. Infeksi sekunder dengan serotipe virus dengue yang berbeda dari sebelumnya merupakan faktor resiko terjadinya manifestasi Demam Berdarah Dengue yang berat atau *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Namun sampai saat ini mekanisme respons imun pada infeksi oleh virus Dengue masih belum jelas, banyak faktor yang mempengaruhi kejadian penyakit Demam Berdarah Dengue, antara lain faktor host, lingkungan (*environment*) dan faktor virusnya sendiri (Hariadhi dan Soegijanto, 2006). Faktor host yaitu kerentanan (*susceptibility*) dan respon imun. Faktor lingkungan (*environment*) yaitu kondisi geografi (ketinggian dari permukaan laut, curah hujan, angin, kelembaban, musim); Kondisi demografi (kepadatan, mobilitas, perilaku, adat istiadat, sosial ekonomi penduduk). Jenis nyamuk sebagai vektor penular penyakit juga ikut berpengaruh (Soegijanto, 2006)..

2.2 Patogenesis Demam Berdarah Dengue

Faktor agen yaitu sifat virus Dengue, yang hingga saat ini telah diketahui ada 4 jenis serotipe yaitu Dengue 1, 2, 3 dan 4. Penelitian terhadap epidemi Dengue di Nicaragua tahun 1998, menyimpulkan bahwa epidemiologi Dengue dapat berbeda tergantung pada daerah geografi dan serotipe virusnya.

Virus dengue terdiri dari 4 serotipe yaitu DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4. Keempat serotipe virus ini terdapat di Indonesia dan dilaporkan bahwa serotipe virus DEN-3 sering menimbulkan wabah, sedangkan di Thailand penyebab wabah yang dominan adalah virus DEN-2 (Soegijanto, 2004). Variasi genetik yang berbeda pada ke-4 serotipe ini tidak hanya menyangkut antar-serotipe, tetapi juga sub tipe (genotipe) di dalam serotipe itu sendiri tergantung waktu dan daerah penyebarannya. Pada masing-masing segmen *codon*, variasi di antara serotipe dapat mencapai 2,6 – 11,0 % pada tingkat nukleotida dan 1,3 – 7,7 % untuk tingkat protein. Perbedaan urutan nukleotida ini ternyata menyebabkan variasi dalam sifat biologis dan antigenitasnya (Leitmeyer, 1999).

Virus dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA* (*ssRNA sense +*), dimana di dalam genomnya terdapat sebuah *Single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid*), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (protein envelop) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 dimana ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated regio (NTR)* di kedua ujungnya (Aryati dkk, 2006; Yao, 2002). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1-NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*-nya, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Aryati dkk 2006; Yao, 2002).

Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenisitas tertinggi adalah protein E, diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS1 (Leitmeyer, 1999).

Patogenesis terjadinya DBD masih belum jelas diketahui, namun berbagai macam teori seperti hipotesis infeksi sekunder (teori *secondary heterologous infection*), *hypothesis antibody dependent enhancement (ADE)*, teori virulensi virus yang mendasarkan pada perbedaan serotipe virus dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 masih dianut hingga saat ini . Kesemuanya dapat ditemukan pada berbagai kasus yang fatal, tetapi berbeda antara daerah yang satu dengan yang lain . Teori hipotesis infeksi sekunder yang saat ini banyak dianut, dikatakan bahwa infeksi sekunder lebih sering menyebabkan keadaan yang lebih berat yaitu DBD dan DSS (Aryati dkk, 2006).

2.3. Penegakkan Diagnosis Demam Berdarah Dengue

Menurut Amin *et al* (2000) definisi kasus *dengue fever* berdasarkan kriteria sebagai berikut demam tinggi dengan atau tanpa kurva biphasic: tidak ada tanda-tanda fokus infeksi bakteri kasus klinis infeksi virus sugestif. Menurut Taleo *et al* (2000) definisi kasus DF, untuk dewasa dan anak-anak yang digunakan, sebagai berikut: a) pada

pasien dewasa dengan demam tinggi ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama lebih dari dua hari, ditambah setidaknya dua dari gejala berikut: sakit kepala parah dan atau sakit di belakang mata, tulang dan atau sakit sendi, ruam dan atau menyiram, mual dan atau muntah-muntah dan atau pusing, dianggap sebagai tersangka untuk demam berdarah. b) Dalam hal definisi anak-anak adalah: demam tinggi ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama lebih dari dua hari ditambah setidaknya salah satu dari berikut: miskin minum dan atau urin miskin, ruam dan atau penggelontoran mual dan atau muntah-muntah dan atau pusing. Manifestasi klinis tersebut sudah dikonfirmasi dari pemeriksaan serologi demam berdarah IgM dan IgG immuno cepat uji kromatografi. Untuk memastikan untuk diagnosis yang sero positif harus dikonfirmasi dengan tes netralisasi. Laboratorium klinis dan kriteria untuk diagnosis DBD berdasarkan kriteria WHO 1997 sebagai berikut: Demam tinggi terus menerus selama 2-7 hari. Manifestasi hemoragik, termasuk setidaknya *fourniquet* positif tes, pembesaran hati, gangguan peredaran darah (seperti syok pada kasus yang berat). Trombositopenia $100,000\text{ sel/cu mm}$, haemokonsentrasi: hematokrit (HCT) meningkat sebesar 20% atau bukti lainnya adanya efusi pleura dan / atau asites (WHO, 1997).

Pemeriksaan serologis berupa IgM dan IgG antidengue sangat diperlukan untuk membedakan demam yang diakibatkan virus dengue ataukah demam oleh sebab lain (demam tifoid, influenza, malaria, hepatitis dan lain-lain). Pemeriksaan IgM dan IgG antidengue juga diperlukan untuk membedakan apakah infeksi tersebut pertama kali/primer atau infeksi sekunder/tersier/berikutnya. Hal ini penting untuk penatalaksanaan manajemen terapi di samping epidemiologi, karena pada infeksi sekunder keadaan dapat menjadi lebih berat (DBD/SSD= Sindrom Syok Dengue). Pada kit komersial deteksi Ig G dan Ig M kebanyakan menggunakan rekombinan protein E sebagai antigen dalam konjugatnya, Padahal diketahui disamping protein E juga terdapat protein lain yaitu C dan prM yang bersifat imunogenik (Blacksell *et al*,2008).

Saat ini sudah ada tes yang dapat mendiagnosis DBD dalam waktu demam 8 hari pertama yaitu antigen virus dengue yang disebut dengan antigen NS1. Keuntungan mendeteksi antigen NS1 yaitu untuk mengetahui adanya infeksi dengue pada penderita tersebut pada fase awal demam, tanpa perlu menunggu terbentuknya antibodi. Namun sayangnya penggunaan tes NS1 secara tunggal, memberikan variasi sensitivitas NS1 yaitu 63 % – 93,4% walaupun spesifisitasnya 100% (Blackshell, 2008).

Idealnya dilakukan penggabungan antara deteksi antibodi untuk pembeda jenis infeksi dengunya (infeksi primer atau sekunder), dengan antigen untuk deteksi pada fase dini sebelum terbentuknya antibodi. Deteksi antibody Ig G dan Ig M direncanakan menggunakan gabungan protein E, C, dan prM. sebagai antigen yang digabungkan dengan konjugat. Diagnosis cepat berupa *rapid test* dengan metode imunokromatografi, akan sangat berguna di lapangan, baik di tingkat puskesmas, maupun di instalasi gawat darurat rumah sakit, untuk secara cepat dapat dilakukan tatalaksana terapi yang seoptimal mungkin, untuk menurunkan angka morbiditas dan mortalitas penderita DBD.

2.4. Gen Poliformisme CD209 dan Infeksi Demam Berdarah Dengue

Sepanjang hidupnya, manusia senantiasa terpapar lingkungan bakteri yang dapat menyebabkan kematian. Kemampuan hospes untuk melawan invasi bakteri patogen merupakan respon yang penting untuk mengendalikan infeksi dan mempertahankan kehidupan. Keterlambatan deteksi bakteri patogen akan menimbulkan infeksi yang berat dan menyebabkan kerusakan jaringan, disfungsi organ serta kematian (Texereau *et al*, 2005). Peranan faktor genetik hospes dalam menentukan kerentanan infeksi mulai dibahas pada akhir-akhir ini, karena faktor genetik dapat menjelaskan mengapa seseorang lebih tahan terhadap infeksi dibanding lainnya (Holmes *et al*, 2003).

Dengan selesainya *human genome project* dan berkembangnya teknologi *genotyping* akan membantu mengidentifikasi jalur utama sistem pertahanan tubuh yang menghasilkan strategi baru untuk diagnosis, terapi dan pencegahan penyakit (Kwiatkowski, 2000). Misalnya beberapa penyakit seperti atopi dan autoimun merupakan dampak dari penyakit infeksi dan varian gen imun. Pemahaman faktor-faktor genetik dapat menentukan kerentanan infeksi yang akhirnya memberikan petunjuk dalam pencegahan yang lebih luas terhadap penyakit yang sama (Holmes *et al*, 2003).

Polimorfisme gen dapat menentukan perbedaan dalam merespon infeksi yang sama, namun ini tergantung juga pada beberapa faktor seperti kesehatan sebelumnya, imunitas yang dimiliki dan variabilitas bakteri patogen. Perubahan monogenik ataupun poligenik diduga berperan dalam respon terhadap adanya infeksi yang masuk kedalam tubuh manusia sehingga membedakan kerentanan individu terhadap infeksi (Holmes *et al*, 2003).

Analisis epidemiologi dari komponen genetik yang menimbulkan infeksi mengungkapkan beberapa kandidat gen yang penting untuk respon inflamasi dan diteliti dalam *case control*, termasuk *tumor necrosis factor (TNF)- α* dan *TNF- β* , *interleukin (IL)-1 receptor antagonist*, interleukin 6, interleukin 10, CD-14, TLR-4, TLR-2 (Holmes *et al*, 2003) termasuk CD209 (Cooke and Hill. 2001; Sakuntabhai *et al* , 2005).

Virus dengue (DENV) merupakan suatu *emerging mosquito-borne arbovirus* yang dapat menginfeksi sekitar 50-100 juta orang per tahun. DENV telah dilaporkan menginfeksi lebih dari; 100 negara dan dapat berpotensi untuk menginfeksi daerah-daerah baru akibat adanya perubahan ekologi nyamuk, perubahan demografi manusia termasuk ekspansi ke perkotaan, perkembangan vektor, dinamika perdagangan dan pertumbuhan penduduk. Diperkirakan 2,5 miliar orang tinggal di daerah beresiko untuk infeksi DENV (Gubler, 2006). DENV (keluarga Flaviviridae, genus Flavivirus) merupakan jenis virus yang memiliki *icosahedral-enveloped* yang mengandung *single-stranded positive sense RNA genome*. DENV diklasifikasikan menjadi 4 serotipe (DENV-1-4) biasanya memiliki filogenetik berbeda dan sesuai dengan daerah geografisnya.. Orang yang terinfeksi DENV akan berkembang menjadi viremia dalam waktu kurang lebih enam hari setelah demam. Pembersihan DENV dalam sirkulasi diperantarai oleh perkembangan antibodi penetralisir yang memiliki respon yang kuat terhadap serotipe penyebab infeksi serta produksi sel T spesifik terhadap DENV yang memicu penghapusan sel yang terinfeksi. Meskipun secara umum DENV mengakibatkan infeksi akan tetapi biasanya tidak menunjukkan gejala atau hanya demam ringan. Terdapat dari sekitar 200.000-500.000 kasus DENV dimana sekitar 20.000-25.000 kasus menyebabkan kematian tiap tahun.

Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap perbedaan pada manifestasi dari penyakit DENV tidak sepenuhnya dipahami. Meskipun demikian, seperti dalam kebanyakan multifaktor proses biologis, maka penyakit DENV ditentukan oleh sejumlah interaksi antara virus, imunologi, dan faktor-faktor genetik manusia. Selain itu, banyak bukti menunjukkan bahwa protein dalam air liur vektor juga dapat memiliki efek immunomodulator terhadap infeksi arbovirus vertebrata (Schneider and Higgs. 2008). Pada manusia, tingkat kepekaan terhadap penyakit DENV dipengaruhi oleh faktor-faktor

dalam darah perifer, termasuk besarnya dan lamanya replikasi virus, ekspresi sitokin, dan sel kekebalan aktivasi dan proliferasi (Simmnos *et al*, 2007; Coffey *et al*, 2006) .

Gen CD209 terletak pada kromosom 19p13.2-3 dan sangat polimorfisme. Sejumlah nukleotida polimorfisme tunggal (SNPs) telah dilaporkan. Salah satu SNPs ini adalah Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A) pada posisi -336 di dalam gen promotor CD209. Daerah ini diprediksi akan mempengaruhi beberapa faktor transkripsi pengikatan untuk Sp1/GATA/CACC, dan *CAC-binding transcription factors*. DC-SIGN -336 SNP telah dikaitkan dengan adanya peningkatan resiko penularan terhadap infeksi HIV-1 dan tingkat keparahan penyakit dengue. Polimorfisme genetik lain juga dapat mempengaruhi sejumlah ulangan di daerah leher dari DC-SIGN. Mengingat adanya relevansi fungsional DC-SIGN di *M.tbc* mengikat DC, maka ada dugaan bahwa gen polimorfisme promotor di dalam kawasan dan di leher domain bisa menjadi faktor risiko untuk mengembangkan tuberkulosis dan tingkat keparahan penyakit DBD (Sakuntabhai *et al*, 2005).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan

- a. Mendapatkan karakter urutan nukelotida dari gen CD209 berbasis alel 332G dan 336G
- b. Mendapatkan model mekanisme infeksi virus dengue pada beberapa ras di Indonesia

3.2 Manfaat

Bagi Kepentingan Pengembangan Ilmu

Memberikan serta menambah wawasan ilmiah tentang peranan genetik terhadap kepekaan infeksi virus dengue pada sel host dengan berbasis pada alel 332G dan 336G pada gen CD209, sehingga diperoleh model mekanisme infeksi melalui pendekatan genetik.

Bagi kepentingan Aplikasi

Sebagai dasar kebijakan untuk tatalaksana pengendalian dan pencegahan wabah DHF yang masih sulit diatasi pada beberapa daerah di Indonesia.

BAB. 4

METODE PENELITIAN

4.1 Sampel Darah

Penelitian ini merupakan *cross sectional study*. 20 sampel darah diambil dari penderita yang diduga DHF dari beberapa ras rumah sakit di Sidoarjo, Surabaya dan Papua.

Sampel darah yang telah diambil ditempatkan dalam 2 (dua) tabung pemusing steril tanpa antikoagulan, kemudian 1 (satu) tabung dilakukan pemusingan untuk mendapatkan serumnya. Serum yang telah dipisah, dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80°C sampai saat pemeriksaan PCR untuk identifikasi strain. Adapun 1 (satu) tabung lain disiapkan untuk identifikasi gen 209 berbasis alel 332G dan 336G.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan April 2009 sampai dengan Nopember 2009, dengan mengambil sampel penderita prioritas dari beberapa ras yang terdapat di beberapa rumah sakit di Sidoarjo, Surabaya dan Papua.

Untuk identifikasi dengue termasuk strain serta identifikasi gen CD209 berbasis alel 332G dan 336G dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis (*Institute of Tropical Disease*) Universitas Airlangga. Kampus C Unair. Jl. Mulyorejo Surabaya-Jawa Timur

4.3 Pemeriksaan RNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Strain

Sampel darah yang telah diambil ditempatkan dalam tabung pemusing steril tanpa antikoagulan, kemudian dilakukan pemusingan untuk mendapatkan serumnya. Serum yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap infeksi virus dengue dan strain dengan metode PCR.

4.4 Pemeriksaan DNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Gen CD209

Persiapan Buffy Coat

Tabung EDTA yang mengandung sampel darah diambil *buffy coat* yaitu dengan cara sentrifus 900 g selama 10 menit pada suhu 4°. Lapisan tipis putih diambil dipisahkan dari sel darah merah dan ditempatkan pada tabung tersendiri untuk PCR.

Persiapan PCR

a. Ekstraksi DNA Dengue dari Serum

DNA diekstraksi dari serum dengan cara ekstraksi Qiagen kit. Dalam proses ekstraksi ini digunakan kit dan manual yang tercantum pada Qiagen kit.

b. Reaksi Amplifikasi dengan Nested PCR

Sampel yang sudah diperoleh, baik yang dinyatakan positif maupun negatif terhadap DHF akan diteruskan untuk dianalisis karakter urutan nukleotida dari gen CD209 terutama alel 332G dan 336G dengan primer yang spesifik yaitu : 5-CAAAAATGAGGACAGCAGCA-3 (Sense) dan 5-CTCCAAGGAACCAAGACTGC-3 (Antisense). Untuk jalannya PCR dirancang sebagai berikut : 95°C selama 15 menit, 94°C selama 20 detik; 65°C selama 30 detik, 72 °C selama 30 detik, diulang selama 40 siklus dan pada akhir ditambah 72 °C selama 3 menit.

c. Elektroforesi Agar

Pada hasil amplifikasi DNA dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarosa 2% dalam larutan TBE 0,5X yang mengandung ethidium bromide, DNA dengue dari sampel, kontrol positif serta marker (Hae III digest) yang sudah diseparasi dapat dilihat dibawah sinar ultraviolet.

d. Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis

Untuk dokumentasi hasil, dilakukan pengambilan foto dengan menggunakan kamera digital.

4.5 Pemeriksaan Gen CD209 dengan Analisis Hasil Sekuensing

a. Purifikasi hasil PCR

Pada hasil PCR positif yang berisi fragmen nukleotida yang telah diamplifikasi dari daerah genom CD209 yang menjadi target, selanjutnya dilakukan purifikasi

b. PCR Pro Sequencing

Setelah pengecekan purifikasi hasil cDNA dengan elektroforesis, dilakukan PCR pro Sequencing menggunakan salah satu primer yang dipakai dalam PCR sebelumnya dalam hal ini menggunakan primer sense.

c. Purifikasi hasil PCR pro Sequencing

Selanjutnya dilakukan purifikasi hasil PCR pro sequencing

d. Sequencing dan analisis sekuens nukelotida

Hasil pemurnian cDNA dengan menggunakan *Low Melting Agarose* dan pelabelan cDNA dengan menggunakan primer *sense*, dilanjutkan PCR dan sekuensing untuk mendapatkan susunan nukleotida Analisis sekuens nukelotida dengan metode *direct sequencing* yang menggunakan mesin ABI Prism 310 sequencer DNA dari Applied Biosystems, Inc. Analisis molekuler lebih lanjut sekuens nukelotida dari gen CD209 serum sampel penderita DHF diolah dengan program GENETIX MAC versi 9. Untuk mengetahui perubahan atau mutasi dari alel 332G dan 336G gen CD209 sejumlah 452 bp.

BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Profil Penderita dan Identifikasi Strain Berbasis PCR

Semua sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 20, dimana sampel ini berasal dari beberapa rumah sakit di Sidoarjo (10 sampel), Surabaya (5 sampel) dan Papua (5 sampel), sehingga mewakili ras Jawa, Madura dan Papua. Sampel yang digunakan dinyatakan *suspect* terhadap demam berdarah dengue (DHF) berdasarkan gejala klinis

Tabel 5.1. Data sampel yang digunakan dalam penelitian

No.	Umur	Ras	Jenis Kelamin	PCR Dengue
1	19 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
2	9 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
3	10 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
4	8 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
5	7 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
6	3 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
7	20 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
8	19 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
9	2 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
10	5 thn	Madura	Laki-Laki	Negatif
11	9 thn	Madura	Perempuan	Positif (Den-2)
12	5 thn	Madura	Prempuan	Negatif
13	2 thn	Madura	Laki-laki	Negatif
14	20 thn	Madura	Perempuan	Positif (Den-2)
15	6 thn	Madura	Perempuan	Negatif
16	15 thn	Papua	Laki-laki	Negatif
17	9 thn	Papua	Perempuan	Negatif
18	10 thn	Papua	Perempuan	Negatif
19	17 thn	Papua	Laki-laki	Negatif
20	12 thn	Papua	Laki-laki	Negatif

Dari hasil PCR pada tabel 5.1, terlihat bahwa dari 20 sampel semua sampel ras Papua ternyata negatif terhadap DHF (0%), ras Jawa (3/5 atau 15%) sedangkan ras Madura (2/20 atau 10%). Dari 5 sampel yang positif ternyata semua menunjukkan hasil DEN strain 2. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Soegijanto dkk (2006) bahwa strain DEN yang terbanyak di daerah Jawa Timur adalah DEN-2 (Tabel 5.1). Walaupun demikian di Indonesia secara umum juga ditemukan strain DEN-1 (Aryati dan Soegijanto, 2006), DEN-3 (Aryati dan Soegijanto, 2006) dan DEN-4 (Lanciotti *et al*, 1997)

5.2 Hasil PCR dan Analisis Gen CD209

Dari hasil PCR terhadap sampel berbasis pada CD209 diperoleh urutan nukleotida sejumlah 452 bp. Hal ini sesuai dengan rancangan primer yang digunakan berdasarkan Kashima *et al* (2009). Dimana daerah yang diamati merupakan daerah pada kromosom 19 (ICAM-3) yang memiliki berbagai fungsi berkaitan kemampuan untuk mengenali berbagai patogen termasuk virus Dengue (Sakuntabhai *et al*, 2005) karena memperlihatkan *pathogen recognition receptor* (PRRs) termasuk TLR dan *C-type lectins* yang dapat mengenali bentuk molekul dari patogen (Gomez *et al*, 2006). Bahkan Kashima *et al* (2009) melaporkan bahwa gen CD209 promotor pada posisi 336, 332, 201 dan 139 dari empat etnis yang berbeda di Brasil yaitu Kaukasian, Afro-Brasil, Asia dan Amerindian ternyata sangat terkait dengan mutasi pada SNP yaitu menjadi lebih peka terhadap infeksi bahkan cenderung menjadi parah.

Hasil sekuensing dan *multialignment* yang dilakukan dengan menggunakan Genetix Mac Ver. 9 terhadap sampel memperlihatkan bahwa pada ras Jawa dan Madura memiliki profil *single nucleotide polymorphism* yang identik yaitu alel 332A dan alel 336A (lihat gambar 5.2), sedangkan pada ras Papua memiliki profil ANP yang berbeda yaitu alel 332G dan 336G.

Dalam hal hasil penelitian ini, maka alel 336G telah dikaitkan dengan pengurangan ekspresi DC-SIGN di permukaan dan di makrofag, seperti posisi 336 yang terletak dekat dengan daerah transkripsi utama. Hal ini mungkin mempengaruhi pengikatan faktor transkripsi SP1 dan faktor lain yang memodulasi aktivitas transkripsional. Atas dasar itu, kemampuan individu menyajikan antigen yang membawa

alel 336G kemungkinan terganggu, dengan konsekuensi perubahan respon kekebalan. Mengenai penyakit menular posisi 336 di daerah promotor gen CD209 telah dipelajari secara ekstensif. Vanberg *et al* (2008) menunjukkan bahwa alel 336G berhubungan dengan perlindungan terhadap tuberkulosis pada populasi di sub-Sahara Afrika. Sebaliknya, varian 336G telah dikaitkan dengan kerentanan terhadap infeksi HIV, DHF dan TB. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat ekspresi tinggi dari DC-SIGN akan mengakibatkan peningkatan kemampuan akan penangkapan dan pengolahan yang lebih baik terhadap antigen (Sakuntabhai *et al*, 2005).

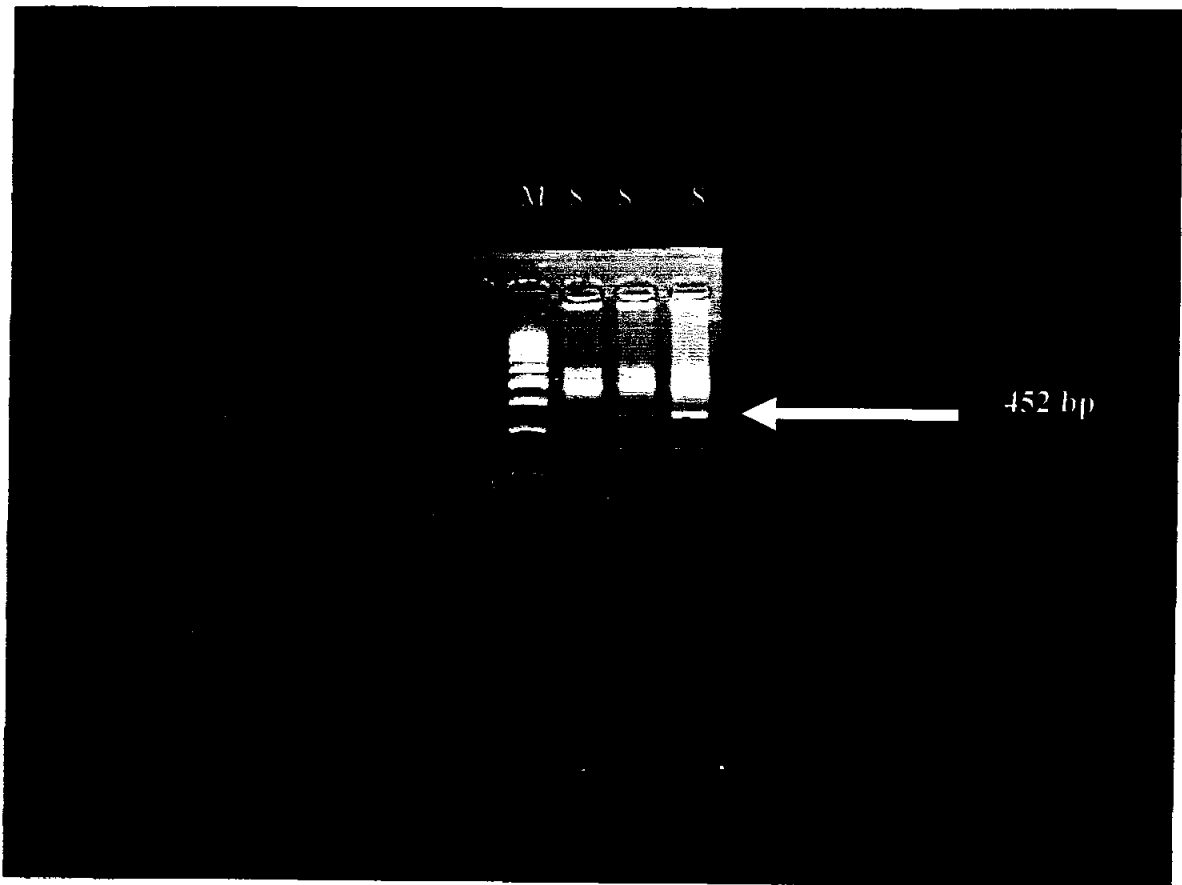
Bila dikaitkan dengan tingkat kejadian dan studi epidemiologi, maka angka kejadian DHF pada Papua sangat jarang terjadi bila dibandingkan dengan di luar Papua dalam hal ini di daerah Jawa dan Madura. Demikian pula pola strain dengue di Papua pernah dilaporkan terdapat strain DEN-4 dimana strain ini sangat jarang terdapat di daerah lain di Indonesia.

Bahkan Coffey *et al* (2009) melaporkan bahwa pada populasi tertentu dan kelompok-kelompok etnis menunjukkan peningkatan kecenderungan untuk berkembang menjadi DBD atau DSS sementara yang lain hanya menjadi DF. Pada tahun 1974 wabah DENV di Tonga, DF ringan adalah dominan. Di Peru, hanya sedikit kasus DBD yang diamati dalam epidemi yang luas. Di tempat lain, kelompok-kelompok etnis lain mengalami DBD / DSS setelah infeksi primer. Di Kuba, pada tahun 1981 rasio DBD / DSS, risiko untuk orang kulit putih: hitam: campuran adalah 5,5: 1: 1,8. Sebuah studi di Haiti tahun 1996 menunjukkan bahwa 85% dari sera anak-anak yang berumur 6-13 tahun yang tinggal di Port-au-prince dinyatakan positif antibodi terhadap DENV akan tetapi tidak ada kasus yang dilaporkan pada anak-anak di kota tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian dan beberapa referensi, maka diduga model mekanisme infeksi dengue sangat terkait dengan fungsi DC. Walaupun fungsi DC sebagai *antigen presenting cell* (APC) adalah penting untuk inisiasi respon imun melawan patogen, akan tetapi beberapa patogen tertentu telah berevolusi untuk mengatasi fungsi DC sehingga mereka dapat bertahan hidup dan menginfeksi host. Salah satu patogen ini adalah *M. Tbc* (Reviglione *et al*, 1995).

DC memperlihatkan *pathogen recognition receptor* (PRRs) termasuk TLR dan *C-type lectins* yang dapat mengenali bentuk molekul dari patogen. Secara khusus, DC

myloid mengungkapkan *C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule-3 nonintegrin* (DC-SIGN) yang dikode oleh gen CD209. DC-SIGN dikendalikan dalam tiga domain: *N-terminal cytoplasmic region*, *neck region* yang mengandung 8 ulangan dari urutan 23-aa, dan *C-terminal C-type lectin domain*. Selain itu, DC-SIGN telah diketahui mampu mengenali berbagai macam patogen, termasuk virus Ebola, *Leishmania amastigotes*, *Aspergillus fumigatus* dan *M. Tbc* (Gomez et al, 2006).



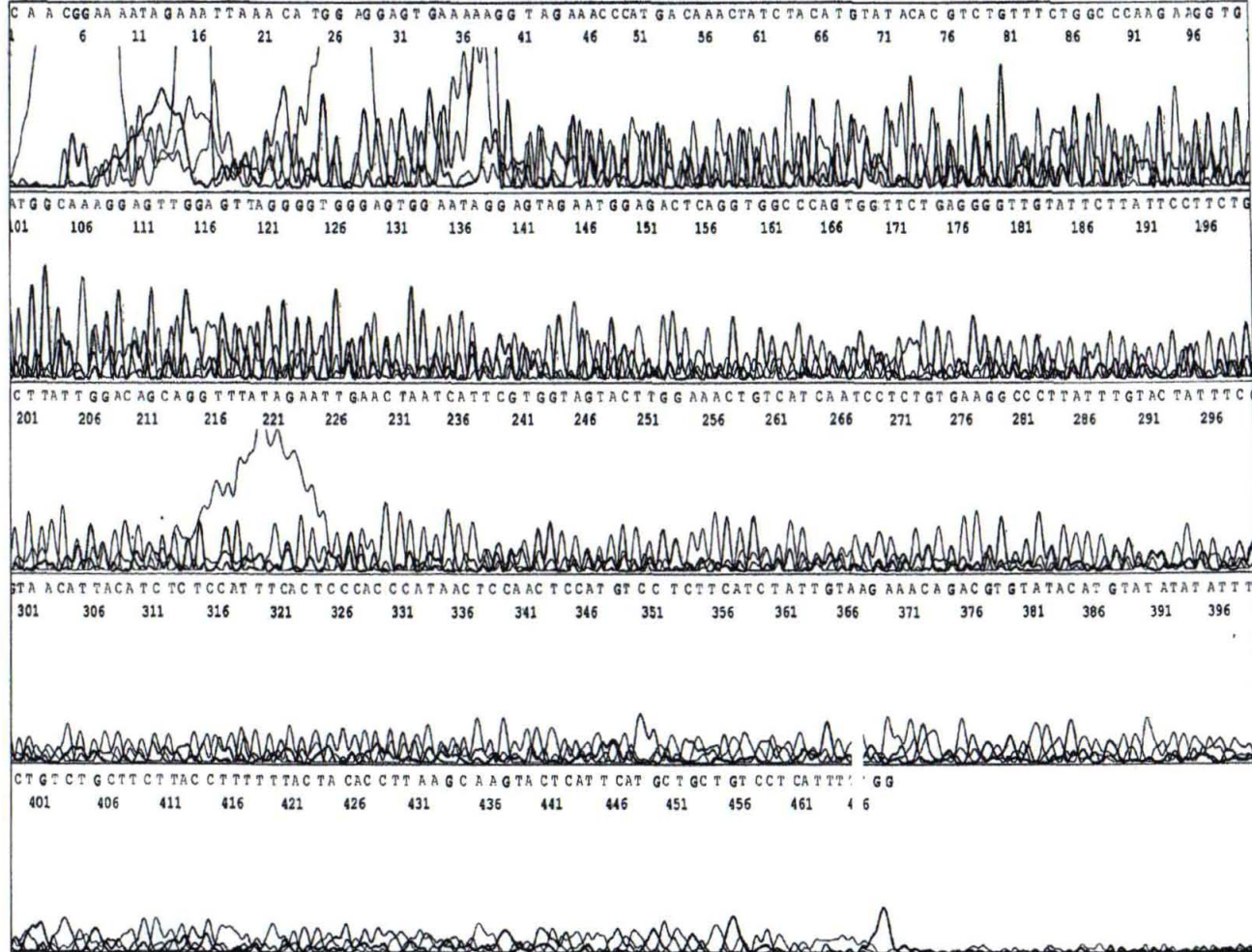
Gambar 5.1. Hasil PCR terhadap gen CD209 sejumlah 452 bp

Untitled3.emf

2009/11/13 17:43:0

Sequence-NC000019-cd209	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-jawa-cd209.336A	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-madura-cd209.336A	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-papua-cd209.336G	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-jawa-cd209.332A	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-madura-cd209.332A	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-papua-cd209.332G	1	caaaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-NC000019-cd209	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-jawa-cd209.336A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-madura-cd209.336A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-papua-cd209.336G	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-jawa-cd209.332A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-madura-cd209.332A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-papua-cd209.332G	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctaccctggcctagtggaggggggtgtaacacag	120
Sequence-NC000019-cd209	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-jawa-cd209.336A	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-madura-cd209.336A	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-papua-cd209.336G	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-jawa-cd209.332A	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-madura-cd209.332A	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-papua-cd209.332G	121	tagctttctcttacaatttatcagatttcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-NC000019-cd209	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-jawa-cd209.336A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-madura-cd209.336A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-papua-cd209.336G	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-jawa-cd209.332A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-madura-cd209.332A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-papua-cd209.332G	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaaccccagaccatccccactgctccctgaaatt	240
Sequence-NC000019-cd209	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-jawa-cd209.336A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-madura-cd209.336A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-papua-cd209.336G	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-jawa-cd209.332A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-madura-cd209.332A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-papua-cd209.332G	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-NC000019-cd209	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-jawa-cd209.336A	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-madura-cd209.336A	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-papua-cd209.336G	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-jawa-cd209.332A	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-madura-cd209.332A	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-papua-cd209.332G	301	tcctaccacaacttctctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-NC000019-cd209	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-jawa-cd209.336A	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-madura-cd209.336A	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-papua-cd209.336G	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-jawa-cd209.332A	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-madura-cd209.332A	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-papua-cd209.332G	361	gagggtgggaaataaaagctgtggcccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-NC000019-cd209	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-jawa-cd209.336A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-madura-cd209.336A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-papua-cd209.336G	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-jawa-cd209.332A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-madura-cd209.332A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-papua-cd209.332G	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451

Gambar 5.2. Hasil *multialignment* sampel ras jawa, ras Madura dan Ras Papua berbasis alel 336 dan alel 332



Gambar 5.3. Hasil sekuenjing gen CD209 sejumlah 452 bp

MIILIK
 PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Terdapat kesamaan profil SNP pada gen CD209 dari ras Jawa dan Ras Madura (alel 332A dan 336A), sedangkan pada ras Papua berbeda (alel 332G dan 336G). Hal ini nampaknya juga terkait dengan tingkat kejadian dan pola strain dengue di Papua berbeda dengan yang terdapat di Jawa dan Madura

6.2. Saran

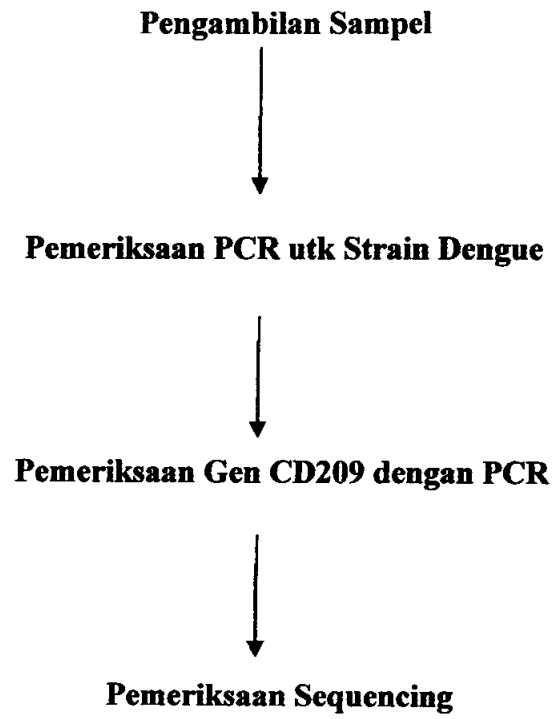
Hasil ini dapat digunakan sebagai dasar kebijakan bahwa penanganan DHF daerah di Papua berbeda prioritas karena secara genetik memiliki tingkat ketahanan lebih baik terhadap infeksi DHF dibandingkan di daerah Jawa dan Madura

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, MMM; AMZ Hussain; K. Nahar; IA. Chowdhury; M. Murshed; Choedhury. 2000. Dengue Bulletin Book. Vol. 24, edition December.
- Aryati; Soetjipto; S.Hariadhi; F.Rantam; S. Soegijanto. 2006. Profil serotipe virus dengue di Indonesia tahun 2003-2005. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia (MKTI)* Maret ; 17 (1) : 72-80.
- Blacksell, SD; MP. Mammen Jr; S. Thongpaseuth; RV. Gibbons; RG. Jarman; K. Jenjaroen; A. Nisalak; R. Phetsouvanh; PN. Newton; NPJ.Day. 2008. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Jan, vol 60, No. 1. : 43-49.
- Coffey, LL; E. Mertens; A.C. Brehin; MD. Fernandez-Garcia; A. Amara; P. Despres.; A. Sakuntabhai. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection* 11. 143-156.
- Cooke GS and A.V. Hill. 2001. Genetics susceptibility to human infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* 2:967-977.
- Geijtenbeek TB; DJ. Krooshoop; DA. Bleijs; SJ. Van Vliet; GC. Duijhoven. 2000. DC-SIGN ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1 : 353-357.
- Geijteebeek TB; R. Torensma; SJ. Van vliet; GC. Duijhoven; GJ. Adema. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100 : 575-585.
- Gordon S. 2002. Patern recognition receptors : doubling up for the innate immune response. *Cell* 111 : 927-930.
- Gubler. D.J. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status, *Novartis Found. Symp.* pp. 3-16
- Hariadhi, S dan S. Soegijanto. 2006. Pola distribusi serotipe virus dengue pada beberapa daerah endemik di Jawa Timur dengan kondisi geografis berbeda. Dalam : *Demam Berdarah Dengue*. Ed. 2. Airlangga University Press.
- Holmes CL, Russel JA, Walley KR. 2003. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. *Chest*; 124: 1103-1115.
- Lanciotti, R.S; D.J. Gubler and D.W. Trent 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of Gen. Virol.* 78, 2279-2286.

- Kashima, S; ES. Rodriguez; R. Azevedo; E. da Crus Castelli; CT. Mendez-Junior; FKN. Yoshioka; IT. Da Silva; OM. Takayanagui; DT. Covas. 2009. DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal. of Gen. Virol.* 90. 927-934.
- Kwiatkowski D. 2000. Susceptibility to infection. *Science, Medicine and Future. Clinical Review. BMJ;* 321: 1061-1065.
- Leitmeyer KC. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 73 (6) : 4738 – 4747.
- Raviglione, MC., DE. Snider., A. Kochi. 1995. A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a world wide epidemic. *JAMA.* 273:220.
- Sakuntabhai A; C. Turbpalboon; I. Casademont; A. Chuansumrit; T. Lowhnoo. 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat. Genet.* 37 : 507-513.
- Schneider, S and S. Higgs. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102. pp. 400–408
- Simmons. C.P; S. Popper; C. Dolocek; T.N. Chau; M. Griffiths; N.T. Dung; T.H. Long; D.M. Hoang; N.V. Chau; T.T. Thao le; T.T. Hien; D.A. Relman; J. Farrar. 2007. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever, *J. Infect. Dis.* 195, pp. 1097–1107.
- Soegeng, S. 2006. Demam Berdarah Dengue. Edisi 2. Airlangga University Press.
- Soegeng, S; Aryati; F. Rantam; Soetjipto; S. Hariadhi. 2006. The Epidemiology of Dengue Virus Infection Could Be More Interesting by Doing Molecular Study Fo Getting The Beneficial of Future Vaccine. *Pediatric Bulletin.*
- Soilleux, E.J; L.S. Morris; G. Leslie; J. Chehimi; Q. Luo; E. Levroney; J. Towdsale; L. Montaner; J.I. Doms; R. Doms., 2002. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulation in situ and in vitro. *J. Leuco. Biol.* 71. 445-457.
- Suharti, C. 2001. Dengue haemorrhagic fever in Indonesia. Thesis. Katholieke Univesiteit Nijmegen Netherlands.
- Suroso, T. 1999. Epidemiological situation of dengue haemorrhagic fever and its control in Indonesia. *Proceeding : International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever.* Surabaya, October 28-29.

- Tailleux L; N. Pham-Thi; A. Begeron-Lafaurie; JL. Hermann; P. Charles. 2005. DC-SIGN induction in alveolar macrophage defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PloS Med.* 2 : e381.
- Tailleux L; O. Schwartz; JL. Herrmann; E. Pivert; M. Jackson. 2003. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exzp. Med.* 197 : 121-127.
- Texereau J, Chiche JD, Taylor W, Choukroun G, Comb B, Mira JP. 2005. The Importance of Toll Like Receptor 2 Polymorphism in Severe Infections. *Clinical Infectious Diseases*;2: 408-415.
- Taleo G; C.Capuano; and T.R.Burkot. 2000. Dengue Control in Vanuatu ; Toward and Integrated Vertical and Horizontal Control Programme. *Dengue Bulletin Book*, vol.24, edition December.
- Vanberg, F; O.Chapman; SJ. Khor; CC. Kosh; K. Floyd; S. Jackson-Sillah; D. Crampin; A. Sichall; L. Bah. 2008. CD209 genetic polymorphisms and tuberculosis disease. *PloS one.* 3. 1388
- Van Kooyk Y; B. Appelmelk; TB. Geijetenbeek. 2003. A fatal attraction : Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends Mol. Med* 9 : 153-159.
- Van Kooyk Y and TB. Geijetenbeek. 2003. DC-SIGN : escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol* 3 : 607-709.
- WHO. 1997. Dengue Haemorrhagic fever, diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd Ed.
- WHO. 2003. WHO annual report on global TB-control-summary. *Weekly Epidemiol. Rec.* 78:122-128.
- WHO. 2000. Pencegahan dan penanggulangan penyakit demam dengue dan demam berdarah dengue. Petunjuk lengkap. Terjemahan oleh Suroso T dkk dari Prevention control of dengue and dengue haemorrhagic fever. World Health Organization dan Departemen Kesehatan.
- Yao H, M. Fang, W.Zhao, F.Duan, L. Lin, C. Chen, H. Guo. 2002. Identification of Genetic variation among dengue virus DEN-3 isolates with heteroduplex analysis. *Dengue Buletin* ; 26 : 118-124.

LAMPIRAN 1. BAGAN ALIR PENELITIAN

LAMPIRAN 2. CONTOH INFORM CONSENT

Data Participant :

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209
DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS
DENGUE PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA
MENDAPATKAN MODEL MEKANISME INFEKSI**

Nama : Aletha Dhya
 Umur : 2 1/2 th
 Alamat : Kebonsari Gg. Kali no 6 Sby.
 PCR Dengue :
 Infeksi Oportunistik :
Status Gizi :
 BB : 13,5 kg
 TB : 98 cm.
 BMI :
Laboratorium :
 DL : 3/80g Hb 11,6 leuc 5000 Hc 48.000 Ptn 34
 BUN (Urea) :
Serum Kreatinin :
 SGOT :
 SGPT :
 UL :
 Foto Thoraks :
 H bs Ag :
 Anti HCV :

LAMPIRAN 3 CONTOH HASIL PEMERIKSAAN PCR DAN STRAIN

TROPICAL DISEASE DIAGNOSTIC CENTER (TDDC)

Laboratorium Canggih untuk Diagnosis yang Berkualitas dan Terpercaya

Ijin Laboratorium Klinik : No. 503.445/8618/045-LAB/436.5.5/VII/2008



Alamat : Lembaga Penyakit Tropis (*Institute of Tropical Disease*) Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya

Tel. (031) 5992445-46 Fax. (031) 5992445

Website: www.itd.unair.ac.id Email: tdrcua@rad.net.id / itd@unair.ac.id

Penanggung Jawab Laboratorium :
Maria Inge Lusida, dr.,M.S.,SpMK,Ph.D

Nama Pasien : ARINI SAUZAN, An.
Alamat :
Dokter Pengirim : Prof.Dr. Soegeng Soegijanto, S
Instansi Asal : RS. Soerya
Jl. Kalijaten 15, Sepanjang, SIDOARJO

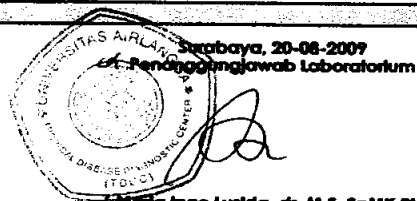
Umur : --- thn / P
Telepon :
No. Order : 0057-000000011
Tanggal : 19-08-2009 / 11:47

JENIS PEMERIKSAAN	HASIL	NILAI NORMAL
DENGUE PCR Dengue Typing	POSITIF (+) Den 2	



Catatan:

000000



Printed by: Helen (20-08-2009/11:51:40)

Hal: 1

[Maria Inge Lusida, dr.,M.S.,SpMK,Ph.D]

• **LAPORAN EKSEKUTIF**

• **ARTIKEL**

**LAPORAN EKSEKUTIF
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(KLASTER & KESEHATAN)**

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209
DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE
PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN
MODEL MEKANISME INFEKSI**

Oleh

Retno Bijanti * and E. Bimo Aksono H *

PERMASALAHAN DAN TUJUAN PENELITIAN. Indonesia dalam peta wabah demam berdarah dengue ada di posisi yang memprihatinkan. Dalam upaya pengendalian wabah demam berdarah dengue, dibandingkan negara lainnya di Asia Tenggara, Indonesia termasuk salah satu negara yang masih mengalami masalah. Timbulnya penyakit DHF ditengarai adanya korelasi antara strain dan genetik. Salah satu tujuan penelitian ini adalah mengungkap mekanisme infeksi virus dengue adalah mempelajari karakter DC-SIGN (*dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin*) yang dikode oleh gen CD209 pada kromosom 19p13.3 (Tailleux *et al*, 2003). Adapun peran DC-SIGN pada DHF dikemukakan oleh Sakuntabhai *et al* (2005) yang menunjukkan bahwa alel 336G pada gen CD209 lebih memberikan sistem pertahanan yang lebih kuat dibandingkan alel 336A demikian juga alel 332G dibandingkan 332A (Kashima *et al*, 2009).

INOVCASI IPTEKS. Hasil sekuensing dan *multialignment* yang dilakukan dengan menggunakan Genetix Mac Ver. 9 terhadap sampel memperlihatkan bahwa pada ras Jawa dan Madura memiliki profil *single nucleotide polymorphism* yang identik yaitu alel 332A dan alel 336A, sedangkan pada ras Papua memiliki profil ANP yang berbeda yaitu alel 332G dan 336G.

Dalam hal hasil penelitian ini, maka alel 336G telah dikaitkan dengan pengurangan ekspresi DC-SIGN di permukaan dan di makrofag, seperti posisi 336 yang terletak dekat dengan daerah transkripsi utama. Hal ini mungkin mempengaruhi pengikatan faktor transkripsi SP1 dan faktor lain yang memodulasi aktivitas

transkripsional. Atas dasar itu, kemampuan individu menyajikan antigen yang membawa alel 336G kemungkinan terganggu, dengan konsekuen perubahan respon kekebalan. Mengenai penyakit menular posisi 336 di daerah promotor gen CD209 telah dipelajari secara ekstensif. Vanberg *et al* (2008) menunjukkan bahwa alel 336G berhubungan dengan perlindungan terhadap tuberkulosis pada populasi di sub-Sahara Afrika. Sebaliknya, varian 336G telah dikaitkan dengan kerentanan terhadap infeksi HIV, DHF dan TB. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat ekspresi tinggi dari DC-SIGN akan mengakibatkan peningkatan kemampuan akan penangkapan dan pengolahan yang lebih baik terhadap antigen (Sakuntabhai *et al*, 2005).

Bila dikaitkan dengan tingkat kejadian dan studi epidemiologi, maka angka kejadian DHF pada Papua sangat jarang terjadi bila dibandingkan dengan di luar Papua dalam hal ini di daerah Jawa dan Madura. Demikian pula pola strain dengue di Papua pernah dilaporkan terdapat strain DEN-4 dimana strain ini sangat jarang terdapat di daerah lain di Indonesia.

KONTRIBUSI TERHADAP PEMBANGUNAN. Hasil ini dapat digunakan sebagai dasar kebijakan bahwa penanganan DHF daerah di Papua berbeda prioritas karena secara genetik memiliki tingkat ketahanan lebih baik terhadap infeksi DHF dibandingkan di daerah Jawa dan Madura. Hasil ini rencananya akan dilaporkan pada Genbank.

MANFAAT BAGI INSTITUSI. Dalam penelitian ini melibatkan mahasiswa program pendidikan dokter spesialis (PPDS) Departemen Pediatri, mahasiswa S2 selain juga Rumah Sakit di Surabaya, Sidoarjo dan Papua.

PUBLIKASI ILMIAH.

1. **E. Bimo Aksono H dan Retno Bijanti. 2009.** Karakterisasi molekuler mutasi gen polimorfisme CD209 dikaitkan dengan kepekaan terhadap infeksi virus dengue pada beberapa ras di Indonesia sebagai upaya mendapatkan model mekanisme infeksi. *Majalah Ilmu Faal Indonesia (in process).*

2. **E. Bimo Aksono H dan Retno Bijanti. 2009.** Pola distribusi strain virus dengue dikaitkan dengan ekspresi gen polimorfismo CD209. *Berkala Hayati (in process)*

**MOLECULAR GENE MUTATIONS CHARACTERIZATION of CD209
POLYMORPHISMS IS ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY TO DENGUE
VIRUS INFECTION IN SOME ETHNICS IN INDONESIA AS A MECHANISM
TO FIND MODEL INFECTIONS**

**KARAKTERISASI MOLEKULER MUTASI GEN POLIMORFISME CD209
DIKAITKAN DENGAN KEPEKAAN TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE
PADA BEBERAPA RAS DI INDONESIA SEBAGAI UPAYA MENDAPATKAN
MODEL MEKANISME INFEKSI**

Retno Bijanti * and E. Bimo Aksono H *

* Department of Veterinary Basic Medical Sciences
Faculty of Veterinary Medicine, University of Airlangga

ABSTRACT

This study aims to map-based genetic 332G and 336G alleles of CD209 gene in some ethnic in Indonesia is associated with susceptibility to dengue virus infection as the cause of DHF.

This study was designed in two phases: the first stage of DHF patients and identification of dengue virus strains by PCR; the second stage of isolation and identification of CD209 gene-based 332G and 336G alleles in the host by PCR and sequencing.

There is a common SNP profiles of the CD209 gene in the Javanese ethnics and Madurese ethnics (332A allele and 336A), whereas in different Papua ethnics (332G and 336G alleles). This also seems related to the incidence rate and pattern of dengue in Papua strains different from those found in Java and Madura. These results can be used as the basis for policies that DHF handling areas in Papua not a priority for genetically better level of resistance to infection in DHF than Java and Madura region.

Key words : Dengue virus, CD209, 332 and 336 alleles, Polymorphisms gene

PENDAHULUAN

Di Indonesia Penyakit *dengue haemorrhagic fever* (DHF) pertama kali ditemukan pada tahun 1968 di Surabaya dan sekarang menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia bahkan angka kejadian sakit infeksi virus dengue meningkat baik kualitas maupun kuantitas (Soegijanto, 2006). Di setiap negara penyakit DHF mempunyai manifestasi klinik yang berbeda. (Aryati dkk, 2006). Indonesia dalam peta wabah demam berdarah dengue ada di posisi yang memprihatinkan. Dalam jumlah angka kesakitan (*morbidity rate*) dan kematian (*mortality rate*) demam berdarah dengue di kawasan Asia Tenggara, selama kurun waktu 1985-2004, Indonesia berada di urutan kedua terbesar setelah Thailand. Selama tahun 1985-2004, di Indonesia tercatat angka penderita demam berdarah dengue terendah 10.362 pada tahun 1989 dan tertinggi 72.133 orang pada tahun 1998, dengan angka kematian terendah 422 orang pada tahun 1999 dan tertinggi 1.527 pada tahun 1988 (Soegijanto, 2006)

Timbulnya penyakit DHF ditengarai adanya korelasi antara strain dan genetik, tetapi akhir-akhir ini ada tendensi agen penyebab DHF di setiap daerah berbeda. Hal ini kemungkinan adanya faktor geografik, selain faktor genetik dari hospesnya. Selain itu berdasarkan macam manifestasi klinik yang timbul dan tatalaksana DHF secara konvensional sudah berubah. Infeksi virus Dengue telah menjadi masalah kesehatan yang serius pada banyak negara tropis dan sub tropis (Hariadhi dan Soegijanto, 2006). Bahkan penelitian terhadap epidemi Dengue di Nicaragua tahun 1998, menyimpulkan bahwa epidemiologi Dengue dapat berbeda tergantung pada daerah geografi dan serotipe virusnya. Untuk menegakkan diagnosa infeksi virus Dengue diperlukan dua kriteria yaitu kriteria klinik dan kriteria laboratorium (WHO, 1997).

Dalam upaya pengendalian wabah demam berdarah dengue, dibandingkan negara lainnya di Asia Tenggara, Indonesia termasuk salah satu negara yang masih mengalami masalah. Indonesia memang sangat jauh tertinggal bila dibandingkan Singapura, yang sejak awal dekade 1980an dapat dikatakan telah berhasil memberantas wabah penyakit demam berdarah dengue (Suroso, 1999). Adapun penanganan secara cepat wabah penyakit demam berdarah dengue di Indonesia setiap tahunnya selalu menjadi masalah

karena pemerintah dinilai oleh masyarakat lamban menanganinya. Pemberantasannya dari tahun ke tahun belum berhasil secara keseluruhan (Suharti, 2001).

Kejadian penyakit DHF semakin tahun semakin meningkat dengan manifestasi klinis yang berbeda mulai dari yang ringan sampai berat. Manifestasi klinis berat yang merupakan keadaan darurat yang dikenal dengan *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) dan *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Manifestasi klinis infeksi virus Dengue termasuk didalamnya Demam Berdarah Dengue sangat bervariasi, mulai dari asimtomatik, demam ringan yang tidak spesifik, Demam Dengue, Demam Berdarah Dengue, hingga yang paling berat yaitu *Dengue Shock Syndrome* (DSS) (Aryati dkk, 2006).

Salah satu upaya mengungkap mekanisme infeksi virus dengue adalah mempelajari karakter DC-SIGN (*dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin*) yang dikode oleh gen CD209 pada kromosom 19p13.3 (Tailleux *et al*, 2003). Ternyata merupakan suatu *C-type lectins* yang berperan terhadap ekspresi subset dari sel dendritik (DC's) dan *alveolar macrophage*. DC-SIGN juga dapat mengikat berbagai macam ligands (Gordon, 2002), ligan endogenous termasuk sel endotel melalui ICAM-2, limfosit-T melalui ICAM-3, neutrofil melalui MAC-1 dan berbagai struktur glikosilasi endogenous termasuk ligands exogenous yang terdapat pada *M. Tbc*, *M. Leprae*, *BCG*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *HIV-1*, *HIV-2*, *SIV-1*, virus dengue, *virus Ebola*, *Cytomegalovirus*, virus Hepatitis C (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).

Pada *M. Tbc*, maka DC-SIGN merupakan reseptor *M. Tbc* yang mempengaruhi subset sel imun demikian juga mempengaruhi dengan menekan peran dari TLR sehingga mempengaruhi keseimbangan Th1/Th2 yang berakibat penurunan respon imun (Geijtenbeek *et al*, 2000; Geijtenbeek *et al* 2003; Van Kooyk and Geijtenbeek 2003).

Adapun peran DC-SIGN pada DHF dikemukakan oleh Sakuntabhai *et al* (2005) yang menunjukkan bahwa alel 336G pada gen CD209 lebih memberikan sistem pertahanan yang lebih kuat dibandingkan alel 336A demikian juga alel 332G dibandingkan 332A (Kashima *et al*, 2009).

Tujuan penelitian ini adalah (a). Mendapatkan karakter urutan nukleotida dari gen CD209 berbasis alel 332G dan 336G; (b). Mendapatkan model mekanisme infeksi virus dengue pada beberapa ras di Indonesia

TINJAUAN PUSTAKA

Virus dengue termasuk dalam genus *Flavivirus*, famili *Flaviviridae*, yang terdiri dari 10.700 basa di dalam genomnya. Virus dengue terdiri dari *single-stranded positive sense RNA (ssRNA sense +)*, dimana di dalam genomnya terdapat sebuah *Single Open Reading Frame (ORF)* yang mengkode 2 macam protein yaitu protein struktural dan protein nonstruktural. Protein struktural terdiri dari C (protein inti/*capsid*), M (protein membran, termasuk *preMembrane*) dan E (*protein envelope*) serta 7 macam protein nonstruktural yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 dimana ditandai oleh sebuah 5' dan 3' *nontranslated regio (NTR)* di kedua ujungnya (Aryati dkk, 2006; Yao, 2002). Protein struktural merupakan 25% dari total protein, sedangkan protein nonstruktural merupakan bagian yang terbesar (75%) terdiri dari NS-1-NS-5. Berdasarkan urutan *sequence heterogeneity*, dikatakan NS-3 maupun NS-5 memiliki *sequence heterogeneity* lebih rendah dibandingkan C-prM dan E (Aryati dkk 2006; Yao, 2002). Kemampuan untuk merangsang pembentukan antibodi di antara protein struktural, urutan imunogenisitas tertinggi adalah protein E, diikuti oleh protein prM dan C, sedangkan pada protein nonstruktural yang paling berperan adalah protein NS1 (Leitmeyer, 1999).

Sepanjang hidupnya, manusia senantiasa terpapar lingkungan bakteri yang dapat menyebabkan kematian. Kemampuan hospes untuk melawan invasi bakteri patogen merupakan respon yang penting untuk mengendalikan infeksi dan mempertahankan kehidupan. Keterlambatan deteksi bakteri patogen akan menimbulkan infeksi yang berat dan menyebabkan kerusakan jaringan, disfungsi organ serta kematian (Texereau *et al*, 2005). Peranan faktor genetik hospes dalam menentukan kerentanan infeksi mulai dibahas pada akhir-akhir ini, karena faktor genetik dapat menjelaskan mengapa seseorang lebih tahan terhadap infeksi dibanding lainnya (Holmes *et al*, 2003).

Dengan selesainya *human genome project* dan berkembangnya teknologi *genotyping* akan membantu mengidentifikasi jalur utama sistem pertahanan tubuh yang menghasilkan strategi baru untuk diagnosis, terapi dan pencegahan penyakit (Kwiatkowski, 2000). Misalnya beberapa penyakit seperti atopi dan autoimun merupakan dampak dari penyakit infeksi dan varian gen imun. Pemahaman faktor-faktor genetik

dapat menentukan kerentanan infeksi yang akhirnya memberikan petunjuk dalam pencegahan yang lebih luas terhadap penyakit yang sama (Holmes *et al*, 2003).

Polimorfisme gen dapat menentukan perbedaan dalam merespon infeksi yang sama, namun ini tergantung juga pada beberapa faktor seperti kesehatan sebelumnya, imunitas yang dimiliki dan variabilitas bakteri patogen. Perubahan monogenik ataupun poligenik diduga berperan dalam respon terhadap adanya infeksi yang masuk kedalam tubuh manusia sehingga membedakan kerentanan individu terhadap infeksi (Holmes *et al*, 2003).

Analisis epidemiologi dari komponen genetik yang menimbulkan infeksi mengungkapkan beberapa kandidat gen yang penting untuk respon inflamasi dan diteliti dalam *case control*, termasuk *tumor necrosis factor (TNF)- α* dan *TNF- β* , *interleukin (IL)-1 receptor antagonist*, interleukin 6, interleukin 10, CD-14, TLR-4, TLR-2 (Holmes *et al*, 2003) termasuk CD209 (Cooke and Hill, 2001; Sakuntabhai *et al*, 2005).

Virus dengue (DENV) merupakan suatu *emerging mosquito-borne arbovirus* yang dapat menginfeksi sekitar 50-100 juta orang per tahun. DENV telah dilaporkan menginfeksi lebih dari; 100 negara dan dapat berpotensi untuk menginfeksi daerah-daerah baru akibat adanya perubahan ekologi nyamuk, perubahan demografi manusia termasuk ekspansi ke perkotaan, perkembangan vektor, dinamika perdagangan dan pertumbuhan penduduk. Diperkirakan 2,5 miliar orang tinggal di daerah beresiko untuk infeksi DENV (Gubler, 2006). DENV (keluarga *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) merupakan jenis virus yang memiliki *icosahedral-enveloped* yang mengandung *single-stranded positive sense RNA genome*. DENV diklasifikasikan menjadi 4 serotipe (DENV-1-4) biasanya memiliki filogenetik berbeda dan sesuai dengan daerah geografisnya.. Orang yang terinfeksi DENV akan berkembang menjadi viremia dalam waktu kurang lebih enam hari setelah demam. Pembersihan DENV dalam sirkulasi diperantarai oleh perkembangan antibodi penetralisir yang memiliki respon yang kuat terhadap serotipe penyebab infeksi serta produksi sel T spesifik terhadap DENV yang memicu penghapusan sel yang terinfeksi. Meskipun secara umum DENV mengakibatkan infeksi akan tetapi biasanya tidak menunjukkan gejala atau hanya demam ringan. Terdapat dari sekitar 200.000-500.000 kasus DENV dimana sekitar 20.000-25.000 kasus menyebabkan kematian tiap tahun.

Faktor-faktor yang berkontribusi terhadap perbedaan pada manifestasi dari penyakit DENV tidak sepenuhnya dipahami. Meskipun demikian, seperti dalam kebanyakan multifaktor proses biologis, maka penyakit DENV ditentukan oleh sejumlah interaksi antara virus, imunologi, dan faktor-faktor genetik manusia. Selain itu, banyak bukti menunjukkan bahwa protein dalam air liur vektor juga dapat memiliki efek immunomodulator terhadap infeksi arbovirus vertebrata (Schneider and Higgs, 2008). Pada manusia, tingkat kepekaan terhadap penyakit DENV dipengaruhi oleh faktor-faktor dalam darah perifer, termasuk besarnya dan lamanya replikasi virus, ekspresi sitokin, dan sel kekebalan aktivasi dan proliferasi (Simmons *et al*, 2007; Coffey *et al*, 2006).

Gen CD209 terletak pada kromosom 19p13.2-3 dan sangat polimorfisme. Sejumlah nukleotida polimorfisme tunggal (SNPs) telah dilaporkan. Salah satu SNPs ini adalah Guanin (G) berubah menjadi Adenin (A) pada posisi -336 di dalam gen promotor CD209. Daerah ini diprediksi akan mempengaruhi beberapa faktor transkripsi pengikatan untuk Sp1/GATA/CACC, dan *CAC-binding transcription factors*. DC-SIGN -336 SNP telah dikaitkan dengan adanya peningkatan resiko penularan terhadap infeksi HIV-1 dan tingkat keparahan penyakit dengue. Polimorfisme genetik lain juga dapat mempengaruhi sejumlah ulangan di daerah leher dari DC-SIGN. Mengingat adanya relevansi fungsional DC-SIGN di *M.tbc* mengikat DC, maka ada dugaan bahwa gen polimorfisme promotor di dalam kawasan dan di leher domain bisa menjadi faktor risiko untuk mengembangkan tuberkulosis dan tingkat keparahan penyakit DBD (Sakuntabhai *et al*, 2005).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan *cross sectional study*. 20 sampel darah diambil dari penderita yang diduga DHF dari beberapa ras di rumah sakit di Sidoarjo, Surabaya dan Papua. Sampel darah yang telah diambil ditempatkan dalam 2 (dua) tabung pemusing steril tanpa antikoagulan, kemudian 1 (satu) tabung dilakukan pemusingan untuk mendapatkan serumnya. Serum yang telah dipisah, dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80 °C sampai saat pemeriksaan PCR untuk identifikasi strain. Adapun 1 (satu) tabung lain disiapkan untuk identifikasi gen 209 berbasis alel 332G dan 336G.

Penelitian dilaksanakan mulai bulan April 2009 sampai dengan Nopember 2009, dengan mengambil sampel penderita prioritas dari beberapa ras yang terdapat di beberapa rumah sakit di Sidoarjo, Surabaya dan Papua. Untuk identifikasi dengue termasuk strain serta identifikasi gen CD209 berbasis alel 332G dan 336G dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis (*Institute of Tropical Disease*) Universitas Airlangga. Kampus C Unair. Jl. Mulyorejo Surabaya-Jawa Timur

Pemeriksaan RNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Strain. Sampel darah yang telah diambil ditempatkan dalam tabung pemusing steril tanpa antikoagulan, kemudian dilakukan pemusingan untuk mendapatkan serumnya. Serum yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap infeksi virus dengue dan strain dengan PCR.

Pemeriksaan DNA Dengue dengan PCR untuk Identifikasi Gen CD209. Tabung EDTA yang mengandung sampel darah diambil *buffy coat* yaitu dengan cara sentrifus 900 g selama 10 menit pada suhu 4°. Lapisan tipis putih diambil dipisahkan dari sel darah merah dan ditempatkan pada tabung tersendiri untuk PCR. Pada saat PCR dilaksanakan dengan primer yang spesifik yaitu : 5-CAAAAATGAGGACAGCAGCA-3 (Sense) dan 5-CTCCAAGGAACCAAGACTGC-3 (Antisense). Untuk jalannya PCR dirancang sebagai berikut : 95°C selama 15 menit, 94°C selama 20 detik; 65°C selama 30 detik, 72 °C selama 30 detik, diulang selama 40 siklus dan pada akhir ditambah 72 °C selama 3 menit. Hasil PCR berupa amplifikasi DNA dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agarosa 2% dalam larutan TBE 0,5X yang mengandung ethidium bromide, DNA dari sampel, kontrol positif serta marker (Hae III digest) yang sudah diseparasi dapat dilihat dibawah sinar ultraviolet.

Pemurnian , PCR pro-sekuensing, sekuensing dan analisis hasil.. Setelah hasil PCR diperoleh kemudian dilakukan purifikasi dan selanjutnya dilakukan pengecekan purifikasi hasil cDNA dengan elektroforesis, setelah itu dilakukan PCR pro Sequencing menggunakan salah satu primer yang dipakai dalam PCR sebelumnya dalam hal ini menggunakan primer sense. Selanjutnya dilakukan purifikasi hasil PCR pro sequencing. Hasil pemurnian cDNA dengan menggunakan *Low Melting Agarose* dan pelabelan cDNA dengan menggunakan primer *sense*, dilanjutkan PCR dan sekuensing untuk mendapatkan susunan nukleotida Analisis sekuens nukelotida dengan metode direct sequencing yang menggunakan mesin ABI Prism 310 sequencer DNA dari Applied

Biosystems, Inc. Analisis molekuler lebih lanjut sekuens nukelotida dari gen CD209 serum sampel penderita DHF diolah dengan program GENETIX MAC versi 9. Untuk mengetahui perubahan atau mutasi dari alel 332G dan 336G gen CD209 sejumlah 452 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Penderita dan Identifikasi Strain Berbasis PCR

Semua sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 20, dimana sampel ini berasal dari beberapa rumah sakit di Sidoarjo (10 sampel), Surabaya (5 sampel) dan Papua (5 sampel), sehingga mewakili ras Jawa, Madura dan Papua. Sampel yang digunakan dinyatakan *suspect* terhadap demam berdarah dengue (DHF) berdasarkan gejala klinis

Tabel 1. Data sampel yang digunakan dalam penelitian

No.	Umur	Ras	Jenis Kelamin	PCR RNA Dengue
1	19 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
2	9 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
3	10 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
4	8 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
5	7 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
6	3 thn	Jawa	Laki-Laki	Negatif
7	20 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
8	19 thn	Jawa	Perempuan	Positif (Den-2)
9	2 thn	Jawa	Perempuan	Negatif
10	5 thn	Madura	Laki-Laki	Negatif
11	9 thn	Madura	Perempuan	Positif (Den-2)
12	5 thn	Madura	Prempuan	Negatif
13	2 thn	Madura	Laki-laki	Negatif
14	20 thn	Madura	Perempuan	Positif (Den-2)
15	6 thn	Madura	Perempuan	Negatif
16	15 thn	Papua	Laki-laki	Negatif
17	9 thn	Papua	Perempuan	Negatif
18	10 thn	Papua	Perempuan	Negatif
19	17 thn	Papua	Laki-laki	Negatif
20	12 thn	Papua	Laki-laki	Negatif

Dari hasil PCR pada tabel 1, terlihat bahwa dari 20 sampel semua sampel ras Papua ternyata negatif terhadap DHF (0%), ras jawa (3/5 atau 15%) sedangkan ras

Madura (2/20 atau 10%). Dari 5 sampel yang positif ternyata semua menunjukkan hasil DEN strain 2. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Soegijanto dkk (2006) bahwa strain DEN yang terbanyak di daerah Jawa Timur adalah DEN-2 (Tabel.1). Walaupun demikian di Indonesia secara umum juga ditemukan strain DEN-1 (Aryati dan Soegijanto, 2006), DEN-3 (Aryati dan Soegijanto, 2006) dan DEN-4 (Lanciotti *et al*, 1997)

Hasil PCR dan Analisis Gen CD209

Dari hasil PCR terhadap sampel berbasis pada CD209 diperoleh urutan nukleotida sejumlah 452 bp. Hal ini sesuai dengan rancangan primer yang digunakan berdasarkan Kashima *et al* (2009). Dimana daerah yang diamati merupakan daerah pada kromosom 19 (ICAM-3) yang memiliki berbagai fungsi berkaitan kemampuan untuk mengenali berbagai patogen termasuk virus Dengue (Sakuntabhai *et al*, 2005) karena memperlihatkan *pathogen recognition receptor* (PRRs) termasuk TLR dan *C-type lectins* yang dapat mengenali bentuk molekul dari patogen (Gomez *et al*, 2006). Bahkan Kashima *et al* (2009) melaporkan bahwa gen CD209 promotor pada posisi 336, 332, 201 dan 139 dari empat etnis yang berbeda di Brasil yaitu Kaukasian, Afro-Brasil, Asia dan Amerindian ternyata sangat terkait dengan mutasi pada SNP yaitu menjadi lebih perka terhadap infeksi bahkan cenderung menjadi parah.

Hasil sekuensing dan *multialignment* yang dilakukan dengan menggunakan Genetix Mac Ver. 9 terhadap sampel memperlihatkan bahwa pada ras Jawa dan Madura memiliki profil *single nucleotide polymorphism* yang identik yaitu alel 332A dan alel 336A (lihat gambar 2), sedangkan pada ras papua memiliki profil ANP yang berbeda yaitu alel 332G dan 336G.

Dalam hal hasil penelitian ini, kemungkinan model infeksi virus dengue sangat terkait dengan mutasi pada alel 336G, yaitu akibat mutasi menjadi 336A maka akan diikuti dengan pengurangan ekspresi DC-SIGN di permukaan dan di makrofag, seperti posisi 336 yang terletak dekat dengan daerah transkripsi utama. Hal ini mungkin mempengaruhi pengikatan faktor transkripsi SP1 dan faktor lain yang memodulasi aktivitas transkripsional. Atas dasar itu, kemampuan individu menyajikan antigen yang membawa alel 336G kemungkinan terganggu, dengan konsekuen perubahan respon

kekebalan. Mengenai penyakit menular posisi 336 di daerah promotor gen CD209 telah dipelajari secara ekstensif. Vanberg *et al* (2008) menunjukkan bahwa alel 336G berhubungan dengan perlindungan terhadap tuberkulosis pada populasi di sub-Sahara Afrika. Sebaliknya, varian 336G telah dikaitkan dengan kerentanan terhadap infeksi HIV, DHF dan TB. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat ekspresi tinggi dari DC-SIGN akan mengakibatkan peningkatan kemampuan akan penangkapan dan pengolahan yang lebih baik terhadap antigen (Sakuntabhai *et al*, 2005).

Bila dikaitkan dengan tingkat kejadian dan studi epidemiologi, maka angka kejadian DHF pada Papua sangat jarang terjadi bila dibandingkan dengan di luar Papua dalam hal ini di daerah Jawa dan Madura. Demikian pula pola strain dengue di Papua pernah dilaporkan terdapat strain DEN-4 dimana strain ini sangat jarang terdapat di daerah lain di Indonesia.

Bahkan Coffey *et al* (2009) melaporkan bahwa pada populasi tertentu dan kelompok-kelompok etnis menunjukkan peningkatan kecenderungan untuk berkembang menjadi DBD atau DSS sementara yang lain hanya menjadi DF. Pada tahun 1974 wabah DENV di Tonga, DF ringan adalah dominan. Di Peru, hanya sedikit kasus DBD yang diamati dalam epidemi yang luas. Di tempat lain, kelompok-kelompok etnis lain mengalami DBD / DSS setelah infeksi primer. Di Kuba, pada tahun 1981 rasio DBD / DSS, risiko untuk orang kulit putih: hitam: campuran adalah 5,5: 1: 1,8. Sebuah studi di Haiti tahun 1996 menunjukkan bahwa 85% dari sera anak-anak yang berumur 6-13 tahun yang tinggal di Port-au-prince dinyatakan positif antibodi terhadap DENV akan tetapi tidak ada kasus yang dilaporkan pada anak-anak di kota tersebut.

Mekanisme kekebalan alami seperti makrofag, sel-sel dendritik, *natural killer cell*, dan neutrofil mungkin memiliki peran penting dalam respon primer untuk *Mycobacterium tuberculosis* termasuk infeksi DHF. Walaupun fungsi DC sebagai *antigen presenting cell* (APC) adalah penting untuk inisiasi respon imun melawan patogen, akan tetapi beberapa patogen tertentu telah berevolusi untuk mengatasi fungsi DC sehingga mereka dapat bertahan hidup dan menginfeksi host. Salah satu patogen ini adalah *M. Tbc* (Reviglione *et al*, 1995).

DC memperlihatkan *pathogen recognition receptor* (PRRs) termasuk TLR dan *C-type lectins* yang dapat mengenali bentuk molekul dari patogen. Secara khusus, DC

myloid mengungkapkan *C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule-3 nonintegrin* (DC-SIGN) yang dikode oleh gen CD209. DC-SIGN dikendalikan dalam tiga domain: *N-terminal cytoplasmic region*, *neck region* yang mengandung 8 ulangan dari urutan 23-aa, dan *C-terminal C-type lectin domain*. Selain itu, DC-SIGN telah diketahui mampu mengenali berbagai macam patogen, termasuk virus Ebola, *Leishmania amastigotes*, *Aspergillus fumigatus* dan *M. Tbc* (Gomez *et al*, 2006).



Gambar 1. Hasil PCR terhadap gen CD209 sejumlah 452 bp

Untitled3.emf

2009/11/13 17:43:0

Sequence-NC000019-cd209	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-jawa-cd209.336A	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-madura-cd209.336A	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-papua-cd209.336G	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-jawa-cd209.332A	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-madura-cd209.332A	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-papua-cd209.332G	1	caaaaatgaggacagcagcagctcaaaagcaggaaaagccaggaggtcacaggggacagtgc	60
Sequence-NC000019-cd209	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-jawa-cd209.336A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-madura-cd209.336A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-papua-cd209.336G	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-jawa-cd209.332A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-madura-cd209.332A	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-papua-cd209.332G	61	ttccaggaactgggggtgctacctgcctacccttgccctagtggagggggtgaacacag	120
Sequence-NC000019-cd209	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-jawa-cd209.336A	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-madura-cd209.336A	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-papua-cd209.336G	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-jawa-cd209.332A	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-madura-cd209.332A	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-papua-cd209.332G	121	tagctttctcttacaatttatcagatattcattaaaagcatcccactgctcagccatccat	180
Sequence-NC000019-cd209	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-jawa-cd209.336A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-madura-cd209.336A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-papua-cd209.336G	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-jawa-cd209.332A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-madura-cd209.332A	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-papua-cd209.332G	181	gagtggatgagtccttctccctgtcaacccagacacatccccactgcctcctgaaatt	240
Sequence-NC000019-cd209	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-jawa-cd209.336A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-madura-cd209.336A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-papua-cd209.336G	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-jawa-cd209.332A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-madura-cd209.332A	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-papua-cd209.332G	241	cttgaagaatccggcccatctcatgctctgatgctttccactagtcttttggatgacaga	300
Sequence-NC000019-cd209	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-jawa-cd209.336A	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-madura-cd209.336A	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-papua-cd209.336G	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-jawa-cd209.332A	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-madura-cd209.332A	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-papua-cd209.332G	301	tcctaccacaacttctgtttctctttctgtgggagactagatttaggaagtaaagatca	360
Sequence-NC000019-cd209	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-jawa-cd209.336A	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-madura-cd209.336A	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-papua-cd209.336G	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-jawa-cd209.332A	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-madura-cd209.332A	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-papua-cd209.332G	361	caggggtgggaaataaaaagctgtggccccaggagttctggacactgggggagagtggggt	420
Sequence-NC000019-cd209	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-jawa-cd209.336A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-madura-cd209.336A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-papua-cd209.336G	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-jawa-cd209.332A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-madura-cd209.332A	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451
Sequence-papua-cd209.332G	421	gacatgagtgactccaaggaaccaagactgc	451

Gambar 2. Hasil *multialignment* sampel ras jawa, ras Madura dan Ras Papua berbasis alel 336 dan alel 332

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Terdapat kesamaan profil SNP pada gen CD209 dari ras Jawa dan Ras Madura (alel 332A dan 336A), sedangkan pada ras Papua berbeda (alel 332G dan 336G). Hal ini nampaknya juga terkait dengan tingkat kejadian dan pola strain dengue di Papua berbeda dengan yang terdapat di Jawa dan Madura

Saran

Hasil ini dapat digunakan sebagai dasar kebijakan bahwa penanganan DHF daerah di Papua berbeda prioritas karena secara genetik memiliki tingkat ketahanan lebih baik terhadap infeksi DHF dibandingkan di daerah Jawa dan Madura

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai pemerintah Republik Indonesia melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch I (Klaster Gizi & Kesehatan) Tahun Anggaran 2009. Untuk itu ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Ditjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional, Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Ketua Lemabag Penyakit Tropis Universitas Airlangga atas kesempatan dan perkenannya sehingga penelitian kami dapat berlangsung dengan lancar

DAFTAR PUSTAKA

- Aryati; Soetjipto; S.Hariadhi; F.Rantam; S. Soegijanto. 2006. Profil serotipe virus dengue di Indonesia tahun 2003-2005. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia (MKTI)* Maret ; 17 (1) : 72-80.
- Coffey, LL; E. Mertens; A.C. Brehin; MD. Fernandez-Garcia; A. Amara; P. Despres; A. Sakuntabhai.. 2009. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection* 11. 143-156.
- Cooke GS and A.V. Hill. 2001. Genetics susceptibility to human infectious disease. *Nat. Rev. Genet.* 2:967-977.
- Geijtenbeek TB; DJ. Krooshoop; DA. Bleijs; SJ. Van Vliet; GC. Duijhoven. 2000. DC-SIGN ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1 : 353-357.
- Geijteebeek TB; R. Torensma; SJ. Van vliet; GC. Duijhoven; GJ. Adema. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100 : 575-585.
- Gordon S. 2002. Patern recognition receptors : doubling up for the innate immune response. *Cell* 111 : 927-930.
- Gubler. D.J. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status, *Novartis Found. Symp.* pp. 3-16
- Hariadhi, S dan S. Soegijanto. 2006. Pola distribusi serotipe virus dengue pada beberapa daerah endemik di Jawa Timur dengan kondisi geografis berbeda. Dalam : *Demam Berdarah Dengue*. Ed. 2. Airlangga University Press.
- Holmes CL; JA. Russel; KR. Walley. 2003. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock. *Chest*; 124: 1103-1115.
- Lanciotti, R.S; D.J. Gubler and D.W. Trent. 1997. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of Gen. Virol.* 78, 2279-2286.
- Kashima, S; ES. Rodriguez; R. Azevedo; E. da Crus Castelli; CT. Mendez-Junior; FKN. Yoshioka; IT. Da Silva; OM. Takayanagui; DT. Covas. 2009. DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in Brazilian population and their association with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal. of Gen. Virol.* 90. 927-934.
- Kwiatkowski D. 2000. Susceptibility to infection. *Science, Medicine and Future. Clinical Review. BMJ*; 321: 1061-1065.

- Leitmeyer KC, 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, 73 (6) : 4738 – 4747.
- Raviglione, MC; DE. Snider; A. Kochi. 1995. A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a world wide epidemic. *JAMA*. 273:220.
- Sakuntabhai A; C. Turbpalboon; I. Casademont; A. Chuansumrit; T. Lowhnoo. 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat. Genet.* 37 : 507-513.
- Schneider, S and S. Higgs. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102. pp. 400–408
- Simmons. C.P; S. Popper; C. Dolocek; T.N. Chau; M. Griffiths; N.T. Dung;;T.H. Long; D.M. Hoang; N.V. Chau; T.T. Thao le; T.T. Hien; D.A. Relman; J. Farrar. 2007. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever, *J. Infect. Dis.* 195, pp. 1097–1107.
- Soengeng, S. 2006. Demam Berdarah Dengue. Edisi 2. Airlangga University Press.
- Soengeng, S; Aryati; F. Rantam; Soetjipto; S. Hariadhi. 2006. The Epidemiology of Dengue Virus Infection Could Be More Interesting by Doing Molecular Study Fo Getting The Beneficial of Future Vaccine. *Pediatric Bulletin*.
- Suharti, C. 2001. Dengue haemorrhagic fever in Indonesia. Thesis. Katholieke Univesiteit Nijmegen Netherlands.
- Suroso, T. 1999. Epidemiological situation of dengue haemorrhagic fever and its control in Indonesia. Proceeding : International Seminar on Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever. Surabaya, October 28-29.
- Tailleux L; O. Schwartz; JL. Herrmann; E. Pivert; M. Jackson. 2003. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exzp. Med.* 197 : 121-127.
- Texereau, J; JD. Chiche; W. Taylor; G. Choukroun; B. Comb; JP. Mira. 2005. TheImportance of Toll Like Receptor 2 Polymorphism in severe infections. *Clinical Infectious Diseases*;2: 408-415.
- Vanberg, F; O.Chapman; SJ. Khor; CC. Kosh; K. Floyd; S. Jackson-Sillah; D. Crampin; A. Sichall; L. Bah. 2008. CD209 genetic polymorphisms and tuberculosis disease. *PloS one.* 3. 1388

- Van Kooyk Y and TB. Geijetenbeek. 2003. DC-SIGN : escape mechanism for pathogens. Nat. Rev. Immunol 3 : 607-709.
- WHO. 1997. Dengue Haemorrhagic fever, diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd Ed.
- Yao H; M. Fang; W.Zhao; F.Duan; L. Lin; C. Chen; H. Guo. 2002. Identification of genetic variation among dengue virus DEN-3 isolates with heteroduplex analysis. Dengue Buletin ; 26 : 118-124.