

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Tinjauan Singkat Penyakit Lepra****2.1.1 Definisi**

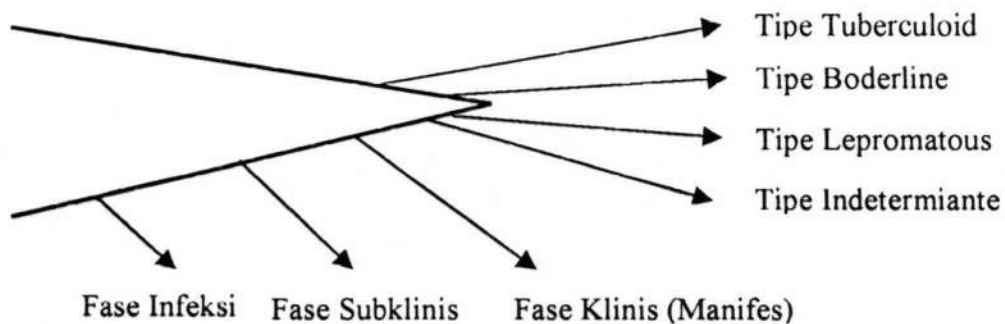
Penyakit Lepra (Morbus Hansen, Lepra) adalah suatu penyakit infeksi menahun yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium Leprae* yang primer menyerang saraf tepi dan sekunder menyerang kulit serta organ tubuh lainnya (Jopling, 1971). Penyakit ini dapat mengakibatkan kecacatan tubuh serta menimbulkan masalah psikososial akibat adanya *stigma* (cap buruk) dari penyakit ini di masyarakat.

2.1.2 Perjalanan Klinik Penyakit Lepra

Sebagian besar penduduk yang tinggal di daerah endemik lepra pernah terinfeksi kuman *M Leprae* namun karena adanya kekebalan alamiah hanya sekitar 15% dari mereka yang mungkin akan menjadi sakit. Pada mereka yang kekebalan alamiah tidak berhasil membunuh kuman yang masuk, terjadilah perkembangbiakan kuman di dalam sel tubuh tertentu, terutama pada sel Schwann di perineurium. Proses ini berjalan sangat lamban sebelum gejala klinik yang pertama timbul. Kini telah diketahui adanya beberapa kelainan laboratorik dalam masa inkubasi, antara lain test LTT (*Lymphocyte Transformation Test*) pada limfosit dan peningkatan kadar antibodi spesifik. Keadaan ini disebut infeksi klinik. Setelah melewati masa inkubasi yang cukup lama (sekitar 2-5 tahun) akan muncul gejala awal yang masih belum

jelas dan sulit dipastikan. Fase ini disebut fase atau tipe indeterminat (*indeterminate phase*), pada fase ini telah ada kelainan kulit berupa bercak dengan sedikit gangguan sensasi dan gangguan produksi keringat (Hastings, 1994).

Fase manifes penyakit lepra akan terjadi beberapa tahun setelah fase indeterminate, yang ditandai dengan munculnya gejala klinis yang khas. Bentuk gejala klinis ini bervariasi dan tergantung pada tipe penyakit. Bila tidak diberikan pengobatan maka penyakit ini akan menjadi parah dan akan mengakibatkan banyak kecacatan tubuh. Penderita biasanya meninggal bukan karena penyakit lepranya, tetapi disebabkan oleh penyakit yang timbul sekunder setelah lepra (Hastings, 1994 ; Noorden, 1994)



Gambar 2.1 Skema perjalanan klinis penyakit Lepra (Ridley, 1988)

2.1.3 Klasifikasi penyakit lepra

Pada penyakit Lepra yang telah manifest, jenis kelainan klinis dibagi sesuai dengan klasifikasi menurut cara Ridley & Jopling, yang umum dipakai di dunia medis atas rekomendasi WHO (1996).

Klasifikasi tersebut adalah :

- Tipe TT (Polar Tuberculoid) : bentuk ringan
- Tipe BT (Borderline Tuberculoid) }
 Tipe BB (Boderline) } : bentuk peralihan
 Tipe BL (Borderline Lepromatous) }
- Tipe LL (Polar Lepromatous) : bentuk berat

Menurut klasifikasi diatas, maka terdapat dua kutub yang dianggap stabil dalam imunitasnya, yaitu tipe TT (Polar Tuberculoid) dimana imunitas selulernya sangat baik, dan tipe LL (Polar Lepromatous) yang imunitas selulernya sangat jelek. Di antara kedua kutub ini terdapat spektrum penyakit Lepra yang imunitasnya tidak stabil, sehingga dapat berubah-ubah ke arah perbaikan ataupun penurunan. Perubahan imunitas ini bila terjadi secara mendadak dapat menimbulkan episode "reaksi Lepra" yang selalu menjadi penyulit dalam pengobatan Lepra (Agusni, 1996).

2.1.4 Immunopatologi Penyakit Lepra

Beberapa pakar menganggap bahwa penyakit Lepra adalah penyakit dengan defek imunologis yang ditimbulkan oleh *M Leprae* (Gill and Godal, 1986). Namun belum didapatkan kejelasan pada tahap mana dalam respons imun seluler, defek ini terjadi serta sejauh mana peranan kuman dalam interaksi dengan tubuh yang mungkin menyebabkan defek tersebut (Goodman, 1991; Hasting, 1994; Choudhuri, 1995).

a. Respons Imun pada Penyakit Lepra

Karena defek imunologik pada lepra bersifat spesifik, hal ini menunjukkan bahwa gangguan yang terjadi adalah pada tingkat adaptive / *acquired immunity* dan bukan pada tingkat *innate immunity*.

a) ***Innate Immunity*** pada penyakit lepra

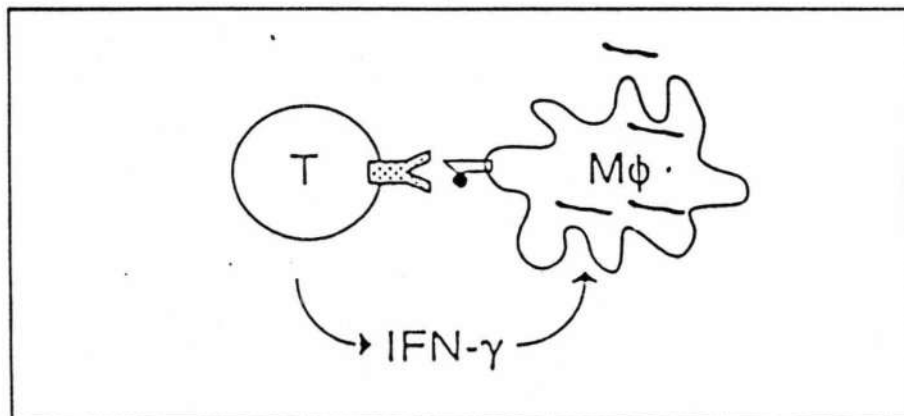
Kuman *M Leprae* yang masuk dalam tubuh dan berhasil melewati sistem pertahanan lapis pertama akan di fagosit, kemudian ikut bersama monosit dalam aliran darah. Selama di dalam monosit, kuman tersebut tidak terbunuh dan bahkan bisa berkembang biak. Keadaan ini disebut *Trojan horse phenomenon*, yaitu kuman ikut menumpang dan berkembang dalam salah satu sel tubuh tanpa dideteksi oleh sistem imunitas yang ada. Suatu saat monosit tersebut akan mati dan pecah, kuman menyebar dan akan mencapai sel Schwann di perineurium saraf tepi yang merupakan predileksi untuk hidupnya *M Leprae*. Sel ini adalah suatu *non profesional phagocyte* dan tidak mengekspresikan molekul MHC kelas II dipermukaannya, kecuali bila sudah diaktifkan oleh IFN gamma (Steinmann dan Young, 1991). Dengan tidak adanya MHC kelas II ini maka sel Schwann yang terinfeksi tidak bisa berkomunikasi dengan limfosit T, dengan akibat kuman di dalam sel Schwann tidak bisa terdeteksi oleh sistem imun. Karena *M. Leprae* sendiri tahan terhadap lisosim (sebab terbungkus lilin / wax) maka kuman tersebut bisa berkembang biak di dalam sel Schwann (Kaplan dan Cohn, 1986). Selanjutnya bila sel Schwann tersebut mati, *M Leprae* akan keluar sewaktu sel pecah dan ditangkap kembali oleh fagosit lainnya, termasuk juga sel Schwann. Respons imun seluler akan bekerja bila kuman ditangkap oleh fagosit yang profesional / aktif khususnya sel makrofag. Setelah melewati

fase pencernaan dan penyajian oleh molekul MHC kelas II selanjutnya limfosit Th CD4⁺ akan mengenal dan dimulailah rangkaian proses respons imun seluler.

b) *Adaptive Immunity* pada Penyakit Lepra

Setelah kuman yang masuk dikenal oleh sistem imun tubuh, maka proses imunitas yang spesifik mulai bekerja. Karena sifat *M Leprae* adalah obligat intra-seluler. Pada individu yang sehat rangkaian respon imun seluler akan segera berlangsung dengan hasil akhir penghancuran *M Leprae* di dalam makrofag, baik lewat penghancuran di dalam makrofag maupun penghancuran sel target oleh sel T- cytotoxic (Tc) (Rawlinson, 1988).

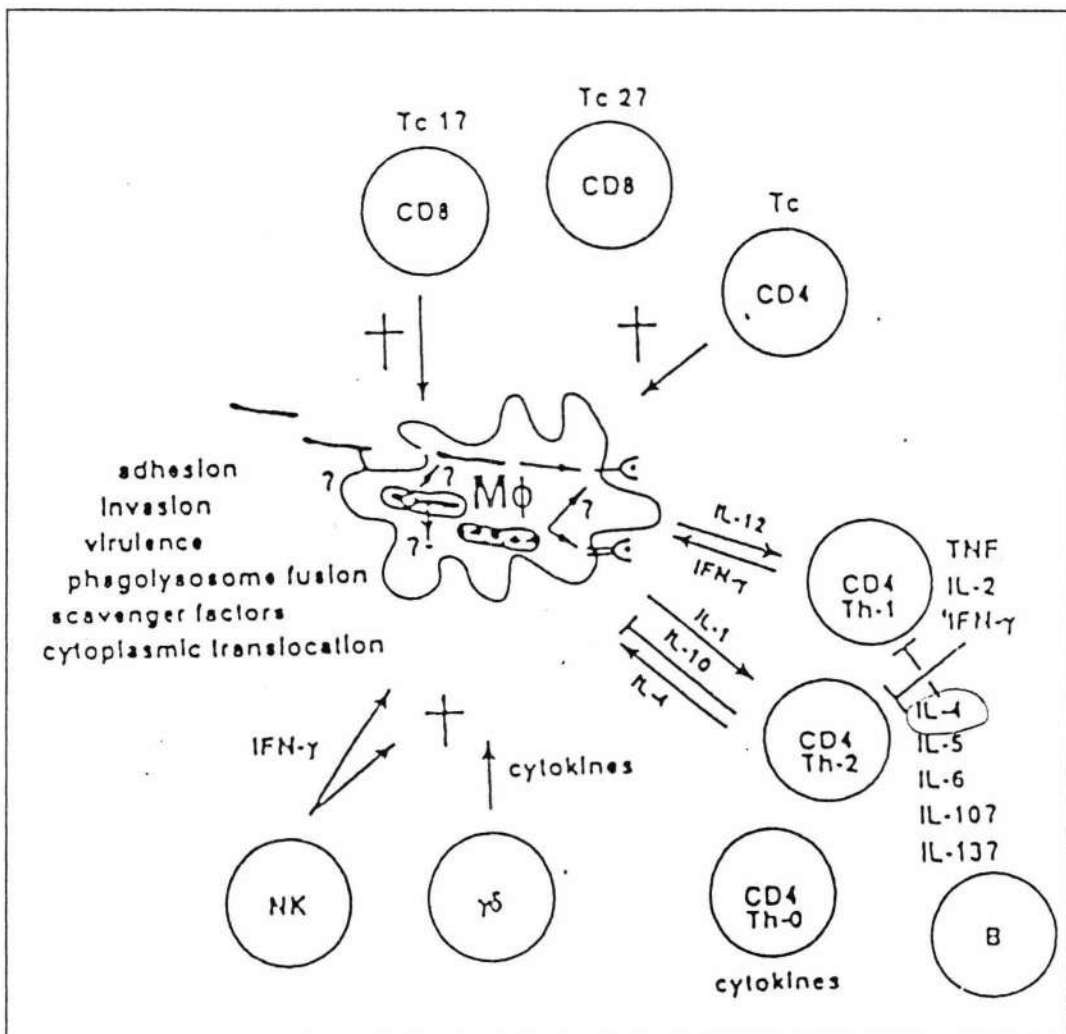
Respons imun seluler pada penyakit lepra ditujukan untuk mengeliminasi kuman *M Leprae* yang hidup dan berkembang di dalam sel tubuh. Dalam konsep yang klasik telah diketahui bahwa penghancuran *M Leprae* di dalam makrofag terjadi sebagai hasil kerjasama antara makrofag dan Limfosit-T.



Gambar 2.2 Konsep klasik kerjasama makrofag dan sel T (Ottenhoff, 1994)

Teori yang klasik dalam respon imun seluler penyakit lepra adalah dimulai dengan makrofag yang menangkap dan memproses antigen, selanjutnya terjadi kontak dengan sel limfosit T yang akan memproduksi IFN-gamma untuk mengaktifkan makrofag tersebut dalam penghancuran antigen (*M. Leprae*).

Namun dalam perkembangannya ternyata diketahui bahwa proses yang terjadi tidak sesederhana diatas, melainkan sangat kompleks dan melibatkan berjenis-jenis sitokin.



Gambar 2.3. Perkembangan konsep hipotesis respon imun pada penyakit lepra (Ottenhof, 1993)

Makrofag yang telah menangkap dan menyajikan antigen akan mengaktifkan limfosit CD4 dan CD8, menghasilkan proliferasi dan diferensiasi menjadi beberapa jenis limfosit yang aktif. Terbentuk beberapa jenis sel Tc dari CD4 dan CD8, yang akan menyerang makrofag yang mengandung antigen yang dikenalnya. Disamping itu dengan bantuan sitokin dari sel gamma - delta serta INF-gamma dari sel NK, makrofag akan memperkuat proses penghancuran kuman dalam fungsi fagosom - lisosom. Terbentuk pula limfosit CD4 yang memproduksi sitokin yaitu limfosit Th1, Th2 dan Th0 dengan masing-masing jenis sitokinnya. Aktifitas Th1 dan Th2 saling berantagonis dalam membentuk keseimbangan antara imunitas seluler dan humoral (Ottenhoff, 1994).

Faktor lain yang masih terus diteliti adalah peranan sitokin pada penyakit lepra. Apabila dihubungkan dengan adanya keseimbangan dalam pengaruh interleukin hasil dari Th1 dan Th2, maka pada penyakit lepra Th1 berperan dominan pada tipe Tuberkuloid serta Nara-kontak lepra. Didapatkan adanya produksi yang tinggi dari IFN-gamma dan IL-4 yang rendah pada limfosit penderita tersebut bila dirangsang dengan *M Leprae* (Haanen dan Mutis, 1991; Mutis, 1993). Begitu pula secara histokimia terlihat bahwa limfosit pada jaringan lesi kulit tipe tuberkuloid memproduksi cukup banyak IL-2. Pada tipe Lepromatosa didapatkan konsentrasi

IL-4, IL-5 dan IL-10 yang tinggi pada lesi lepromatosa dan tidak ditemukan IFN-gamma maupun IL-2 (Modlin dan Rea, 1991).

Di samping itu ternyata beberapa jenis sel Th2 bisa menekan aktifitas sel Th1 dengan cara pelepasan IL-4 lebih banyak daripada IFN-gamma (Salgame dan Birdie, 1991). Pemberian antibodi pada IL-4 ternyata menghilangkan efek supresi diatas, sehingga disimpulkan bahwa IL-4 berperan dalam supresi sel Th1.

b. Respons Imun Humoral pada Lepra

Pada penyakit lepra juga terjadi perubahan dalam sistem imunitas humoral, namun peranannya dalam menghancurkan kuman *M Leprae* yang letaknya intra-seluler kurang penting, dibandingkan dengan peranan imunitas seluler / CMI (*Cell Mediated Immunity*). Justru perubahan-perubahan dalam sistem ini menyebabkan terjadinya beberapa penyulit yang menghambat pengobatan dan penyembuhan penyakit. Sistem imunitas humoral merupakan aktifitas dari limfosit B yang berada di jaringan limfoid dan sebagian kecil di dalam sirkulasi darah. Rangsangan antigen akan merubah limfosit B ini menghasilkan imunoglobulin yaitu protein serum yang mempunyai aktifitas antibodi. Pada penyakit lepra biasanya terjadi di IgG, IgM dan kadang-kadang juga IgA (Sehgal, 1989). Peningkatan imunoglobulin ini juga diikuti dengan meningkatnya kadar komplemen dalam sirkulasi darah.

2.1.5 Predisposisi genetik sebagai salah satu hipotesis penyebab anergi pada lepra tipe LL.

Keadaan anergi pada lepra tipe LL telah banyak diselidiki, namun belum ada kesepakatan mengenai mekanisme terjadinya keadaan tersebut. Beberapa hipotesis telah dikemukakan a.l. faktor predisposisi genetik.

Telah lama dicurigai bahwa faktor genetik berperan dalam penyakit lepra dimana penderita lepra seakan-akan sudah diprogram secara genetik untuk tidak memberi respons terhadap *M Leprae*. Penelitian di daerah endemis lepra menunjukkan adanya beberapa individu dalam keluarga yang tes leprominnya selalu negatif (Beiguelman, 1972).

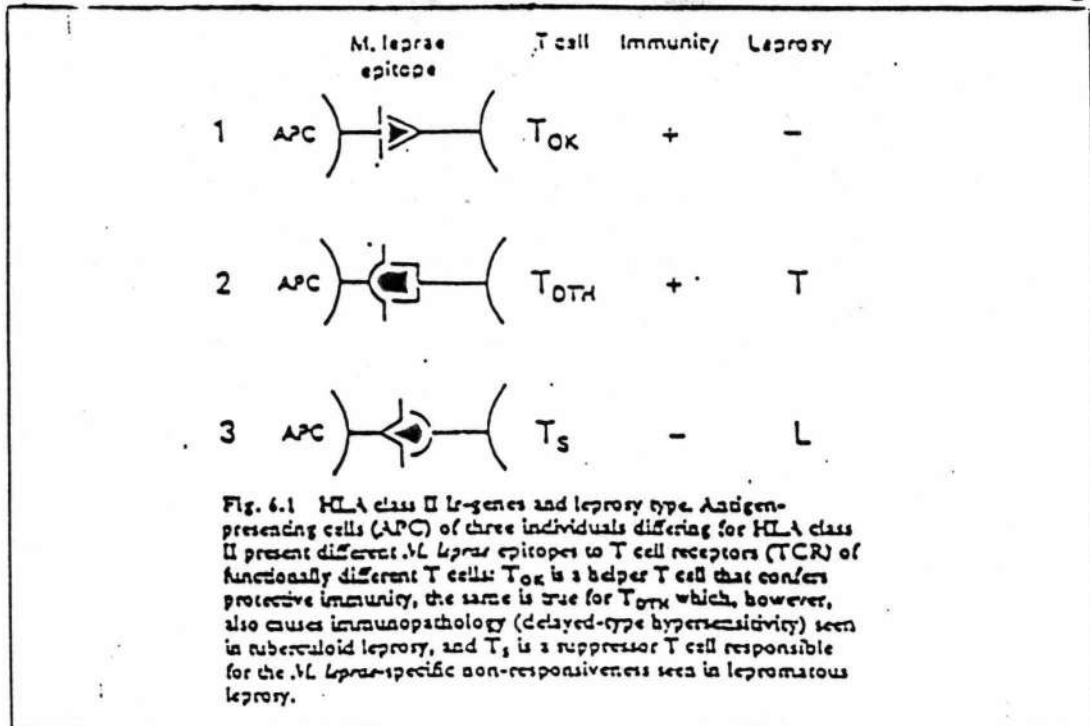
Penyelidikan dalam bidang genetika khususnya HLA, menunjukkan bahwa insiden HLA-DR2 dan HLA-DR3 meningkat pada lepra tipe TT, sedang HLA-DR2-DQW1 meningkat pada tipe lepromatosa (De Vries, 1976; Fine, 1981; Van Eden dan De Vries, 1984; Shields 1987). Pada saat ini secara umum pendapat yang diterima adalah bahwa faktor genetik hanya berperan dalam menentukan kedalam tipe apa seseorang akan menderita lepra bila infeksi *M Leprae* telah menjadi manifes.

Peranan imunogenetik pada penyakit lepra ini terutama bekerja pada tingkat makrofag. Telah diketahui bahwa untuk pengenalan dan penyajian antigen oleh sel APC diatur oleh molekul MHC kelas II. MHC ini sendiri adalah produk dari HLA, khususnya HLA-D (DP, DQ dan DR). Gen Ir (*immune response gene*) dari HLA ini akan mengontrol molekul MHC kelas II di permukaan makrofag, sehingga hanya epitope tertentu yang akan disajikan kepada sel T (Ottenhoff dan De Vries, 1994). Dengan demikian epitope tersebut hanya bisa menempel pada reseptor sel T yang

tertentu pula. Apabila reseptor sel T ini dimiliki oleh sel T yang membangkitkan imunitas, maka proses yang timbul mengaktifkan respons imun seluler. Sebaliknya apabila yang terangsang adalah milik sel T supresor, maka yang terjadi adalah penekanan dari respons imun seluler. Dengan demikian terjadinya bentuk klinik tuberkuloid dan lepromatosa bisa diterangkan (lihat gambar 2.4).

Tipe lepromatosa terjadi apabila epitope yang disajikan merangsang sistem T-supresor, sedangkan tipe tuberkuloid terjadi apabila sistem T-DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*) terangsang. Pada sebagian besar masyarakat, orang tidak menjadi sakit meskipun terinfeksi *M Leprae* karena epitop yang disajikan kepada sel T merangsang sistem imun yang protektif (De Vries & Ottenhoff, 1993).

HLA-DR3 diketahui memberikan respon pada jenis subset antigen tertentu dari *M Leprae* seperti protein HSP (*Heat Shock Protein*) 70, 65 dan 18, dimana peptida jenis itulah yang akan disajikan kepada sel Th. Jenis sel Th yang akan teraktifkan juga tertentu sesuai dengan jenis peptida yang disajikan. Hal ini penting diketahui dalam pembuatan vaksin lepra, yaitu mencari epitop yang bisa merangsang sel T yang protektif (De Vries, 1994; Agusni, 1996).



Gambar 2.4. Hubungan HLA dengan tipe lepra (De Vries, 1994).

Dari konsep imunogenetika diatas terlihat bahwa peran HLA cukup besar dalam penentuan kearah mana penyakit lepra akan berlangsung, apabila seseorang terinfeksi oleh *M. Leprae*. Namun teori ini tidak dapat menjelaskan mengapa dalam perjalanan klinik terjadi perubahan dari tipe T ke tipe L atau sebaliknya (Agusni, 1996).

2.2 Major Histocompatibility Complex

2.2.1 Antigen lekosit manusia

Human Leucocyte Antigen atau HLA dihasilkan oleh suatu lokus gena yang polimorf, yang menempati semua segmen kurang lebih dua centi morgan (cM) pada lengan pendek kromosom nomor 6 (Walker, 1987; Schwartz, 1994; Browning and Michael, 1996). Regio genetik tersebut di atas dikenal sebagai *Major*

Histocompatibility Complex (MHC), dan mengandung suatu seri loki yang saling berhubungan erat. Gena pada loki ABC dan D merupakan subset MHC, yang dikenal sebagai *Human Leucocyte Antigen*.

Sistem MHC sendiri terdiri dari sekelompok antigen glikoprotein yang dapat dijumpai pada hampir semua permukaan sel berinti, kecuali sel spermatozoa dan sel amnion (Walker, 1987; Bryceson, 1996).

Antigen HLA pertama dilaporkan oleh Jean Dauset pada tahun 1958, namun oleh karena ketidakpastian pada waktu itu, maka sistem tersebut belum banyak berkembang. Baru setelah metode mikrolimfositotoksitas yang dikemukakan oleh Terasaki, diterima sebagai metode standar pada lokakarya Histokompabilitas International kedua di Leiden Netherland 1985, maka sistem HLA berkembang dengan pesat.

Kini diketahui bahwa antigen MHC merupakan antigen terpenting yang berperan dalam proses pengendalian pengenalan sendiri (*self recognition*), yang bersangkutan paut dengan sistem pertahanan tubuh di mana setiap jenis antigen, baik antigen diri sendiri (*self*) atau bukan diri sendiri (*non-self*), hanya akan dikenal oleh limfosit, bila terdapat bersamaan dengan molekul MHC.

Kegagalan dalam proses pengenalan antigen diri sendiri tersebut diatas, dapat berakibat terjadinya penyakit autoimun, sedangkan kegagalan pengenalan terhadap antigen asing, dapat berakibat terjadinya keadaan imunodefisiensi, dengan resiko terjadinya infeksi yang meluas, serta pertumbuhan dan penyebaran jaringan tumor.

2.2.2 Gena HLA Kompleks

Kelompok HLA diketahui terdiri dari 7 loki yang saling terkait dengan erat (*closely-linked*) pada lengan pendek kromosom 6. Loki tersebut adalah HLA-A, -B, -C, -DR, -DP dan -DQ.

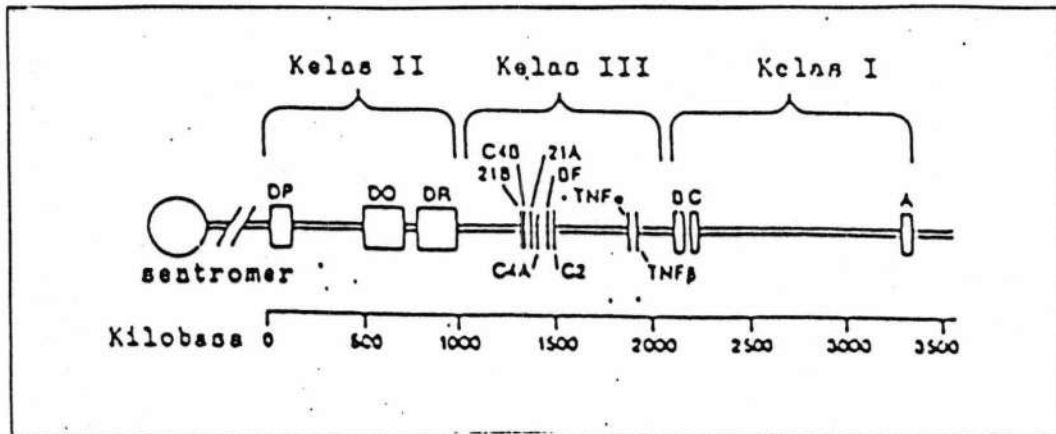
Di samping itu, beberapa regio genetik lain juga dapat dijumpai pada kompleks HLA tersebut, antara lain regio komplemen C2, C4 dan faktor B properdin (BF) yang terletak antara regio HLA-B dan DR. Juga gena yang menentukan aktivitas 21-hidroksilase A dan B dalam biosintesis steroid, dapat dijumpai di regio tersebut, dimana hanya gena B yang berfungsi pada manusia (**Giphart dan Van der Poel, 1992; Schwartz, 1994**).

Gena untuk faktor nekrosis tumor alfa dan beta, yang juga dikenal sebagai cachectin dan lymphotoxin, akhir-akhir ini juga telah dipetakan di antara regio komplemen dan regio HLA-B (**Schwartz, 1994**).

Karakteristik dari sistem HLA sangat polimorfik, dimana beberapa alleles berada bersamaan dalam satu lokus. Misalnya, sekurang-kurangnya terdapat 24 alleles yang berada pada lokus HLA-A, dan sedikitnya 50 alleles yang berbeda pada lokus HLA-B. Tiap allele diketahui menentukan struktur dari rantai glikoprotein (**Schwartz, 1994**).

Produk dari allele HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ dan -DP semuanya merupakan molekul permukaan sel dengan determinan antigenik tersendiri, yang dapat dikenal in vitro melalui berbagai tes histokompatibilitas.

Loki genetik HLA-A, -B dan -C akan menentukan produk molekul HLA klas I, sedangkan subregio genetik HLA-DR, -DQ dan -DP akan menentukan produk molekul HLA klas II.



Gambar 2.5 HLA Kompleks
(Schwartz, 1994)

2.2.3 Nomenklatur Sistem HLA

Nomenklatur sistem HLA berasal dari HLA Nomenclature Committee of the World Health Organization yang dibentuk pada tahun 1969, dan dilaporkan pertama kali pada tahun 1970. Panitia tersebut sepakat untuk bertemu pada setiap kesempatan lokakarya International mengenai *histocompatibility testing*, untuk mengadakan perbaikan maupun tambahan nomenklatur terhadap faktor yang baru ditemukan, baik secara serologik maupun secara *cellular typing* (Tiwari dan Terasaki, 1985).

Kini ada 7 kelompok antigen yang secara resmi telah dikenal oleh HLA Nomenclature Committee WHO, yaitu : HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ dan -DP, sedangkan antigen yang belum secara resmi dikenal, dinyatakan dengan huruf W, yang merupakan singkatan daripada workshop dan ditempatkan di depan angka, contoh : HLA-DRW12.

Sistem HLA sangat polimorfik dan mempunyai bentuk alternatif yang multipel atau alleles dari gena pada setiap lokus diketahui.

Spesifitas HLA yang lengkap dan terbaru dapat dilihat pada lampiran 7, yang dikutip dari "The 12th International Histocompatibility Workshop", France, 1996.

Antigen HLA yang ditemukan pada molekul tunggal dan tidak pada yang lain, disebut sebagai HLA private antigens, sedangkan yang merupakan determinan umum terhadap beberapa molekul HLA., dimana masing-masing dapat membawakan HLA private antigen disebut sebagai HLA public antigen. Sebagai contoh adalah HLA-BW4 dan -BW6, dimana satu atau yang lain dapat ditemukan pada setiap molekul yang ditentukan oleh HLA-B alleles.

Beberapa antigen yang semula diduga merupakan *single private antigens*, terbukti kemudian terdiri dari sekelompok 2 atau tiga antigen yang saling erat berhubungan, dan masing-masing mempunyai spesifikasi yang sempit. Antigen tersebut kemudian disebut sebagai split dari antigen dengan spesifitas yang lebar. Penelitian biokimia menunjukkan bahwa split sebetulnya adalah varian yang secara struktural mempunyai hubungan erat satu dengan yang lain (Tiwari dan Terasaki, 1985; Schwartz, 1994). Daftar lengkap terbaru splits antigen HLA dapat dilihat pada lampiran 8.

2.2.4 Struktur dan Distribusi Molekul HLA

Molekul HLA beserta gena yang memprogram sintesisnya, dapat digolongkan dalam 3 klas, yaitu klas I, II dan III.

a. **Antigen HLA Klas I**

Molekul HLA klas I juga disebut sebagai molekul histokompatibilitas klasik, termasuk didalamnya molekul HLA-A, -B dan -C yang bersifat polimorfik.

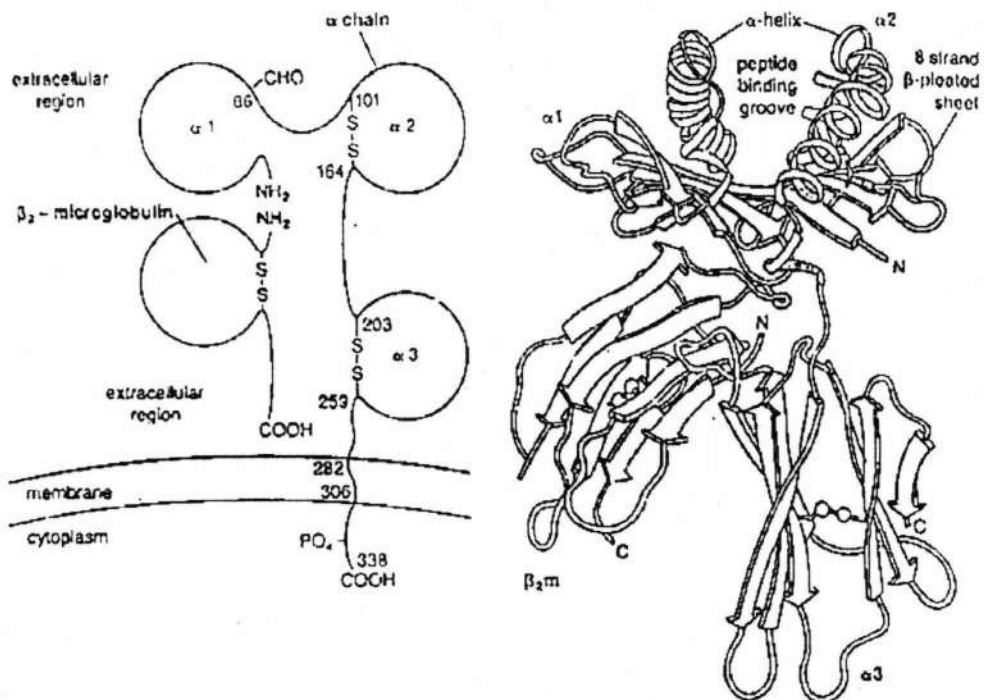
Masing-masing molekul tersebut di atas terdiri dari dua struktur rantai, yaitu rantai alfa dan beta. Rantai alfa mempunyai berat molekul 44,000 dengan tipe domain diluar membran sel yaitu alfa1, alfa2 dan alfa3. Rantai alfa merupakan glikoprotein polimorfik, yang sintesisnya diprogram oleh gena di kompleks HLA pada kromosom 6. Rantai ini berikatan secara non-kovalen dengan rantai protein non-polimorfik, beta 2-mikroglobulin dengan berat molekul 12.000, yang program sintesisnya diatur oleh gena pada kromosom 15. Beta 2 mikroglobulin selalu akan ditemukan pada molekul HLA klas I (Walter, 1987; Schwartz, 1994). Ketiga domain ekstra-membran dari rantai alfa terdiri dari : N-terminal glycan region yang bersifat variabel, alpha2-disulphide loop peptide, bersifat variabel, dan alpha3 disulphide loop peptide, bersifat tidak variabel dan berasosiasi dengan beta2-mikro globulin (Walter, 1987; Schwartz, 1994).

Ujung carboxyl terminal dari rantai alfa, tertanam lapisan ganda folsofilid membran ke dalam sel (Gambar 2.6).

Penelitian menunjukkan bahwa antigenik determinan molekul HLA, terutama terletak pada domain alfa1 dan alfa2. Kedua domain

tersebut masing-masing terdiri dari 4 beta strands, dan satu alpha helix, yang membentuk bagian atas molekul HLA klas I.

Kedelapan beta strands dari domain alfa1 dan alfa2 tersebut diatas, membentuk lipatan lembaran beta, yang bertindak sebagai penyanggah kedua alfa helix. Alfa helix sendiri membentuk celah yang berfungsi sebagai tempat pengikat fragmen peptida antigen, dan menentukan sifat polimorfisme molekul HLA klas I (Gambar 2.6).



Gambar 2.6 Skema Molekul HLA klas I
(Schwartz, 1994)

Agar antigen dikenal oleh reseptor antigen dari limfosit T sitotoksik (CD8), maka fragmen peptida antigen, harus dalam hubungan fisik

dengan antigen HLA klas I tertentu. Fenomena ini dikenal sebagai HLA restriction.

Molekul HLA klas I seperti diketahui terpaparkan pada permukaan semua sel berinti, kecuali sel spermatozoa dan sel amnion.

Menurut **Doran (1988)**, molekul HLA klas I juga dapat dijumpai larut dalam plasma, terabsorpsi pada permukaan trombosit, dan hanya sedikit terabsorpsi pada sel darah merah.

Di samping loki polimorfik (-A, -B, dan -C), masih ada kurang lebih 14 loki antigen HLA lain dengan polimorfisme yang terbatas, sayang perannya dalam peristiwa penolakan pencangkokan jaringan, sampai sekarang masih diragukan, antara lain antigen HLA-E (**Doran, 1988**).

b. Antigen HLA Klas II

Molekul HLA klas II (HLA-DR, -DP dan -DQ), juga terdiri dari dua rantai polipeptida, yaitu rantai alfa yang tersusun dari 229 asam amino (BM 34.000), dan rantai beta yang tersusun dari 237 asam amino (BM 29.000). Kedua rantai alfa dan beta saling berikatan secara non-kovalen, dan kedua-duanya juga ditanamkan ke dalam sel.

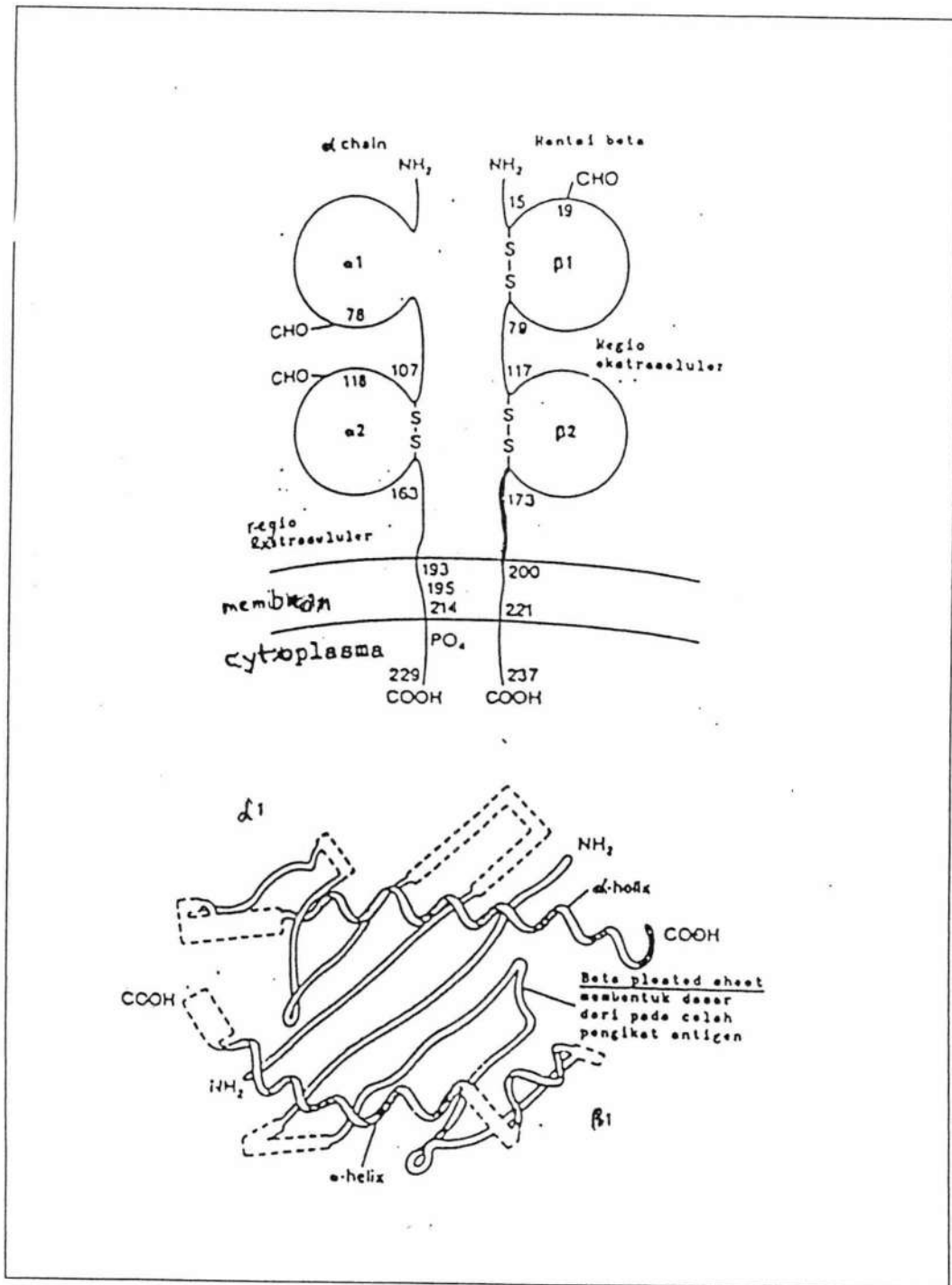
Berbeda dengan molekul HLA klas I, pada HLA klas II justru beta yang mengandung urutan asam amino variabel, dan yang menentukan epitope, sedangkan rantai alfa justru tidak variabel dan tidak menentukan epitope.

Masing-masing rantai alfa dan beta mengandung tiga regio, yaitu : regio hidrofilik ekstra-sel, regio hidrofobik transmembran, dan regio hidrofilik intraseluler.

Regio hidrofilik ekstra seluler rantai alfa, mengandung dua domain alfa 1 dan alfa 2. Regio hidrofilik ekstra-seluler rantai beta, juga mengandung dua domain, disebut masing-masing beta 1 dan beta 2. Domain alfa 2 dan beta 2 kedua-duanya menunjukkan banyak persamaan dengan domains dari regio imunoglobulin yang tetap.

Struktur molekuler daripada DQ dan DP sama dengan DR, perbedaannya hanya terletak pada jumlah asam amino rantai alfa dan beta. Rantai alfa dan beta molekul DR, masing-masing mempunyai 229 dan 237 asam amino, rantai alfa dan beta molekul DQ, masing-masing mengandung 234 dan 229 asam amino, sedangkan rantai alfa dan beta molekul DP, masing-masing 229 asam amino.

Seperti pada molekul HLA klas I, pada molekul HLA klas II, juga terdapat celah yang dibentuk oleh kedua helix alfa dari domain alfa 1 dan beta 1, dan lipatan lembaran beta sebagai dasar. Celah tersebut berfungsi sebagai pengikat antigen, dan menentukan sifat polimorfisme molekul HLA klas II (Gambar 2.7).

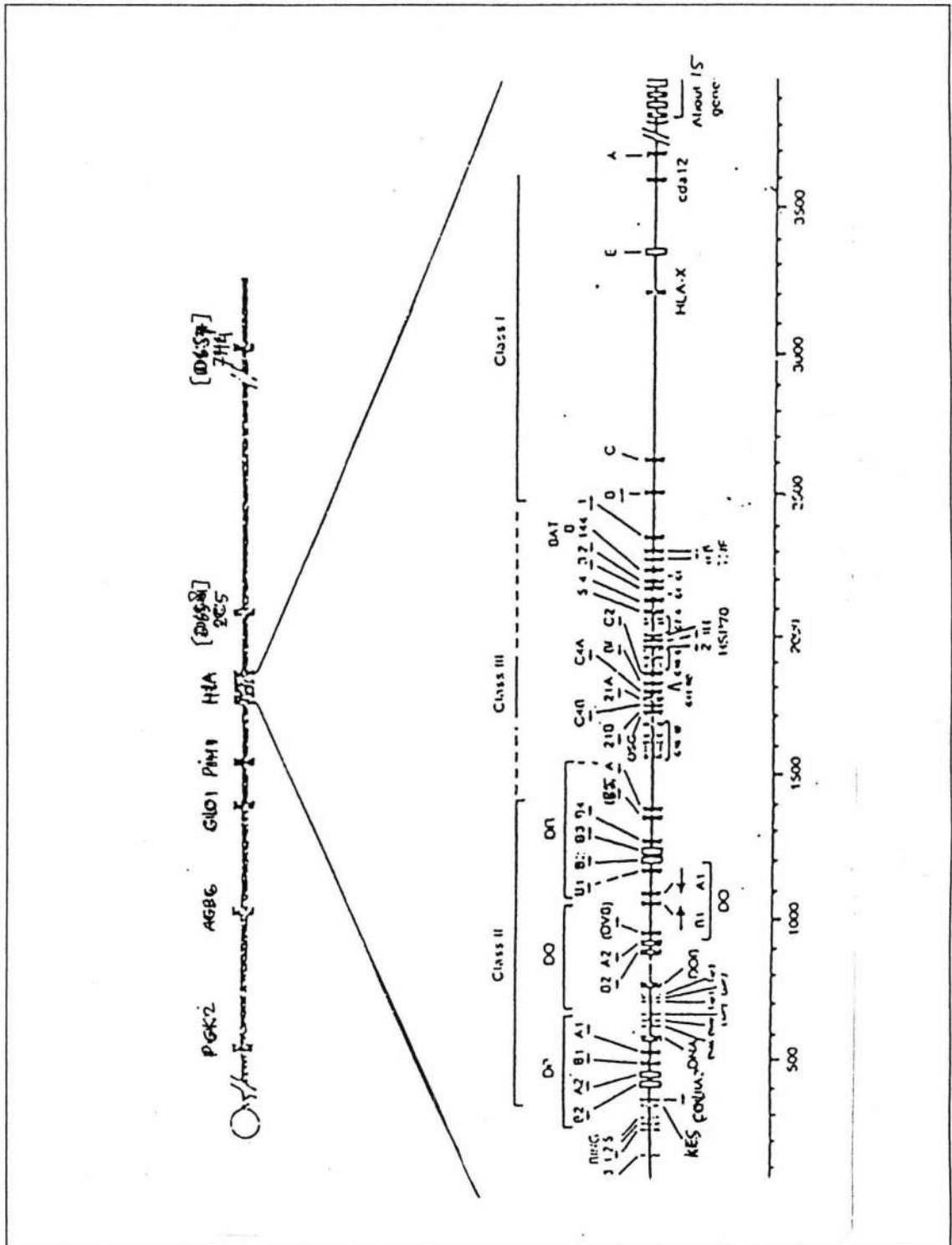


Gambar 2.7 Skema Molekul HLA Klas II (Schwartz, 1994)

a) **Organisasi genom gen HLA klas II**

Dua rantai molekul HLA klas II disandi oleh gen yang terpisah yaitu gen A (menyandi rantai α) dan gen B (menyandi rantai β). Gen A terdiri dari 5 ekson yang masing-masing menyandi: 1) 5' UTR (5' untranslated region) dan urutan sinyal, 2) domain alfa, 3) domain alfa, 4) peptida penghubung, regio transmembran, ekor sitoplasmik dan sebagian 3' UTR (3' untranslated region) serta 5' sisa 3' UTR dari rantai alfa molekul HLA.

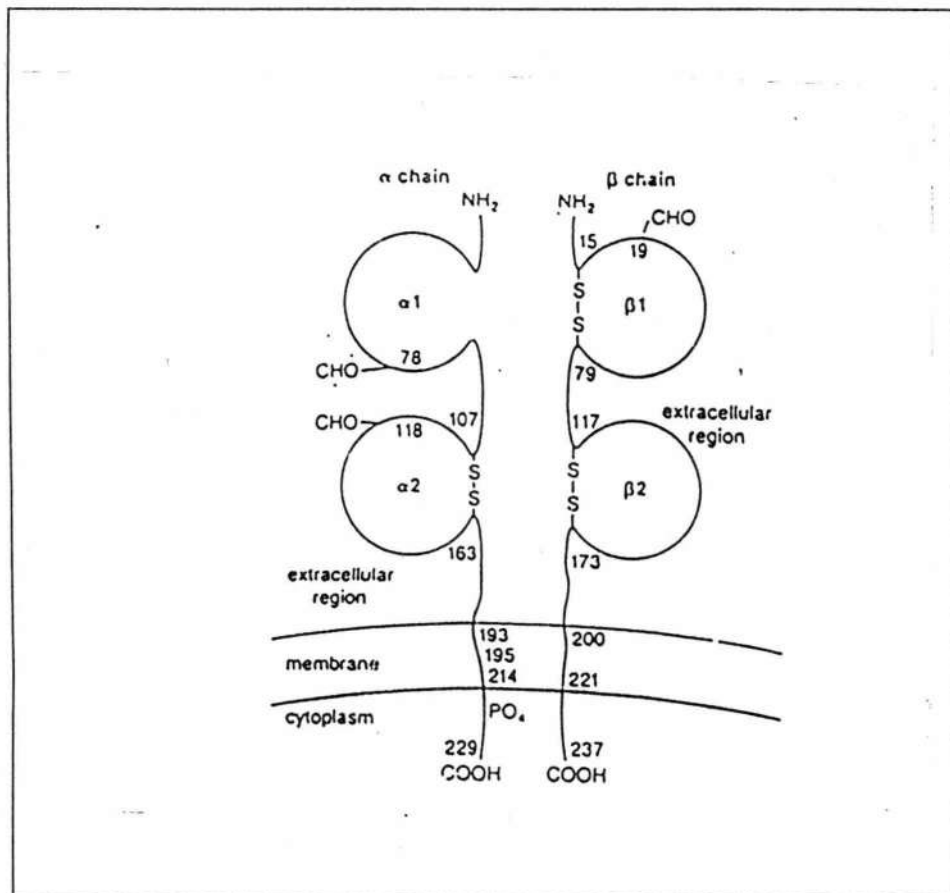
Gen B tersusun sama kecuali untuk ekor sitoplasmik yang sebagian disandi oleh suatu ekor tambahan dan sebagian lagi oleh ekson 3' UTR. Ekson-ekson yang menyandi protein dipisahkan oleh intron. Setiap subregio klas II terdiri paling sedikit satu pasang gen yaitu A dan B, tetapi tidak seluruh gen selalu terekspresi. Lokus HLA-DP mempunyai dua pasang gen A dan B tetapi satu pasang diantaranya tidak terekspresi disebut pseudogen. Lokus HLA-DQ juga mempunyai dua gen A dan B dengan organisasi genom yang sama dengan DP. Lokus HLA-DR berbeda yakni hanya mempunyai satu gen A dan satu sampai lima gen B tergantung haplotipenya dan satu diantaranya pseudogen (Gambar 2.8).



Gambar 2.8 Peta Regio dan Organisasi HLA pada lengan pendek kromosom 6 (Fugger, 1994)

b. Struktur dan fungsi molekul HLA klas II

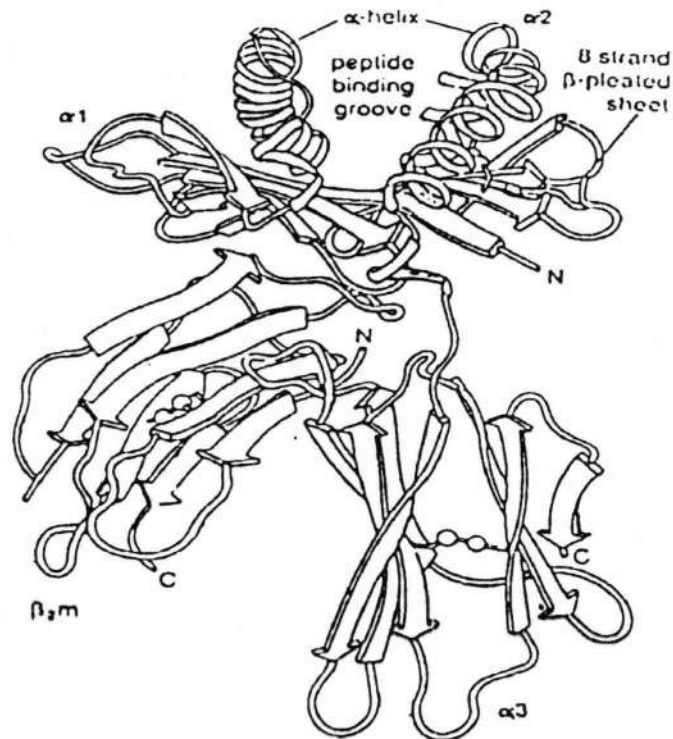
Lokus klas II sistem HLA menyandi paling sedikit 3 bagian glikoprotein transmembran polimorfik yang selalu terekspresi pada permukaan sel limfosit B, makrofag, sel dendrit dan limfosit T yang teraktifasi dan dapat terekspresi pada sebagian besar sel epitel dan endotel oleh rangsangan interferon gama. Molekul klas II yaitu DR, DQ dan DP masing-masing dibentuk oleh dua rantai yang berbeda yaitu alfa dan beta, yang menekuk bersama membentuk molekul heterodimer yang menyajikan antigen eksogen yang diproses intraseluler pada suatu celah yang terbentuk oleh rantai peptida HLA. Didalam celah ini suatu peptida dikenali oleh sel T penolong/CD4' (Gambar 2.8).



Gambar 2.9 Molekul HLA klas II secara skematik (Schwartz, 1994)

Molekul heterodimer tersebut terdiri dari rantai alfa 35 kD dan rantai beta 29 kD yang berikatan secara nonkovalen. Setiap rantai tersusun dari dua domain ekstraseluler, segmen transmembran dan ekor sitoplasmik yang pendek. Domain proksimal kedua membran yaitu alfa 2 dan beta 2 sangat stabil sementara domain distal kedua membran sangat bervariasi dan diduga merupakan bagian yang berinteraksi dengan reseptor sel T dan fragmen peptida antigen (Fugger, 1994).

Struktur tiga dimensi antigen HLA klas I telah dikenal melalui kristalografi sinar-X, sementara struktur molekul HLA klas I belum berhasil ditentukan, maka dibuat suatu model hipotetik tempat ikatan antigen molekul klas I yang serupa dengan molekul klas I. Bagian proksimal molekul klas I, yaitu bagian yang terletak diluar membran, mempunyai celah yang dalam tempat antigen terikat (Gambar 2.10).



Gambar 2.10 Diagram struktur molekul HLA kelas I.

Tempat pengikatan peptida pada kelas I berupa celah yang dibentuk dari 8 helai lembar β yang berlipat-lipat dan pasangan heliks α dari domain $\alpha 1$ dan α . Lembar β membentuk dasar dan kedua heliks α membentuk dinding celah (Fuger, 1994; Handono, 1998)

Celah ini dibentuk oleh domain alfa1 dan alfa2 molekul HLA dan disini terletak residu asam amino yang hipervariabel. Mutasi asam amino residu pada bagian dasar dan bagian dalam celah ini akan berpengaruh pada pengikatan antigen, sedangkan mutasi sepanjang bagian atas dan luar dari heliks alfa disekitar celah akan berpengaruh pada pengenalan oleh sel T.

Antigen HLA banyak diteliti dalam usaha untuk memahami dasar terjadinya perubahan respons imun sebagai patogenesis penyakit otoimun termasuk LES. Molekul HLA kelas I dan kelas II

mempunyai peran utama pada respons imun. Pertama, memberi sifat pada sel T melalui seleksi positif dan negatif pada saat perkembangannya dalam timus. Kedua, menyajikan antigen peptida (pada umumnya antigen adalah peptida) pada sel T (Accola, 1995).

Molekul klas II yang terdapat pada permukaan makrofag, sel dendrit dan sel B mengikat pecahan peptida dan menyajikan antigen (terutama antigen eksogen) tersebut pada sel T penolong. Interaksi trimolekuler antara molekul HLA pada permukaan sel penyaji antigen. Pecahan-pecahan peptida dan reseptor sel T (*T Cell Receptor* atau TCR) merupakan syarat minimal bagi antigen bergantung sel T (*T cell dependent antigen*) untuk menghasilkan respons terhadap antigen tersebut. Untuk meningkatkan afinitas kontak antara sel penyaji antigen dan sel T, molekul pelengkap seperti CD4 pada sel T penolong akan berinteraksi dengan molekul HLA klas II terlebih dahulu (Fugger, 1994; Handono, 1998).

c. Antigen HLA Klas III

Komponen komplemen yang sintesisnya diprogram oleh loki komplemen pada regio HLA klas III, juga menunjukkan sifat polimorfisme.

Dikenal ada 4 alleles yang menentukan keempat bentuk alternatif dari properdin faktor B (BF), yang dapat dipisahkan berdasarkan mobilitas elektroforesisnya.

C2 lokus mempunyai 2 common alleles dan satu null allele. Defisiensi C2 terjadi pada individu homozygote terhadap null allele. Ini merupakan defisiensi genetik yang sering dijumpai pada individu kulit putih, dan disertai dengan insidens tinggi penyakit yang menyerupai systemic lupus erythematosus atau SLE (Walker, 1987).

Kedua common alleles C2 lokus S dan F, dan dua alleles frekuensi rendah S1 dan F1, terdapat pada lokus Faktor B (Bf), dan produk genanya berupa : faktor B, berperan penting dalam aktivasi komplemen melalui jalur alternatif.

Pada C4 lokus, sedikitnya terdapat 3 polimorfik C4B alleles dan 6 alleles C4A. Juga ditemukan beberapa varian alleles yang relatif jarang dijumpai pada kedua loki tersebut di atas. Gena null juga bisa terdapat pada kedua loki tersebut, sehingga individu homozygote dengan *double-null haplotype*, akan menderita defisiensi C4 yang lengkap, berupa SLE atau berhubungan dengan SLE.

2.2.5 Fungsi Biologik Molekul MHC

Molekul MHC bersangkutan paut dengan pengaturan respons imun. Untuk pengenalan antigen asing, dibutuhkan pemaparan antigen yang telah diproses, bersama-sama dengan molekul MHC pada permukaan sel, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi antar sel.

Limfosit T hanya akan memberikan respin terhadap antigen, bila antigen tersebut berasosiasi dengan molekul MHC klas I atau II.

Sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), antara lain adalah makrofag, yang akan mencernakan sebagian daripada antigen tersebut, selanjutnya memaparkan fragmen polipeptida pada permukaan sel bersama-sama dengan molekul MHC.

Pada proses pengenalan antigen tersebut di atas, limfosit T sitotoksik (Tc) akan teraktivasi menjadi sel afektor, dan selanjutnya memecah (lisis) sel-sel sasaran spesifik tersebut. Limfosit T sitotoksik, dapat juga menyerang langsung sel-sel sasaran spesifik, dan menimbulkan lisis sel dengan molekul MHC asing pada permukaan. Jadi untuk kerja limfosit T sitotoksik, dibutuhkan adanya molekul non self atau altered self.

Limfosit T pembantu (*Helper T Cell*) yang disingkat dengan Th, hanya akan memberikan respon terhadap pemaparan antigen yang berasosiasi dengan molekul HLA klas II, dan sebagai APC disini adalah limfosit B. Jadi untuk terjadinya interaksi antar sel, limfosit T pembantu harus dijematani oleh sel limfosit B.

Selanjutnya limfosit T pembantu yang terangsang, akan mensekresi berbagai bahan mediator lymphokones, dan mengirimkan signals kepada limfosit B, sehingga limfosit B tersebut akan terangsang, memperbanyak diri dan berdiferensiasi.

Mengingat bahwa untuk terjadinya interaksi antar sel, dibutuhkan kehadiran molekul HLA klas I dan II maka fenomena tersebut dikenal sebagai MHC restriction, yang mungkin ikut berperan penting dalam peristiwa terjadinya fenomena toleransi dan autoimunitas (Walker, 1987).

Molekul HLA klas III diketahui ikut berpartisipasi dalam aktivasi komplemen. Atas pertimbangan fungsi biologis molekul HLA tersebut di atas, serta pula atas dasar hasil pemetaan (*mapping*) dengan teknik genetika yang klasik, yang menunjukkan

bahwa letak gena respons imun (ir), sangat berdekatan dengan gena MHC klas II, maka diduga molekul MHC, ikut serta dalam respons imun terhadap antigen asing.

2.2.6 Pewarisan Keturunan dari Molekul HLA

Akibat adanya '*close linkage*,' maka kombinasi dari alleles pada tiap lokus satu kromosom, akan diwariskan sebagai suatu kesatuan (unit) yang disebut sebagai '*haplotype*.' Oleh karena itu tiap individu mewarisi satu kromosom dari masing-masing orang tuanya, maka setiap individu akan memiliki 2 HLA haplotype.

Gena HLA diketahui adalah co-dominant, sehingga kedua alleles pada lokus HLA tertentu akan ditampilkan bersama, dan dua set lengkap antigen HLA, masing-masing berasal dari kedua orangtuanya, dapat ditemukan pada tiap sel.

Berdasarkan hukum pewarisan Mendel, 25% kemungkinan bahwa 2 saudara kandung, akan memiliki kedua haplotype yang sama, sedangkan kemungkinan 50% mereka akan memiliki satu haplotype yang sama, dan 75% kemungkinan mereka tidak memiliki haplotype yang sama, atau sama sekali HLA-incompatible.

2.2.7 Genetika Populasi

Genetika populasi mempelajari gen yang terdapat di dalam populasi dan menguraikan secara matematik akibat dari keturunan pada tingkat populasi (Klein, 1996).

Informasi yang penting pada studi genetika populasi ini adalah pola genetik yang berupa frekuensi penyebaran gen HLA pada suatu masyarakat / populasi tertentu (Svejgaard, 1980; Tiwari dan Terasaki, 1985; Shields, 1987).

Terdapat tiga golongan besar penduduk dunia ini yang ciri penampilan fisiknya mudah dikenal yaitu : golongan Kaukasoid (Caucasian), Mongoloid dan Negroid (Rusdi, 1992; Bidwell, 1994). Masing-masing ternyata mempunyai kekhususan frekuensi antigen HLA atau frekuensi gene HLA (Histocompatibility Workshop, 1996).

Pemakaian istilah oriental dalam bidang imunogenetik (MHC/HLA) lebih sering digunakan dibandingkan dengan istilah Mongoloid (De Vries, 1992).

Populasi di Indonesia merupakan suatu populasi yang unik, dikarenakan adanya proses pembauran ras akibat migrasi ataupun karena *gene flow* (Rusdi, 1992). Pada tahun 1990, Moeslichan melaporkan hasil studi populasi genetik tentang HLA-A, -B dan -C yang dilakukan di Jakarta dan sekitarnya, bahwa gen HLA pada populasi penelitiannya digolongkan dalam golongan Oriental (Mongoloid).

Ekspresi antigen HLA dalam suatu populasi dinyatakan sebagai frekuensi antigen yaitu suatu angka prosentase antigen yang ditemukan pada pemeriksaan serologi dalam suatu populasi. Istilah tersebut merupakan gambaran frekuensi phenotype, sedangkan gambaran genotype lazim disebut sebagai frekuensi gen korelasi frekuensi antigen HLA dan gen HLA dapat diperhitungkan menurut formula Matiuiz, 1970.

$$g = 1 - \sqrt{1-f}$$

g = frekuensi gen

f = frekuensi antigen

Di dalam suatu pemeriksaan, apabila diperoleh anti serum yang lengkap akan memudahkan penentuan seluruh alel daru suatu lokus, maka jumlah seluruh frekuensi

gen dari alel tersebut akan berjumlah sama dengan 1,0 atau 100%. Berdasarkan hal tersebut, maka tidak akan ditemukan antigen blank (frekuensi antigen blank = 0). Antigen blank adalah HLA yang masih belum dapat diidentifikasi didalam suatu populasi.

Frekuensi gen tersebut sangat penting dalam memperhitungkan jarak genetika antara satu ras dengan ras lainnya. Jarak genetik atau *genetic distance* adalah terminologi statistik yang dipergunakan untuk menilai keeratan antara kelompok / ras berdasarkan frekuensi gen yang dipunyai masing-masing kelompok tersebut (Kikuchi, 1987).

2.2.8 *Linkage Disequilibrium* (Timpang Rangkai)

Konsep lain yang penting dalam genetika populasi dalam HLA / MHC adalah *linkage disequilibrium* (timpang rangkai) antara alel pada lokus-lokus sistem HLA (Shields, 1987).

Kejadian timpang rangkai lebih sering diartikan ketimpangan antara frekuensi haplotype HLA yang terdapat (diamati) di masyarakat dengan frekuensi yang diperhitungkan / diperkirakan, dengan cara menghitung perbedaan frekuensi antara yang diamati (observasi) dengan frekuensi yang diperhitungkan. Penyebab keadaan belum bisa diterangkan dan mungkin karena adanya seleksi genetik (Tiwari-Terasaki, 1985; Svejgaard, 1994).

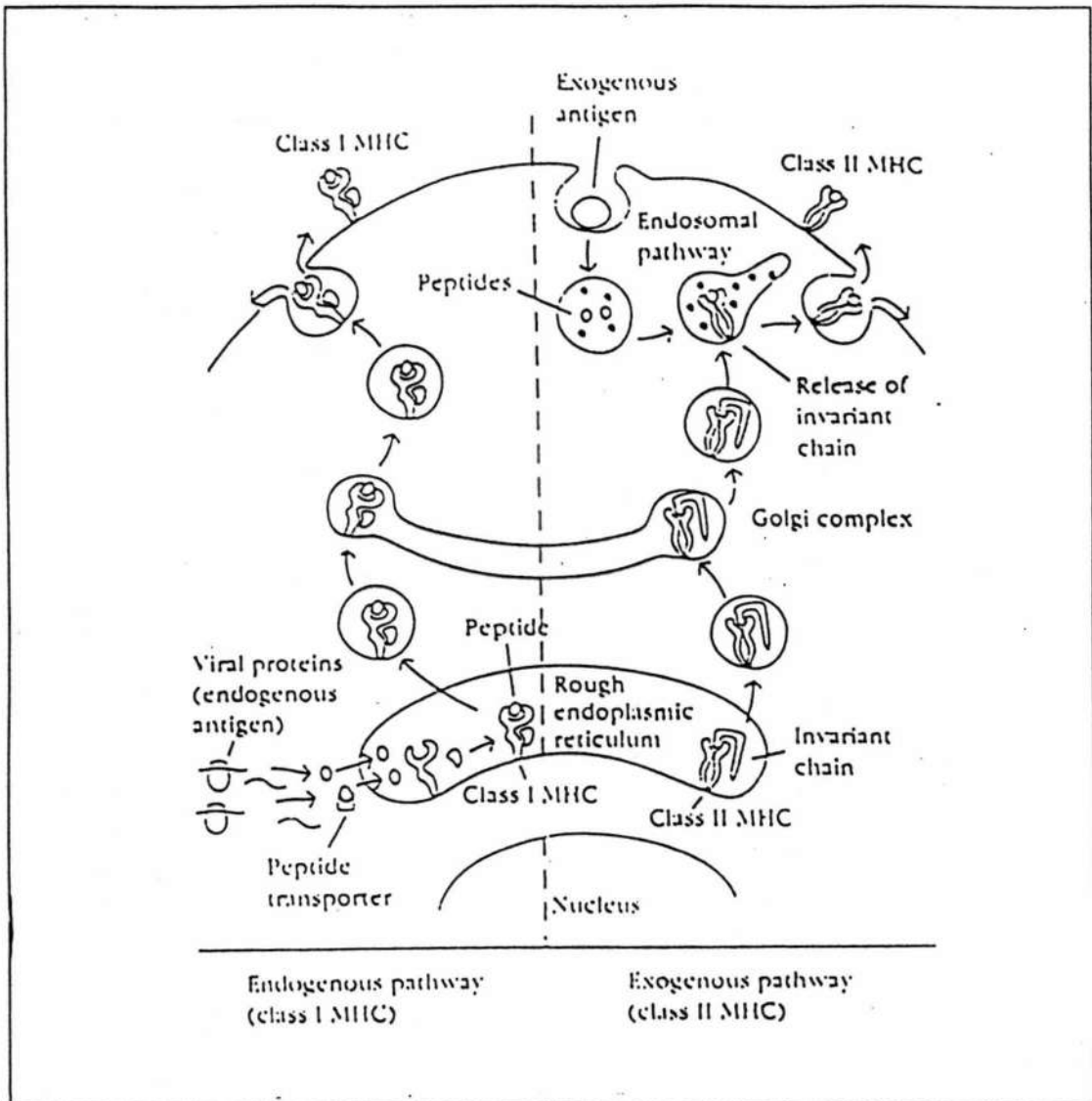
Timpang Rangkai ini sering spesifik untuk suatu populasi, misalnya frekuensi haplotype A1, B8 lebih sering pada populasi Kaukasoid dibandingkan dengan populasi Negroid atau Oriental.

2.2.9 Pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II

Proses dan penyajian antigen exogen maupun endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II diduga berbeda jalurnya. Hal ini berdasarkan eksperimen **Morisson dan Braciale dalam Kuby, 1992**, dengan virus influenza. Ternyata asosiasi antigen virus dengan molekul MHC klas I memerlukan replikasi virus dan sintesis protein virus. Sebaliknya dengan molekul MHC klas II tidak memerlukannya.

Adanya pemisahan jalur tersebut secara kompartemen intraseluler memungkinkan penentuan tipe *antigenic peptide* yang akan diikat oleh masing-masing klas molekul MHC. Molekul MHC klas I diduga berinteraksi dengan peptide yang dibawa ke dalam *rough endoplasmic reticulum (RER)* oleh *transporter protein*. Selama proses pengikatan peptide, interaksi antara molekul MHC klas I rantai α dan β_2 -microglobulin dan kompleks pengikatan ini selanjutnya akan menuju ke *apparatus golgi* lalu akhirnya ke plasma membran. Kehadiran rantai *invariant (invariant chain = li)* diduga bertujuan untuk melindungi pengikatan peptide pada MHC klas II di dalam *endoplasmic reticulum (ER)* serta memudahkan jalan ke kompartemen sel, dimana antigen exogen diproses. Terakhir yaitu jalur proses endosom, dimana vesicles yang mengandung molekul MHC klas II dan rantai li akan bergabung / fusi dengan lisosom. Enzim di dalam lisosom lalu memutuskan rantai li, sehingga memungkinkan molekul MHC klas II mengikat peptide. Sebagai kesimpulan akhir, bahwa molekul MHC klas I berfungsi memproses antigen endogen melalui cytoplasma dan menyajikannya kepada T cells / $CD8^+$. Sedangkan molekul MHC

klas II berperan memproses antigen exogen melalui endosom dan meyajikannya kepada T cells / CD4⁺.



Gambar 2.11 Model pemisahan jalur pemrosesan dan penyajian antigen exogen dan endogen oleh molekul MHC klas I dan klas II (Kuby, 1992).

2.2.10 Manfaat Klinis Sistem HLA

a. Transplantasi Jaringan

Keberhasilan transplantasi jaringan sangat ditentukan oleh kecocokan antara antigen HLA donor dengan antigen HLA resipien / penderita. Landasan konsep ini berawal dari penemuan Van Rood dan Belner pada tahun 1966, tentang ketahanan / daya hidup jaringan dari suatu transplantasi kulit pada kembar identik yang sistem dan golongan darah ABO-nya sama, ternyata daya hidup jaringannya lebih lama dibandingkan dengan penderita yang mengalami transplantasi kulit yang berasal dari saudara yang hanya identik pada salah satu dari kedua sistem tersebut.

b. Transfusi Lekosit dan Trombosit

Transfusi darah pada hakekatnya suatu alotransplantasi sel darah dari seseorang ke orang lainnya. Seperti diketahui bahwa antigen HLA terdapat pada semua sel berinti termasuk lekosit dan trombosit, sehingga menyebabkan tubuh resipien akan membentuk antibodi yang akan bereaksi dengan antigen HLA dari darah donor dan berakibat timbulnya reaksi transfusi / penolakan.

c. Studi Keayahan / Paterniti

Sistem HLA dikenal sebagai salah satu petanda genetik (*genetic marker*) pada manusia, sehingga dapat digunakan untuk penelusuran yang

menerangkan kaitan seseorang dengan kedua orangtuanya yang menurunkannya.

d. Asosiasi HLA dan Penyakit

Karena HLA / MHC sebagai petanda genetik sekaligus regulator respon imun dari berbagai penyakit, maka banyak usaha para peneliti untuk mencari asosiasi antara HLA dan kerentanan terhadap suatu penyakit (De Vries, 1978; Svejgard, 1994).

Penelitian-penelitian empirik telah banyak dilakukan pada beberapa penyakit, yang mempunyai aspek imun (autoimune), Infeksi dan kelainan endoktrin / metabolik (De Vries, 1992).

Adanya interaksi molekuler antara molekul HLA / MHC dengan komponen seluler yang non imun, telah mendorong usaha penelitian tentang asosiasi HLA antigen dengan penyakit non imun, untuk mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam dan lebih luas tentang fungsi biologi molekul HLA / MHC tersebut.

2.2.11 Perkembangan Metode Reaksi Rantai Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction* atau PCR) untuk Pemeriksaan Gen HLA Klas II

Sebagian besar gen HLA klas II yang terekspresi menunjukkan diversitas alel (polimorfisme) yang tinggi kecuali gen HLA-DRA, DPA1 dan DRB4. Oleh karena fungsinya yang amat penting dalam bidang imunogenetika serta diversitasnya yang tinggi tersebut maka diperlukan suatu protokol identifikasi yang baik. Prosedur untuk mengidentifikasi seluruh variasi urutan gen klas II dengan cepat dan tepat akan sangat

membantu penapisan awal suatu sampel yang besar guna keperluan transplantsi atau pada penelitian-penelitian penyakit khususnya autoimun (Busye, 1993; Handono, 1998).

Dalam 5 tahun terakhir telah dicapai suatu perkembangan yang luar biasa pada metode penetapan HLA (*HLA typing*), yaitu penetapan gen HLA berdasarkan PCR. Perkembangan tersebut sejalan dengan penggunaan PCR dalam bidang biologi atau biomedis. Karena polimorfisme yang sangat tinggi, maka hasil penetapan gen HLA sekarang lebih menjadi tolok ukur yang utama untuk setiap metode PCR yang baru (Bidwell, 1994). Ditinjau dari segi pelaksanaannya, penetapan gen HLA berdasarkan PCR dapat dikategorikan dalam 2 cara yaitu teknik berdasarkan hibridisasi pelacak (*probe*) dan teknik berdasarkan elektroforesis.

a. Teknik Berdasarkan Hibridisasi Pelacak

Teknik *PCR Sequence Specific Oligonucleotide* (PCR-SSO) merupakan metoda yang pertama kali digunakan untuk penetapan gen HLA dan merupakan perkembangan dari teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Chen, 1994). Metode ini meliputi hibridisasi urutan gen HLA sasaran (*sequence target*) yang telah diamplifikasi dari ekson polimorfik (ekson 2 gen HLA klas II), menggunakan sejumlah pelacak dengan urutan spesifik (*Sequence Specific Oligonucleotide* atau SSO). Setiap pelacak SSO adalah komplementer terhadap motif yang berbeda-beda dalam urutan basa nukleotida gen HLA yang hipervariabel. Pola hibridisasi pelacak yang spesifik dapat digunakan untuk

mengidentifikasi setiap alel HLA maupun kombinasi alel tersebut. PCR-SSO dibedakan dalam 2 bentuk yaitu *PCR-SSO dot blot* dan *PCR-SSO reverse dot blot*. Akhir-akhir ini telah dikembangkan modifikasi cara-cara tersebut untuk lebih mempermudah analisis, diantaranya dengan menggunakan lempeng mikotiter (*microtitre tray*) seperti *oligocapture sandwich assay*, *the dual-phase oligocapture assay* dan *hybridization protection assay*. Seluruh teknik-teknik tersebut tidak menggunakan petanda radioaktif (Miller dan Rodey, 1981; Dyer dan Middleton, 1993; Handono, 1998).

b. Teknik Berdasarkan Elektroforesis

Beberapa teknik yang menggunakan elektroforesis untuk menganalisis produk PCR telah dikembangkan akhir-akhir ini, diantaranya adalah PCR-RFLP. Teknik ini didasarkan pada penggunaan sebuah panel enzim endonuklease restriksi untuk memotong urutan basa nukleotida gen HLA sasaran hasil amplifikasi. Selanjutnya hasil pemotongan tersebut dianalisis dengan menggunakan gel agarosa atau akrilamid. Penentuan spesifitas alel HLA dibedakan berdasarkan pola fragmen endonukleolitik yang dihasilkan dari daerah pemotongan.

PCR-Sequence Specific Primers (PCR-SSP) merupakan metoda yang juga berkembang saat ini. Prinsip dari metoda ini adalah setiap grup alel diamplifikasi dengan pasangan pemicu (*primer*) yang benar-benar cocok terhadap grup tersebut. Dengan mengatur kondisi dengan ketat maka

pasangan pemicu tersebut tidak akan mengamplifikasi alel lain yang urutan basa nukleotidanya sangat mirip (*closely related*). Identifikasi alel didasarkan pada ada atau tidak adanya produk amplifikasi yang diobservasi melalui elektroforesis gel agarosa. Metoda ini banyak digunakan untuk penetapan HLA donor pada transplantasi organ, oleh karena dapat diselesaikan dalam waktu yang cepat (**Bunce, 1993**). Penetapan urutan (*sequencing*) nukleotida produk PCR meskipun mulanya dianggap sebagai cara yang sulit, sekarang telah dapat dilakukan untuk penetapan HLA klas I dan II. Hal ini dimungkinkan dengan dipergunakannya *solid phase sequencing* dari produk PCR yang ditandai biotin pada ujung 5' pada partikel magnetik yang dilapisi streptavidin (Dynabeads) atau *sequence based typing* (PCR-SBT). Pada metode PCR-SBT, salinan (*copy*) cDNA dari ekson polimorfik gen HLA yang diperoleh dari transkripsi terbalik (*reverse transcription*) total RNA diamplifikasi dengan PCR dan ditentukan urutannya dengan menggunakan metode Sanger (**Bidwell, 1994; Handono, 1998**).

Pemilihan metoda PCR di atas akan sangat tergantung pada jumlah sampel, kepentingan klinis, keperluan alat serta biaya. Oleh karena kemampuan untuk menetapkan alel yang lebih sensitif dan spesifik, kontribusi metoda tersebut pada histokompatibilitas dan imunogenetik baik untuk keperluan penelitian maupun klinis sangat dirasakan manfaatnya (**Bidwell, 1994; Handono, 1998**).

2.3 Asosiasi Sistem HLA Dengan Penyakit

2.3.1 HLA Dengan Penyakit

Beberapa penyakit diketahui mempunyai asosiasi dengan antigen HLA tertentu yang spesifik yang sudah jelas, antara lain dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Asosiasi antara antigen HLA dan penyakit

Antigen HLA	Penyakit	Resiko Relatif	Antigen HLA	Penyakit	Resiko Relatif
B27	Spondylitis ankylopoietica	90.1	Dw2	Multiple sclerosis	3.4
	Reiter syndrome	35.9		optic neuritis	2.9
	Yersinia arthritis	17.6	Dw4	rheumatoid arthritis	3.9
	Salmonella arthritis	17.6			
	arthritis psoritica	8.6	B5	Behcet's disease	7.4
	frozen shoulder	6.3		Ulcerative colitis	3.8
	juvenile rheumatoid arthritis	4.5	B7	Pernicious anaemia	1.7
	acute uveitis	9.4	B12	Cryptogenic Fibrosing Alveolitis	9.4
	Psoriasis pustularis	3.7	Bw35	Subacute thyroiditis	16.8
	Asbestosis	3.7	Bw38	Arthritis psoriatica	9.1
Dw3	gluten-sensitive enteropathy	73.0	Cw6**	Psoriasis vulgaris	3.6
	dermatitis herpetiformis	13.5	A2	Rheumatic vitium cordis	1.7
	Addison's disease	8.8	A10	Pemphigus	2.8
	auto-immune chronic thyreotoxicosis	6.8			
	juvenile-onset Diabetes	4.4	Bw16	Paralytic poliomyelitis	4.3
		3.8	A1	Recurrent herpes labialis	3.7
			A10		
B8	Myasthenia gravis	4.4	B18		
	Systemic lupus erythematosus	2.1	Dw2 haplo type	C2 deficiency	?
			B12	Retinoblastoma	0.4
			B5	Polycystic kidney disease	2.6
			A2	Congenital heart malformation	4.9
			Bw16	Manic depressive disorder	2.3
			A28	Schizofrenia	2.3
			A3	Idiopathic haemochromatosis	9.3

'De Vries, 1979'

Faktor yang perlu dipahami dalam asosiasi sistem HLA dengan suatu penyakit adalah:

1. Jumlah kuantitatif variasi molekul HLA
2. Variasi ekspresi molekul HLA
3. Variasi pola sistem HLA pada berbagai populasi yang berbeda. (De Vries, 1992; Judajana, 1994)

Umumnya penyakit yang berasosiasi dengan antigen HLA mempunyai beberapa karakteristik (Spickett, 1962; Fine, 1988) antara lain:

1. Penyebab penyakit maupun patofisiologi, tidak diketahui.
2. Mempunyai distribusi herediter lemah, sehingga tidak mempunyai asosiasi yang mutlak dengan antigen HLA tertentu.
3. Mempunyai asosiasi dengan kelainan imunologik.
4. Hanya berpengaruh sedikit atau tidak sama sekali terhadap reproduksi.

Besarnya asosiasi penyakit dengan antigen HLA tertentu dinyatakan dengan resiko relatif, yang menunjukkan besarnya kemungkinan individu dengan antigen HLA tertentu, untuk menderita penyakit tertentu, dibanding individu tanpa antigen HLA tersebut.

Mekanisme asosiasi antigen HLA dengan penyakit tertentu, hingga kini belum diketahui dengan jelas, dan masih merupakan hipotesis, antara lain dikemukakan 5 hipotesis (Schwartz, 1994) sebagai berikut:

1. Molekul HLA sebagai Reseptor Agen Penyebab

Hipotesis ini didasarkan pada kenyataan bahwa antigen HLA tertentu, dapat bekerja sebagai reseptor untuk agen penyebab penyakit, seperti virus, toksin dan lain

bahan asing. Kenyataan yang mendukung hipotesis tersebut, antara lain bersumber dari hasil observasi, yang menyatakan bahwa molekul pada permukaan sel, dapat bekerja sebagai reseptor terhadap virus. Contohnya adalah CD4 dapat bekerja sebagai reseptor untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).

Juga misalnya HLA-B27 adalah reseptor untuk virus penyebab spondilitis ankilosa, maka individu dengan antigen HLA-B27, mempunyai resiko lebih besar untuk menderita spondilitis ankilosa bila terinfeksi virus tersebut, daripada individu tanpa antigen HLA-B27.

2. HLA Merupakan Pilihan Untuk Peptida Antigenik

Hanya celah pengikat antigen molekul HLA tertentu saja yang dapat menerima fragmen peptida dari antigen penyebab penyakit. Jadi bila HLA-B27 merupakan satu-satunya molekul HLA kelas I yang dapat menerima peptida penyakit tersebut dan menyampaikannya kepada CD8 limfosit T, maka individu dengan antigen HLA-B27, mempunyai kecenderungan untuk menderita penyakit tersebut.

3. Reseptor Limfosit T Menentukan Predisposisi Penyakit.

Menurut hipotesis ini reseptor antigen dari limfosit T yang sebenarnya bertanggung jawab terhadap predisposisi seseorang terhadap penyakit. Walaupun demikian, oleh karena proses pengenalan antigen dibatasi oleh molekul HLA, maka asosiasi yang tampak adalah antara antigen HLA dengan penyakit.

Bila diumpamakan bahwa semua individu dengan antigen HLA-B27 dapat membentuk B27-processed antigen complex tertentu, tetapi hanya individu tertentu

saja yang memiliki B27-restricted T lymphocytes dengan reseptor sel T yang bersangkutan, yang dapat mengenal kompleks tersebut.

Bila proses pengenalan kompleks tersebut oleh limfosit T akan menyebabkan terjadinya penyakit spondilitis ankilosa, maka hanya individu dengan limfosit T tersebut yang dapat terkena penyakit tersebut.

4. Agen Penyebab Penyakit Menyerupai Molekul HLA (*Molecular Mimicry Hypothesis*)

Dalam hipotesis ini, antigen HLA yang berasosiasi dengan penyakit mempunyai sifat imunologik yang sama dengan agen penyebab penyakit.

Hipotesis ini meliputi dua alternatif:

1. Oleh karena persamaan sifat imunologik antara agen penyebab penyakit dengan antigen HLA, maka agen penyebab dianggap sebagai diri sendiri (self), sehingga tidak terjadi respons imun, dan dengan agen tersebut menyebabkan terjadinya penyakit tanpa gangguan dari sistem imun tuan rumah (host).
2. Agen penyebab penyakit dianggap sebagai bahan asing, sehingga timbul respons imun. Oleh karena adanya persamaan sifat imunologik antara gen penyebab penyakit dengan antigen HLA, maka respons imun juga ditujukan kepada antigen HLA, sehingga terjadi respons autoimun, dan terjadilah penyakit. Hipotesis tersebut didukung oleh hasil pengamatan sebagai berikut:

Antigen HLA-B27 berasosiasi dengan penyakit Reiter dan spondilitis ankilosa. Penyakit Reiter pada individu dengan antigen HLA-B27 mengikuti penderita disentri yang disebabkan *Shigella Flexneri*. Strain *Shigella* diketahui

mengandung plasmid yang memprogram sintesis suatu protein dengan rentangan 5 asam amino pada antigen HLA-B27. Akibat persamaan struktur dan sifat imunologik dari gen penyebab penyakit dan antigen HLA, maka hanya individu dengan antigen HLA-B27, yang peka terhadap penyakit tersebut.

5. Penampilan Molekul MHC Klas II Yang Menyimpang

Dalam hipotesis ini dikemukakan postulat bahwa induksi penampilan antigen HLA klas II pada permukaan sel (yang dalam keadaan normal tidak terjadi) menjadi penyebab timbulnya penyakit.

Molekul jaringan spesifik pada permukaan sel, secara tetap akan mengalami penggantian dan degradasi. Bila sel tersebut tidak menampilkan molekul HLA klas II, maka degradasi dari molekul jaringan spesifik tersebut tidak terjadi.

Sebaliknya bila sel jaringan spesifik terinduksi untuk menampilkan molekul HLA klas II, maka degradasi jaringan akan mengarah kepada terjadinya antigen processing. Selanjutnya fragmen peptida dari molekul jaringan spesifik akan terikat oleh sisi pengikat antigen dari molekul HLA klas II, sehingga membentuk kompleks imunogenik dan dimulainya respons imun terhadap molekul jaringan spesifik.

Postulat tersebut didukung oleh hasil pengamatan pada penyakit hipertiroid atau penyakit Grave, dimana ada antibodi yang ditujukan kepada reseptor untuk thyroid stimulating hormon yang berasosiasi dengan HLA-DR3.

2.3.2 HLA dengan penyakit lepra

Sejak diketahui bahwa sistem HLA memegang peranan penting dalam regulasi respons imun, maka banyak sudah penelitian yang dilakukan untuk menganalisa distribusi HLA-A dan HLA-B diantara penderita lepra dan kontrol yang sehat pada berbagai populasi.

Thorsby (1973) melaporkan tingginya frekuensi HLA-B21 pada seluruh penderita, kecuali tipe LL. Di Ethiopia, **Escobar (1973)** melaporkan bahwa ke dua HLA-A2 dan HLA-A3 frekuensinya rendah di Mexico, **Reis (1974)** menemukan tingginya frekuensi HLA-B5 dan HLA-B27 pada Tuberculoid dan HLA-Aw23 pada Lepromatous Leprosy. Di Brazilia, **Kreisler (1974)** melaporkan tingginya frekuensi HLA-B14 di Spanyol. Bagi populasi Asia, **Smith (1975)** melaporkan peningkatan HLA-B8 pada Lepromatous dan rendahnya HLA-A9 pada non-lepromatous Leprosy di India. Di Jepang telah pula dilaporkan hasil penelitian **Takata (1978)** yang juga menemukan frekuensi HLA-B8 pada penderita Lepra disana. Di Thailand, **Youngchaiyud (1977)** melaporkan adanya HLA-B40 pada semua penderita, dimana **Greiner (1978)** mendapatkan adanya hubungan yang erat antara HLA-B8 dengan Lepromatous Leprosy dan HLA-B17 dengan Tuberculoid pada etnik yang sama. **Chan (1979)** melaporkan adanya frekuensi yang tinggi HLA-B17 pada penderita Tuberculoid di Cina (seluruh hasil penelitian tersebut di atas dikutip dari **Job, 1980**).

Dengan melihat berbagai data mengenai HLA-A dan HLA-B yang dihubungkan dengan Lepra, maka kesimpulan yang diperoleh dari berbagai studi populasi tersebut adalah bahwa peranan HLA-A dan HLA-B determinants dalam Lepra tidak mengesankan dan lemah. Artinya HLA-A dan HLA-B tidak bertanggung

jawab secara langsung atas perbedaan kerentanan terhadap Lepra, tetapi muncul sebagai linkage disequilibrium dalam beberapa populasi, dengan hipotesis 'gen kerentanan' terhadap lepra (MC Devit and Bodmer, 1974).

Untuk mengatasi hal ini, maka pilihan utama adalah 'studi famili' (= analisis pedigree = analisis garis keturunan) yang kelihatannya dapat menggambarkan keterkaitan kontrol HLA dalam ketiadaan hubungan (= hubungan yang lemah) pada level populasi. De Vries (1979) di Suriname, yaitu peningkatan yang bermakna atas HLA-DR2 pada penderita Tuberculoid dan penurunan yang bermakna pada HLA-DR6. dengan demikian dapat disimpulkan bahwa HLA-DR2 merupakan pertanda genetik ('genetic marker') bagi kerentanan pada tipe Tuberculoid, dan mungkin HLA-DR6 merupakan pertanda genetik bagi resistensi terhadap Leprosy. Tetapi penelitian di Jepang (Izumi, 1982; Serjeantson, 1983) melaporkan bahwa HLA-DR2 mempunyai hubungan dengan Lepromatous Leprosy.

Berdasarkan diskusi data yang ditemukan pada penelitian HLA dan Lepra, maka kontrol keterkaitan HLA pada kerentanan terhadap Lepra Tuberculoid tampaknya mempunyai arti yang bermakna. Selanjutnya prediksi yang berdasarkan latar belakang fungsi HLA, menyatakan bahwa asosiasi yang lebih konsisten terjadi dengan HLA-DR atau dengan produk HLA-klas II (Van Eden, 1980).

Spikett (1962) menunjukkan bahwa bentuk-bentuk lepra ditentukan oleh faktor genetik serta memberi kesan adanya suatu gen tunggal yang irreguler, dominan sebagai pengontrol kerentanan pada seorang individu terhadap lepra. Spikett juga memberi petunjuk bahwa dalam suatu populasi telah terjadi penetrasi gen sebesar 83,3%. Penelitian Aycock, 1941, yang dikutip dari Job, 1980, terhadap family

analisis pedigree atas 2010 anak dari 587 pasangan mendapatkan hasil bahwa bilamana ibu saja yang lepra, maka 14% kelak anaknya cenderung menderita, jikalau bapak yang lepra maka 7% anaknya cenderung jadi lepra, tetapi bilamana ibu dan bapak lepra, maka 26% anak-anaknya kelak cenderung menderita penyakit ini.

Ali dan Ramanujam (1964; 1966) seperti dikutip **Chatterjee, 1978** melakukan penelitian terhadap 35 pasang kembar yang salah satu atau keduanya lepra. 19 diantaranya kembar monozygot (MZ), maka terdapat 82,6% peluang menderita lepra, sementara kembar dizygot (DZ) mempunyai resiko 16,7% menderita lepra kelak. Selanjutnya terhadap 12 kembar monozygot yang menderita lepra, ternyata 100% peluang dipunyai mereka untuk menderita lepra, yaitu 5 pasang mendapat tipe LL dan 7 pasang menderita tipe TT dikemudian harinya. Penelitian terbesar atas pasangan kembar (62 MZ dan 40 DZ) di India, oleh **Chakravarti dan Vogel (1973)**, diperoleh bukti kesesuaian MZ sebesar 59,7% dan DZ sebanyak 20%.

Oleh karena ternyata respon imun dikontrol secara genetik oleh sistem HLA, maka penelitian selanjutnya banyak dititik beratkan pada peran faktor HLA dalam kerentanan terhadap lepra (**Spikett, 1962, 1964; Beiquelman, 1965; Rea 1976, 1980; De Vries, 1976, 1979, 1980, 1986, 1987, 1988, 1989; Youngchaiyud, 1977; Nakajiman, 1977; Fine, 1979, 1981, 1988; Massoud, 1978; Van Eden, 1980, 1985; Izumi, 1982; Serjeantson, 1983; Keyn, 1985; Shauf, 1985; Kikuchi, 1986, 1987; Kim, 1987; Shields, 1987; Told, 1990; George, 1993; Svejgaard, 1994; Mehra, 1995; Dessoukey, 1996; Visentainer, 1997; Soebono, 1997**).