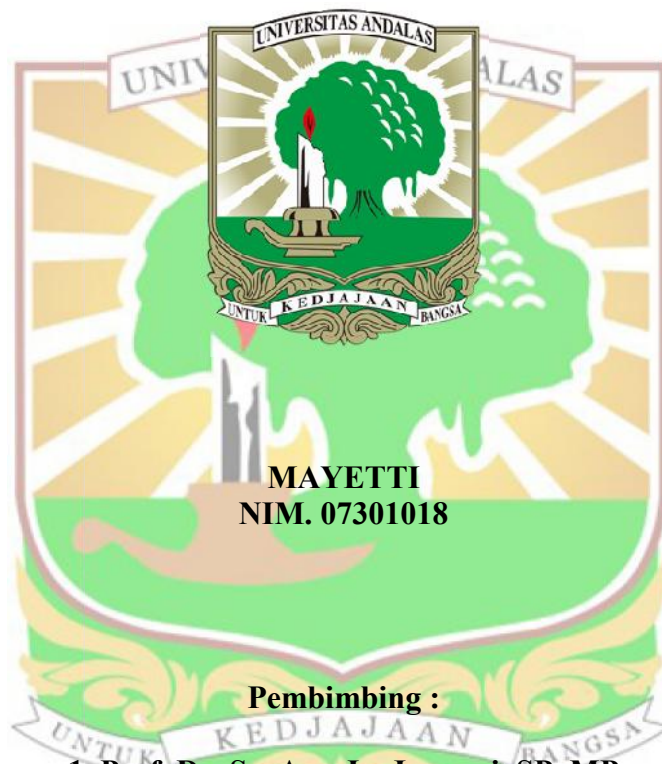


DISERTASI

**HUBUNGAN POLIMORFISME GEN DAN KADAR ANGIOPOETIN 2
SERTA KADAR *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR*
DENGAN TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT AKIBAT
INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK**



**MAYETTI
NIM. 07301018**

Pembimbing :

- 1. Prof. Dr. Sc. Arg. Ir. Jamsari, SP, MP**
- 2. Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA (K)**
- 3. Dr. dr. Dadang H. Somasetia, Sp.A (K)**

**PROGRAM PASCA SARJANA S3 BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2017**

**HUBUNGAN POLIMORFISME GEN DAN KADAR ANGIOPOETIN 2
SERTA KADAR *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR*
DENGAN TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT AKIBAT
INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK**

DISERTASI

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi S3 Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Andalas**



LEMBAR PERSETUJUAN

oleh

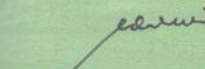
KOMISI PEMBIMBING

Ketua



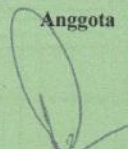
Prof. Dr. sc. arg. Ir. Jamsari, MP

Anggota



Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA (K)

Anggota



Dr. dr. Dadang H. Somasetia, Sp.A (K)

Menyetujui

**Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Universitas Andalas**



Prof. dr. Nur Indrawati Lipoeto, MSC, PhD, SpGK

SURAT PERNYATAAN

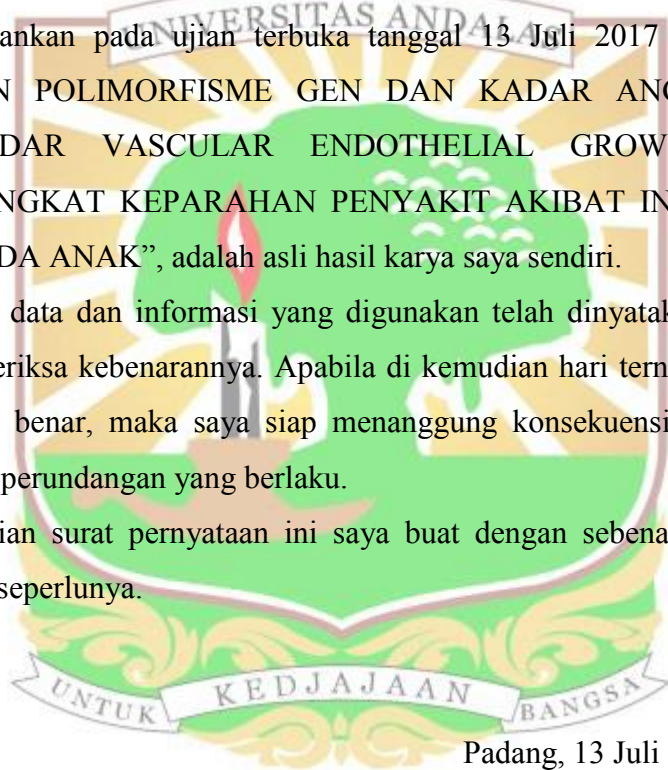
Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mayetti
Tempat / Tanggal lahir : Batusangkar/ 28 Mei 1958
NIM : 07301018
Program Studi : S3 Biomedik

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya bahwa disertasi saya yang telah dipertahankan pada ujian terbuka tanggal 13 Juli 2017 yang berjudul: “HUBUNGAN POLIMORFISME GEN DAN KADAR ANGIOPOETIN 2 SERTA KADAR VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DENGAN TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT AKIBAT INFEKSI VIRUS DENGUE PADA ANAK”, adalah asli hasil karya saya sendiri.

Semua data dan informasi yang digunakan telah dinyatakan secara jelas dan dapat diperiksa kebenarannya. Apabila di kemudian hari ternyata pernyataan saya ini tidak benar, maka saya siap menanggung konsekuensi sesuai dengan ketentuan dan perundangan yang berlaku.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan dapat dipergunakan seperlunya.



Padang, 13 Juli 2017

Saya yang menyatakan

Mayetti

**Naskah Disertasi ini telah dipertahankan pada
Ujian Terbuka S3 Biomedik FK Unand Padang**

Pada tanggal 13 Juli 2017

TIM PENGUJI

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Prof. Dr. dr. Yanwirasti, PA (K)	Penguji	
2.	Dr. dr. Hafni Bachtiar, MPH, FisPH, FisCM	Penguji	
3.	Dr. dr. Irza Wahid, Sp.PD-KHOM, FINASIM	Penguji	
4.	Dr. dr. Yuliarni Syafrita, Sp.S (K)	Penguji	
5.	Dr. dr. Dzulfikar Djalil Lukmanul Hakim, Sp.A (K), MKes, MMRS	Penguji	

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini. Disertasi ini merupakan karya tulis akademik sebagai syarat untuk menyelesaikan pendidikan tingkat Doktoral pada S3 Biomedik Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Penelitian ini berdasarkan adanya variasi munculan klinis pada infeksi virus Dengue mulai dari ringan berupa demam dengue (DD) hingga demam berdarah dengue (DBD) dan yang paling berat sindrom syok dengue (SSD). Penyakit yang diakibatkan oleh infeksi virus dengue, merupakan hasil interaksi multifaktorial yang meliputi faktor agen, faktor lingkungan dan faktor *host*. Pada penelitian ini ingin diketahui pengaruh faktor genetik berupa polimorfisme gen angiopoetin-2 (ANGPT-2) dengan kadar angiopoetin-2 serta kadar *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.

Penulis berharap penelitian ini dapat memberikan sumbangsih dalam pengembangan ilmu pengetahuan untuk dapat digunakan sebagai landasan teoritis pengaruh polimorfisme gen ANGPT-2, kadar ANGPT-2 dan kadar VEGF terhadap kebocoran plasma dan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue

Penulis menyadari bahwa selama proses penulisan disertasi ini tidak terlepas dari peran serta dan dukungan Ibu dan Bapak tim promotor, tim penguji, para guru besar dan seluruh staf pengajar program Pascasarjana S3 Biomedik Universitas Andalas. Penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, karena itu penulis mengharapkan saran, masukan maupun kritik yang membangun sehingga menghasilkan penelitian yang lebih baik di masa mendatang.

Padang, Juli 2017

Penulis

RINGKASAN

Hubungan Polimorfisme Gen dan Kadar Angiopoetin 2 serta *Kadar Vascular Endothelial Growth Factor* dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak

Mayetti

Manifestasi klinis infeksi virus dengue sangat bervariasi, mulai dari bentuk yang asimtomatik sampai bentuk sangat berat, yaitu sindrom syok dengue (SSD) yang dapat menyebabkan kematian. Beberapa penelitian terbaru menunjukkan adanya pengaruh genetik, berupa mutasi dan polimorfisme terhadap keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Beratnya penyakit ini disebabkan oleh integritas endotel vaskular. Angiopoetin-2 (ANGPT-2) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) merupakan protein angiogenik yang berperan dalam terjadinya kebocoran plasma. Beberapa penelitian menunjukkan adanya pengaruh polimorfisme pada gen ANGPT-2 pada beberapa penyakit. Polimorfisme gen ANGPT-2 pada anak dengan infeksi virus dengue belum pernah diteliti.

Tujuan penelitian adalah mengetahui hubungan polimorfisme gen dan kadar ANGPT-2 serta kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.

Penelitian ini merupakan suatu penelitian observasional dengan desain *cross sectional* pada anak dengan infeksi virus dengue di RSUP DR M Djamil Padang. Jumlah subjek penelitian 108 anak dikelompokkan berdasarkan tingkat keparahan infeksi dengue menurut WHO 2011, yaitu demam dengue (34), demam berdarah dengue (39), sindrom syok dengue (35). Pemeriksaan kadar angiopoetin-2 dan VEGF diperiksa dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) menggunakan ANGPT-2 & *Human Quantikine VEGF Immunoassay Kit*, Ray Biotech. Isolasi gen DNA menggunakan *genomic DNA Mini Kit*, PCR menggunakan metode *direct DNA sekuensing* dengan menggunakan 2 primer Exon 4-F, yaitu primer *forward* 5'-CACCCATATCCCACCTATCCT-3' dan primer *reverse* 5'-TGCCCAGTCTCATCCTTCTA-3'. Primer disintesis oleh *Integrated DNA Technologies* (IDT), Singapura, dilakukan analisis BLAST selanjutnya sekuensing pada semua sampel darah. Kadar ANGPT-2, VEGF dan jenis mutasi dihubungkan dengan tingkat keparahan penyakit.

Analisis statistik menggunakan uji *chi-square* dan anova dengan signifikansi ($p < 0,05$) jika distribusi data tidak normal maka disajikan dalam median dan diuji dengan Kruskal-Wallis, Mann-Whitney.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan kadar ANGPT-2 sesuai tingkat keparahan penyakit pada pasien anak dengan infeksi virus dengue, dan perbedaan tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Kadar VEGF cenderung meningkat sesuai tingkat keparahan penyakit namun tidak berbeda bermakna. Pada penelitian ini ditemukan adanya polimorfisme gen ANGPT-2 pada 8 dari 10 SNP yang diperiksa, yaitu pada SNP rs3020221, rs7834131, rs55633437, rs115694540, dan 4c.46981, dengan mutasi terbanyak pada rs3020221 (35,18%). Jenis mutasi terbanyak adalah mutasi heterozigot. Hasil penelitian ini juga menemukan adanya SNP baru yang belum terdaftar di NCBI yaitu 4c.46981 yang

berlokasi pada urutan basa ke 232 mengubah asam amino lysin menjadi glutamat. Kadar ANGPT-2 pada kelompok mutan rs7834131 lebih tinggi dibandingkan kelompok normal. Polimorfisme gen angiopoetin-2 tidak mempengaruhi tingkat keparahan penyakit.

Pada penelitian ini terdapat peningkatan bermakna kadar ANGPT-2 sesuai dengan tingkat keparahan penyakit, kadar VEGF juga meningkat tapi tidak bermakna. Polimorfisme gen ANGPT-2 pada rs7834131 diduga mempunyai efek protektif terhadap tingkat keparahan penyakit infeksi virus dengue anak.



SUMMARY

Association of Gene Polymorphism, Angiopoietin-2 Level and Vascular Endothelial Growth Factor Level with Dengue Virus Infection Severity In Children

Mayetti

Clinical manifestations of dengue virus infection vary widely, ranging from asymptomatic to heavy forms, dengue shock syndrome (DSS) which can cause death. Recent several studies have demonstrated that there is genetically influence such as mutation and polymorphism toward dengue infection severity. Angiopoietin-2 (ANGPT-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) are protein molecule that playing role on integrity and damage of endothelial. Several studies have shown that polymorphism influence in ANGPT-2 gene toward some diseases. On contrary ANGPT-2 gene polymorphism in infected children has been yet observed.

This study aimed to determine association of gene polymorphism, Angiopoietin-2 level and VEGF level with dengue infection severity in children. This study was observational method with cross sectional study in 108 infected dengue children in Dr. M. Djamil Hospital Padang. All patient was classified according to World Health Organization (WHO) 2011. Level of Angiopoietin-2 and VEGF were examined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using ANGPT-2 & Human Quantikine VEGF Immunoassay Kit, Ray Biotech. Gene DNA was isolated by using genomic DNA mini kit, PCR using direct DNA sequencing method by using two primary Exon 4-f; primary forward 5'-CACCCATATCCCACCTATCCT-3', and primary reverse 5'-TGCCAGTCTCATCCTTCTA-3'. Primary was synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT), Singapore then conducted BLAST analysis and sequencing all samples. Angiopoietin-2 level, VEGF and type of mutation are associated with dengue infection severity.

Analytical statistic was chi-square test and anova with significant level ($p < 0,05$) if distribution data was not normal so it was presented in median data and tested by Kruskali Wails, Mann-Whitney

The results showed an increase in ANGPT-2 levels according to the severity of the disease in pediatric patients with dengue virus infection, and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). While VEGF levels did not differ significantly between groups. In this study found ANGPT-2 gene polymorphism in 8 of 10 SNPs examined, which are in SNP rs3020221, rs7834131, rs55633437, rs115694540, and 4c.46981, with the most mutation at rs3020221 (35.18%). Most types of mutations are heterozygous mutations. The results of this study also found a new SNP that has not been registered in NCBI which is 4c.46981 located on the sequence of bases to 232 232 changing lysine to glutamine. The level of ANGPT-2 in the mutation group rs7834131 was higher than the normal. ANGPT-2 gene polymorphism didn't affect the severity of the disease.

Conclusion, there is an increase of ANGPT-2 levels according to the severity, VEGF levels is also increasing but it's not statistically significant.

ANGPT-2 gene polymorphism at rs7834131 has been assumed that has protective effect toward the severity of the disease due to dengue virus infection in children



ABSTRAK

Hubungan Polimorfisme Gen dan Kadar Angiopoetin-2 serta Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak

Mayetti

Latar Belakang. Manifestasi klinis infeksi virus dengue sangat bervariasi, mulai dari bentuk yang asimtomatik sampai bentuk sangat berat, yaitu sindrom syok dengue (SSD) yang dapat menyebabkan kematian. Beberapa penelitian menunjukkan adanya pengaruh genetik terhadap keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Beratnya penyakit disebabkan oleh integritas endotel vaskular. Angiopoetin-2 (ANGPT-2) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) merupakan protein angiogenik yang berperan dalam terjadinya kebocoran plasma. Beberapa penelitian menunjukkan pengaruh polimorfisme gen ANGPT-2 pada beberapa penyakit, namun pada infeksi virus dengue belum pernah diteliti.

Tujuan penelitian. Mengetahui hubungan polimorfisme gen dan kadar ANGPT-2 serta kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.

Metode. Penelitian merupakan suatu penelitian *cross sectional* observasional pada anak dengan infeksi virus dengue di RSUP Dr M Djamil Padang. Sebanyak 108 anak dikelompokkan berdasarkan tingkat keparahan infeksi dengue menurut WHO 2011, yaitu demam dengue, demam berdarah dengue, dan sindrom syok dengue. Pemeriksaan kadar ANGPT-2 dan VEGF dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* menggunakan Kit ANGPT-2 & Human *Quantikine* VEGF *Immunoassay*, Ray Biotech. Isolasi DNA menggunakan Mini Kit *genomic DNA*. Dilakukan *polymerase chain reaction* dan sekuensing DNA menggunakan 2 primer Exon 4-F, yaitu primer *forward* 5'-CACCCATATCCCCACCTATCCT-3' dan primer *reverse* 5'-TGCCCAGTCTCATCCTTCTA-3'. Primer disintesis oleh *Integrated DNA Technologies*, Singapura. Kadar ANGPT-2, VEGF dan jenis mutasi dihubungkan dengan tingkat keparahan penyakit. Analisis statistik menggunakan uji *chi-square* dan anova dengan signifikansi ($p < 0,05$). Jika distribusi data tidak normal, disajikan dalam median dan diuji dengan uji Kruskal Wallis atau Mann-Whitney.

Hasil. Terdapat peningkatan yang bermakna secara statistik ($p < 0,05$) kadar ANGPT-2 sesuai tingkat keparahan penyakit. Kadar VEGF cenderung meningkat sesuai tingkat keparahan penyakit namun tidak bermakna. Polimorfisme gen ANGPT-2 ditemukan pada 8 dari 10 SNP yang diperiksa, mutasi terbanyak pada Exon 4 rs3020221 G/A (35,18%). Ditemukan SNP baru (4c.46981), berlokasi pada urutan basa ke-232, mengubah asam amino *lysin* menjadi *glutamate*. Kadar ANGPT-2 kelompok mutan rs7834131 lebih tinggi dibandingkan non mutan. Polimorfisme gen ANGPT-2 tidak memengaruhi tingkat keparahan penyakit.

Kesimpulan. Terdapat peningkatan bermakna kadar ANGPT-2 sesuai tingkat keparahan penyakit, kadar VEGF juga meningkat tapi tidak bermakna. Polimorfisme pada rs7834131 diduga mempunyai efek protektif terhadap keparahan penyakit infeksi virus dengue pada anak.

Kata Kunci : Infeksi virus dengue, anak, ANGPT-2, polimorfisme gen, VEGF

ABSTRACT

Association of Gene Polymorphism, Angiopoietin-2 Level and Vascular Endothelial Growth Factor Level with Dengue Virus Infection Severity in Children

Mayetti

Background: Clinical manifestations of dengue virus infection vary widely, ranging from asymptomatic to heavy forms, dengue shock syndrome (DSS) which can cause death. Recent several studies have demonstrated that there is genetically influence such as mutation and polymorphism toward dengue infection severity. Angiopoietin-2 (ANGPT-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) are protein molecule that playing role on integrity and damage of endothelial. Several studies have shown that polymorphism influence in ANGPT-2 gene toward some diseases. On contrary ANGPT-2 gene polymorphism in infected children has been yet observed.

Objective: This study aimed to determine association of gene polymorphism, ANGPT-2 level and VEGF level with dengue infection severity in children.

Methods: This study was observational method with cross sectional study in 108 infected dengue children in Dr. M. Djamil Hospital Padang. All patient was classified according to World Health Organization (WHO) 2011 into 3 DF (34), DHF (39), and DSS (35). Level of ANGPT-2 and VEGF were examined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using ANGPT-2 & Human Quantikine VEGF Immunoassay Kit, Ray Biotech. Gene DNA was isolated by using genomic DNA mini kit, PCR using direct DNA sequencing method by using two primary Exon 4; primary forward 5'-CACCCATATCCCACCTATCCT-3', and primary reverse 5'-TGCCAGTCTCATCCTTCTA-3'. Primary was synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT), Singapore then conducted BLAST analysis and sequencing all samples. Angiopoietin-2 level, VEGF and type of mutation are associated with dengue infection severity. Analytical statistic was chi-square test and anova with significant level ($p < 0,05$) if distribution data was not normal so it was presented in median data and tested by Kruskali Wails, Mann-Whitney

Result: The results showed an increase in ANGPT-2 levels according to the severity and that increasing was statistically significant ($p < 0.05$). While VEGF levels increased along with severity of the disease though it was not significantly. Polymorphism was found in 8 of the 10 SNPs examined, and the most mutation occurred at Exon 4 rs3020221 G/A (35,18%). This study also found a new SNP 4c.46981 located on the sequence of bases to 232 changing lysine to glutamine. The level of ANGPT-2 in the mutation group rs7834131 was higher than the normal. ANGPT-2 gene polymorphism didn't affect the severity of the disease.

Conclusion: there is an increase of ANGPT-2 levels according to the severity, VEGF levels is also increasing but it's not statistically significant. ANGPT-2 gene polymorphism at rs7834131 has been assumed that has protective effect toward the severity of the disease due to dengue virus infection in children.

Keyword: dengue virus infection, children, ANGPT-2, gene polymorphism, VEGF

DAFTAR ISI

	Halaman
KULIT LUAR	i
KULIT DALAM	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iv
SURAT PERNYATAAN	v
LEMBAR PENGESAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	8
1.4. Manfaat penelitian	8
1.4.1. Manfaat pengembangan ilmu pengetahuan	8
1.4.2. Manfaat terapan	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1. Infeksi Virus Dengue	10
2.1.1. Etiologi dan Klasifikasi	10
2.1.2. Epidemiologi	11
2.1.3. Patogenesis Infeksi Virus Dengue dan Mekanisme Kebocoran Plasma	14
2.1.4. Spektrum Klinis	22
2.1.5. Tes Diagnostik	23
2.1.6. Kriteria Diagnosis Infeksi Virus Dengue	28
2.2. Angiopoietin	29
2.2.1. Struktur Kimia	29
2.2.2. Reseptor Tirosin Kinase-1 (Tie-1) dan Tirosin Kinase-2 (Tie-2)	32
2.2.3. Integritas Endotel dan Peranan Angiopoietin pada Kondisi kebocoran Plasma	33
2.2.4. Mekanisme Transduksi Sinyal dan Peranan ANGPT-1 dan ANGPT-2	36
2.2.5. Angiopoietin pada DBD	40

2.2.6. Gen Angiopoeitin dan Polimorfisme	42
2.3. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	49
2.3.1. Fungsi VEGF	49
2.3.2. Reseptor VEGF dan Mekanisme Aktivasi	50
2.3.3. VEGF pada Infeksi Virus Dengue	51
2.3.4. Hubungan ANGPT-2 dengan VEGF	52
2.3.5. Angiopoeitin-2 dan VEGF sebagai Marker Kebocoran Plasma pada Infeksi Virus Dengue	55
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	57
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	57
3.2. Keterangan Kerangka Konseptual	58
3.3. Hipotesis Penelitian	59
BAB 4 METODE PENELITIAN	60
4.1. Disain Penelitian	60
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian	60
4.3. Populasi dan Sampel	60
4.3.1. Populasi Penelitian	60
4.3.2. Sampel Penelitian	60
4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	61
4.4.1. Kriteria Inklusi	61
4.4.2. Kriteria Eksklusi	61
4.5. Perkiraan Besar dan Cara Pengambilan Sampel	61
4.5.1. Perkiraan Besar Sampel	61
4.5.2. Cara Pengambilan Sampel	61
4.6. Identifikasi Variabel	62
4.7. Definisi Operasional	62
4.8. Izin Penelitian	63
4.9. Prosedur Penelitian	64
4.9.1. Pengambilan Spesimen	64
4.9.2. Pemeriksaan IgG dan IgM Antidengue	65
4.9.3. Pemeriksaan Kadar Angiopoeitin-2	66
4.9.4. Pemeriksaan Kadar VEGF	68
4.9.5. Pemeriksaan Polimorfisme Gen Angiopoeitin-2	72
4.10. Pengumpulan dan Pengolahan Data	75
4.11. Alur Penelitian	76
BAB 5 HASIL PENELITIAN	77
5.1. Karakteristik Subjek Penelitian	77
5.2. Hubungan Kadar ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak	79
5.3. Hubungan Kadar VEGF pada dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak	81
5.4. Polimorfisme Gen ANGPT-2	83
5.4.1. Ekstraksi DNA (<i>Genomic DNA Purification</i>)	83
5.4.2. Konstruksi Primer untuk Gen ANGPT-2 Exon 4	84
5.4.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> Gen ANGPT-2 Exon 4	87

5.4.4. Sekuensing DNA	88
5.5. Polimorfisme Gen ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue	95
5.6. Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Kadar ANGPT-2	96
5.7. Hubungan Mutasi rs7834131 dengan Kadar ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue	98
5.8. Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue	99
BAB 6 PEMBAHASAN	101
6.1. Karakteristik Subjek Penelitian	101
6.2. Hubungan Kadar Angiopoeitin-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak	103
6.3. Hubungan Kadar VEGF dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak	105
6.4. Polimorfisme Gen ANGPT-2	107
6.5. Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Kadar ANGPT-2	109
6.6. Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue	110
6.7. Keterbatasan dan Kebaruan Penelitian	113
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	115
7.1. Kesimpulan	115
7.2. Saran	115

Daftar Pustaka



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Derajat DBD Berdasarkan Klasifikasi WHO 2011	29
Tabel 4.1 Komposisi Reaksi PCR Gen Angiopoeitin-2	73
Tabel 4.2 Program PCR Gen Angiopoeitin-2	73
Tabel 4.3 Sekuens Primer Gen Angiopoeitin-2	74
Tabel 5.1 Karakteristik Klinis dan Laboratorium Subjek Penelitian Berdasarkan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi	77
Tabel 5.2 Hubungan Kadar ANGPT-2 dengan Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue	79
Tabel 5.3 Hubungan Kadar VEGF dengan Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak	81
Tabel 5.4 Konstruksi Primer Gen ANGPT-2 Exon 4	83
Tabel 5.5 Karakteristik SNP Hasil Sekuensing Gen ANGPT-2	88
Tabel 5.6 Distribusi Mutasi <i>Genotype</i> Gen ANGPT-2 berdasarkan Motif SNP dan Tingkat Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue	93
Tabel 5.7 Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Kadar ANGPT-2	95
Tabel 5.8 Efek Mutasi A/G terhadap Peningkatan Kadar ANGPT-2 pada rs 7834131	96
Tabel 5.9 Hubungan Mutasi rs 7834131 dengan Kadar ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue	97
Tabel 5.10 Polimorfisme Gen ANGPT-2 Berdasarkan Tingkat Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue	98

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Struktur Virus Dengue 11
Gambar 2.2	Tren Insiden DBD di Indonesia 12
Gambar 2.3	Peta Epidemiologi DBD di Indonesia tahun 2010-2013 13
Gambar 2.4	Patogenesis Multifaktorial pada Infeksi Virus Dengue 14
Gambar 2.5	Teori <i>Secondary Heterologous Infection</i> 16
Gambar 2.6	Imunopatogenesis DBD 19
Gambar 2.7	Perubahan Permeabilitas Sel Endotel 21
Gambar 2.8	Spektrum Klinis Infeksi Virus Dengue 22
Gambar 2.9	Respon Immunologi pada Infeksi Virus Dengue 27
Gambar 2.10	Perbedaan Ligan Angiopoeitin 30
Gambar 2.11	Struktur Angiopoeitin-1 dan Angiopoeitin-2 31
Gambar 2.12	Struktur Molekul Reseptor Tie-1 dan Tie-2 33
Gambar 2.13	Keseimbangan Angiopoeitin dan Integritas Endotel 34
Gambar 2.14	Keseimbangan Angiopoeitin pada Kondisi Endotel Normal dan Respon Terhadap Inflamasi dan Hipoksia 34
Gambar 2.15	Pengaruh Angiopoeitin-2 pada Sel Endotel 35
Gambar 2.16	Mekanisme Molekuler Pelepasan Angiopoeitin-2 36
Gambar 2.17	Mekanisme Transduksi Sinyal Angiopoeitin 38
Gambar 2.18	Mekanisme ANGPT-2 Menghambat Aktivasi Sinyal Rho Kinase, PI3K/ AKT dan NF κ B 39
Gambar 2.19	Lokasi dan Struktur Gen Pengode Angiopoeitin 42
Gambar 2.20	Susunan Exon dan Intron pada Gen ANGPT-2 43
Gambar 2.21	Ekspresi Gen ANGPT-2 Normal pada Berbagai Jaringan 44
Gambar 2.22	Polimorfisme Gen Angiopoeitin-2 48
Gambar 2.23	Reseptor VEGF dan Ligan 51
Gambar 2.24	Regulasi Aktivitas VEGF oleh Infeksi Virus dan Imunitas 52
Gambar 2.25	Peranan VEGF dan ANGPT-2 pada Kebocoran 53

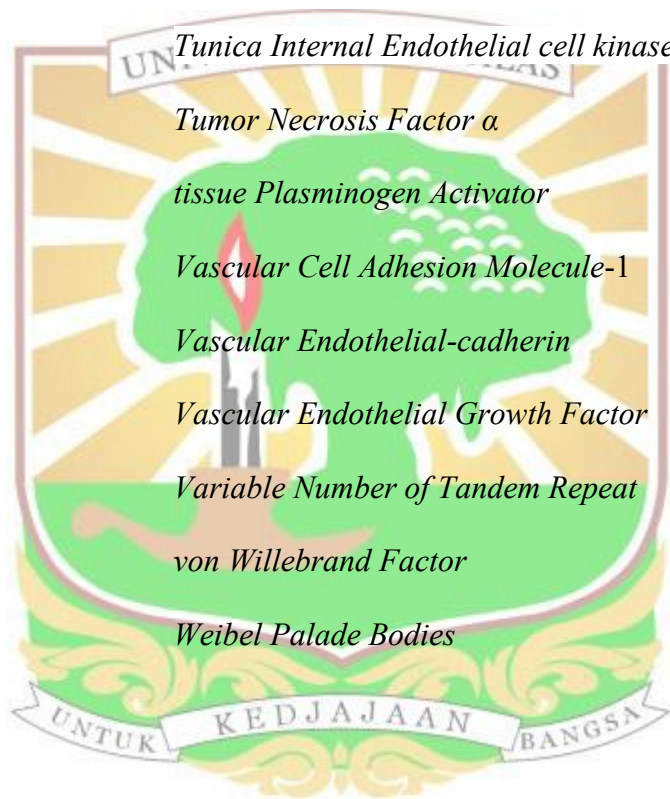
	Plasma	
Gambar 2.26	Pengaruh VEGF dan ANGPT terhadap Permeabilitas Vaskuler Endotel	54
Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian	56
Gambar 4.1	Alur Penelitian	75
Gambar 5.1	Perbedaan Kadar ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan akibat Infeksi Virus Dengue	78
Gambar 5.2	Perbedaan Kadar VEGF pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit akibat Infeksi Virus Dengue	80
Gambar 5.3	Hasil Elektroforesis dan Ekstraksi DNA	82
Gambar 5.4	Sekuen Gen ANGPT-2 (NG_029483.1) dan Posisi Penempelan Primer ANGPT-2-Exon4-F dan ANGPT-2-Exon4-R serta Posisi SNP yang Terdaftar di dbSNP NCBI dengan GMAF (<i>Global Minor Allele Frequency</i>) ≥ 0.01	84
Gambar 5.5	Hasil Primer-BLAST Pasangan Primer ANGPT-2 Exon 4	84
Gambar 5.6	Elektroforegram Hasil PCR ANGPT-2 Exon 4	85
Gambar 5.7	Hasil BLAST	87
Gambar 5.8	Hasil Sekuensing Gen ANGPT-2 Exon 4 Menggunakan Primer yang Telah Didisain	89
Gambar 5.9	<i>Multiple Alignment</i> Hasil <i>Sequencing</i> SNP rs7834131 (A/G)	90
Gambar 5.10	<i>MultipleAlignment</i> Hasil <i>Sequencing</i> SNP Terbaru c.46.981 A>G (ungu), rs149699486 (T/C), rs55633437 (G/T)	91
Gambar 5.11	<i>MultipleAlignment</i> Hasil <i>Sequencing</i> SNP rs3020221(G/A)	91
Gambar 5.12	<i>MultipleAlignment</i> Hasil <i>Sequencing</i> rs374966371 (A/T)	92

DAFTAR SINGKATAN

ADE	<i>Antibody Dependent Enhancement</i>
ANGPT-1	Angiopoeitin-1
ANGPT-2	Angiopoeitin-2
DD	Demam Dengue
DBD	Demam Berdarah Dengue
SSD	Sindrom Syok Dengue
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IRS3	<i>Insulin Receptor-Substrat-3</i>
IUGR	<i>Intra Uterine Growth Restriction</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	<i>Matrix Metallo Proteinase</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
NS1	<i>Non Structural glycoprotein 1</i>
P13K	<i>Phosphatidyl Inositol-3 Kinase</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAI	<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>
PGI2	<i>Prostaglandin</i>



PIP2	<i>Phosphatidul Inositol 4,5-bifosfat</i>
PIP3	<i>Phosphatidyl Inositol 3,4,5-trisphosphate</i>
PKB	<i>Protein Kinase-B</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sVEGFR-2	<i>soluble VEGF Receptor-2</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
Tie-2	<i>Tunica Internal Endothelial cell kinase 2</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VE-cadherin	<i>Vascular Endothelial-cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
WPB	<i>Weibel Palade Bodies</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi virus dengue masih merupakan salah satu masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Insiden infeksi virus dengue meningkat 30 kali lipat dalam 50 tahun terakhir, diperkirakan 50 juta orang terinfeksi setiap tahun dengan angka kematian mencapai 22.000 pertahun. Asia Tenggara merupakan wilayah endemis dengue tertinggi di dunia, dan jumlah kasus dengue di Indonesia paling tinggi se Asia Tenggara (WHO, 2014). Penelitian Karyanti (2014) menunjukkan bahwa angka kejadian infeksi dengue di Sumatera Barat mengalami peningkatan dari 20-25/100.000 penduduk tahun 2010 menjadi >55/100.000 penduduk pada tahun 2012, sedangkan kejadian DBD di RSUP M Djamil Padang pada tahun 2007 mencapai 259 kasus selama 1 tahun dengan insiden syok sebanyak 46% (Mayetti, 2010).

Manifestasi klinis infeksi virus dengue sangat bervariasi, mulai dari bentuk yang asimtomatik, demam yang tidak khas (*undifferentiated fever*), demam dengue (DD) sebagai bentuk klinis ringan, demam berdarah dengue (DBD) dan sindrom syok dengue(SSD) sebagai bentuk lebih berat yang dapat menyebabkan kematian. Pada bentuk yang lebih berat ini (DBD/SSD) terjadi kebocoran plasma akibat peningkatan permeabilitas vaskular yang merupakan tanda patognomonik DBD dan SSD (WHO, 2011).

Penyakit yang diakibatkan oleh infeksi virus dengue merupakan hasil interaksi multifaktor yang meliputi faktor agen, faktor lingkungan dan faktor

pejamu. Faktor agen meliputi virulensi virus, perbedaan virulensi serotipe virus dengue menyebabkan perbedaan manifestasi klinis. Kelemahan teori ini adalah tidak adanya bukti eksperimental, baik percobaan binatang maupun kultur jaringan yang dapat membuktikan perbedaan virulensi keempat serotipe virus dengue tersebut. (Dejnirattisai, 2010; Soegijanto, 2010; Sasaki *et al*, 2013). Teori lainnya adalah teori *secondary heterologous infection* yang menyatakan bahwa infeksi virus dengue kedua kali atau berikutnya dengan serotipe virus yang berbeda pada seorang individu akan bermanifestasi lebih berat dibandingkan infeksi primer. Antibodi heterolog yang telah ada setelah infeksi virus dengue sebelumnya akan mengenal virus dengue yang menginfeksi berikutnya dan membentuk kompleks antigen antibodi yang berikatan dengan *Fc reseptor* dari membran sel leukosit terutama makrofag. Antibodi ini bersifat heterolog sehingga virus tidak dinetralisir oleh tubuh yang akan menyebabkan virus bebas melakukan replikasi dalam sel makrofag. Teori ini memiliki kelemahan yaitu tidak dapat menjelaskan terjadinya kasus DBD/ SSD pada bayi dan anak yang mengalami infeksi primer (Wagenaar *et al.*, 2004).

Teori lain adalah teori *antibody dependent enhancement* (ADE), menurut teori ini infeksi virus dengue akan menyebabkan sekresi mediator inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α), Interleukin (IL)-1, *Platelet Activating Factor*(PAF), IL-6 dan histamin sehingga terjadi peningkatan permeabilitas vaskular dan kebocoran plasma, protein dan elektrolit. Keadaan ini dapat berkembang menjadi hipovolemia dan syok (Soegeng, 2010).

Penelitian di Haiti menunjukkan bahwa walaupun infeksi virus dengue disebabkan oleh serotipe yang beragam, namun tidak satupun yang mengalami

DBD dan SSD (Halstead *et al.*, 2001). Penelitian di Kuba mendapatkan tingkat keparahan infeksi virus dengue lebih ringan pada ras kulit hitam dibandingkan kulit putih. Kedua hal ini memunculkan teori tentang adanya pengaruh genetik, berupa mutasi dan polimorfisme yang berpengaruh terhadap tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue (Kouri *et al.*, 1998).

Beberapa penelitian polimorfisme genetik baik yang berupa *human leucocyte antigen* (HLA) dan non-HLA telah teridentifikasi dan memiliki pengaruh terhadap kerentanan dan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. *Human leucocyte antigen* disandi oleh *major histocompatibility complex* (MHC) dan gen pada kromosom 6, HLA berfungsi untuk mempresentasikan protein antigen ke reseptornya pada limfosit T (epitop sel T spesifik) untuk mengaktifkan respons imun seluler. Beberapa polimorfisme gen yang terkait HLA dan memengaruhi infeksi virus dengue antara lain kelompok HLA kelas I; HLA-A1, HLA-A2, dan HLA-B *blank*, lebih sering dijumpai pada pasien DBD. Sebaliknya, HLA-B13, HLA-B14, dan HLA-A29 lebih jarang dijumpai pada pasien DBD. Pasien dengan HLA-A*2402/03/10 dua kali lebih sering mengalami DBD/SSD dibanding pasien tanpa HLA tersebut. Pada kelompok HLA kelas II; grup HLA-B15, yakni HLA-B62, B76, dan B77, memberikan efek protektif terhadap DBD pada infeksi primer. Sementara itu, individu dengan HLA-B46 (yang juga berasal dari serotipe grup HLA-B15) memiliki kerentanan menderita DBD akibat infeksi sekunder sebaliknya HLA-B44 memiliki efek protektif terhadap DBD pada infeksi sekunder. Beberapa *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada kelompok non-HLA juga telah diidentifikasi memiliki pengaruh terhadap infeksi virus dengue seperti pada gen yang mengkode MBL2,

TNF- α , *Fc reseptor*, CTLA-4, TGF- β 1, HPA, DC-SIGN, TAP, VDR dan JAK 1 (Wagenaar *et al.*, 2004; Harapan *et al.*, 2013).

Kebocoran plasma merupakan faktor utama yang membedakan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Kebocoran plasma pada DBD terjadi akibat peningkatan permeabilitas kapiler yang bersifat sementara dan berlangsung tidak lebih dari 48 jam yang kemudian diikuti dengan resolusi spontan. Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan erat antara disfungsi endotel dan peningkatan permeabilitas vaskular yang menyebabkan kebocoran plasma, elektrolit dan protein. Namun, penelitian lain menunjukkan bahwa kebocoran plasma tersebut bersifat sementara tanpa cedera endotel sehingga memunculkan teori lain adanya keterlibatan mediator inflamasi yang mencetuskan peningkatan permeabilitas vaskular (Srikiatkhachorn *et al.*, 2007).

Endotel adalah suatu sel berlapis tunggal yang melapisi bagian dalam pembuluh darah. Disfungsi endotel merupakan bagian penting dari patogenesis infeksi virus dengue (Wallez *et al.*, 2008). Integritas vaskular dan kebocoran plasma pada infeksi virus dengue dipengaruhi antara lain oleh (1) sitokin proinflamasi, pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6 dan IL-12 dari sel monosit yang terinfeksi virus dengue akan mengaktifasi sel endotel (Dalrymple *et al.*, 2012). Sitokin tersebut akan meningkatkan ekspresi molekul adhesi seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *selectin* dan *integrin ligan* (Whalen *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 1997).(2) aktivasi protein angiogenik yang memengaruhi integritas *junctional* endotel yaitu *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan angiopoietin (ANGPT) (Parikh *et al.*, 2006; Gavard *et al.*, 2008).

Angiopoietin merupakan suatu molekul glikoprotein yang berikatan dengan reseptor tirosin kinase (Tie-2). Angiopoietin terdiri dari ANGPT-1 sampai ANGPT-4. Namun, hanya ANGPT-1 dan ANGPT-2 yang bermakna secara klinis dan banyak dipublikasikan. Pada keadaan normal kadar ANGPT-1 lebih tinggi dari ANGPT-2. Ikatan antara ANGPT-1 dengan reseptor Tie-2 akan mencetuskan sinyal elektrik melalui jalur *Phosphatidyl Inositol-3-Kinase* (PI3K) yang mengakibatkan *recruitment* sel perisit ke endotel sehingga integritas endotel tetap terjaga. Angiopoietin-1 juga memiliki kemampuan menghentikan efek fosforilasi VEGF terhadap VE-cadherin. Namun, pada kondisi jejas, hipoksia dan infeksi bakteri terjadi ketidakseimbangan rasio ANGPT-1 dan ANGPT-2, berupa peningkatan kadar ekspresi ANGPT-2. Peningkatan kadar ekspresi ANGPT-2 akan menyebabkan pergeseran ikatan reseptor Tie-2 dengan ANGPT-1 sehingga akan terjadi gangguan integritas endotel dan terjadilah peningkatan permeabilitas vaskular dan kebocoran plasma (Parikh *et al.*, 2006; Gavard *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan ANGPT dengan kebocoran plasma pada penyakit tertentu seperti retinopati diabetes (Hackett *et al.*, 2000), pertumbuhan janin terganggu (IUGR) (Malamitsi-Puchnet *et al.*, 2006), preeklamsia (Hadidy *et al.*, 2013), efusi pleura (Kalomenidis *et al.*, 2006), tumor (Yu *et al.*, 2001), sepsis (Siner *et al.*, 2009) dan *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) (Parikh *et al.*, 2006). Penelitian Michels *et al.* (2012), dan Van de Weg *et al.* (2014), serta Rampengan *et al.* (2015) melaporkan adanya peningkatan kadar ANGPT-2 pada kelompok DBD dan SSD namun tidak pada kelompok DD dan anak sehat.

Protein angiogenik lain yang berperan pada terjadinya kebocoran plasma adalah VEGF. Molekul VEGF memiliki 3 reseptor yaitu *soluble vascular endothelial growth factor receptor* (sVEGFR) 1, sVEGFR-2, sVEGFR-3. Kadar VEGF dilaporkan meningkat signifikan pada pasien DBD dan SSD dibandingkan kontrol (Srikiatkachornet *al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2005). Pada infeksi virus dengue berat dilaporkan terjadi peningkatan sVEGFR-1 dan penurunan kadar sVEGFR-2 (Srikiatkachornet *al.*, 2007). Penurunan kadar sVEGFR-2 pada infeksi virus dengue disebabkan efek langsung virus dengue yang menyebabkan menurunnya produksi sVEGFR-2 dan peningkatan ekspresi sVEGFR-2 pada permukaan sel endotel. Efek ini akan mengakibatkan peningkatan kadar VEGF bebas didalam plasma yang memicu fosforilasi VE-chaderin dan terjadinya kebocoran plasma (Srikiatkachornet *al.*, 2007). Kadar VEGF bebas juga akan menguatkan efek kebocoran plasma yang ditimbulkan oleh ANGPT-2 (Thomas, 2008). Kadar ANGPT-2 dan sVEGFR-2 dilaporkan merupakan protein penanda utama terjadinya kebocoran plasma pada DBD (Weg *et al.*, 2014).

Gen pengode protein ANGPT-2 berlokasi pada kromosom 8 dan merupakan gen yang sangat polimorfik. Variasi genetik ANGPT-2 menyebabkan perbedaan variasi ekspresi protein ANGPT dan angiogenesis vaskular. Penelitian Su Li *et al.* (2009) menunjukkan bahwa variasi genetik ANGPT-2 berhubungan dengan meningkatnya risiko menderita ARDS. Pasien yang memiliki varian alel tSNP (rs2515475) memiliki risiko tinggi mengalami ARDS. Demikian juga penelitian Huber yang melaporkan bahwa polimorfisme ANGPT-2 akan menyebabkan gangguan proses angiogenesis dan berhubungan dengan risiko keguguran berulang dan kematian intrauterin (Huber *et al.*, 2005). Penelitian

polimorfisme gen ANGPT-2 pada infeksi virus dengue belum pernah dilakukan, sehingga peneliti tertarik untuk melihat adanya hubungan antara peranan genetik berupa polimorfisme gen, kadar ANGPT-2 dan kadar VEGF yang memengaruhi integritas endotel dan mengakibatkan kebocoran plasma yang berdampak terhadap keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat hubungan kadar ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak ?
2. Apakah terdapat hubungan kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak ?
3. Apakah terdapat polimorfisme gen ANGPT-2 pada anak dengan infeksi virus dengue ?
4. Apakah terdapat hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan kadar ANGPT-2 pada berbagai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak ?
5. Apakah terdapat hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui hubungan polimorfisme gen dan kadar ANGPT-2 serta kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui hubungan kadar ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak
2. Mengetahui hubungan kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak
3. Membuktikan polimorfisme gen ANGPT-2 pada anak dengan infeksi virus dengue
4. Mengetahui hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan kadar ANGPT-2 pada berbagai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak
5. Mengetahui hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat pengembangan ilmu pengetahuan

Dalam ranah pengembangan ilmu pengetahuan, penelitian ini bermanfaat sebagai landasan teoritis pengaruh polimorfisme gen ANGPT-2, kadar ANGPT-2 dan kadar VEGF terhadap kebocoran plasma dan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue.

1.4.2 Manfaat Terapan

1. Penelitian ini dapat digunakan untuk mengetahui kerentanan genetik individu terhadap infeksi virus dengue.
2. Meningkatkan kewaspadaan terhadap infeksi virus dengue pada individu yang memiliki kerentanan genetik.

3. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai modalitas pemeriksaan untuk menentukan prognosis penyakit infeksi dengue pada anak dengan kerentanan genetik tertentu.
4. Hasil penelitian ini dapat dijadikan pertimbangan untuk mengembangkan anti ANGPT untuk mencegah terjadinya perembesan plasma dan sebagai modalitas terapi pada infeksi virus dengue.



BAB 2

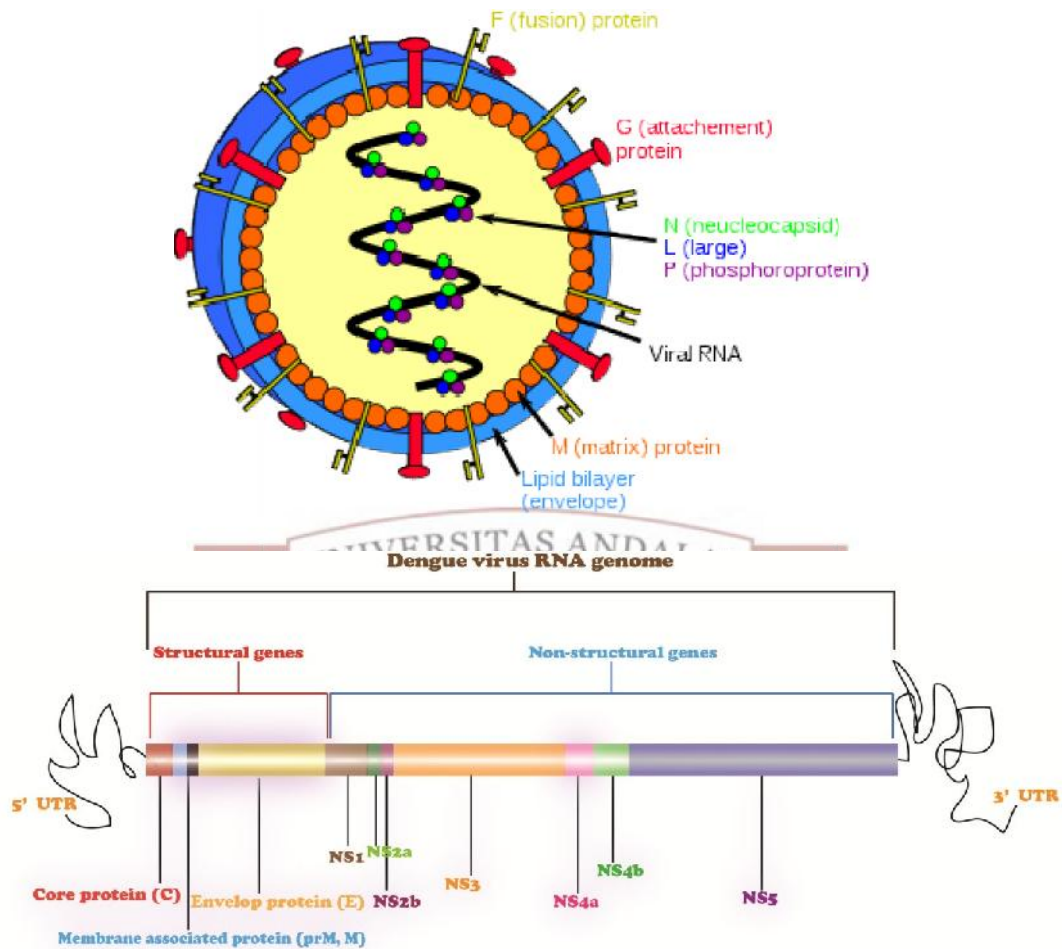
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infeksi Virus Dengue

2.1.1 Etiologi dan Klasifikasi

Demam dengue (DD), DBD dan SSD adalah penyakit akibat infeksi virus dengue yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Virus dengue termasuk famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* yang terdiri dari 4 serotipe, yaitu *Den-1*, *Den-2*, *Den-3*, dan *Den-4*. Serotipe yang dapat ditemukan dan yang paling banyak beredar disuatu negara atau area geografis tertentu berbeda-beda. Di Indonesia, keempat serotipe tersebut dapat ditemukan dan *Den-3* merupakan galur yang paling virulen dan sering menimbulkan wabah (Taib, 2009; Soegijanto, 2010; UKK Infeksi dan Penyakit Tropis, 2014), serupa dengan penelitian di Thailand yang menemukan penyebab wabah yang dominan adalah virus *Den-3* (Endy *et al.*, 2002)

Virus dengue virionnya tersusun oleh suatu untaian genom *ribonucleic acid* (RNA) dikelilingi oleh nukleokapsid, ditutupi oleh suatu selubung/*envelope* (E) dari lipid yang mengandung 2 protein, yaitu selubung protein (E) dan protein membran (M). Genom RNA virus dengue mengode tiga protein struktural, kapsid (C), membran (M) dan selubung (E) serta tujuh protein nonstruktural, yaitu NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b dan NS5 (Soegijanto, 2010)



Gambar 2.1 Struktur Virus Dengue (Idrees *et al.*, 2012)

Manifestasi klinis infeksi virus dengue sangat luas dapat bersifat asimtomatis, demam yang tidak khas atau sulit dibedakan dengan infeksi virus lain, DD, DBD dan SSD. Demam dengue dibedakan dengan DBD/SSD karena adanya kebocoran plasma (*plasma leakage*) yang mendasari patogenesis pada DBD/ SSD (UKK Infeksi dan Penyakit Tropis, 2014).

2.1.2 Epidemiologi

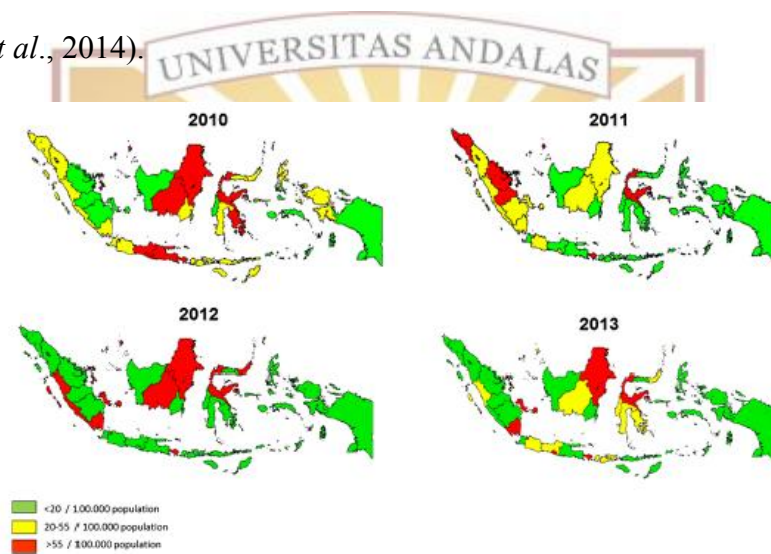
Penyakit akibat infeksi virus dengue pertama kali dilaporkan terjadi di Manila tahun 1953, kemudian menyebar ke kawasan Asia Tenggara, bahkan ke seluruh dunia. Di Indonesia pertama kali ditemukan di kota Surabaya

pada tahun 1968, tetapi konfirmasi virologis baru diperoleh pada tahun 1972. Sejak pertama kali ditemukan jumlah kasus infeksi virus dengue menunjukkan kecenderungan meningkat, baik dalam jumlah maupun luas wilayah yang terjangkit. Angka kesakitan rata-rata infeksi virus dengue di Indonesia mulai dari 0.05 per 100.000 penduduk pada tahun 1968 menjadi 35,19 per 100.000 penduduk pada kejadian luar biasa (KLB) terbesar tahun 1998 dengan jumlah kematian mencapai 1.414 orang(Siner *et al.*, 2009). Sebuah penelitian epidemiologi di Indonesia mendapatkan kejadian DBD di Indonesia meningkat dari 0.05/100.000 pada tahun 1968 menjadi 34-40/100.000 pada tahun 2013 ($p < 0.001$). Kejadian epidemik tertinggi terjadi pada tahun 2010, ditemukan 86 kasus dari 100.000. Kejadian *outbreak*DBD terjadi pada tahun 1973, 1988, 1998, 2007 dan 2010. Pada penelitian epidemiologi ini didapatkan bahwa kejadian DBD lebih sering pada anak usia 5 hingga 14 tahun(Karyantiet *al.*, 2014)



Gambar 2.2 Tren insiden DBD per 100.000 Penduduk dari Tahun 1968 Hingga 2013 di Indonesia (Karyantiet *al.*, 2014)

Sebuah peta epidemiologi menunjukkan kejadian DBD di Indonesia dari tahun 2010 hingga 2013 dapat dilihat pada Gambar 2.3. Pada tahun 2013, lima besar provinsi dengan kejadian tertinggi adalah Bali (168.5/100.000), DKI Jakarta (104.0/100.000), DI Yogyakarta (96.0/100.000), Kalimantan Timur (92.7/100,000) dan Sulawesi Tenggara (66.8/100.000). Peta epidemiologi menunjukkan bahwa Sumatera Barat berada pada zona kuning dengan kejadian 20-25/100.000 penduduk kecuali pada tahun 2012 meningkat menjadi >55/100.000 penduduk (Karyanti *et al.*, 2014).

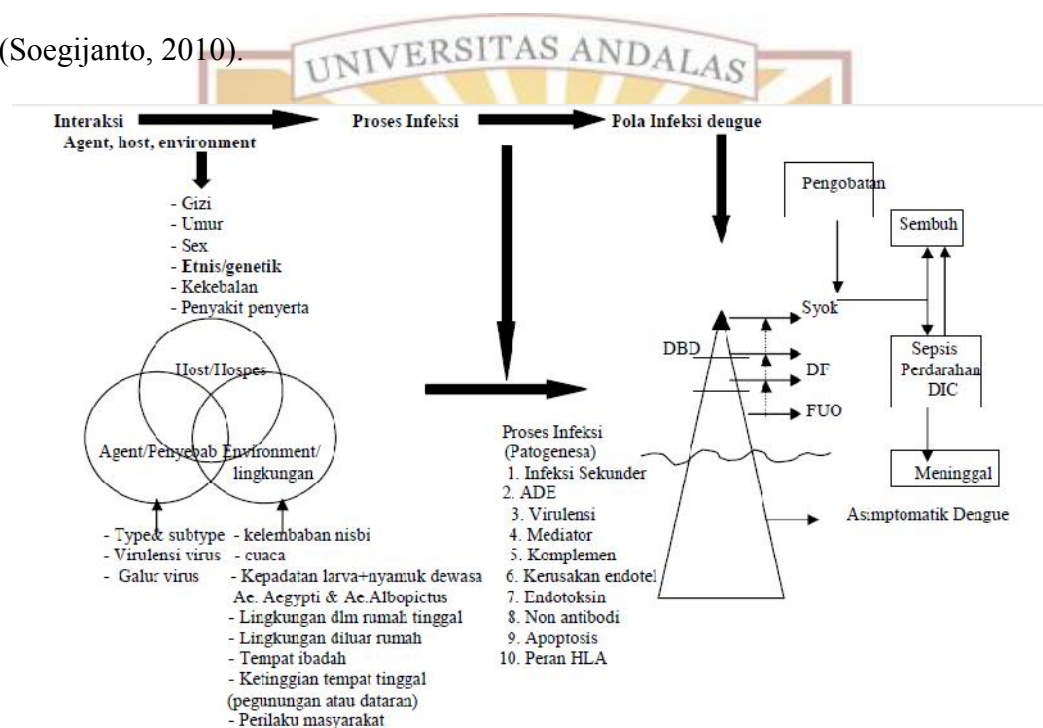


Gambar 2.3 Peta Epidemiologi DBD di Indonesia Tahun 2010-2013
(Karyanti *et al.*, 2014)

Sekitar 20%-30% pasien DBD berlanjut dan menimbulkan syok. Demam berdarah dengue yang berlanjut menjadi syok (SSD) merupakan masalah serius pada anak. Rampengan *et al.* (2015) di Manado melaporkan bahwa syok terjadi 60% dari kasus DBD dengan kematian mencapai 6,6%. Hadinegoro (1996) melaporkan bahwa prevalensi syok pada DBD di seluruh rumah sakit di Indonesia mencapai 16%-40% dengan angka kematian 5,7%. Sebagian besar kematian terjadi karena syok dan syok berulang.

2.1.3 Patogenesis Infeksi Virus Dengue dan Mekanisme Kebocoran Plasma

Penyakit infeksi virus dengue merupakan hasil interaksi multifaktorial yaitu faktor agen atau penyebab, faktor lingkungan dan faktor *host*. Faktor agen meliputi tipe, galur virus dan virulensi virus. Faktor lingkungan dipengaruhi oleh kelembaban, cuaca, ketinggian tempat tinggal dan perilaku masyarakat. Faktor *host* terdiri dari status gizi, umur, jenis kelamin, kerentanan genetik atau etnis, status imun dan penyakit penyerta, seperti yang terlihat pada Gambar 2.4 (Soegijanto, 2010).



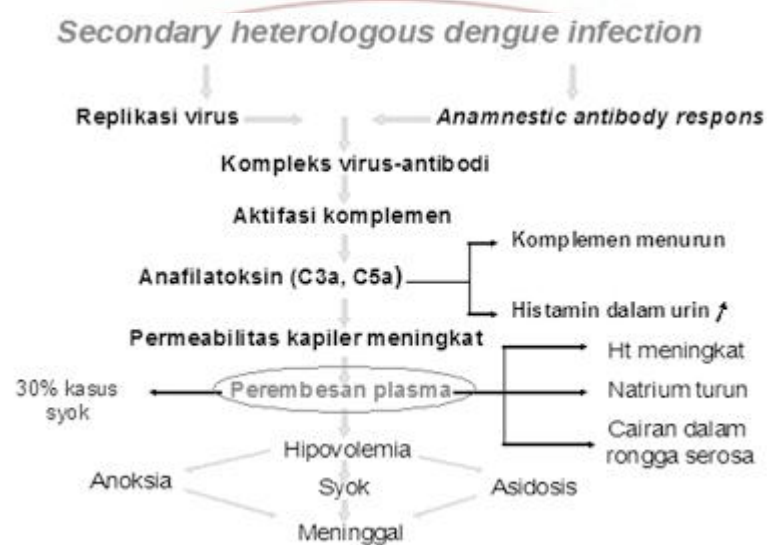
Gambar 2. 4 Patogenesis Multifaktorial pada Infeksi Virus Dengue (Soegijanto, 2010).

Penyakit infeksi virus dengue ditularkan melalui gigitan nyamuk. Saat nyamuk menghisap darah manusia yang sedang mengalami viremia, virus masuk kedalam tubuh nyamuk dan nyamuk kemudian menularkan virus kemanusia lain (UKK Infeksi dan Penyakit Tropis, 2014). Setelah virus dengue masuk kedalam tubuh manusia, virus berkembang biak dalam sel retikuloendotel (sel kuffer hepar, endotel pembuluh darah, nodus limfatikus, sumsum tulang serta paru-paru) dan

diikuti dengan viremia yang berlangsung 5-7 hari. Virus akan masuk ke peredaran darah dan ditangkap oleh makrofag. Makrofag akan segera bereaksi dengan menangkap virus dan memprosesnya sehingga makrofag menjadi *antigen presenting cell* (APC). Antigen yang menempel di makrofag ini akan mengaktifasi sel T helper dan menarik makrofag lain untuk memfagosit virus lebih banyak. Sel T helper akan mengaktifasi sel T sitotoksik yang akan melisis makrofag yang sudah memfagosit virus, disamping itu juga akan mengaktifkan sel B sehingga terjadi pelepasan antibodi (Soegijanto, 2010).

Banyak teori yang menjelaskan tentang patogenesis DBD antara lain; teori antigen antibodi, teori imunopatologi, teori *infection enhancing antibody*, teori mediator, teori apoptosis, dan *secondary heterologous infection*. Namun dua teori yang banyak dianut dalam menjelaskan patogenesis infeksi virus dengue adalah hipotesis infeksi sekunder (*secondary heterologous infection theory*) dan hipotesis *immune enhancement*. Menurut hipotesis infeksi sekunder, sebagai akibat infeksi sekunder oleh tipe virus dengue yang berbeda, respons antibodi pasien akan terpicu. Hal ini akan menyebabkan proliferasi dan transformasi limfosit dan menghasilkan titer tinggi IgG antidengue. Proliferasi limfosit juga menyebabkan tingginya angka replikasi virus dengue, sehingga mengakibatkan terbentuknya kompleks virus-antibodi yang selanjutnya mengaktifasi sistem komplemen. Pelepasan C3a dan C5a menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah dan merembesnya cairan ke ekstrasvaskular. Hal ini terbukti dengan terjadinya peningkatan kadar hematokrit, penurunan natrium dan terdapatnya cairan dalam rongga serosa seperti yang terlihat pada gambar 2.5. Hipotesis *immune enhancement* menyatakan secara tidak langsung bahwa

mereka yang terkena infeksi kedua oleh virus heterolog mempunyai risiko lebih besar untuk menderita DBD berat. Antibodi heterolog yang telah ada akan mengenali virus dengan *serotype* yang berbeda kemudian membentuk kompleks antigen-antibodi yang berikatan dengan *Fc reseptor* dari membran leukosit terutama makrofag. Proses ini mengakibatkan sekresi mediator vasoaktif yang kemudian menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, sehingga mengakibatkan keadaan hipovolemia dan syok (Soegijanto, 2010).



Gambar 2.5. Teori *secondary heterologous infection* (Soegijanto, 2010)

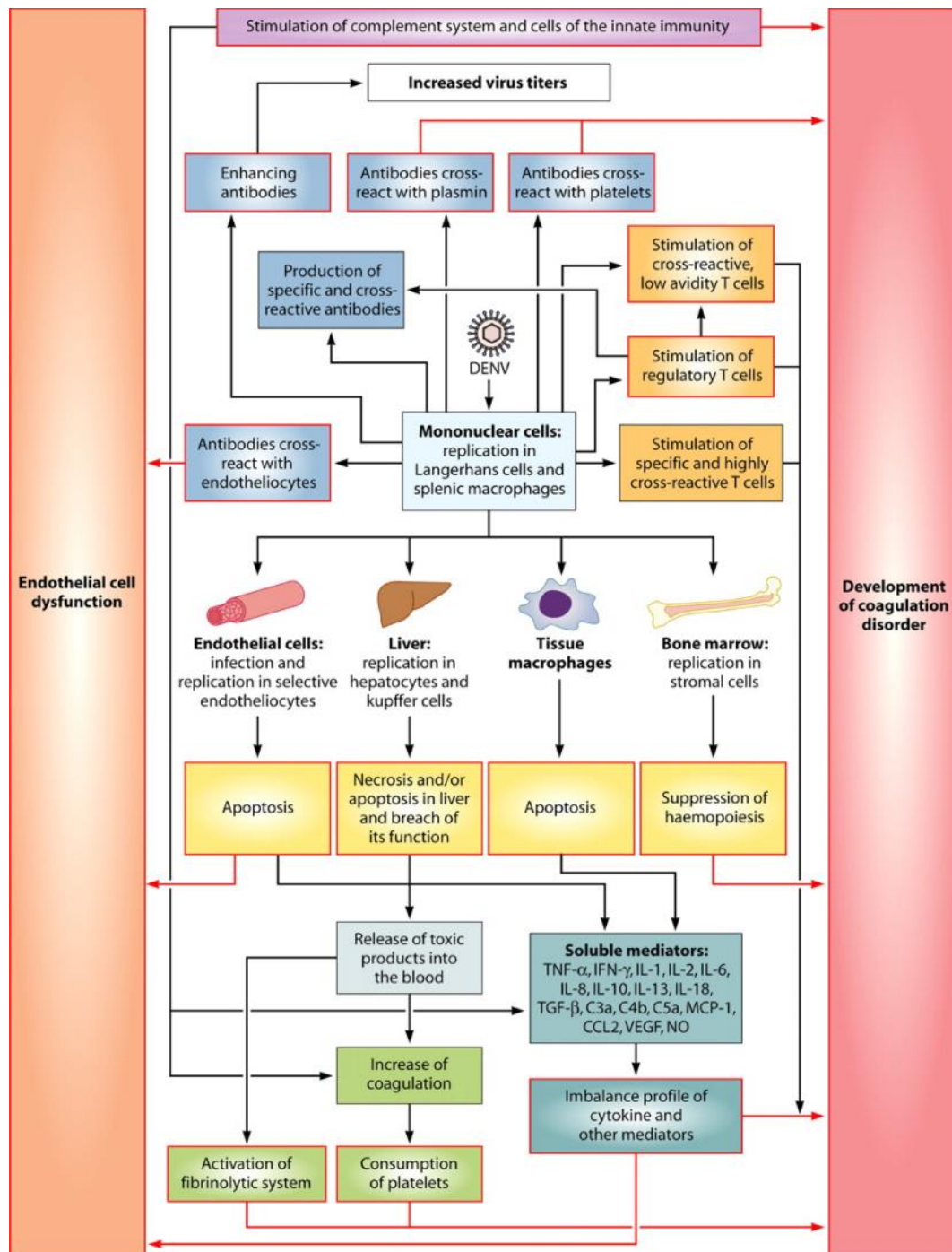
Antigen dengue ditemukan di berbagai sel termasuk monosit, kupffer, makrofag alveoli, limfosit darah tepi dan limpa, juga sel endotel di hepar dan paru-paru (Limonta *et al.*, 2007). Monosit atau makrofag dan limfosit merupakan sel-sel utama yang diinfeksi oleh virus dengue (Jessie *et al.*, 2004). Infeksi virus dengue terhadap sel monosit, makrofag, dan dendrit menyebabkan produksi mediator-mediator yang memengaruhi fungsi sel endotel. Monosit yang terinfeksi menginduksi perubahan permeabilitas sel endotel umbilikus manusia karena terkait dengan pengaruh TNF- α . Infeksi virus dengue dapat menginduksi maturasi sel dendrit (Ho *et al.*, 2001). Sel dendrit virus dengue dapat memicu ekspresi

enzim *matrix metalloprotease* (MMP), MMP-2 dan MMP-9, meningkatkan permeabilitas yang berakibat kebocoran plasma dan perdarahan. Aktivitas sel T lebih tinggi pada DBD dibanding pada DD menunjukkan bahwa pada infeksi sekunder sel T CD8+ spesifik berjumlah lebih banyak dari infeksi sebelumnya. Sitokin dan kemokin yang diinduksi oleh sel T berdampak pada permeabilitas vaskular sebagai penyebab kebocoran plasma pada DBD. Risiko DBD yang tinggi pada infeksi sekunder memberi gambaran bahwa antibodi dari reaksi silang yang tidak menetralkan antigen virus sebelumnya, dapat meningkatkan penyerapan virus oleh sel pejamu dan akan memicu replikasinya. Kemudian sistem imun bawaan dan adaptif akan teraktivasi secara intensif (Mongkolsapaya *et al.*, 2003).

Aktivasi reaksi silang sel T spesifik dengue dapat menurunkan respons pembersihan virus dan memicu produksi mediator-mediator proinflamasi dan vasoaktif. Mediator-mediator yang dilepaskan oleh sel T dan sel-sel yang terinfeksi berkombinasi dengan komplemen yang teraktivasi protein virus dan kompleks imun memudahkan peningkatan permeabilitas vaskular (Gambar 2.6). Sel yang terinfeksi virus dengue dapat memproduksi sejumlah sitokin proinflamasi termasuk TNF- α , IL-6, IL-8, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, dan RANTES. Beberapa penelitian menunjukkan *viral load* yang lebih tinggi di antara pasien DBD dibanding demam dengue. *Viral load* mencapai puncaknya saat periode febris dan menurun drastis saat afebris. Kadar NS1 dijumpai lebih tinggi pada kondisi yang lebih berat, sesuai dengan perannya dalam mengaktivasi komplemen penyebab kebocoran plasma. Antibodi terhadap NS1 yang terikat sel endotel dapat memicu apoptosis, sementara pada trombosit akan memicu aktivasi *platelet*. Virus dengue juga berperan mengubah produksi faktor koagulasi sel

endotel seperti naiknya respons plasminogen jaringan, trombomodulin, *Protease Activated Receptor-1*, *tissue factor receptor*, turunnya *responstissue factor inhibitor*, dan aktivasi protein C. Virus dengue berpengaruh langsung pada sel endotel dengan memodulasi molekul permukaan sel dan ekspresi reseptor sitokin. Mediator yang dilepaskan oleh sel T dan sel-sel yang terinfeksi virus dapat mengakibatkan peningkatan permeabilitas vaskular dan koagulopati (Lee *et al.*, 2006).





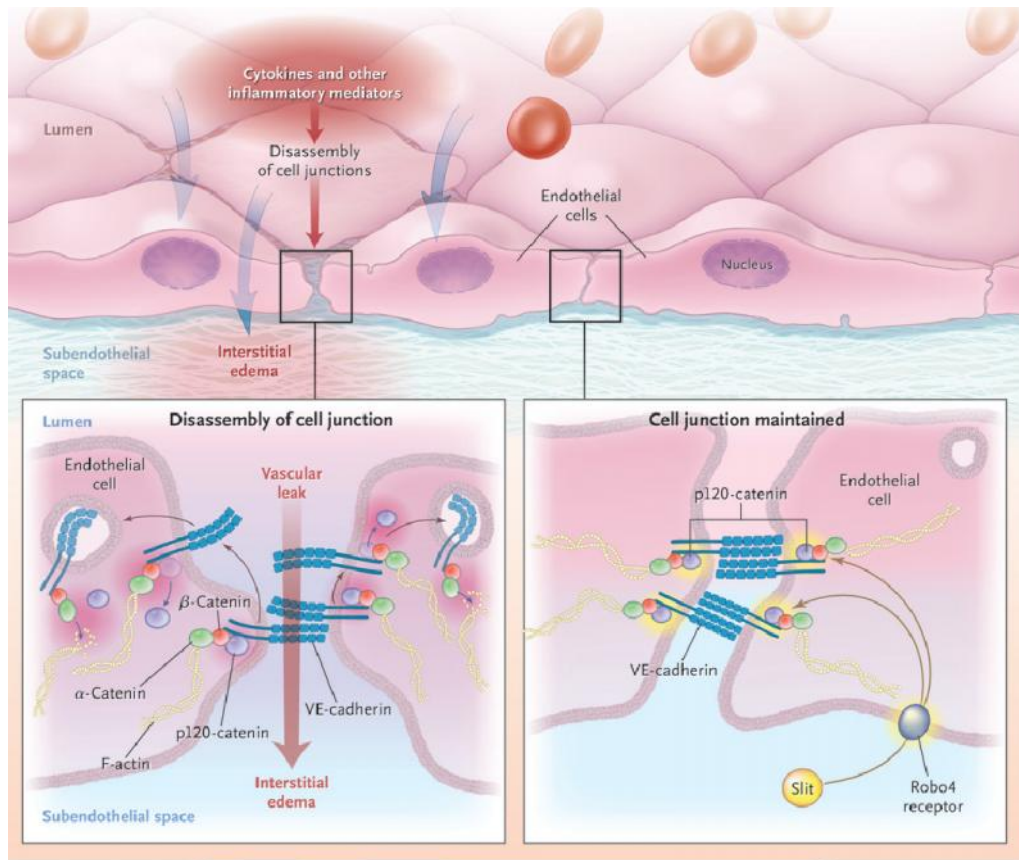
Gambar 2.6 Immunopatogenesis DBD (Srikiatkachorn *et al.*, 2007)

Sel endotel mengontrol lintasan komponen plasma dan sel-sel yang bersirkulasi dari darah ke jaringan. Fungsi ini akan hilang atau melemah pada beberapa kondisi seperti inflamasi, sepsis, iskemia, dan diabetes. Permeabilitas yang meningkat dapat disertai gangguan nyata pembuluh darah seperti

perdarahan, adhesi leukosit, formasi trombus mikrovaskular, syok, dan kegagalan fungsi organ. Berbeda dengan agen lain, histamin, trombin, dan *Vascular Endothelial Growth Factor*(VEGF) masih dapat mengembalikan kondisi awal permeabilitas sehingga tidak memengaruhi kelangsungan hidup sel endotel dan respons fungsional. Peningkatan permeabilitas sebenarnya memiliki efek positif seperti meningkatnya akses nutrisi, oksigenasi jaringan, naiknya pasokan leukosit ke area inflamasi, dan induksi dari akumulasi fibrinogen dan fibrin di dinding pembuluh darah. Keadaan ini bila tidak diimbangi dengan reabsorpsi cairan limfe, akan timbul edema yang menyebabkan iskemia jaringan, akumulasi cairan stroma, dan naiknya tekanan intersisial yang berujung pada nekrosis dan gangguan transportasi obat(Dejana *et al.*, 2008).

Permeabilitas endotel diatur oleh pembukaan dan penutupan dinamis dari ikatan simpang (*adherens junctions*) sel-sel. Ikatan simpang sel-sel ini dibentuk oleh keluarga *cadherin*. *VE-cadherin* secara ketat mengatur kompleks protein yang bergabung dengan sel-sel endotel dan mencegah migrasi leukosit dan kebocoran vaskular. Perpindahan *VE-cadherin* dari membran sel ke bagian interior sel mampu memicu terjadinya celah antar sel endotel dan peningkatan permeabilitas vaskular. Mediator inflamasi seperti VEGF dikenal sebagai penyebab rusaknya integritas p120-catenin dan *VE-cadherin*. Infeksi virus dengue pada sel endotel mengakibatkan penurunan sVEGFR-2 (*soluble VEGF Receptor-2*) dan peningkatan ekspresi membran VEGFR-2; kadar sVEGFR-2 secara progresif menurun selama perjalanan penyakit karena korelasinya dengan *viral load* dalam plasma. Rekombinasi *Slit* dapat melemahkan permeabilitas endotel karena sitokin dan endotoksin, untuk itu diperlukan efek proteksi reseptor

Robo4 yang meningkatkan ikatan molekul membran sel, *VE-cadherin* seperti terlihat pada Gambar 2.7 (Cabello-Gutierrez *et al.*, 2009).



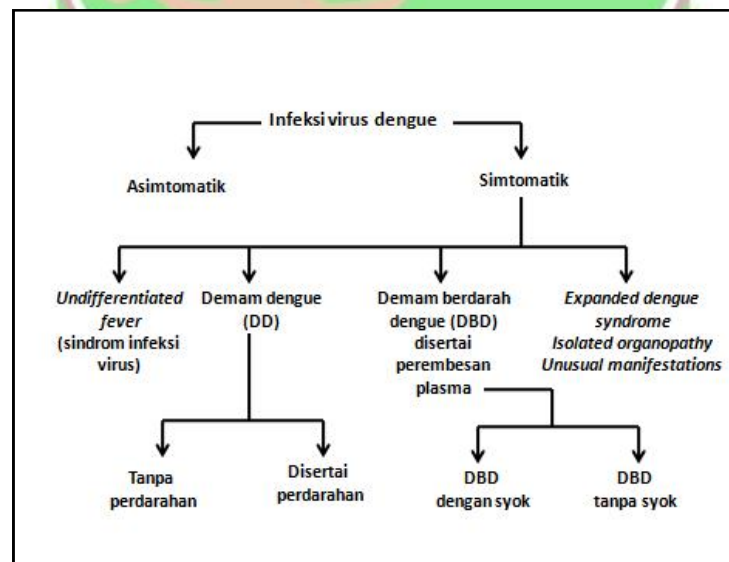
Gambar 2.7 Perubahan Permeabilitas Sel Endotel (Cabello-Gutierrez *et al.*, 2009).

Pada DBD/ SSD terbentuk kompleks antigen-antibodi yang selanjutnya akan mengakibatkan aktivasi sistem komplemen. Pelepasan C3a (complement 3a) dan C5 (complement 5) akibat aktivasi C3 dan C5 menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah dan merembesnya plasma dari ruang intravaskular ke ruang ekstrasvaskular. Pada pasien dengan syok berat, volume plasma dapat berkurang lebih dari 30% dan berlangsung selama 24-48 jam. Perembesan plasma ini terbukti dengan adanya peningkatan kadar hematokrit, penurunan kadar natrium, dan terdapatnya cairan di dalam rongga serosa (efusi pleura, asites). Syok yang tidak ditanggulangi secara adekuat akan menyebabkan

asidosis dan anoksia yang dapat berakhir fatal. Oleh karena itu, tatalaksana syok sangat penting guna mencegah kematian (Jessie *et al.*, 2004).

2.1.4 Spektrum Klinis

Berdasarkan kriteria diagnosis WHO 2011, gejala klinis infeksi virus dengue dapat asimtomatik dan simtomatik. Infeksi virus dengue simtomatik terbagi menjadi *undifferentiated fever* (sindrom infeksi virus) dan DD sebagai infeksi ringan, sedangkan infeksi berat terdiri dari DBD dan *expanded dengue syndrome* atau *isolated organopathy*. Kebocoran plasma merupakan tanda patognomonik DBD, sedangkan kelainan organ lain serta manifestasi yang tidak lazim dikelompokkan ke dalam *expanded dengue syndrome* atau *isolated organopathy*. Secara klinis, DD dapat disertai dengan perdarahan atau tidak, sedangkan DBD dapat disertai syok atau tidak seperti terlihat pada Gambar 2.8 (WHO, 2011; UKK Infeksi dan Penyakit Tropis, 2014).



Gambar 2.8. Spektrum Klinis Infeksi Virus Dengue (WHO, 2011)

2.1.5 Tes Diagnostik

Terdapat beberapa tes diagnostik yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya infeksi virus dengue (Darwish *et al.*, 2015).

1. Isolasi virus

Isolasi virus dianggap sebagai alat tes diagnostik yang terbaik pada beberapa literatur dan memiliki keuntungan yang dapat digunakan untuk menganalisa virus. Teknik isolasi virus memiliki efektivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR), hanya saja teknik ini akan berhasil jika dilakukan sebelum timbulnya onset demam. Pengambilan darah terbaik adalah dalam 3 hari fase awal demam yaitu saat terjadinya viremia, sebelum terbentuknya antibodi antidengue. Sampel dapat berupa serum, plasma atau *buffy-coat* darah-heparinized (Darwish *et al.*, 2015). Meskipun memiliki spesifitas 100%, uji sensitivitas untuk isolasi virus masih lemah, yakni sekitar 63%. Isolasi virus memerlukan peralatan laboratorium yang mahal dan zat kimia tertentu serta membutuhkan waktu yang lama. Isolasi virus dapat memakan waktu sehari-hari hingga berminggu-minggu. Kesuksesan teknik isolasi juga dipengaruhi oleh banyak hal, diantaranya jumlah virus yang *viable*, kesiapan sampel yang tidak baik serta konstruksi dari kompleks virus-antibodi. Pada teknik isolasi virus hanya virus yang aktif yang dapat diproduksi dalam sel kultur (Darwish *et al.*, 2015).

2. *Reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Polymerase chain reaction adalah proses amplifikasi dari DNA untuk memproduksi cDNA dari RNA target dengan menggunakan teknik reaksi *reverse transcription*. PCR telah digunakan secara luas untuk mendeteksi

DENV atau virus lain. Keunggulan RT-PCR juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi serotipe virus dengue sehingga banyak digunakan dalam protokol penegakan diagnosis infeksi DENV (Darwish *et al.*, 2015).

Sampel untuk pemeriksaan RT-PCR diambil dari darah, serum, plasma, jaringan, nyamuk, sel yang terinfeksi, sistem saraf pusat, saliva dan urin. Kesulitan teknik ini adalah dalam hal menentukan regio koding yang bermakna, dikarenakan sifat dari genom DENV yang tidak stabil. Faktor lain yang memengaruhi keberhasilan teknik ini adalah banyaknya jumlah RNA yang digunakan pada tahap RT, parameter PCR serta kondisi enzim yang digunakan. Secara umum RT-PCR memiliki 2 kelemahan; adanya false-negatif akibat variasi dari serotipe DENV dan tidak adanya protokol standar dalam melakukan RT-PCR (Darwish *et al.*, 2015).

Pemeriksaan infeksi DENV dengan PCR hanya bisa dideteksi pada saat fase infeksi dan tidak lagi efisien jika dilakukan setelah hari ke 5-7. Selain itu pemeriksaan RT-PCR tidak tepat jika dilakukan di daerah endemis karena memerlukan biaya yang besar dan tenaga analisis yang terlatih (Darwish *et al.*, 2015).

3. Antigen NS1 (*nonstructural glycoprotein-1*)

Gejala awal infeksi virus dengue sering tidak khas sehingga terjadi keterlambatan diagnosis. Perjalanan penyakit bisa sangat cepat dalam beberapa hari, bahkan dalam hitungan jam penderita bisa masuk dalam keadaan kritis (Setiabudi, 2011). Untuk menghindari keterlambatan diagnosis, perlu diketahui deteksi dini terhadap infeksi virus ini. Saat ini dikembangkan suatu metode pemeriksaan baru terhadap antigen nonstruktural 1 (NS1) yang dapat

mendeteksi infeksi virus dengue lebih awal, bahkan pada hari pertama onset demam karena protein NS1 bersirkulasi dalam konsentrasi tinggi dalam darah pasien selama awal fase akut (Dussart *et al.*, 2006; Alcon *et al.*, 2002).

Nonstructural glycoprotein-1 merupakan glikoprotein yang *highly conserved*, yang tampaknya merupakan regio penting dalam viabilitas virus namun tidak memiliki aktivitas biologis. Tidak seperti glikoprotein virus yang lain, NS1 diproduksi baik dalam bentuk yang berhubungan dengan membran maupun dalam bentuk yang disekresikan (Dussart *et al.*, 2006).

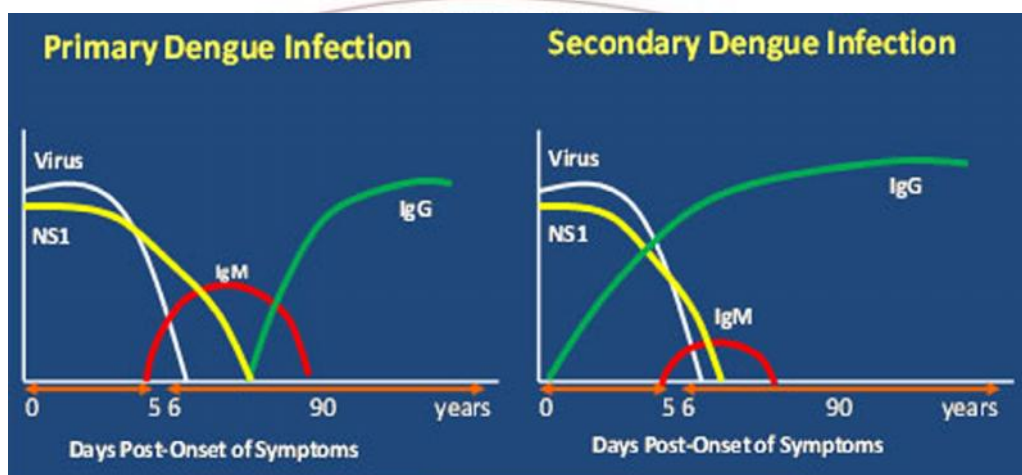
Antigen NS1 terdapat baik pada infeksi primer maupun sekunder. Antigen NS1 dapat dideteksi dalam 9 hari pertama demam yang terdapat pada semua serotipe; DEN-1 (terbanyak), DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 (Alconet *et al.*, 2002). Libraty *et al.* (2002) meneliti 18 orang anak dengan DBD, didapatkan NS1 sudah terdeteksi pada hari ke-2 demam dan kadar tertinggi didapatkan pada hari ke-3 demam, sedangkan kadar terendah didapatkan pada hari ke-8 demam. Dussart *et al.* (2006) meneliti 299 pasien DD di Perancis didapatkan sensitivitas NS1 pada hari ke 1-4 demam adalah 87,6% dan 43,5% pada hari ke 5-10 demam. Penelitian lain dilakukan Kumarasamy *et al.* (2007) diperoleh hasil bahwa sensitivitas reagen komersial antigen dengue NS1 untuk infeksi virus dengue akut 93,4% dan spesifisitas 100%, nilai ramal positif dan negatif masing-masing 100% dan 97,3%. Lastere *et al.* (2010) meneliti 181 pasien DBD di Polinesia, Perancis, mendapatkan sensitivitas NS1 76,5% dan spesifisitas 96,2%. Megariani *et al.* (2014) di Padang mendapatkan *rapid test* NS1 memiliki sensitivitas 92,3%, spesifisitas 95,8%. Persentase NS1 positif lebih besar pada hari ke-3 demam dibandingkan hari ke-2, tetapi tidak didapatkan nilai yang

bermakna secara statistik. Sensitivitas NS1 yang tinggi pada fase awal demam karena protein NS1 bersirkulasi dalam konsentrasi tinggi dalam darah pasien selama awal fase akut, baik pada infeksi primer maupun sekunder. Kadar NS1 yang tinggi sampai hari ke-5 demam berhubungan dengan waktu terjadinya viremia karena merupakan periode replikasi virus dan belum terdapatnya antibodi terhadap virus. Kadar viremia dan kadar NS1 juga tergantung pada karakteristik intrinsik dari *strain* virus yang menginfeksi dan status imunitas dari penderita sendiri (Nimmannitya, 2008).

Untuk diagnosis dini sejak hari pertama sampai ketiga panas, NS1 menunjukkan sensitivitas yang terbaik (30-50%) dengan spesifisitas 100%. Tidak seperti pemeriksaan yang lain, yaitu peningkatan sensitivitas pada spesimen yang diambil pada hari-hari selanjutnya, sensitivitas NS1 hanya mencapai 50-60%. Rendahnya angka sensitivitas NS1, meskipun spesifisitasnya 100% disebabkan oleh tingginya angka infeksi virus dengue sekunder atau bahkan tersier di daerah hiperendemik seperti di Indonesia, yaitu kompleks imun yang terjadi akan mengurangi sensitivitas (Suwandono *et al.*, 2011). Kit pemeriksaan antigen NS1 di Indonesia ada dua macam, yaitu dari Panbio dan BioRad, keduanya memakai prinsip metode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Saat ini juga sudah terdapat reagen NS1 dalam bentuk *rapid test immunochromatography* (ICT).

4. Immunoglobulin (Ig)M dan IgG antidengue, baik dengan cara *rapid test* menggunakan metode *immunochromatography* (ICT) ataupun *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Setelah infeksi virus dengue masuk dalam tubuh manusia, virus berkembang biak dalam sel retikuloendotel yang selanjutnya diikuti dengan viremia yang berlangsung selama 5-7 hari. Akibat infeksi virus ini muncul respons imun baik humoral maupun selular, antara lain anti netralisasi, anti-hemaglutinin, anti komplemen. Antibodi yang muncul pada umumnya adalah IgG dan IgM, pada infeksi dengue primer antibodi mulai terbentuk, dan pada infeksi sekunder kadar antibodi yang telah ada meningkat (*booster effect*) (Garcia *et al.*, 2010).



Gambar 2.9 Respons Imunologi pada Infeksi Dengue (Oliveira *et al.*, 2009)

Antibodi terhadap virus dengue dapat ditemukan di dalam darah. Immunoglobulin M terdeteksi pada hari ke-5 pada 80% pasien, dan 90% pasien pada hari ke 10. Titer tertinggi di observasi pada hari ke-15 dan menurun hingga tak terdeteksi dalam 2 hingga 3 bulan sesudah infeksi. Kinetik kadar IgG berbeda dengan kinetik kadar antibodi IgM. Oleh karena itu, kinetik antibodi IgG harus dibedakan antara infeksi primer dan sekunder. Pada infeksi primer antibodi IgG meningkat sekitar demam hari ke-14, sedangkan pada infeksi sekunder antibodi IgG meningkat pada hari kedua. Oleh karena itu, diagnosis dini infeksi primer hanya dapat ditegakkan dengan mendeteksi antibodi IgM setelah hari ke-5 demam, diagnosis infeksi sekunder dapat

ditegakkan lebih dini dengan adanya peningkatan antibodi IgG dan IgM yang cepat (Garcia *et al.*, 2010; WHO, 1997).

Kegunaan antibodi IgM pada awal sakit (1-4 hari) sangatlah rendah (0-35%). Namun, pada hari ke 5-7 menunjukkan sensitivitas yang sangat tinggi (93-100%) dengan spesifisitas dari awal sebesar 100%. Penggunaan gabungan uji NS1 dan antibodi IgM seperti yang banyak diusulkan menunjukkan sensitivitas yang sama dengan penggunaan NS1 di hari pertama dan kedua. Selanjutnya pada hari ke-3 dan ke-4 terjadi peningkatan yang cukup tajam dibandingkan dengan penggunaan NS1 atau antibodi IgM saja. Karena sensitivitas IgM untuk hari ke 5-7 sudah sangat tinggi (93%-100%), penggunaan NS1 tidak memberikan kontribusi yang berarti (Suwandono *et al.*, 2011).

Berdasarkan beberapa tes diagnostik yang telah diuraikan diatas, maka pemeriksaan IgM merupakan tes diagnostik yang memiliki sensitivitas dan spesifitas yang sangat tinggi pada demam hari ke 5-7.

2.1.6 Kriteria Diagnosis Infeksi Virus Dengue

Kriteria diagnosis infeksi virus dengue dibagi menjadi kriteria diagnosis klinis dan kriteria diagnosis laboratoris. Kriteria diagnosis klinis penting dalam penapisan kasus, tatalaksana kasus, memperkirakan prognosis kasus dan *surveillance*. Kriteria diagnostik laboratoris yaitu kriteria diagnosis dengan konfirmasi laboratorium yang penting dalam pelaporan, *surveillance* dan langkah-langkah tindakan preventif dan promotif (UKK Infeksi dan Penyakit Tropis, 2014).

Tabel 2.1 Derajat DBD Berdasarkan Klasifikasi WHO 2011 (WHO, 2011)

DBD	Derajat	Tanda dan gejala	Laboratorium
-----	---------	------------------	--------------

DD		Demam disertai minimal dengan 2 gejala Nyeri kepala Nyeri retro-orbital Nyeri otot Nyeri sendi/ tulang Ruam kulit makulopapular Manifestasi perdarahan Tidak ada tanda perembesan plasma	Leukopenia (jumlah leukosit ≤ 4000 sel/mm ³) Trombositopenia (jumlah trombosit < 100.000 sel/mm ³) Peningkatan hematokrit (5%-10%) Tidak ada bukti perembesan plasma
DBD	I	Demam dan manifestasi perdarahan (uji bendung positif) dan tanda perembesan plasma	Trombositopenia < 100.000 sel/mm ³ ; peningkatan hematokrit $\geq 20\%$
DBD	II	Seperti derajat I ditambah perdarahan spontan	Trombositopenia < 100.000 sel/mm ³ ; peningkatan hematokrit $\geq 20\%$
DBD*	III	Seperti derajat I atau II ditambah kegagalan sirkulasi (nadi lemah, tekanan nadi ≤ 20 mmHg, hipotensi, gelisah, diuresis menurun)	Trombositopenia < 100.000 sel/mm ³ ; peningkatan hematokrit $\geq 20\%$
DBD*	IV	Syok hebat dengan tekanan darah dan nadi yang tidak terdeteksi	Trombositopenia < 100.000 sel/mm ³ ; peningkatan hematokrit $\geq 20\%$

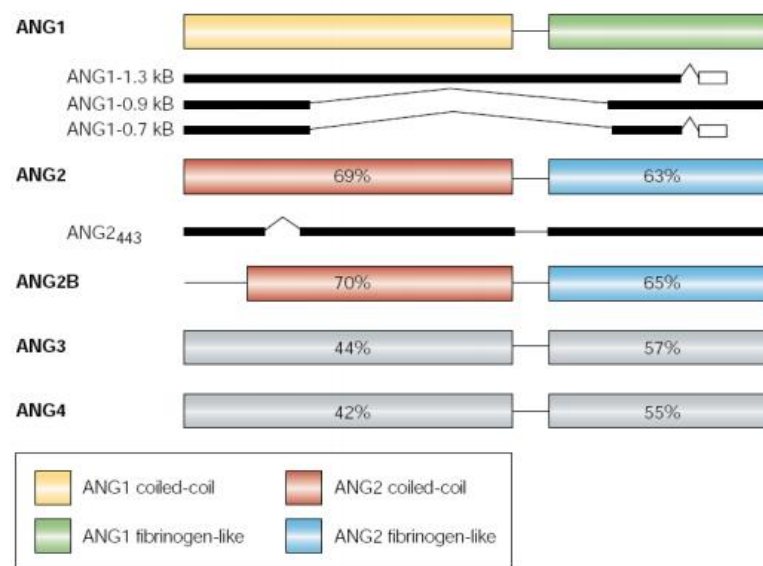
Diagnosis infeksi virus dengue: Gejala klinis + trombositopenia + hemokonsentrasi, dikonfirmasi dengan deteksi antigen virus dengue (NS-1) atau dan uji serologi anti dengue positif (IgM anti dengue atau IgM/IgG anti dengue positif)

2.2 Angiopoeitin

2.2.1 Struktur kimia

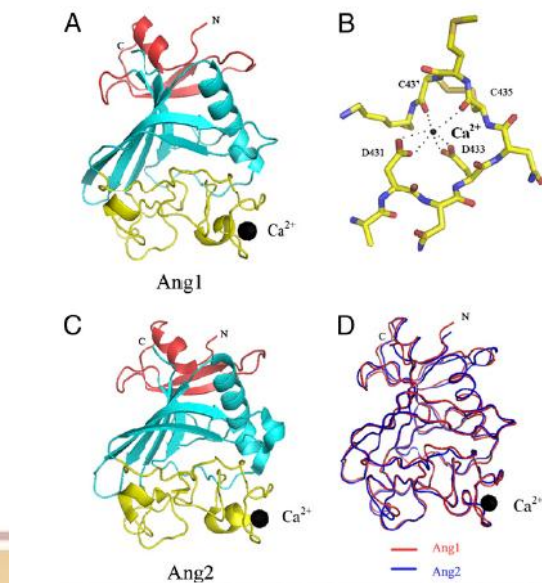
Angiopoeitin (ANGPT) merupakan suatu molekul glikoprotein dan tergolong kedalam *vascular growth factor*. Angiopoeitin mempunyai 4 ligan dan 2 reseptor. Empat ligan tersebut adalah ANGPT-1 sampai ANGPT-4, sedangkan reseptornya terdiri dari tirosin kinase-1 (Tie-1) dan tirosin kinase -2 (Tie-2). Angiopoeitin-1 dan ANGPT-2 berikatan pada reseptor Tie-2, sedangkan ANGPT-3 dan ANGPT-4 berikatan pada reseptor Tie-1. Angiopoeitin-1 dan ANGPT-2 merupakan ligan yang memiliki relevansi klinis dan banyak diteliti. Angiopoeitin 3 ditemukan pada tikus, sedangkan ANGPT-4 merupakan homolog ANGPT-3 yang terdapat pada manusia (Davis *et al.*, 1996; Valenzuale *et al.*, 1999).

Semua ligan ANGPT terdiri dari 2 domain, yaitu *coiled coil domain* dan *fibrinogen like domain*. *Coiled coil domain* terletak pada ujung terminal-N dan berperan pada homo-oligomerisasi ligan, sedangkan *fibrinogen like domain* terletak pada ujung terminal C dan berperan pada proses *binding* reseptor. Persentase *coiled coil* dan *fibrinogen like domain* inilah yang membedakan ANGPT-1 sampai ANGPT-4 seperti terlihat pada gambar 2.10.



Gambar 2.10 Perbedaan Ligan Angiopoeitin (Jones *et al.*, 2001)

Fibrinogen binding domain merupakan domain yang paling penting karena berperan dalam ikatan dengan reseptor Tie-2. Struktur kristal *receptor-binding-fibrinogen like domain* (RBD) terdiri dari protein kompak, dengan ukuran 50 x 40 x 35 Amstrong yang memiliki 3 domain, yaitu domain A, B dan P. Domain P merupakan domain tempat ikatan dengan reseptor. *Receptor-binding-fibrinogen like domainAngiopoetin* (RBD-ANGPT) memiliki 3 ikatan disulfida, salah satunya berperan dalam menjaga koordinasi struktur dan stabilisasi molekul permukaan yang mengandung *site calcium binding* seperti terlihat pada Gambar 2.11 (Barton, 2005. Yua *et al.*, 2013).



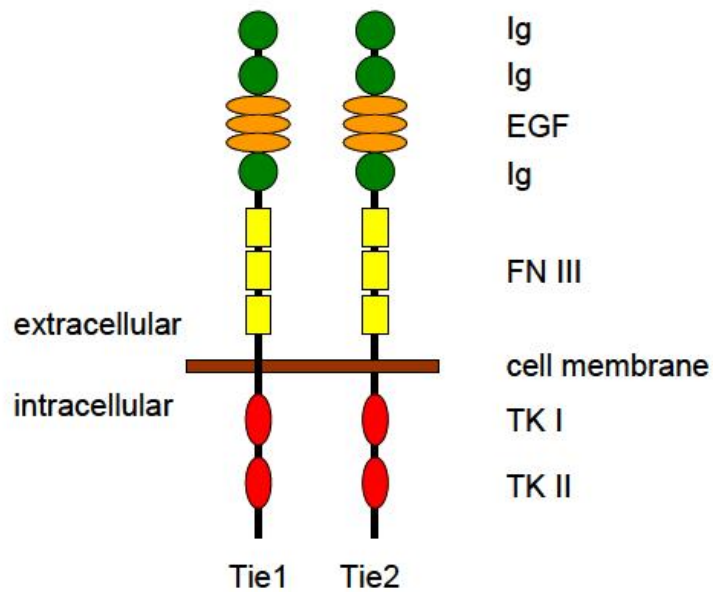
Gambar 2.11 (A) Struktur kristal RBD ANGPT-1, (B) Gambaran *close up calcium binding site*, (C) RBD ANGPT-2 (D) keselerasan struktur ANGPT-1 dan ANGPT-2 (Yua *et al.*, 2013).

Angiopoeitin-1 diproduksi oleh sel perisit dan sel otot polos dan jumlahnya juga meningkat dalam trombosit. Pada glomerulus yang kandungan sel perisitnya rendah, ANGPT-1 disintesis oleh sel podosit. Angiopoeitin-1 memiliki afinitas yang tinggi terhadap matrix ekstraseluler, dan kadarnya dalam plasma tidak menunjukkan kadar yang sebenarnya pada jaringan. Angiopoeitin-2 disintesis dan disimpan terutama pada sel endotel dalam organel spesifik yang dikenal dengan *Weibel Palade Bodies* (WPB). Apabila terjadi stimulus berupa inflamasi maka akan dikeluarkan secara cepat melalui proses eksositosis. *Weibel Palade Bodies* juga mengandung protein lain seperti faktor Von Willebrand, endothelin, interleukin-8, p-selektin, dan *tissue plasminogen activator*. Angiopoeitin-2 diekspresikan terutama oleh sel endotel, dan dalam jumlah kecil juga diekspresikan oleh sel makrofag. Penelitian di Semarang menunjukkan bahwa pada 73 anak dengan DBD dan 30 anak dengan SSD, aktivasi sel endotel akan diikuti eksositosis WPB dan peningkatan molekul yang disimpan dalam

WPB seperti VWF-Ag, VWF propeptida, dan osteoprotegrin (OPG), sedangkan aktivitas VWF-cleaving enzim dan ADAMTS-13 (*desintegrin dan metaloproteinase dengan trombospondin-1-like domain*) menurun(Djamiatun *et al.*, 2012).

2.2.2 Reseptor Tirosin Kinase-1 (Tie-1) dan Tirosin Kinase-2 (Tie-2)

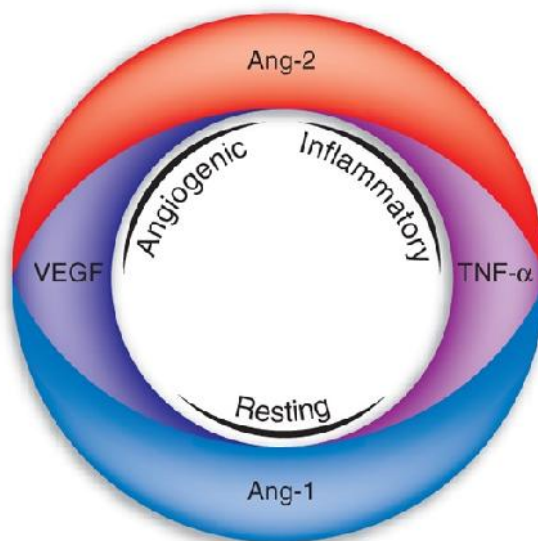
Reseptor Tie-1 dan Tie-2 merupakan reseptor spesifik yang terdapat pada endotel. Berat molekulnya hampir sama, Tie-1 memiliki berat molekul 135 kDa, sedangkan Tie-2 150 kDa. Reseptor Tie terbagi atas domain ekstrasel dan domain intrasel. Domain ekstraseluler terdiri dari 2 domain imunoglobulin (Ig) yang disisipi oleh 3 *epidermal growth factor* (EGF) diikuti oleh 3 domain fibronektin tipe III. Domain intraseluler terdiri atas 2 domain kinase yang dapat berikatan dengan molekul lain setelah proses *autophosphorilasi*. Reseptor *tirosin kinase-1* hanya diekspresikan pada sel endotel, sedangkan Tie-2 disamping diekspresikan pada sel endotel, juga ditemukan pada sel hematopoetik dan sel tumor seperti sarkoma kaposi. Reseptor Tie-1 berperan penting dalam diferensiasi sel endotel dan regulasi integritas pembuluh darah. Percobaan pada mencit menunjukkan bahwa kehilangan gen regulasi Tie-1 akan menyebabkan kematian karena terjadinya edema dan perdarahan. Reseptor *tirosin kinase-1* bersifat *downregulation* terhadap stabilitas endotel. Reseptor Tie-2 lebih banyak ditemukan pada pembuluh darah besar dibandingkan pembuluh darah kecil(Suri *et al.*, 1996;Hansen *et al.*, 2010).



Gambar2.12 Struktur Molekul Reseptor Tie-1 dan Tie-2(Thomas, 2008)

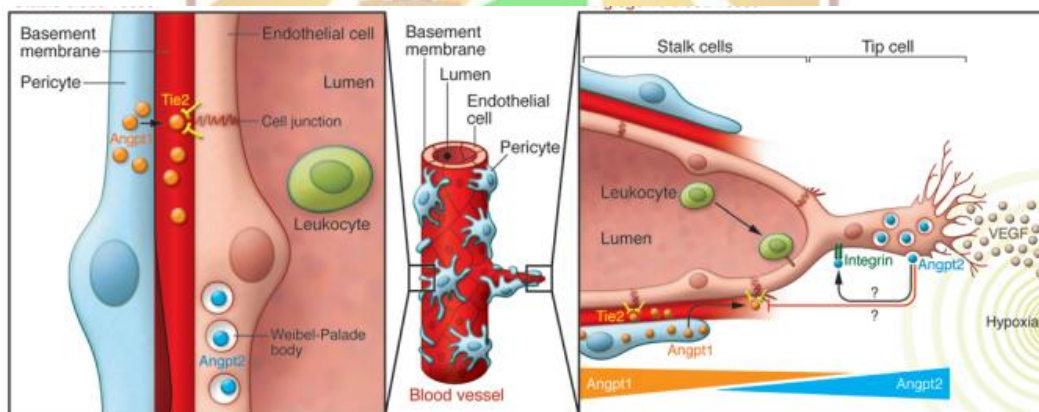
2.2.3 Integritas Endotel dan Peranan Angiopoetin pada Kondisi Kebocoran Plasma

Angiopoetin-1 dihasilkan oleh sel perindotel pembuluh darah, selanjutnya ANGPT-1 yang disekresikan akan melekat pada matriks ekstraseluler melalui *linker region* dan menyebabkan aktivasi ANGPT-1 pada permukaan sel endotel. Ekspresi ANGPT-1 akan meningkat pada kondisi inflamasi seperti artritis reumatoid melalui aksi TNF- α atau interleukin 1- β pada ESE-1-*transkripsional activating factor*. Peningkatan kadar ANGPT-1 juga diinduksi oleh keadaan hipoksia dan VEGF, sedangkan ANGPT-2 disekresikan saat terjadi *remodelling* jaringan terutama pada keadaan infeksi, penyembuhan luka, dan pada jaringan tertentu seperti ovarium, plasenta, dan uterus (Moss, 2011).



Gambar 2.13 Keseimbangan ANGPT dan Integritas Endotel (Imhof, 2006)

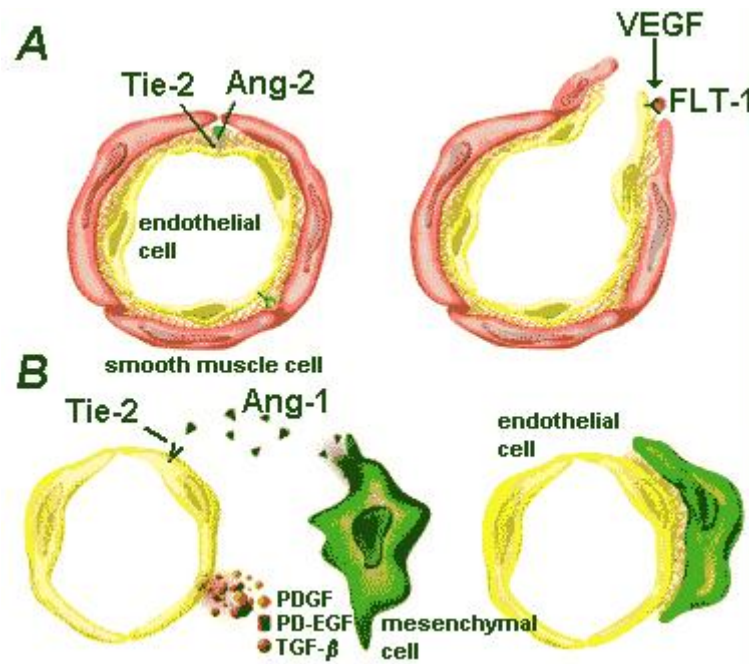
Interaksi antara VEGF dan ANGPT sangat berperan dalam regulasi angiogenesis dan permeabilitas vaskular. Dalam keadaan normal, integritas endotel pembuluh darah dipertahankan oleh keseimbangan ANGPT-1 dan TNF- α seperti terlihat pada gambar 2.13 (Imhof *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2012).



Gambar 2.14 Keseimbangan ANGPT pada Kondisi Endotel Normal dan Respons terhadap Inflamasi dan Hipoxia (Saharinen *et al.*, 2010)

Kedaaan inflamasi atau hipoksia akan menyebabkan terjadinya peningkatan permeabilitas vaskular akibat peningkatan kadar VEGF. Peningkatan permeabilitas ini dapat ditemukan pada pembuluh darah besar, mikrovaskular dan kultur sel endotel. Over ekspresi sistemik VEGF akan menyebabkan kebocoran

kapiler multiorgan dan efek ini dapat dihambat oleh peningkatan kadar ANGPT-1. Efek ANGPT-1 dan ANGPT-4 dalam menjaga integritas endotel adalah melalui pengaruh terhadap kompleks *junctional* sel endotel dan efek antiapoptosis sel endotel. Sedangkan ANGPT-2 menyebabkan kerusakan sel endotel melalui mekanisme kompetitif terhadap reseptor Tie-2 (Mura *et al.*, 2004).

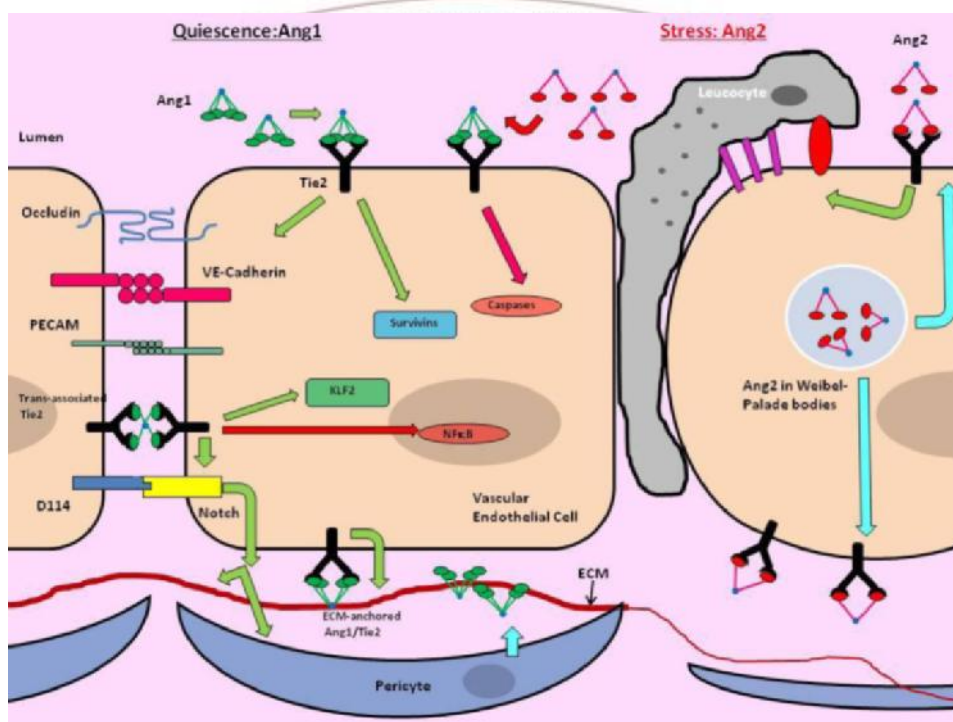


Gambar 2.15 Pengaruh Angiopoietin-2 pada Sel Endotel (Mura *et al.*, 2004).

Kombinasi ANGPT-1 dan VEGF berfungsi untuk menjaga integritas endotel. Peningkatan ANGPT-2 akan menyebabkan blok sinyal reseptor Tie-2. Dalam kondisi peningkatan ANGPT-2 dengan overekspresi VEGF akan terjadi pelepasan endotel dari sel periendothelial. Selanjutnya akan menyebabkan sel endotel kehilangan kontak dengan sel sekitarnya sehingga terjadi kebocoran plasma (Mura *et al.*, 2004).

2.2.4 Mekanisme Transduksi Sinyal dan Peranan ANGPT-1 dan ANGPT-2

Angiopoeitin-1 berperan menjaga integritas endotel melalui 3 fungsi utamanya yaitu sebagai antiapoptosis, antiinflamasi dan antipermeabilitas. Angiopoeitin-2 merupakan antagonis ANGPT-1 dan disekresikan ketika terjadi injuri, hipoksia dan infeksi bakteri. Efek utama ANGPT-2 menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular. Dalam keadaan normal, kadar ANGPT-1 lebih tinggi daripada ANGPT-2 (Brindel *et al.*, 2006).



Gambar 2.16. Mekanisme molekuler pelepasan Angiopoeitin 2 dari *weibel palade bodies* (Moss, 2013).

Efek anti apoptosis memengaruhi motilitas sel melalui aktivasi *Phosphatidyl Inositol-3 Kinase Pathway* (PI3K). Pada keadaan normal ANGPT-1 dapat mempertahankan integritas sel endotel melalui aktivasi jalur PI3K dengan syarat konsentrasi ANGPT-1 lebih tinggi dari ANGPT-2. PI3K menginduksi konversi PIP2 (*Phosphatidyl Inositol 4,5-bisfosfat*) ke PIP3 (*Phosphatidyl Inositol*

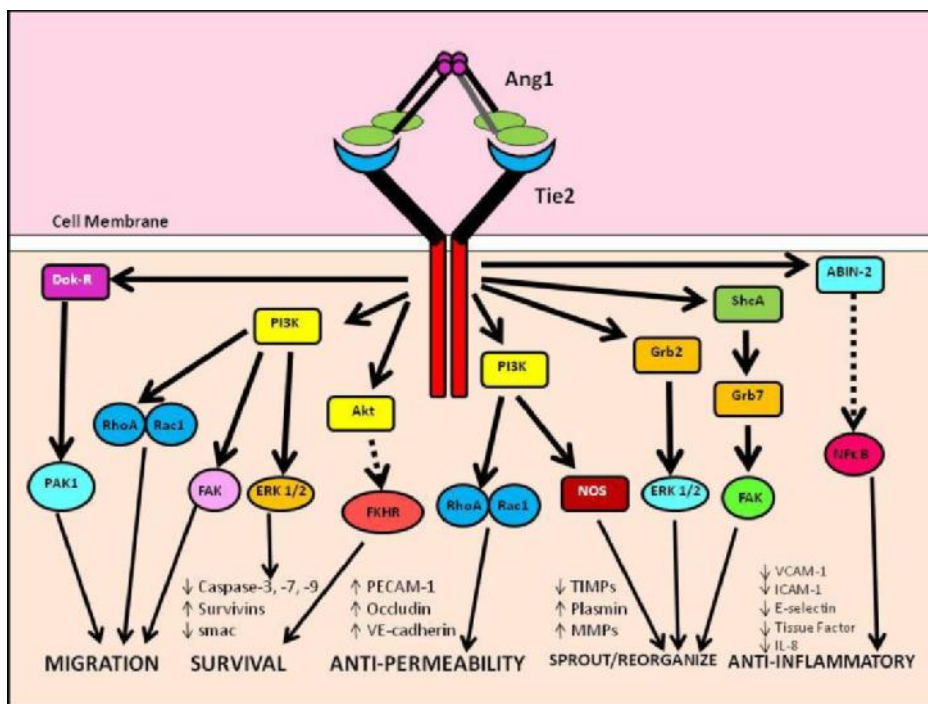
3,4,5-trisphosphate). Pembentukan PIP3 diperlukan untuk fosforilasi Akt oleh kinase PDK-1. Aktivasi jalur PI3K berkontribusi untuk fosforilasi eNOS yang diinduksi ANGPT-1, produksi Nitric Oxidec (NO), dan angiogenesis sel endotel. Aktivasi Akt/ PKB (Protein Kinase-B) juga menyebabkan peningkatan regulasi Caspase-9 dan Bcl2 yang juga akan menjaga integritas sel endotel (Shen *et al.*, 2003).

Angiopoeitin-1 dapat memengaruhi proses migrasi, *budding*, dan kelangsungan hidup sel endotel melalui aktivasi jalur sinyal yang berbeda, melalui mekanisme yang dipicu oleh reseptor tirosin kinase (Tie-2). Protein adaptor SHCA menjadi target diaktifkannya tirosin kinase dan terlibat dalam transmisi sinyal aktivasi ke jalur Ras / MAPK (MAPK). Molekul utama dari jalur Ras / MAPK, Grb2 dan SHP2, bertindak sebagai mitra yang mengikat Docking Tie-2. Tie-2 juga mengikat DOKR, sebuah molekul adaptor struktural homolog ke p62DOK dan IRS3 (*Insulin Receptor-Substrat-3*). DOKR mampu merekrut protein adaptor Nck, PAK (*p21-Activated Kinase*) dan RASGAP (*Ras-GTPase-activated protein*). Dua molekul lainnya dan SHP2 fosfatase protein juga menggunakan jalur ini untuk memotensiasi migrasi sel. *Docking* protein (DOKR) direkrut dengan cara fosforilasi dan bekerjasama dengan Nck sehingga meningkatkan migrasi sel, proses ini bergantung pada PAK. Molekul yang terlibat dalam interaksi Tie-2-ABIN2 dan mekanisme hipotesis dimana ABIN2 dapat menghambat aktivasi NF-kappaB masih dalam penelitian lebih lanjut (Brindel *et al.*, 2006; Thomas, 2008).

Angiopoeitin-1 juga memiliki efek antiinflamasi. Efek antiinflamasi ANGPT-1 diperantarai melalui mekanisme "*down regulation*", melalui hambatan

sinyal NFkB (*nuclearfactor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) sehingga akan menghambat adhesi molekul leukosit pada permukaan sel seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) seperti terlihat pada Gambar 2.17 (Brindel *et al.*, 2006; Thomas, 2008).

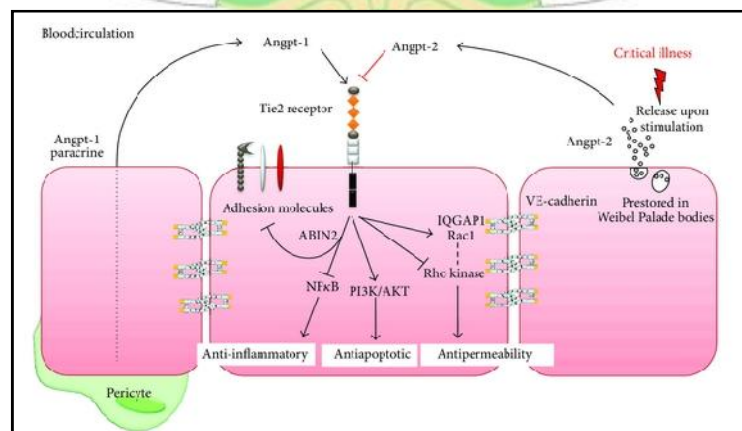
Efek antipermeabilitas ANGPT-1 terjadi melalui IQGAP-1 (*IQ motif-containing GTPase activating protein-1*), yang menyebabkan pergeseran keseimbangan RhoA-Rac1 ke arah Rac1. Peningkatan Rac1 secara morfologik akan berdampak terhadap peningkatan pembentukan protein F-aktin kortikal sehingga struktur integritas endotel tetap terjaga, sehingga dapat disimpulkan bahwa ikatan ANGPT-1 dengan reseptor Tie-2 akan menyebabkan aktivasi signal P13K mengakibatkan antiapoptosis sel endotel, efek antiinflamasi melalui hambatan sinyal NFkB, dan efek antipermeabilitas melalui sinyal Rho-kinase seperti yang terlihat pada Gambar 2.18(Lukazs, 2012).



Gambar 2.17. Mekanisme Transduksi Sinyal ANGPT (Brindle, 2006)

Sebaliknya, ANGPT-2 dapat menyebabkan instabilitas integritas sel endotel dan menyebabkan kebocoran plasma. Pelepasan ANGPT-2 dari WPB terjadi setelah adanya stimulus baik berupa sitokin proinflamasi, trombin, aktivasi leukosit dan trombosit, perubahan sirkulasi atau berkurangnya oksigenasi jaringan. Angiopoetin 2 yang dilepaskan akan berikatan dengan reseptor Tie-2 menyebabkan defosforilasi reseptor Tie-2, sehingga menghambat pelepasan signal ANGPT-1/Tie-2. ANGPT-2 tidak menyebabkan aktivasi reseptor, sehingga *cascade* aktivasi sinyal PI3K dan Ras *pathway* seperti yang diakibatkan oleh ANGPT-1 tidak terjadi apabila reseptor Tie-2 diduduki oleh ANGPT-2. Hal ini akan berdampak tidak terbentuknya sinyal migrasi, sinyal antipermeabilitas dan antiinflamasi pada sel endotel, sehingga memudahkan terjadinya kebocoran plasma (Thomas, 2008; Lukasz, 2012).

Percobaan invitro menunjukkan bahwa ANGPT-2 dibutuhkan lebih dari 40 pq/ml TNF- α untuk menimbulkan aktivasi kerusakan sel endotel, sedangkan bila terjadi pelepasan ANGPT-2 sekitar 200 pq/ml maka hanya sekitar 5 pg/ml TNF- α yang dibutuhkan. Angiopoetin-2 juga dapat meningkatkan efek sitokin lain terhadap kerusakan endotel (Chen *et al.*, 2004).



Gambar 2.18. Mekanisme ANGPT-2 Menghambat Aktivasi Sinyal Rho kinase, PI3K/AKT dan NF κ B (Lukasz, 2012)

2.2.5 Angiopoietin pada DBD

Imunopatologi DBD/SSD belum sepenuhnya dipahami. Sel endotel berperan penting dalam patofisiologi kebocoran plasma pada infeksi virus dengue. Peningkatan permeabilitas vaskular dan disfungsi endotel pada infeksi virus dengue juga berhubungan dengan pengaruh ANGPT-1 dan ANGPT-2. Angiopoietin-1 dan ANGPT-2 berperan untuk mengikat Tie-2 reseptor pada sel endotel. Pengikatan ANGPT-2 ke reseptor Tie akan meningkatkan angiogenesis yang diinduksi oleh *VEGF*, menginduksi apoptosis sel endotel dan akhirnya bergabung dengan *Tumor Necrosis Factor- α* (*TNF- α*) dalam mengekspresikan permukaan molekul adhesi. Peran ANGPT-2 telah dilaporkan oleh banyak penelitian, terutama dalam patogenesis retinopati diabetes, retardasi pertumbuhan intrauterin, efusi pleura, penyakit jantung kongestif, tumor dan sepsis. Namun sampai saat ini, hanya sedikit penelitian yang melaporkan tentang peran ANGPT-2 dalam proses kebocoran plasma pada infeksi virus dengue (Anderson *et al.*, 1997; Hadinegoro, 1996).

Angiopoietin-1 dan ANGPT-2 serta reseptor Tie-2 merupakan pusat transduksi sinyal dalam mengatur permeabilitas endotel. Angiopoietin-2 merupakan antagonis dari ANGPT-1, bekerja menurunkan stabilisasi endothelium dengan merusak adhesi antar sel dan endothelial sel melalui efek sitokin pro-inflamatori dan VEGF. Angiopoietin-2 secara umum diproduksi oleh sel endothelial dan disimpan dalam *Weibel-Palade bodies* (WPBs), yang akan dilepas saat terjadi aktivitas endothelium. Angiopoietin-1 diproduksi di perisit dan sel otot polos, selain itu trombosit juga mengandung kadar ANGPT-1 yang sangat tinggi. Sehingga jumlah dan aktivasi trombosit dapat memengaruhi kadar ANGPT-1

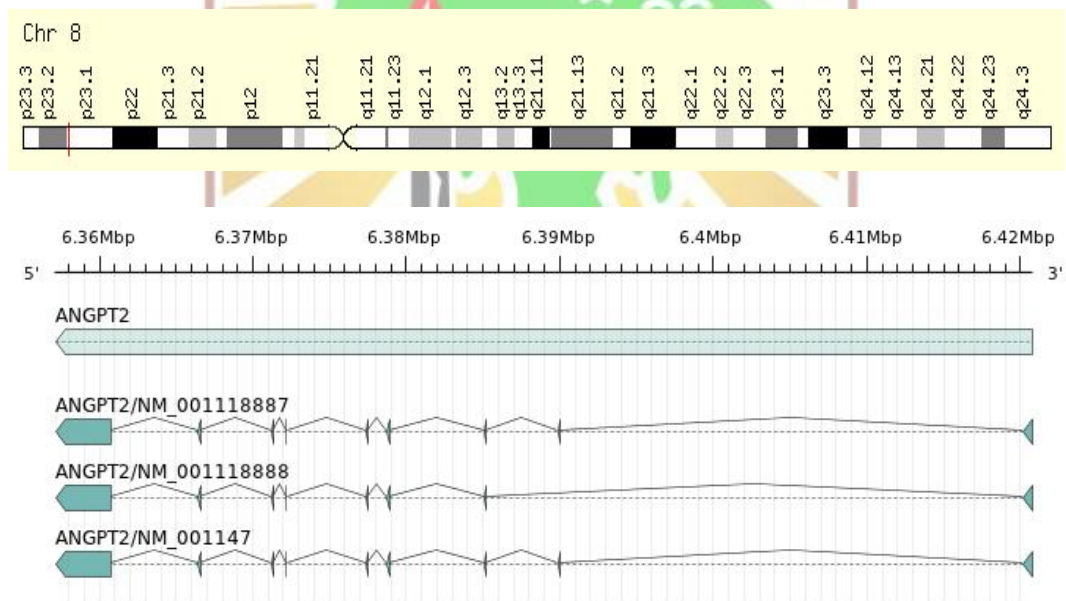
dalam plasma. Pada infeksi dengue regulasi ANGPT-1 dalam trombosit memegang peranan penting dalam mempertahankan stabilisasi vaskular (Hadinegoro, 1996).

Demam berdarah dengue (DBD)/SSD berhubungan dengan trombositopenia, inflamasi, dan aktivasi endotel. Ketiga proses tersebut akan memengaruhi keseimbangan ANGPT-1 dan ANGPT-2 serta akan berujung pada perembesan plasma dan perdarahan. Sebuah penelitian kohor skala besar di Semarang menunjukkan pada DBD/SSD terjadi ketidakseimbangan kadar ANGPT-1 dan ANGPT-2, dimana terjadi penurunan kadar ANGPT-1 plasma sedangkan kadar ANGPT-2 mengalami peningkatan. Pada DBD/SSD terjadi aktivasi trombosit yang menyebabkan menurunnya kadar trombosit dalam plasma. Angiopoeitin-1 juga terdapat didalam trombosit, dan kadarnya berkorelasi dengan jumlah trombosit. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa penurunan kadarangiopoeitin sejalan dengan rendahnya kadar P selektin yang merupakan marker aktivasi trombosit(Michels *et al.*, 2012). Rampengan melaporkan bahwa ANGPT-2 berperan dalam patogenesis kebocoran plasma yang bersifat transien pada DBD, terjadi peningkatan signifikan kadar plasma ANGPT-2 pada pasien anak dengan DBD dan SSD namun tidak pada pasien DD. Rata-rata kadar ANGPT-2 pada kelompok DD pada saat awal rawatan adalah 2486,21(SD 1534,55) pg/ml, pada kelompok DBD 3194,95(SD 1572,02) pg/ml, dan pada kelompok SSD 4005,32 (SD 1706,43) pg/ml. Kadar ANGPT-2 menurun secara signifikan baik pada kelompok DD, DBD dan SSD setelah 48 jam rawatan (Rampengan *et al.*, 2014).

2.2.6 Gen Angiopoetin dan Polimorfisme

Struktur Gen Angiopoetin-2

Angiopoetin memiliki berat molekul 75kDa. Angiopoetin 1 tersusun atas 498 asam amino dan gen pengode protein ANGPT-1 terdapat pada kromosom 8q22.3 sampai q23, sedangkan ANGPT-2 tersusun atas 494 asam amino dan berlokasi pada kromosom 8p23.1, terdiri dari 9 exon dengan panjang 32.3 kb dan 8 intron dengan panjang 1,497 bp. Exon 1 sampai 5 berperan dalam mengode ujung terminal N, *coiled coil domain*, dan sebagian *hinge region*. Exon 5-9 mengode sebahagian *hinge region*, *fibrinogen-like domain* dan ujung terminal C seperti terlihat pada gambar 2.19 (Ward *et al.*, 2001).

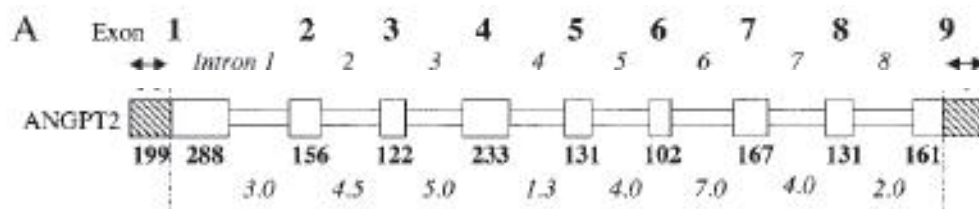


Gambar 2.19 Lokasi dan Struktur Gen Pengkode Angiopoetin
(Diunduh dari <http://www.bioinfo.mochsl.org.br/miriad/gene/ANGPT-2>)

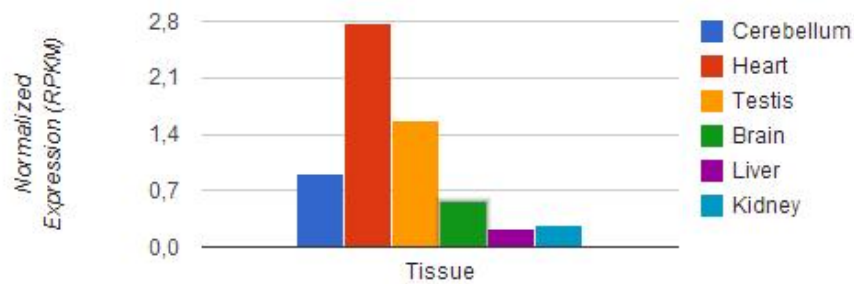
Pada ANGPT-2, tiga posisi ditemukan dengan angka polimorfisme yang tinggi di antara individu, yaitu pada posisi 759 di exon 2, posisi 1087 di exon 4 dan posisi 1233 di exon 5 pada sekuensing DNA. Semua polimorfisme yang

terdeteksi merupakan mutasi tersembunyi dan tidak menimbulkan perubahan pada asam amino pada protein yang disandi (Ward *et al.*, 2001). Polimorfisme ANGPT-2 yang sering ditemukan adalah polimorfisme G/A pada exon 4 yang dapat dideteksi oleh pembelahan enzim restriksi Eco57I, yang dianggap mengubah ekspresi protein dan selanjutnya dapat menghambat angiogenesis.(Pietrowski *et al.*, 2003). Exon 4 dimulai dari nukleotida ke 46.854 – 47.086 dengan panjang 232 bp. Exon 4 berperan dalam mengode ujung terminal N, *coiled coil domain*, dan sebagian *hinge region*. Exon 4 merupakan region yang banyak diteliti sebelumnya karena merupakan daerah yang sangat polimorfik. (Ward *et al.*, 2001)

Beberapa penelitian terdahulu seperti penelitian Pietrowski (Pietrowski *et al.*, 2003) menggunakan primer exon 4 untuk mendeteksi polimorfisme gen ANGPT-2 pada wanita yang mengalami keguguran berulang, demikian juga dengan Onen (Onen *et al.*, 2007) yang menggunakan primer exon 4 untuk mendeteksi polimorfisme gen ANGPT-2 pada kanker prostat sporadik. Disamping itu region exon 4 memiliki SNP yang lebih banyak dibanding region lainnya dengan frekuensi alel minor yang cukup besar.



Gambar 2.20 Susunan Exon dan Intron pada Gen ANGPT-2 (Ward *et al.*, 2001)



Gambar 2.21. Ekspresi Gen Angiopoietin-2 Normal pada Berbagai Jaringan (Diunduh dari <http://www.bioinfo.mochsl.org.br/miriad/gene/ANGPT-2>)

Polimorfisme Genetik

Polimorfisme genetik merupakan perbedaan sekuens DNA suatu gen yang muncul secara tetap diantara individu. Polimorfisme terjadi karena adanya mutasi, dan beberapa faktor yang menyebabkan polimorfisme ini bisa bertahan terus pada populasi tertentu (Albert, 2011).

Terdapat beberapa macam bentuk polimorfisme, diantaranya “*Single Nucleotide Polymorphism*” (SNP) dan “*Variable Number of Tandem Repeat*” (VNTR). Jenis polimorfisme yang sering terjadi adalah SNP, yang dapat berupa substitusi, delesi atau insersi dari sebuah nukleotida tunggal. Dinyatakan SNP bila hanya terdapat perubahan satu nukleotida pada alel yang terlibat, dan ini bisa digunakan sebagai petanda regio spesifik dari genom, walaupun substitusi satu nukleotida pada regio koding bisa juga merupakan suatu varian polimorfisme yang normal meskipun mereka merubah produk polipeptida. Mutasi dapat terjadi pada *coding region* (exon) atau *noncoding region* (intron) sebuah gen. Apabila SNP terjadi pada *coding region* maka akan menyebabkan substitusi asam amino dan dapat membuat protein yang disintesis terganggu fungsinya. *Single nucleotide polymorphism* bisa juga terjadi pada bagian yang *noncoding* dari gen (intron),

sehingga bisa tidak terlihat pada produk proteinnya. *Variable number of tandem repeat* merupakan bentuk polimorfisme dari beberapa nukleotida yang berulang, bisa meliputi 10 sampai 60 panjang nukleotida (Rimoin *et al.*, 2002).

Polimorfisme DNA sangat berguna pada pengembangan pemetaan genom manusia, misalnya untuk memetakan penyakit yang monogenik atau poligenik, untuk menentukan asal dari *aneuploidi* dan kelainan kromosom, untuk membedakan kromosom normal dan yang mengalami mutasi pada diagnosis genetik, untuk keperluan forensik, paternitas, studi transplantasi, juga untuk pembelajaran evolusi genom, hilangnya heterogenisitas pada keganasan tertentu, ketidakstabilan genom pada beberapa jenis tumor serta rekomendasinya didalam genom. Pada studi tentang peran dari gen kandidat terhadap terjadinya penyakit tertentu, perlu dibedakan antara mutasi yang berdampak pada *fenotipe* dengan variasi polimorfisme pada *genotipe* yang normal (Rimoin *et al.*, 2002).

Polimorfisme Genetik pada Infeksi Virus Dengue

Spektrum klinis infeksi virus dengue bervariasi dari asimtomatis sampai syok yang dapat menyebabkan kematian. Tiga faktor yang memengaruhi manifestasi infeksi virus dengue pada manusia ialah faktor genetik, virologik, dan epidemiologik (Waidab *et al.*, 2008). Faktor genetik, seperti mutasi dan polimorfisme ikut memengaruhi kerentananseseorang terhadap DBD (Shepherd *et al.*, 2010). Studi epidemiologis menunjukkan adanya perbedaan kerentanan terhadap DBD pada berbagai populasi etnis. Pada epidemi dengue di Kuba tahun 1981 dan 2001, keturunan Afrika terlihat relatif protektif terhadap DBD/SSD, tetapi tidak terhadap DD (Kouri *et al.*, 1998). Penelitian di Brazil juga

menunjukkan bahwa etnis Afro-Brazil dan keturunan Afrika protektif terhadap DBD dengan *odds ratio* (OR) 0,28 dan 0,13 (Blanton *et al.*, 2008). Di Haiti, pada tahun 1994-1999, tidak ada kasus DBD/SSD walaupun terdapat sirkulasi intensif 3 serotipe DENV. Di Afrika, walaupun terdapat sirkulasi sporadis virus dengue, belum pernah dilaporkan terjadi epidemi DBD (Halstead *et al.*, 2001).

Berbagai studi membuktikan bahwa polimorfisme genetik dapat melindungi atau merentankan individu terhadap DBD/SSD. Beberapa alel *human leukocyte antigen* (HLA) dan *non-human leukocyte antigen* (non-HLA) telah diketahui berhubungan dengan beratnya penyakit. Perbedaan alel HLA dihubungkan dengan susceptibilitas atau resistensi terhadap infeksi tertentu. Sejumlah peneliti telah menemukan beberapa variasi gen HLA yang berhubungan dengan DBD. Pasien dengan memiliki alel HLA kelas I seperti (A1, A2, A*0207, A24, A*2402/03/10, B blank, B*07, B*40, B46, B51) lebih rentan mengalami infeksi dengue, sedangkan pasien dengan alel HLA A*0203, A*03, A29, A33, B13, B14, B44, B52, B62, B76, B77 lebih protektif terhadap infeksi virus dengue. Demikian juga halnya dengan kelompok HLA kelas II dan III, pasien dengan alel HLA DRB1*04, DRB1*0901 lebih resisten (protektif) terhadap infeksi virus dengue, sedangkan pasien dengan alel TNF- α 308A lebih gampang terinfeksi virus dengue. Studi mengenai polimorfisme gen non-HLA masih sedikit. Ada 2 gen yang sudah terbukti meningkatkan risiko terkena DBD, yakni reseptor II Fc γ (Fc γ RII) dan reseptor vitamin D (VDR) (Lan *et al.*, 2011; Eppy, 2012).

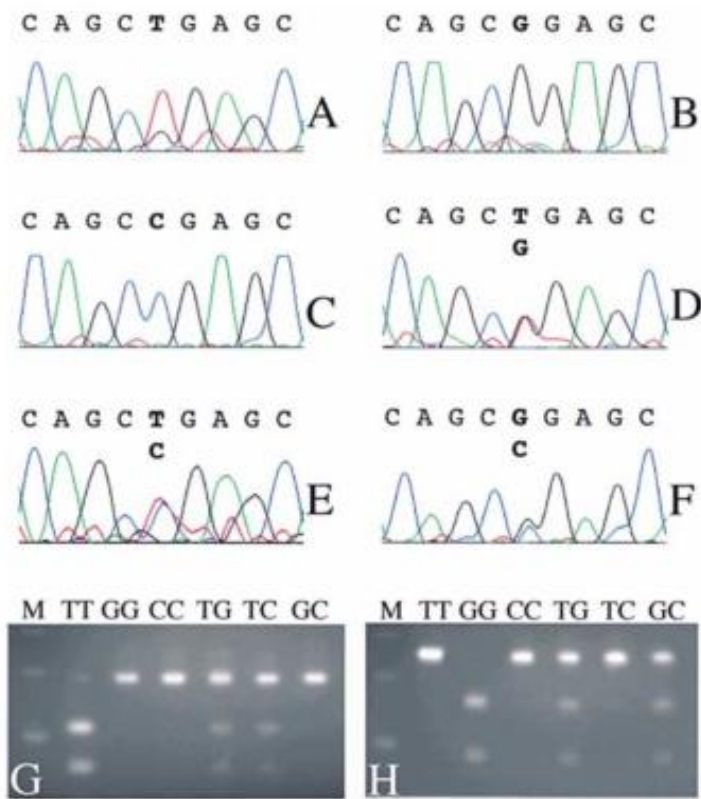
Polimorfisme pada protein tertentu juga berhubungan dengan tingkat keparahan DBD. Sebuah studi metaanalisis pada pasien anak dengan infeksi virus

dengue menunjukkan bahwa genotip SNP CLEC5A (rs1285933 C>T) berhubungan dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue (OR=2.25; p=0.03) sedangkan genotipe SNP -336G>A DCSIGN (CD209) berhubungan dengan proteksi terhadap infeksi virus dengue berat (OR=0.12; p=0.04)(Carvalho *et al.*, 2013).

Polimorfisme Gen ANGPT-2

Struktur kedua molekul ANGPT-1 dan ANGPT-2 memiliki kesamaan (homolog) sekitar 64% dan hanya berbeda pada domain P, sedangkan struktur lainnya dan *calcium binding site* hampir sama. Pada gen yang mengkode ANGPT-1 tidak ditemukan polimorfisme sedangkan pada gen pengkode ANGPT-2 sangat polimorfisme. Over ekspresi ANGPT-2 mRNA pada permukaan sel endotel terutama diinduksi oleh hipoksia, faktor lain yang juga dapat menginduksi ekspresi ANGPT-2 mRNA adalah VEGF dan *fibroblast growth factor*(Ward *et al.*,2001).

Variasi genetik pada gen ANGPT-2 dapat menyebabkan perbedaan ekspresi gen dan gangguan proses angiogenesis. Ward *et al.*,2001 melaporkan dari 10 individu ditemukan tiga bentuk polimorfisme gen ANGPT-2, yaitu pada exon 2 posisi 759, exon 4 pada posisi 1087, dan exon 5 pada posisi 1233 (Ward *et al.*, 2001). Bentuk polimorfisme yang paling umum adalah G/A polimorfisme pada exon 4 yang bersifat *silent* mutasi. Walaupun bersifat *silent*, mutasi tersebut tetap dapat menimbulkan perbedaan ekspresi protein yang dihasilkan.



Gambar 2.22 Polimorfisme Gen ANGPT-2(Ward *et al.*, 2001)

Berbagai hipotesis muncul sehubungan dengan adanya pengaruh polimorfisme gen ANGPT-2 dengan berat ringannya munculan klinis suatu penyakit. Beberapa penelitian berhasil membuktikan adanya hubungan antara polimorfisme gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan suatu penyakit, namun beberapa penelitian lain melaporkan hasil sebaliknya. Penelitian Su Li menunjukkan bahwa variasi genetik ANGPT-2 berhubungan dengan meningkatnya risiko menderita ARDS. Pasien yang memiliki varian alel tSNP (rs2515475) memiliki risiko tinggi mengalami ARDS(Parikh *et al.*, 2006). Penelitian Huber juga melaporkan bahwa polimorfisme ANGPT-2 akan menyebabkan gangguan proses angiogenesis dan berhubungan dengan risiko keguguran berulang dan kematian intrauterin (Yuan *et al.*, 2009). Hasil yang sama juga didapatkan Hao et al, 2014, terdapat hubungan antara variasi genetik gen

angiopoeitin dengan insiden *acute lung injury* akibat sepsis pada populasi suku Han, China. Hasil yang berbeda dilaporkan beberapa peneliti lain, seperti Hadidy et al 2009, yang melaporkan tidak ada hubungan antara variasi genetik gen ANGPT-2 dengan severitas preeklamsi pada wanita Mesir. Sampai saat ini belum ada penelitian tentang polimorfisme gen ANGPT-2 pada DBD.

2.3 *Vascular Endothelial Growth Factor*

2.3.1 Fungsi *Vascular Endothelial Growth Factor*

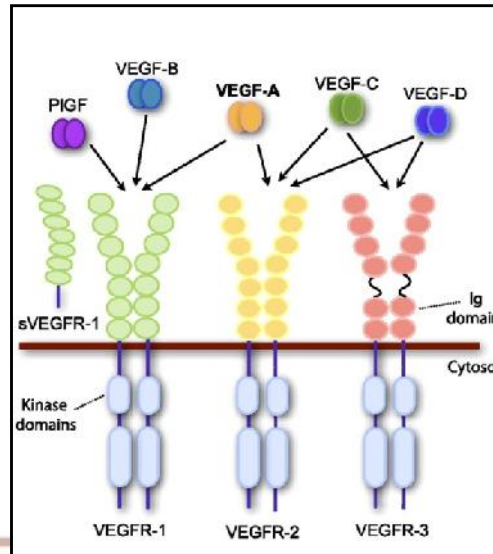
Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah glikoprotein proangiogenik yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, dan *survival rate* sel endotel, namun VEGF juga dikenal sebagai *inducer* kuat yang menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular, menstimulasi vasodilatasi dan menginduksi fenestra pada sel endotel secara *in vivo* dan *in vitro* dan turut berperan terhadap terjadinya kebocoran plasma (Srikiatkachorn et al., 2007)

Ekspresi VEGF dipicu oleh berbagai faktor. Faktor utama yang merangsang VEGF adalah hipoksia jaringan/sel sedangkan faktor lainnya adalah estrogen, *nitric oxide* (NO), serta faktor pertumbuhan (*fibroblast growth factor-4*, PDGF, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), *keratinocyte growth factor*, interleukin (IL)-6, IL-1 β , dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1)) (Brkovic et al., 2006).

2.3.2 Reseptor VEGF dan Mekanisme Aktivasi

Vascular endothelial growth factor mempunyai 3 jenis reseptor yaitu VEGFR-1, VEGFR-2 dan VEGFR-3. VEGFR-1 diekspresikan hampir pada semua endotel, monosit dan makrofag (Gambar 2.23). Reseptor VEGFR-2 terdistribusi pada kapiler, pembuluh darah dan endokardium. Ekspresinya meningkat dengan rangsangan hipoksia dan berperan utama pada regulasi permeabilitas vaskular. VEGFR-3 hanya ditemukan pada sel endotel saluran limfe dewasa dan mempunyai peran pada limfatogenesis. Masing-masing reseptor memiliki 7 *immunoglobulin like domains* di ekstraseluler, sebuah transmembran tunggal dan *sequence* tirosin kinase. VEGFR-2 merupakan reseptor penting pada mitogenesis dan permeabilitas yang diinduksi VEGF (Hoeben *et al.*, 2004 ; Brkovic *et al.*, 2006).

Lima kelas VEGF telah diketahui antara lain VEGF-A, *placental growth factor* (PLGF), VEGF-B, VEGF-C, dan VEGF-D. *Vascular endothelial growth factor*-A, VEGF-B dan PLGF berikatan dengan VEGFR-1, VEGFR-2 distimulasi oleh VEGF-A, VEGF-C dan VEGF-D sedangkan VEGFR 3 diaktivasi oleh VEGF-C dan VEGF-D. *Vascular endothelial growth factor* akan berinteraksi dengan reseptor FLK-1 atau KDR (VEGFR-2) sehingga menstimulasi proliferasi, migrasi, ketahanan dan permeabilisasi sel endotel, sedangkan VEGFR-1 berfungsi sebagai inhibitor dari aksi VEGFR-2 (Hoeben *et al.*, 2004; Stuttfeld *et al.*, 2009).

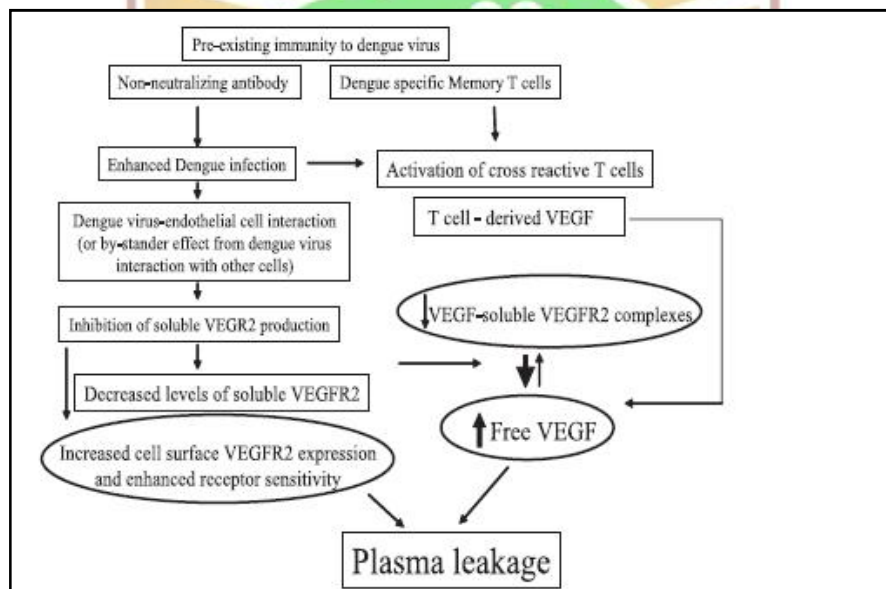


Gambar 2.23. Reseptor VEGF dan Ligan (Almodovaret *al.*, 2009)

2.3.3 *Vascular Endothelial Growth Factor* pada Infeksi Virus Dengue

Kadar VEGF dilaporkan meningkat signifikan pada pasien DBD dan SSD dibandingkan kontrol (Srikiatkachorn *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2005). Namun, penelitian lain melaporkan tidak terdapat hubungan kadar plasma VEGF dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue (Seet Ret *et al.*, 2009; Rathakrishnan *et al.*, 2012). *Vascular endothelial growth factor* berikatan dengan sVEGFR-1 dan sVEGFR-2. Pada infeksi virus dengue berat dilaporkan terjadi peningkatan sVEGFR-1 dan penurunan kadar sVEGFR-2 (Srikiatkachorn *et al.*, 2007). Kadar sVEGFR-2 juga dilaporkan menurun secara signifikan pada infeksi virus dengue dengan *warning sign* dibandingkan infeksi virus dengue tanpa *warning sign* (Weg *et al.*, 2014). Kadar rata-rata sVEGFR-2 pada pasien DBD menurun signifikan dibandingkan pasien DD mulai satu hari sebelum fase penurunan suhu dan akan kembali mendekati nilai normal selama fase penyembuhan (Srikiatkachorn *et al.*, 2007).

Mekanisme infeksi virus dengue menyebabkan penurunan kadar sVEGFR-1 dan peningkatan kadar VEGF bebas dapat dilihat pada gambar 2.24. Penurunan kadar sVEGFR-2 pada infeksi virus dengue disebabkan efek langsung virus dengue yang menyebabkan menurunnya produksi sVEGFR-2 dan peningkatan ekspresi VEGFR-2 pada permukaan sel endotel. Penurunan kadar sVEGFR-2 akan menyebabkan peningkatan kadar VEGF bebas akibat berkurangnya jumlah VEGF yang diikat oleh sVEGFR-2. Kadar VEGF bebas akan menyebabkan fosforilasi *VE-chaderin* sehingga terjadi kebocoran plasma (Srikiatkachornet *al.*, 2007).

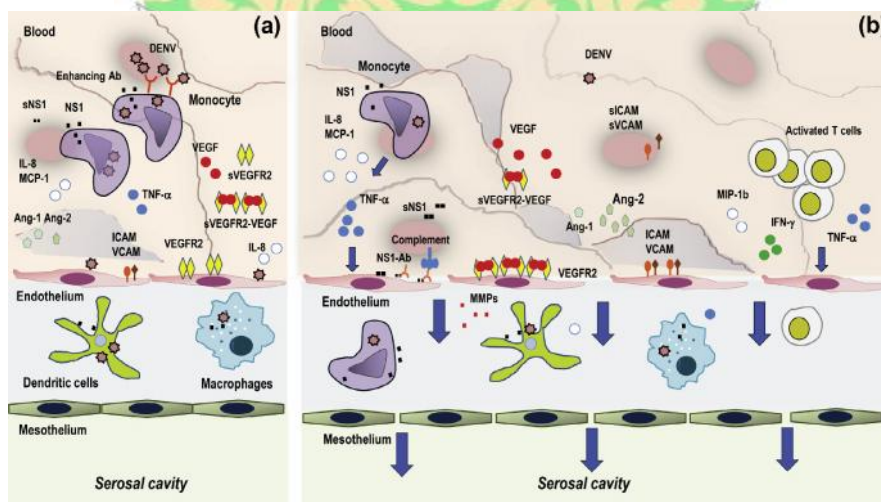


Gambar 2.24. Regulasi Aktivitas VEGF oleh Infeksi Virus dan Imunitas Spesifik (Srikiatkachornet *al.*, 2007)

2.3.4 Hubungan ANGPT-2 dengan VEGF

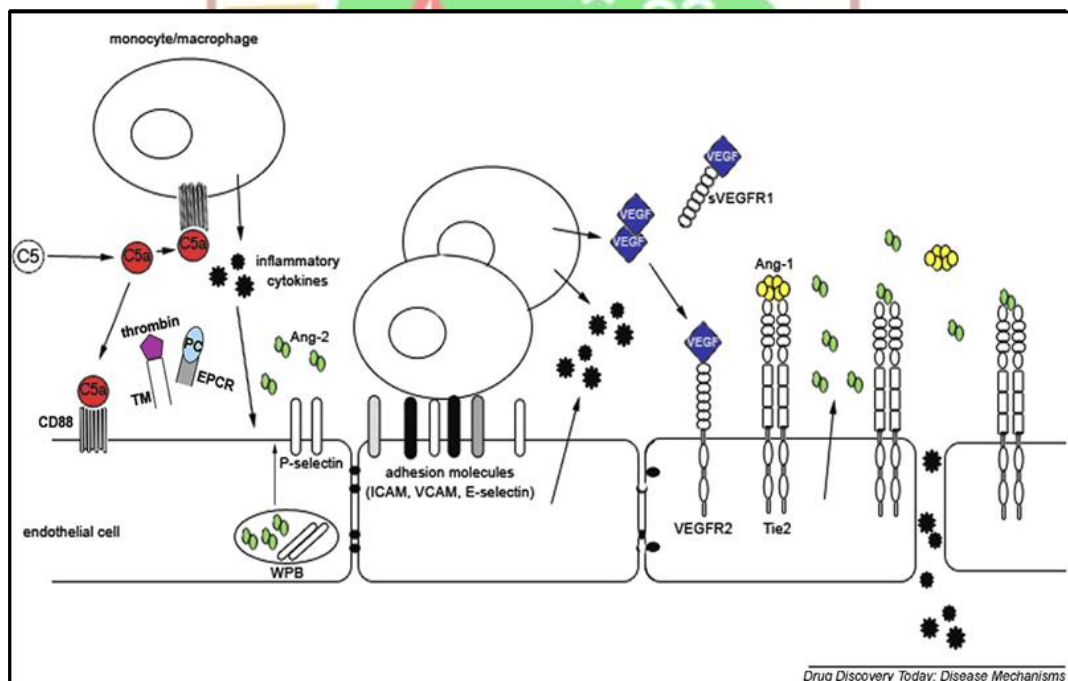
Teori yang menjelaskan pengaruh ANGPT-2 dan VEGF terhadap endotel dan kebocoran plasma pada infeksi virus dengue dapat dilihat pada gambar 2.25. Selama infeksi virus dengue fase akut, sebelum terjadi kebocoran plasma (Gambar a), virus dengue akan menginfeksi monosit, sel dendritic (DC's),

makrofag dan termasuk sel endotel untuk replikasi virus dan viremia. Sel yang terinfeksi menghasilkan kemokin seperti IL-8 dan MCP-1 dan *cytokines* termasuk TNF- α , memicu respons alami. Virus dengue NS1 diekspresikan pada permukaan sel terinfeksi dan sNS1 dapat dideteksi dari darah. Kadar basal ANGPT-1 dan ANGPT-2, VEGF dan sVEGFR-2 ditemukan di dalam darah dan ekspresi ICAM dan VCAM pada permukaan sel endotel. Selama fase ini, pada *endothelial* belum terjadi kebocoran plasma. Gambar (b) menunjukkan fase kebocoran plasma. NS1 terlarut dan antibodi anti-NS1/kompleks NS1 dapat berinteraksi dengan sel endotel dan mengaktifasi sistem komplemen. Sitokin seperti TNF- α , MIP-1 β , IFN- δ dan mediator lainnya yang diproduksi oleh sel terinfeksi DENV dan sel T memori. Peningkatan VEGF dan penurunan kadar sVEGFR-2 berhubungan dengan kebocoran plasma. Angiopoietin-1 berperan sebagai antagonis dari VEGF, kadarnya menurun. Sementara itu kadar ANGPT-2 meningkat. DENV menginduksi sekresi *matrix metalloproteinases* (MMPs) oleh sel dendritik, yang dapat merusak sel endotel ketika berbeda ekspresi ICAM dan VCAM (Srikiatkachorn *et al.*, 2014).



Gambar 2.25. Peranan VEGF dan ANGPT-2 pada Kebocoran Plasma (Srikiatkachorn *et al.*, 2014).

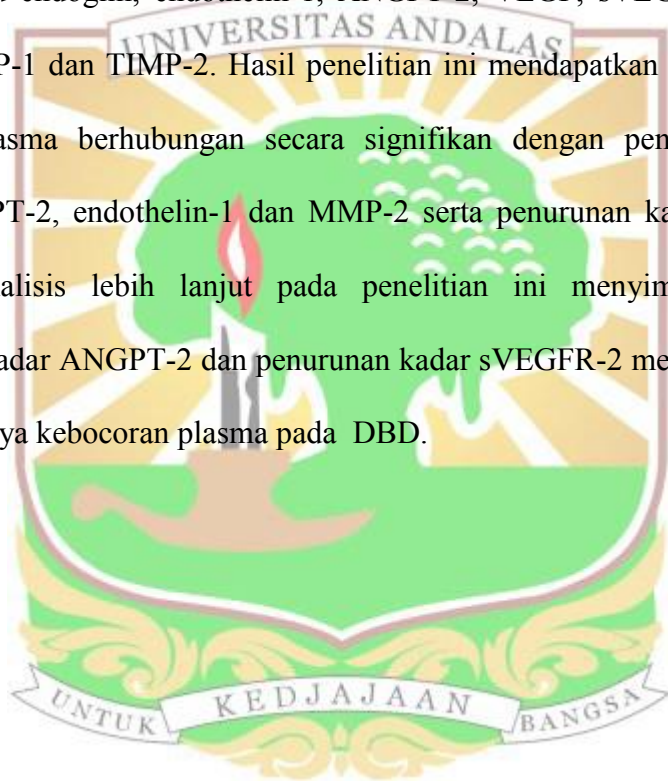
Leukosit yang teraktivasi juga mensekresikan VEGF, yang menyebabkan perubahan permeabilitas vaskular dan sekresi ANGPT-2. Angiopoietin-2 menggantikan ANGPT-1 dari reseptor Tie-2, sehingga mengakibatkan inflamasi lebih lanjut dan peningkatan permeabilitas endotel (Karleeet *al.*, 2007). Studi pada kultur sel endotel (HUVE) menunjukkan bahwa pada sel endotel yang diaktivasi VEGF tanpa ANGPT-2 tidak menunjukkan adanya peningkatan permeabilitas endotel. Namun, apabila sel endotel diaktivasi oleh ANGPT-2 dan VEGF akan terjadi peningkatan permeabilitas endotel. Sehingga disimpulkan bahwa VEGF menguatkan efek peningkatan permeabilitas endotel oleh ANGPT-2 (Thomas, 2008).



Gambar 2.26 Pengaruh VEGF dan Angiopoietin terhadap Permeabilitas Vaskular Endotel (Karlee, 2007)

2.3.5 Angiopoetin-2 dan VEGF sebagai Penanda Kebocoran Plasma pada Infeksi Virus Dengue

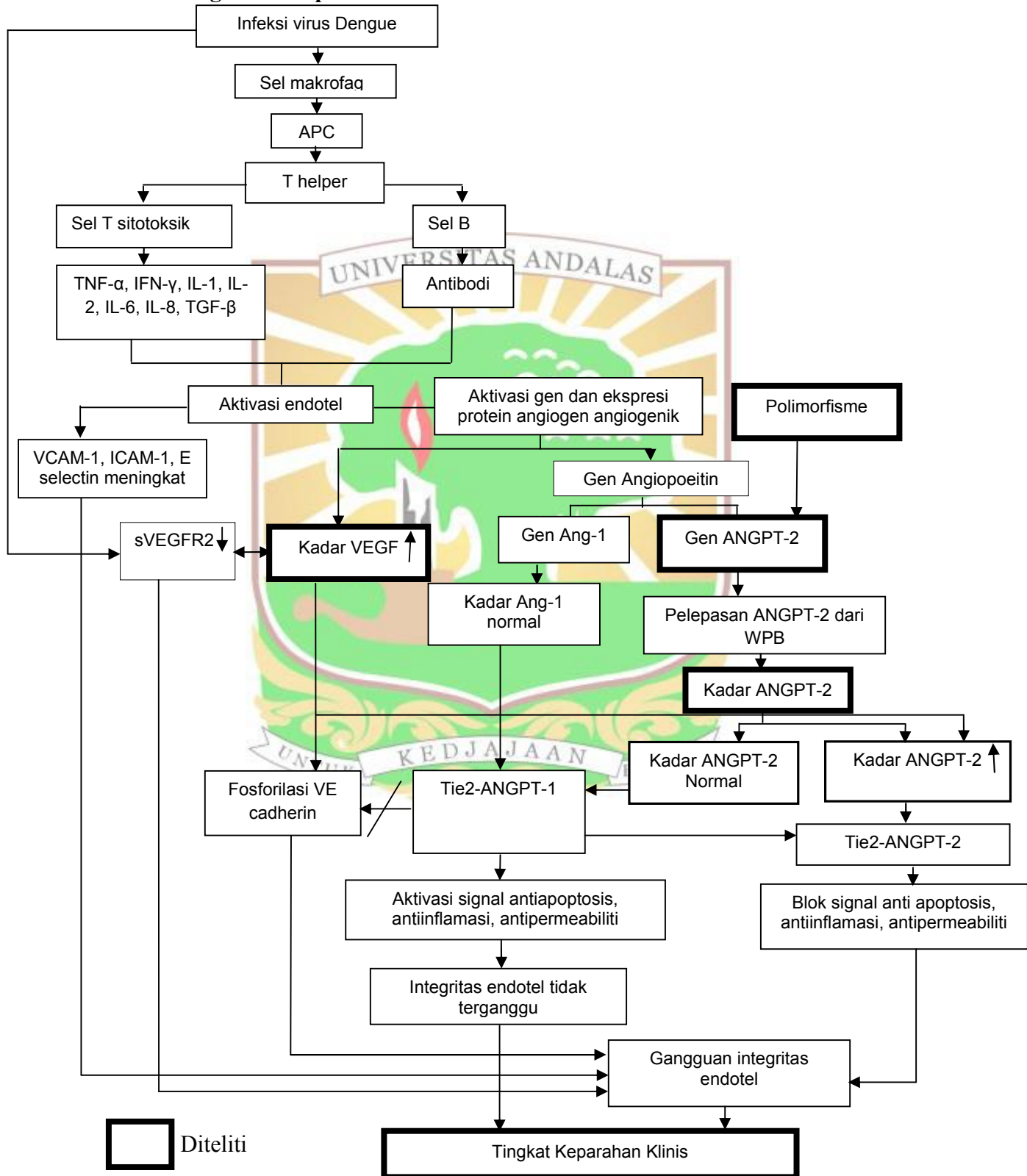
Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kadar ANGPT-2 dan sVEGFR merupakan marker utama kebocoran plasma pada DBD. Weg et al., (2014) melakukan suatu studi kohor terhadap 105 pasien dengan infeksi virus dengue, untuk mengetahui marker yang dapat dijadikan penanda adanya kebocoran plasma. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar serum beberapa protein penanda, yaitu endoglin, endothelin-1, ANGPT-2, VEGF, sVEGFR-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 dan TIMP-2. Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa kejadian kebocoran plasma berhubungan secara signifikan dengan peningkatan kadar plasma ANGPT-2, endothelin-1 dan MMP-2 serta penurunan kadar sVEGFR-2 dan hasil analisis lebih lanjut pada penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan kadar ANGPT-2 dan penurunan kadar sVEGFR-2 merupakan marker utama terjadinya kebocoran plasma pada DBD.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

3.2 Keterangan Kerangka Konseptual Penelitian

Virus dengue akan masuk ke peredaran darah ditangkap oleh makrofag sehingga makrofag akan berubah menjadi *antigen presenting cell* dan akan mengaktivasi sel T helper, sel T helper akan mengaktivasi sel T sitotoksik yang akan melepaskan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TGF- β . Sel T helper juga akan mengaktivasi sel B dan menghasilkan antibodi. Sitokin proinflamasi dan antibodi selanjutnya akan mengaktivasi endotel, endotel yang teraktivasi akan menyebabkan peningkatan ekspresi molekul *adhesive* (ICAM, VICAM dan P-selektin) serta peningkatan ekspresi protein angiogenik yaitu ANGPT-2 dan VEGF.

Peningkatan ekspresi ANGPT-2 akan menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2 didalam plasma sehingga terjadi ketidakseimbangan rasio ANGPT-1 dan ANGPT-2, ketidakseimbangan tersebut akan menggeser ikatan reseptor Tie-2 dengan ANGPT-1 menjadi ikatan Tie-2-ANGPT-2. Ikatan Tie-2-ANGPT-2 akan mengakibatkan fungsi ANGPT-1 sebagai penghambat fosforilasi VE-cadherin dan sebagai antiapoptosis, antiinflamasi dan antipermeabiliti terhadap sel endotel tidak berfungsi sehingga terjadi gangguan integritas endotel yang berujung pada kebocoran plasma.

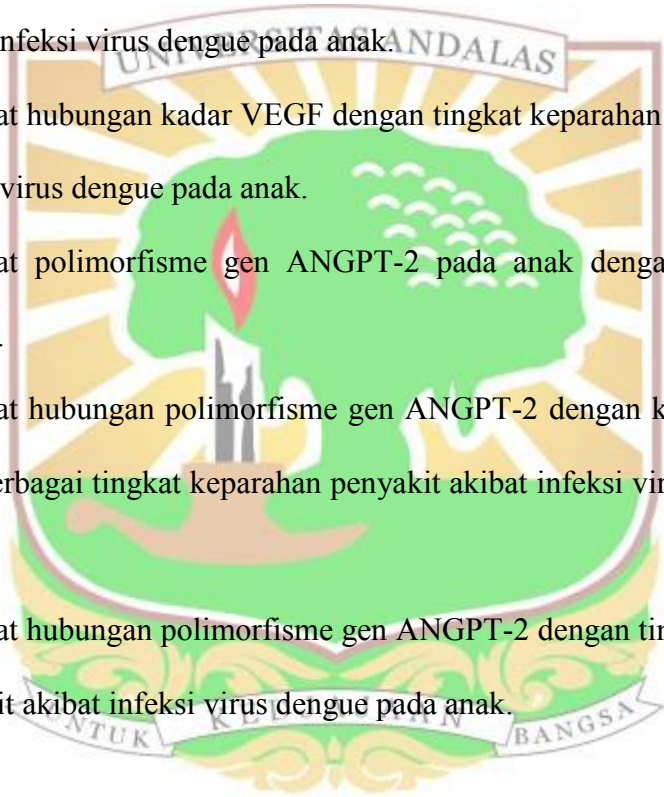
Variasi genetik (polimorfisme) gen pengode ANGPT-2 pada beberapa penelitian telah diketahui berpengaruh terhadap tingkat keparahan suatu penyakit seperti pada sepsis dan ARDS. Diduga terdapat polimorfisme gen ANGPT-2 pada infeksi virus dengue yang menentukan tingkat keparahan penyakit.

Infeksi virus dengue secara langsung akan menyebabkan penurunan kadar sVEGFR sehingga jumlah VEGF bebas akan meningkat. Kadar VEGF

bebas yang meningkat akan menyebabkan fosforilasi *VE-cadherin* sehingga menyebabkan gangguan *junctional* sel endotel sehingga terjadi kebocoran plasma. Kadar VEGF yang meningkat juga akan menguatkan efek kebocoran plasma yang ditimbulkan oleh ANGPT-2.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Terdapat hubungan kadar ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.
2. Terdapat hubungan kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.
3. Terdapat polimorfisme gen ANGPT-2 pada anak dengan infeksi virus dengue.
4. Terdapat hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan kadar ANGPT-2 pada berbagai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.
5. Terdapat hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Disain Penelitian

Jenis penelitian adalah observasional

Disain penelitian adalah *cross sectional study*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel darah dilakukan di Bagian Anak RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pemeriksaan darah rutin, IgM dan IgG anti dengue di Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pemeriksaan kadar ANGPT-2, VEGF dan polimorfisme gen ANGPT-2 bertempat di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang .

Waktu penelitian sejak Agustus 2014 sampai Juli 2017.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah pasien yang dirawat dengan infeksi virus dengue berdasarkan kriteria klinis WHO 2011 dengan IgM antidengue positif dan IgM atau IgG antidengue positif di Bagian Anak RSUP Dr. M. Djamil Padang/ Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bagian dari populasi yang memenuhi kriteria inklusi.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1 Kriteria Inklusi


- Usia 1 bulan sampai 14 tahun
- Mendapat izin dari orangtua untuk mengikuti penelitian

4.4.2 Kriteria Eksklusi

- Pasien dengan infeksi virus dengue yang disertai *expanded dengue syndrome*

4.5 Perkiraan Besar dan Cara Pengambilan Sampel

4.5.1 Perkiraan Besar Sampel


$$N = \frac{Z\alpha^2 P.Q}{d^2}$$

n = jumlah sampel yang dicari

$Z\alpha$ = tingkat kemaknaan ($\alpha = 0,05$ $Z\alpha = 1,96$)

P = proporsi dari penyakit (Prevalensi DBD di Indonesia 50 %. Nilai P=0,5)

Q = 1-P = 0,5

d = tingkat ketepatan absolut yang ditetapkan adalah 10%= 0,1

Jumlah sampel yang didapatkan adalah:

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times 0,5}{(0,1)^2} = 96$$

Jumlah sampel 96 orang ditambah drop out 10% adalah 106 orang.

4.5.2 Cara Pengambilan Sampel

Pemilihan sampel dilakukan secara *consecutive sampling*.

4.6 Identifikasi Variabel

Variabel bebas: polimorfisme gen ANGPT-2, kadar ANGPT-2 dan kadar VEGF.

Variabel tergantung: tingkat keparahan klinis infeksi virus dengue.

4.7 Definisi Operasional

1. Tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue

Definisi : Tingkat beratnya penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dengue.

Cara ukur : Manifestasi klinis dan laboratorium

Alat ukur : Kriteria WHO 2011

Hasil ukur : Derajat keparahan klinis

1. Ringan (DD) : demam tinggi selama 2-7 hari, tidak ditemukan hemokonsentrasi, trombositopenia (trombosit $< 100.000/mm^3$), IgM/ IgM dan IgG anti dengue positif
2. Berat (DBD) : DD ditambah dengan adanya hemokonsentrasi
3. Sangat berat (SSD): DBD ditambah dengan renjatan

Skala ukur : Ordinal

2. Polimorfisme gen ANGPT-2

Definisi : Variasi susunan nukleotida pada alel ANGPT-2 exon 4

Cara ukur : Sekuensing DNA dan Elektroforesis

Alat ukur : Sekuenser dan sistem elektroforesis

Hasil ukur : Hasil dari sekuenser berupa urutan nukleotida gen ANGPT-2 dan hasil dari elektroforesis berupa fragmen gen ANGPT-2

Skala ukur : Ordinal

3. Kadar ANGPT-2

Definisi : Kadar protein Angiopoietin dalam serum penderita infeksi virus dengue

Cara ukur : ELISA

Alat ukur : Angiopoietin kit

Hasil ukur : Kadar dalam satuan pg/ml

Skala ukur : Rasio

4. Kadar VEGF

Definisi : Kadar protein VEGF dalam serum penderita infeksi virus dengue

Cara ukur : ELISA

Alat ukur : *Quantikine Human VEGF Immunoassay kit*

Hasil ukur : Kadar dalam satuan pg/ml

Skala ukur : Rasio

4.8 Izin Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan izin dari Komite Etik FK UNAND sesuai peraturan yang berlaku. *Informed consent* diminta kepada orangtua yang bersangkutan sesuai dengan kode etik penelitian yang ditetapkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.



4.9 Prosedur Penelitian

1. Penelitian diawali dengan mengajukan izin ke Komite Etik FK UNAND
2. Pasien dipilih secara *consecutive sampling*.
3. Dilakukan sosialisasi dan *informed consent* mengenai penelitian yang akan dilaksanakan kepada orangtua.
4. Dilakukan pengumpulan data (usia, jenis kelamin, etnik, status gizi, gejala klinis, laboratorium rutin dan diagnosis) saat masuk.
5. Semua sampel diterapi berdasarkan protokol WHO 2011.

4.9.1 Pengambilan spesimen

1. Pada demam hari ke-5 atau ke-6 dilakukan pemeriksaan darah tepi lengkap, IgM dan IgG ant dengue, polimorfisme gen ANGPT-2, kadar ANGPT-2 dan kadar VEGF.
2. Pengambilan spesimen darah vena dengan menggunakan spuit 5 cc, darah vena yang diambil sebanyak 5 cc. Pengambilan darah dilakukan di daerah fossa cubiti dengan memperhatikan prinsip aseptik dan antiseptik.
3. Darah diaspirasi perlahan, sampai 5 cc. Spuit dicabut dan bekas suntikan ditutup dengan kapas alkohol. Sampel darah kemudian dibagi ke dalam 3 tabung *vacutainer* dan diberi label.
 - a. Tabung I: tabung EDTA dimasukkan sampel darah 0.5 cc, diberi label ungu, serta dikirimkan ke Laboratorium Patologi Klinik RS. M. Djamil Padang untuk pemeriksaan darah tepi (hemoglobin, leukosit, hitung jenis, hematokrit, dan trombosit).

- b. Tabung II: tabung serum dimasukkan sampel darah 2 cc, diberi label kuning, serta dikirimkan ke Laboratorium Patologi Klinik RS. M. Djamil Padang untuk pemeriksaan IgG dan IgM antidengue.
- c. Tabung III: tabung EDTA dimasukkan 2.5 cc sampel darah, diberi label merah serta dikirimkan ke Laboratorium Biomedik FK Unand untuk pemeriksaan kadar ANGPT-2, kadar VEGF dan pemeriksaan DNA (polimorfisme ANGPT-2).

4.9.2 Pemeriksaan IgG dan IgM Antidengue

Darah dari tabung *vacutainer* dilakukan pemeriksaan IgG dan IgM antidengue secara cepat dengan menggunakan *Kit SD Bioline*. Pipet serum 10 μ l di teteskan pada *rapid test*, kemudian ditambahkan 2 tetes buffer, dan hasilnya dibaca setelah 15 menit.

Interpretasi hasil :

Positif :

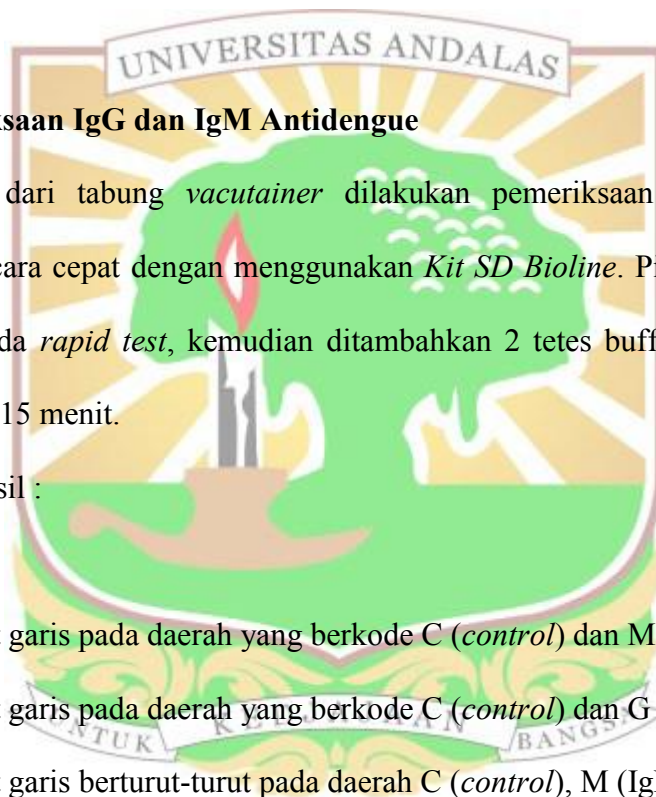
- Terdapat garis pada daerah yang berkode C (*control*) dan M (IgM)
- Terdapat garis pada daerah yang berkode C (*control*) dan G (IgG)
- Terdapat garis berturut-turut pada daerah C (*control*), M (IgM) dan G (IgG)

Negatif :

- Terdapat garis pada daerah C (*control*) saja.

Invalid :

- Terdapat garis pada daerah M (IgM) saja
- Terdapat garis pada daerah G (IgG) saja
- Tidak ada garis yang muncul sama sekali.



4.9.3 Pemeriksaan Kadar ANGPT-2

Petunjuk pencucian

- Setelah aspirasi, sampel dicuci dengan minimal 0,4 ml larutan *wash buffer*.
- Rendam selama 15 sampai 30 detik, kemudian diaspirasi. Setelah prosedur pencucian, sampel kemudian dikeringkan dengan jaringan *absorbent*.

Persiapan sampel

- Serum dan plasma manusia memerlukan pengenceran 10 kali lipat dalam *Standard Diluent Buffer*. Untuk sampel ini, tambahkan 25 μ L sampel ke dalam tabung *microfuge*, diikuti oleh 225 μ L *Standard Diluent Buffer* kemudian dicampur dengan rata.

Persiapan reagen dan penyimpanan

A. Rekonstitusi dan dilusi Hu Angiopoietin-2

1. Rekonstitusi standar menjadi 20.000 pg/ml dengan *Standard Diluent Buffer*. Campurkan secara perlahan dan diamkan selama 10 menit agar terlarut sempurna.
2. Tambahkan 0.1 ml *reconstituted standard* ke dalam tabung yang berisi 0.9 ml *Standard Diluent Buffer*. Kemudian dilabel sebagai 2000 pg/ml Hu ANGPT-2. Mix
3. Tambahkan 0.300 ml *Standard Diluent Buffer* ke dalam 6 tabung dan dilabel dengan 1000, 500, 250, 125, 62.5, and 31.2 pg/mL Hu ANGPT-2.

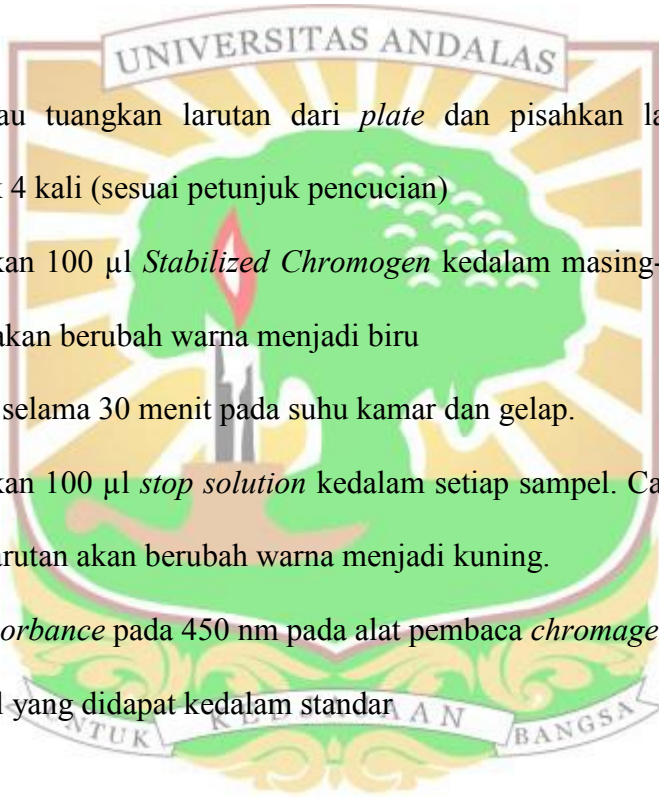
4. Buat dilusi serial seperti yang terlihat pada tabel berikut:

Standard:	Add:	Into:
2000 pg/mL	Prepare as described in Step 2.	
1000 pg/mL	0.300 mL of the 2000 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
500 pg/mL	0.300 mL of the 1000 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
250 pg/mL	0.300 mL of the 500 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
125 pg/mL	0.300 mL of the 250 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
62.5 pg/mL	0.300 mL of the 125 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
31.2 pg/mL	0.300 mL of the 62.5 pg/mL std.	0.300 mL of the Diluent Buffer
0 pg/mL	0.300 mL of the Diluent Buffer	An empty tube

Metode kerja

1. Sampel darah yang dimasukkan ke dalam tabung serum dikirim ke laboratorium Biomedik FK UNAND dengan menggunakan media *transport* pada suhu 4⁰C.
2. Sampel harus disimpan pada suhu beku apabila tidak diperiksa secara langsung setelah pengambilan.
3. Sediakan 8 buah strip untuk pemeriksaan
4. Larutkan serum dan plasma dengan *Standard Diluent Buffer* perbandingan 1:10.
5. Tambahkan 25 ul *Incubation Buffer* ke dalam setiap sampel
6. Tambahkan 100 ul *Standard Diluent Buffer* kedalam standar
7. Tambahkan 100 ul standar, kontrol, atau sampel ke tabung mikrotiter yang sesuai
8. Pipet larutan 50 ul *biotinylated Hu ANGPT-2 Biotin Conjugate* ke dalam setiap *plate* reagen. Campurkan selama 30 detik

9. Tutup *plate* dengan *plate cover* dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar.
10. Tarik atau tuangkan larutan dari *plate* dan pisahkan larutannya. Cuci sebanyak 4 kali (sesuai petunjuk pencucian).
11. Tambahkan 100 μ l larutan Streptavidin HRP masing-masing sampel kecuali *chromagen* kosong (sesuai petunjuk persiapan reagen dan penyimpanan)
12. Tutup *plate* dengan *plate cover* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.
13. Tarik atau tuangkan larutan dari *plate* dan pisahkan larutannya. Cuci sebanyak 4 kali (sesuai petunjuk pencucian)
14. Tambahkan 100 μ l *Stabilized Chromogen* kedalam masing-masing sampel. Larutan akan berubah warna menjadi biru
15. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan gelap.
16. Tambahkan 100 μ l *stop solution* kedalam setiap sampel. Campurkan secara pelan. Larutan akan berubah warna menjadi kuning.
17. Baca *absorbance* pada 450 nm pada alat pembaca *chromagen*.
18. Plot hasil yang didapat kedalam standar



4.9.4 Pemeriksaan VEGF

Pemeriksaan kadar VEGF dilakukan secara ELISA dengan menggunakan kit *Quantikine*® ELISA.

Pengumpulan dan penyimpanan sampel

- a. Supernates kultur sel. Buang partikulat dengan sentrifugasi dan uji segera atau aliquot dan simpan sampel pada suhu ≤ -20 °C.

- b. Gunakan tabung pemisah serum (SST) dan sampel didiamkan selama 30 menit pada suhu ruangan sebelum sentrifugasi selama 15 menit pada 1000 xg.
- c. Plasma dikumpulkan menggunakan EDTA atau heparin sebagai antikoagulan. *Sentrifuge* selama 15 menit pada 1000 x g dalam waktu 30 menit.

Persiapan sampel

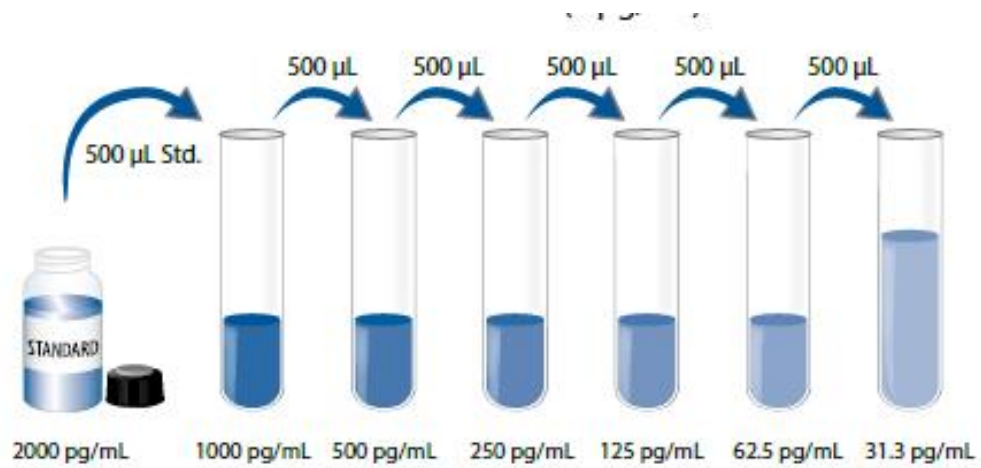
1. Sampel serum dan plasma diencerkan sebanyak 5 kali.
2. Sel dari ekstrak kultur dilisis sebelum pengujian dengan cara berikut.
 - a. Cuci sel tiga kali dalam PBS dingin.
 - b. Sel di *resuspend* dalam *Cell Lysis Buffer 2* hingga konsentrasi 1,5x10⁶ sel/mL.
 - c. Inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dengan pencampuran lembut.
 - d. Sel *disentrifuge* pada 1000 x g selama 15 menit.
 - e. Uji supernatan segera atau aliquot dan simpan di $\leq -70^{\circ} \text{C}$.

Persiapan reagen

Semua reagen dibawa ke suhu kamar sebelum digunakan.

- a. *Wash Buffer* - Jika kristal terbentuk dalam konsentrat, dihangatkan untuk suhu kamar dan dicampurkan perlahan sampai kristal telah benar-benar larut. Tambahkan 20 mL *Wash Buffer* Konsentrat untuk deionisasi atau air suling untuk mempersiapkan 500 mL *Wash Buffer*.
- b. Larutansubstrat - Reagen A dan B dicampur bersama-sama dalam volume yang sama dalam waktu 15 menit. Lindungi dari cahaya.

c. *Standard VEGF* -Buat VEGF standar dengan menggunakan diluen kalibrator RD6U. Diluen ini mungkin mengandung presipitat, aduk dan ratakan sebelum digunakan. Untuk pemeriksaan yang dengan sampel serum darah, ambil 500 μL kalibrotor diluen RD6U kedalam tiap tabung reaksi. Aduk sebelum dipindahkan ke tabung selanjutnya. Kadar 2000 pg/mL merupakan standar tertinggi yang bisa dipakai.



Prosedur Assay

1. Siapkan seluruh reagen, cara kerja dan sampel
2. Buka bungkus mikroplate strip
3. Tambahkan 100 μL *Assay Diluent* RD1W pada masing-masingnya.
4. Tambahkan 100 μL standar, kontrol atau sampel. Tutup dengan strip pelekats yang telah disediakan dan diamkan selama 2 jam pada suhu kamar.
5. Aspirasi tiap sampel dan cuci, ulang hingga dua kali sehingga total pencucian menjadi tiga kali. Cuci dengan benar menggunakan *Wash Buffer*. Setelah pencucian terakhir pastikan cairan *wash buffer* sudah tidak ada. Balikkan lempeng sampel dan keringkan menggunakan kertas pengering.

6. Tambahkan 200 μL VEGF konjugasi ke tiap lempeng sampel. Tutup dengan perekat. Diamkan selama 2 jam pada suhu kamar.
7. Cuci kembali seperti tahap 5.
8. Tambahkan 200 μL *Substrate Solution* pada tiap lempeng. Hindari paparan cahaya. Lalu diamkan selama 25 menit pada suhu kamar
9. Tambahkan 50 μL *Stop Solution* pada tiap lempeng. Jika tidak terjadi perubahan warna, ketuk lembut pada lempeng untuk memastikan tercampur.
10. Gunakan *mikroplate reader* yang diset pada 450 nm untuk dapat membaca *optical density* pada tiap lempeng selama 30 menit.

Perhitungan Hasil

Buat kurva standar dengan mengurangi data menggunakan perangkat lunak komputer yang mampu menghasilkan empat parameter logistik (4-PL) kurva fit. Sebagai alternatif, buat sebuah kurva standar dengan memplot absorbansi rata-rata untuk masing-masing standar pada sumbu y terhadap konsentrasi pada sumbu x dan menggambar cocok kurva terbaik melalui titik-titik pada grafik. Data dapat linierisasi oleh memplot log dari konsentrasi VEGF-R2 versus log dari OD dan paling cocok baris dapat ditentukan dengan analisis regresi. Prosedur ini akan menghasilkan cukup data. Jika sampel telah diencerkan, membaca konsentrasi dari kurva standar harus dikalikan dengan faktor pengenceran.

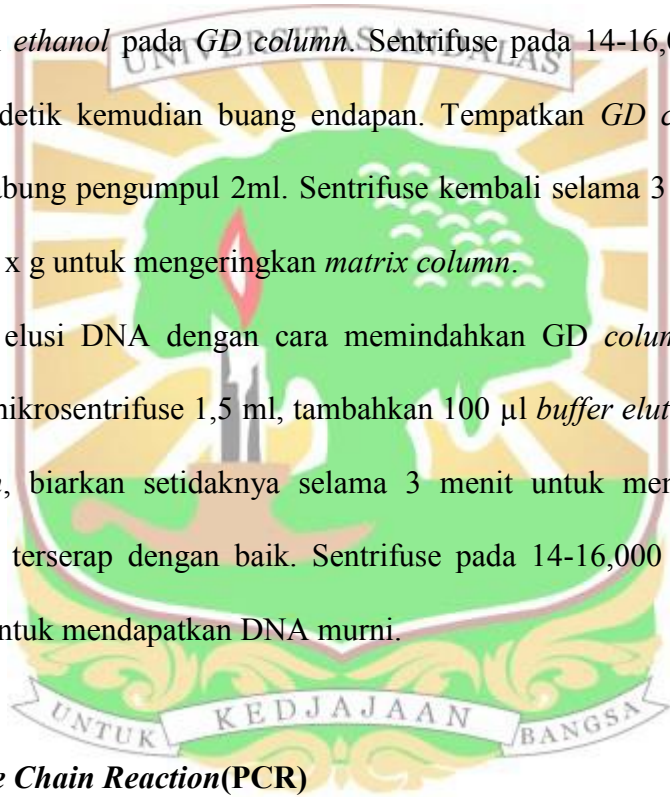
4.9.5 Pemeriksaan Polimorfisme Gen Angiopoeitin 2

1. Ekstraksi DNA

DNA genomik diisolasi dari sampel darah menggunakan *Genomic DNA mini kit (Blood/cultured cell) Geneaid Cat. No GB100*. Isolasi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur kit yang terdiri atas tahap preparasi sampel, tahap lisis sel, tahap pengikatan DNA, tahap pencucian, dan tahap elusi DNA.

- a. Tahap persiapan: darah diambil 300 μ l pada 1.5 ml botol mikrosentrifuse, ditambahkan *buffer RBC (buffer lysis)* 200 μ l. Kemudian dicampur dengan dibalikkan dan tidak boleh dilakukan *vortex* (diaduk). Inkubasi botol selama 10 menit pada suhu ruang. Lakukan sentrifuse selama 5 menit pada kecepatan 3,000 x dan buang supernatant. Tambahkan 100 μ l *buffer lysis RBC* untuk membuang kembali leukosit kemudian diproses dengan lisis sel. Tambahkan 200 μ l *buffer GB* pada 1.5 ml botol mikrosentrifuse kemudian dikocok secara hati-hati. Inkubasi pada suhu 60°C setidaknya 10 menit untuk memastikan sampel *lysate* jernih. Selama inkubasi, balikkan botol setiap 3 menit.
- b. Tahap lisis sel: diperlukan pemanasan *buffer Elution* (200 μ l setiap sampel) sampai dengan suhu 60°C, kemudian tambahkan 5 μ l RNAase (10 mg/ml) pada *lysate* jernih dan campurkan dengan dikocok secara hati-hati. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Tambahkan 200 μ l *ethanol absolute* pada *lysate* kemudian campur dan kocok segera secara hati-hati selama 10 detik. Jika endapan muncul, pecahkan sesering mungkin dengan menggunakan pipet.

- c. Tahap pengikatan DNA (*DNA binding*) dan pencucian DNA. Tempatkan *GD column* pada botol pengumpul 2ml. pindahkan campuran termasuk endapan pada *GD column*, sentrifuse pada 14-16,000 x g selama 5 menit, buang dan tempatkan *GD column* pada botol pengumpul 2ml. Tambahkan 400 μ l *buffer* W1 pada *GD column* kemudian sentrifuse pada 14-16,000 x g selama 30-60 detik, buang endapan kemudian tempatkan pada *GD column* kembali pada tabung pengumpul 2ml. Tambahkan 600 μ l *wash* dengan *ethanol* pada *GD column*. Sentrifuse pada 14-16,000 x g selama 30-60 detik kemudian buang endapan. Tempatkan *GD column* kembali pada tabung pengumpul 2ml. Sentrifuse kembali selama 3 menit pada 14-16,000 x g untuk mengeringkan *matrix column*.
- d. Tahap elusi DNA dengan cara memindahkan *GD column* kering pada botol mikrosentrifuse 1,5 ml, tambahkan 100 μ l *buffer elution* pada *matrix column*, biarkan setidaknya selama 3 menit untuk memastikan *buffer elution* terserap dengan baik. Sentrifuse pada 14-16,000 x g selama 30 detik untuk mendapatkan DNA murni.



2. *Polymerase Chain Reaction*(PCR)

Proses PCR dilakukan dengan cara memasukkan 100 ng *genomic* DNA, 200 μ m dNTP, 10 pmol primer, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq DNA *polymerase* (Promega, Madison, WI, USA) dalam volume total 25 μ l. PCR *cycling condition* melalui 94°C selama 5 menit, 30 *cycles* pada 94°C untuk 45s, *annealing temperature* untuk 45s, 72°C untuk 45s, dan 72°C untuk tiap 7 menit.

Komponen reaksi PCR dimasukkan sesuai tabel 4.1 dibawah ini ke dalam tabung PCR.

Tabel 4.1 Komposisi Reaksi PCR Gen Angiopoetin-2

Komponen PCR	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume (μ l)
GoTaq Green Master Mix PCR, Promega	2x	1x	12,5
Primer sr1040079-F	10 μ M	0,3 μ M	0,75
Primer sr1040079-R	10 μ M	0,3 μ M	0,75
MgCl ₂	50mM	2mM	1
ddH ₂ O	-	-	7
Sampel DNA	-	-	3
Volume akhir			25

Spin down beberapa detik agar semua komponen berada di dasar tabung PCR. Selanjutnya masukkan ke dalam mesin PCR dan atur program PCR dengan profil sebagai berikut:

Tabel 4.2 Program PCR Gen Angiopoetin-2

Tahap PCR	Suhu ($^{\circ}$ C)	Durasi	Siklus
Denaturasi awal	95	10 menit	
Denaturasi lanjut	95	30 detik	10 kali
<i>Annealing</i>	67,5	30 detik	
Elongasi	72	1 menit	
Denaturasi lanjut	95	30 detik	5 kali
<i>Annealing</i>	67,5-55	30 detik	
Elongasi	72	1 menit	
Denaturasi lanjut	95	30 detik	20 kali
<i>Annealing</i>	65	30 detik	
Elongasi	72	1 menit	
Elongasi akhir	72	5 menit	

Hasil PCR dielektroforesis menggunakan *gel agarose* 1,5% yang sudah ditambahkan pewarna DNA dan divisualisasi menggunakan *GelDoc BioRad*.

3. Sekuensing DNA

Sekuensing (proses untuk mengetahui urutan basa nukleotida suatu DNA) dilakukan di Laboratorium Macrogen Korea Selatan dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse*. Primer yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.3 Sekuen Primer Gen ANGPT-2 (Ward *et al.*, 2001)

Primer	Sekuens	Panjang (bp)
<i>Forward</i>	5'-CAC CCA TAT CCC ACC TAT CCT-3'	793
<i>Reverse</i>	5'-TGC CCA GTC TCA TCC TTC TA-3'	

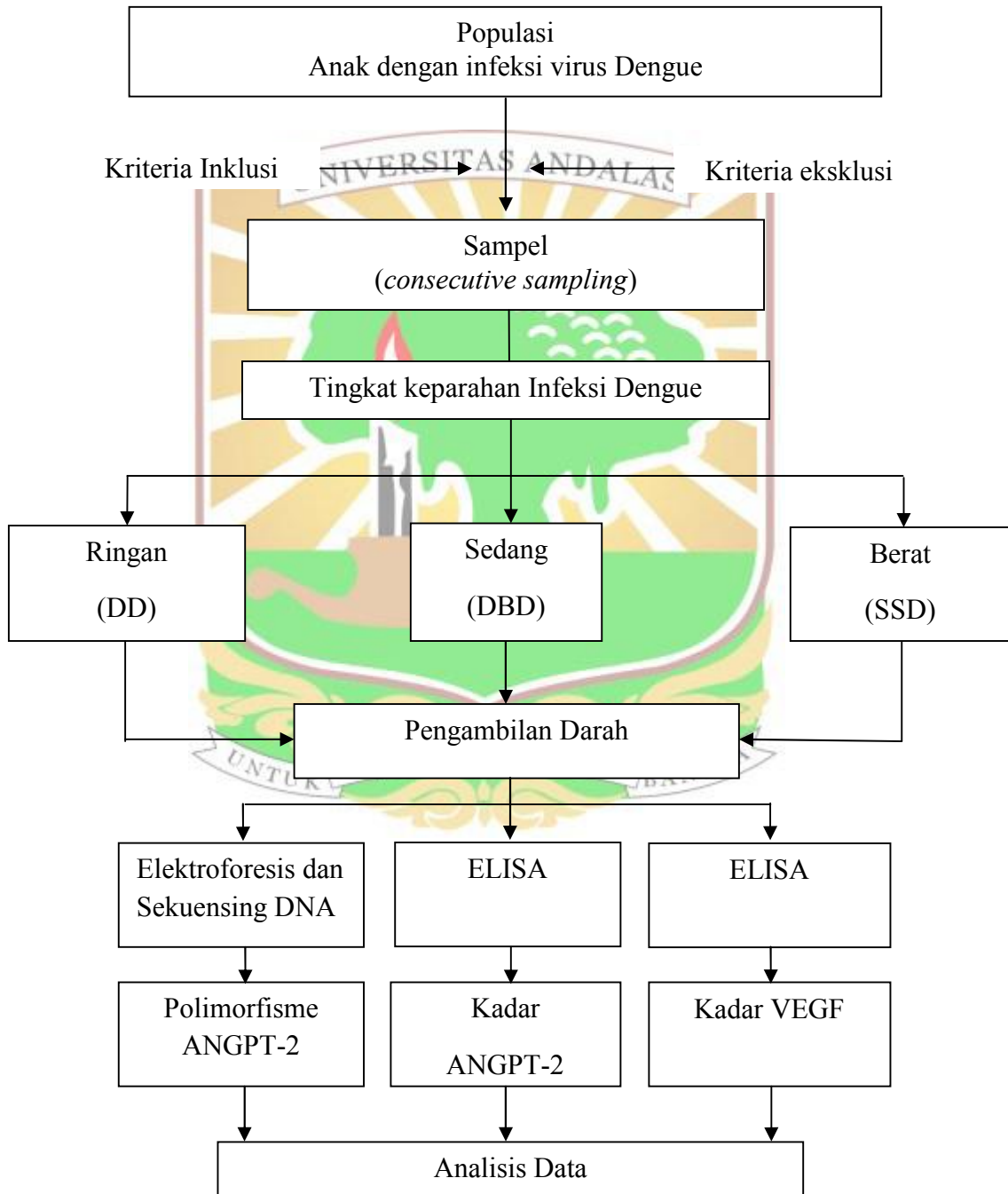
Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan tahapan berikut. Tahap analisis kualitatif yang dilakukan adalah : pertama analisis *contig*. Analisis *Contig* digunakan untuk mengetahui baik atau buruk kualitas sekuen basa DNA hasil sekuensing. *Contig* dilakukan untuk menggunakan *software* Geneious. 7.0. Kedua alignment. Alignment digunakan untuk mengetahui *single nucleotide polymorphism* atau SNP antara sekuen basa DNA hasil sekuensing. *Alignment* dilakukan menggunakan *software* Geneious.7.0. Ketiga, analisis BLAST (*Basic Local Alignment Tool*). Analisis BLAST digunakan untuk mengetahui validitas hasil sekuensing terhadap spesies objek penelitian. Analisis BLAST dilakukan menggunakan program BLAST yang ada pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

4.10 Pengumpulan dan Pengolahan Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sistem komputer serta disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Karakteristik subjek penelitian yang berhubungan dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue diuji dengan *chisquare* dan ANOVA. Uji

beda variabel bebas dengan tingkat keparahan penyakit diuji dengan ANOVA, dengansignifikansi $p < 0,05$. Jika distribusi data tidak normal, data disajikan dalam bentuk median dan diuji dengan uji Kruskal Wallis

4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis hubungan polimorfisme gen dan kadar ANGPT-2 serta kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak. Subjek penelitian adalah pasien anak dengan infeksi virus dengue yang dirawat di RS Dr. M. Djamil Padang. Terdapat 3 tingkat keparahan, terdiri dari DD, DBD dan SSD yang ditentukan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium sesuai kriteria WHO 2011. Pemeriksaan kadar ANGPT-2 dan VEGF dilakukan secara ELISA. Polimorfisme gen ANGPT-2 difokuskan pada region exon 4 karena merupakan region yang sangat polimorfik dan memiliki SNP yang paling banyak diantara 9 exon pada ANGPT-2. Selama masa pengumpulan subjek penelitian mulai bulan September 2015 sampai September 2016, didapatkan 121 subjek penelitian dengan infeksi virus dengue yang dipilih secara *consecutive sampling*. Sebanyak 13 subjek dikeluarkan karena volume sampel darah tidak mencukupi pada 6 subjek dan pada 7 subjek lainnya sampel darah tidak dapat diperiksa karena lisis. Jumlah subjek penelitian yang dianalisis adalah 108 subjek, terdiri dari kelompok DD 34 subjek (31,48%), kelompok DBD 39 subjek (36,11%) dan kelompok SSD 35 subjek (32,40%). Data demografi dan karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Karakteristik Klinis dan Laboratorium Subjek Penelitian Berdasarkan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Karakteristik	DD (n=34)	DBD (n=39)	SSD (n=35)	Nilai p
Karakteristik klinis				
Jenis kelamin, n (%)				
Laki-laki	18 (52,9)	13 (33,3)	19 (54,3)	0,897*
Perempuan	16 (47,1)	26 (66,7)	16 (45,7)	
Usia, tahun, mean (SD)	7,87 (3,59)	7,07 (3,25)	6,19 (4,06)	0,165**
≤ 1 tahun	2	2	5	
1-5 tahun	8	9	12	0,344***
>5-10 tahun	15	22	10	
>10 tahun	9	6	8	
Status Gizi (n)				
Gizi kurang	10	16	13	0,872***
Gizi baik	21	17	18	
Gizi lebih/ obesitas	3	6	4	
Lama demam (hari), median (min-max)	5 (2-6)	5 (2-8)	5 (3-6)	0,454***
Karakteristik laboratorium				
Hemoglobin (g/dl), median (min-max)	12,2 (10,5-14,8)	13,3 (9,2-17,3)	13,5 (5,6-17,4)	0,010***
Hematokrit (vol%), median (min-max)	37,5 (33-49)	41 (28-53)	41 (16-53)	0,016***
Jumlah trombosit, (/mm ³), median (min-max)	78 500 (13.000- 247.000)	40 000 (13.000- 133.000)	40 000 (4.000-131.000)	0,001***
Jenis infeksi dengue n (%)				
Infeksi Primer (Ig-M positif)	18 (53)	8 (20,5)	4 (11,4)	0,001*
Infeksi Sekunder (Ig M dan IgG Positif)	16 (47)	31 (79,5)	31 (88,6)	

* Uji Chi-Square for trend, ** Uji One way anova

*** Uji Kruskal Wallis, uji post hoc Mann-Whitney:

Tabel 5.1 memperlihatkan jumlah subjek perempuan 58 orang (53.71%) lebih banyak dari laki-laki 50 orang (46.29%), namun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ketiga kelompok keparahan penyakit ($p > 0.05$). Usia subjek penelitian pada kelompok DD adalah 7.87 ± 3.59 tahun, DBD 7.07 ± 3.25 tahun dan SSD 6.19 ± 4.06 tahun, dan tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik usia subjek penelitian antara ketiga kelompok keparahan penyakit ($p > 0.05$). Kelompok usia terbanyak adalah usia 5-10 tahun. Virus dengue paling banyak menginfeksi subjek anak dengan status gizi baik. Lama demam saat dilakukan pemeriksaan adalah 5 hari. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara jenis kelamin, usia, status gizi

dan lama demam pada ketiga kelompok tingkat keparahan penyakit (DD, DBD dan SSD).

Nilai median kadar hemoglobin subjek dengan DD adalah 12.2 g/dl, DBD 13.3 g/dl, dan SSD 13.5 g/dl. Terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik kadar hemoglobin dan nilai hematokrit antar ketiga kelompok tingkat keparahan penyakit ($p < 0.05$). Uji post hoc kadar hemoglobin dan nilai hematokrit menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok DD dengan DBD ($p < 0.05$), namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna antara kelompok DD dengan SSD dan antara kelompok DBD dengan SSD ($p > 0.05$). Jumlah trombosit pada kelompok DBD dan SSD lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DD, dan secara statistik terdapat perbedaan yang bermakna antar ketiga kelompok berdasarkan tingkat keparahan penyakit ($p < 0.05$), uji post hoc jumlah trombosit menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok DD dengan DBD dan kelompok DD dengan SSD ($p < 0.05$), namun tidak ditemukan perbedaan yang bermakna antara kelompok DBD dengan SSD ($p > 0.05$).

Kejadian infeksi primer ditemukan lebih banyak pada kelompok DD dibandingkan DBD dan SSD, dan terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik kejadian infeksi primer dan sekunder antar ketiga kelompok berdasarkan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue ($p < 0.005$).

5.2 Hubungan Kadar ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak

Kadar ANGPT-2 pada berbagai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak dan hubungan kadar ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak dapat dilihat pada Tabel 5.2. Kadar ANGPT-2 pada setiap kelompok berdasarkan tingkat keparahan penyakit terdapat beberapa nilai ekstrim, nilai ekstrim ini menunjukkan distribusi data yang tidak normal yang dibuktikan dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$), sehingga data kadar ANGPT-2 ditampilkan berupa median bukan rerata, dan untuk uji kemaknaan digunakan uji Kruskal-Wallis.

Tabel 5.2 Hubungan Kadar ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak

Tingkat Keparahan Penyakit	n=108	Kadar ANGPT-2(pg/ml)	Nilai p
Demam Dengue (DD)	34	397,45 (64,48-1895,07)	< 0,001
Demam Berdarah Dengue (DBD)	39	558,52 (79,36-2797,71)	
Sindrom Syok Dengue (SSD)	35	1393,82 (58,52-6310,49)	

Uji Kruskal-Wallis $p < 0,001$, Uji post hock Mann-Whitney: DD vs DBD $p < 0,05$, DD vs SSD $p < 0,001$, DBD vs SSD $p < 0,001$.
Data disajikan dalam median (minimum-maksimum)

Tabel 5.2 menunjukkan kadar ANGPT-2 meningkat sesuai dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue, nilai median kadar ANGPT-2 pada kelompok SSD lebih tinggi dibandingkan kelompok DBD dan median kadar pada kelompok DBD lebih tinggi dibandingkan kelompok DD. Perbedaan kadar ANGPT-2 ketiga kelompok berdasarkan tingkat keparahan penyakit tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Pada Uji post hock Mann-Whitney juga terdapat perbedaan yang bermakna kadar ANGPT-2 antar kelompok; yaitu antara kelompok DD dengan DBD ($p < 0,05$), kelompok DBD dengan SSD ($p < 0,05$) serta antara kelompok DD dengan SSD ($p < 0,05$).

5.3 Kadar VEGF pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Kadar VEGF pada berbagai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak dan hubungan kadar VEGF dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak dapat dilihat pada Tabel 5.3. Kadar VEGF pada setiap kelompok terdapat beberapa nilai ekstrim, nilai ekstrim ini menunjukkan distribusi data yang tidak normal yang dibuktikan dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$), sehingga data kadar VEGF ditampilkan berupa median bukan rerata, dan untuk uji kemaknaan digunakan uji Kruskal-Wallis.

Tabel 5.3 Hubungan Kadar VEGF dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue pada Anak

Tingkat Keparahan Penyakit	n=108	Kadar VEGF(pg/ml)	Nilai p
Demam Dengue (DD)	34	20,59 (0,69-183,87)	0,471
Demam Berdarah Dengue (DBD)	39	23,97 (5,22-290,58)	
Sindrom Syok Dengue (SSD)	35	33,74 (0,69-254,93)	

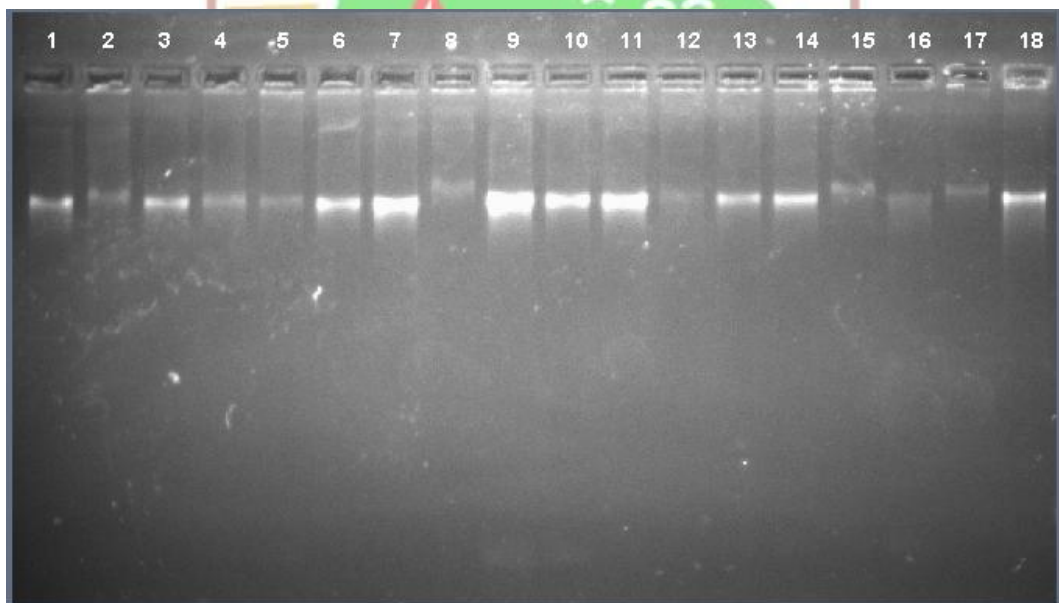
Uji Kruskal-Wallis.

Tabel 5.3 menunjukkan terdapat kecenderungan peningkatan nilai median kadar VEGF sesuai tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue, nilai median kadar VEGF pada kelompok SSD lebih tinggi dibandingkan kelompok DBD dan median kadar VEGF pada kelompok DBD lebih tinggi dibandingkan kelompok DD, namun secara statistik perbedaan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$).

5.4 Polimorfisme Gen ANGPT-2

5.4.1 Ekstraksi DNA (*Genomic DNA Purification*)

Ekstraksi DNA menggunakan *genomicDNA Mini Kit*. DNA diekstraksi dari darah vena setiap subjek penelitian. Uji keberhasilan dan efektifitas isolasi DNA dikontrol dengan menggunakan elektroforesis. Elektroforesis di *running* pada gel agarose 1,5% dengan tegangan 100 volt selama 30 menit, kemudian *gel agarose* diamati dengan *GelDoc*. Konsentrasi (ng/ μ l) dan kemurnian DNA (rasio 260/280) yang diisolasi diukur dengan alat Nanodrop spektrofotometer dengan volume DNA sebanyak 1-2 μ l. Contoh hasil ekstraksi dan elektroforesis DNA pada beberapa subjek penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.1. Hasil Elektroforesis dan Ekstraksi DNA


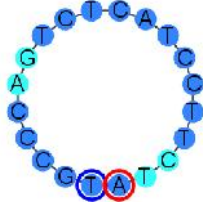
Keberhasilan ekstraksi DNA ditunjukkan pada Gambar 5.3, pada semua sampel terlihat pita DNA. Hasil isolasi DNA ini selanjutnya disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C dan siap digunakan sebagai *template* pada reaksi *in vitro* PCR metode *direct DNA sequencing* untuk gen ANGPT-2 Exon 4.

5.4.2 Konstruksi Primer untuk Gen ANGPT-2 Exon 4

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen ANGPT-2 Exon 4 didisain menggunakan bantuan *software* bioinformatik *Geneious* versi 7.0.6. Primer didisain berdasarkan sekuen gen ANGPT-2 *Homo sapiens* (NCBI Accession No. NG_029483.1) sebagai DNA cetakan.

Hasil konstruksi primer untuk ANGPT-2 Exon 4 didapatkan *selfdimer* TM. Pada elektroforegram ditemukan *band* yang letaknya berdekatan sekali. Hal ini kemungkinan ada SNP yang posisinya berdekatan sehingga pada ANGPT-2 Exon 4 digunakan PCR metode *direct DNA sequencing*. PCR metode *direct DNA sequencing* membutuhkan 2 macam primer, yaitu primer *forward* rs ANGPT-2 Exon 4-F dan primer *reverse* ANGPT-2 Exon 4-R. Primer ANGPT-2 Exon 4-F dan primer ANGPT-2 Exon 4-R digunakan untuk mengimplikasi DNA yang mencakup daerah 793 bp. Hasil konstruksi 2 primer gen ANGPT-2 Exon 4 dapat dilihat pada Tabel 5.4.

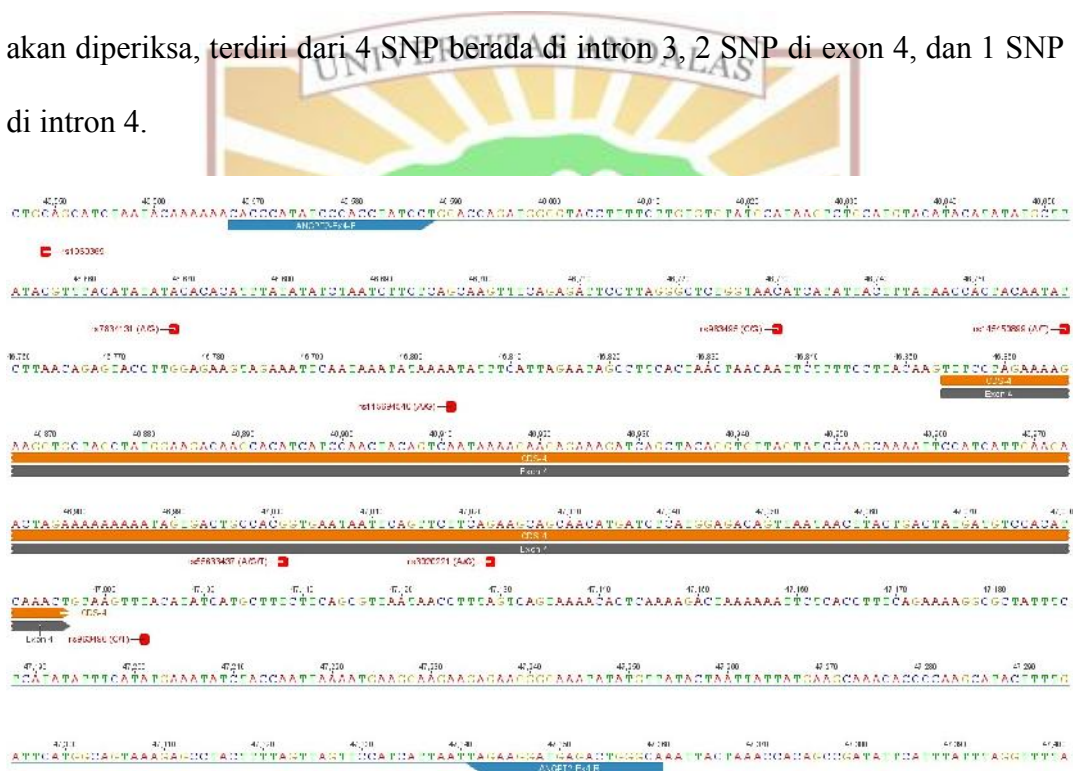
Tabel 5.4. Konstruksi Primer Gen ANGPT-2 Exon 4

No.	Karakteristik Primer	DNA Fold	Ukuran Produk PCR
1	<p>ANGPT2-Ex4-F</p> <p>Sequence (5' to 3'): CACCCATATCCCACCTATCCT</p> <p>Type: Primer</p> <p>Length: 21</p> <p>created by: primer3</p> <p>%GC: 52.4</p> <p>Tm: 56.1</p> <p>Hairpin Tm: None</p> <p>Self Dimer Tm: None</p>		793 bp
2	<p>ANGPT2-Ex4-R</p> <p>Sequence (5' to 3'): TGCCDAGTCTCATCCTTCTA</p> <p>Type: Primer</p> <p>Length: 20</p> <p>created by: primer3</p> <p>%GC: 50.0</p> <p>Tm: 57.5</p> <p>Hairpin Tm: None</p> <p>Self Dimer Tm: None</p>		

Pada Tabel 5.4 dapat dilihat hasil konstruksi sekuen primer *forward* ANGPT-2 Exon 4-F, yaitu 5'-CACCCATATCCCACCTATCCT-3', dan

primer *reverse*ANGPT-2 Exon 4-R, yaitu 5'-TGCCCAGTCTCATCCTTCTA-3'. Kedua primer sudah memenuhi kriteria primer yang baik karena tidak ada *hairpin* TM. Pasangan primer tersebut disintesis oleh *IntegratedDNA Technologies* (IDT), Singapura.

Sekuen Gen ANGPT-2 dan posisi penempelan primer serta posisi SNP dapat dilihat pada Gambar 5.4. Cetakan primer mengamplifikasi sebagian daerah intron 3, exon 4 dan intron 4, dimana terdapat 7 SNP dengan GMAF $\geq 0,01$ yang akan diperiksa, terdiri dari 4 SNP berada di intron 3, 2 SNP di exon 4, dan 1 SNP di intron 4.



Gambar 5.2. Sekuen Gen ANGPT-2 (NG_029483.1) dan Posisi Penempelan Primer ANGPT-2-Ex4-F dan ANGPT-2-Ex4-R serta Posisi SNP yang Terdaftar di dbSNP NCBI dengan GMAF (*Global Minor Allele Frequency*) ≥ 0.01

Hasil disain primer diperiksa kembali spesifisitasnya menggunakan *tools* Primer-BLAST di situs NCBI. Hasil Primer-BLAST (Gambar 5.3) menunjukkan bahwa pasangan primer hasil disain spesifik mengamplifikasi gen angiotensin-2

(ANGPT-2) manusia dengan panjang produk amplikon 793 bp. Pasangan primer tersebut disintesis oleh *Integrated DNA Technologies (IDT)*, Singapura.

Primer-BLAST Primer-blast results

Job ID: PRW1810g; mva0010g001200.001.02056; [more](#)

Print PCR template [Print](#)
 Specificity of primers Target templates were found in selected databases (Nucleotide collection (nr) (Organism limited by home options) & GenBank Eukaryote)

[Other reports](#)

Detailed primer reports

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self-complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAAGCAATGAGAGCAATCC1	21	59.95	52.39	4.00	0.00
Reverse primer	TACCGACATCCATCCCTCTTA	20	57.45	50.00	5.00	2.00

Products in target templates

NC_018398.1 Homo sapiens: segment 4 (ANGPT2), full-length on chromosome 8

product length = 195
 forward primer 5' CAAGCAATGAGAGCAATCC1 21
 Template

reverse primer 3' TACCGACATCCATCCCTCTTA 20
 Template

NC_018398.1 Homo sapiens: chromosome 8, clone RP11-19G12, complete sequence

product length = 195
 forward primer 5' CAAGCAATGAGAGCAATCC1 21
 Template

reverse primer 3' TACCGACATCCATCCCTCTTA 20
 Template

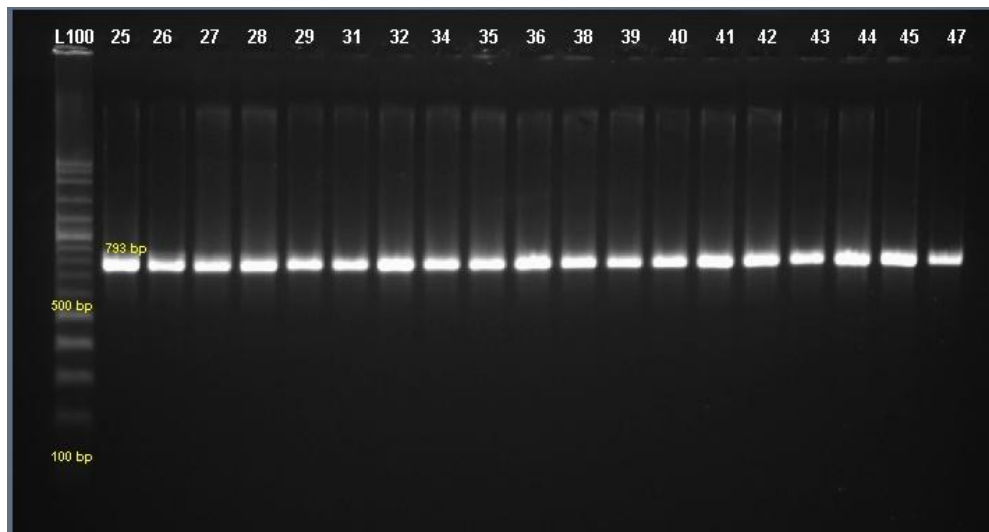
Gambar 5.3. Hasil Primer-BLAST Pasangan Primer ANGPT-2 Exon 4

5.4.3 *Polymerase Chain Reaction* Gen ANGPT-2 Exon 4

Komposisi reaksi PCR untuk ANGPT-2 Exon 4 dengan volume total 25 µl terdiri dari 12,5 µl *GoTaq Green Master Mix*, Promega (Cat. No M7122), 2,5 µl DNA genomik; dan 0,4 µM primer ANGPT-2 Exon 4-F dan 0,4 µM primer ANGPT-2 Exon 4-R. PCR gen ANGPT-2 Exon 4 dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, kemudian diikuti oleh 35 siklus yang terdiri dari denaturasi lanjut pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 62,5°C selama 30 detik, dan *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit. Proses PCR diakhiri dengan tahap *elongasi* akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

Produk PCR ANGPT-2 Exon 4 sebanyak 5 µl dicampurkan dengan 5 µl pewarna DNA *GelRed* 1:1000 kemudian dipipet ke dalam sumur-sumur *gel agarose* 1,5%. Produk PCR dielektroforesis dengan voltase 120V selama 45 menit, kemudian *gel agarose* diamati di bawah sinar UV menggunakan *GelDoc*. Pita DNA produk PCR ANGPT-2 Exon 4 berukuran 793 bp. Berikut adalah

elektroforegram hasil PCR ANGPT-2 Exon 4 pada beberapa subjek penelitian (Gambar 5.4), terlihat semua subjek penelitian berada pada 793 bp sesuai primer.



Gambar 5.4. Elektroforegram Hasil PCR ANGPT-2 Exon 4

Selanjutnya, sebanyak 20 μ l produk PCR ANGPT-2 Exon 4 dikirim untuk sekuensing ke Macrogen, Korea Selatan dan 1st BASE, Singapura. Metode sekuensing yang dipakai adalah metode Sanger.

5.4.4 Sekuensing DNA

Data sekuensing dianalisis dengan bantuan *software* bioinformatik Geneious. Data sekuensing setiap sampel dari primer forward digabung (*contig*) dengan data *sequencing* dari *primer reverse*. Selanjutnya, data *contig* tersebut di-BLAST (Gambar 5.5) pada situs NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

BLAST » blastn suite » RID-JRU1XYMY015 Home Recent Results

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to](#)

Job title: 113

RID: JRU1XYMY015 (Expires on 05-30 17:22 pm)

Query ID: Id|Query_192231
 Description: None
 Molecule type: nucleic acid
 Query Length: 760

Database Name: nr
 Description: Nucleotide collection (nt)
 Program: BLASTN 2.6.1+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Color key for alignment scores

■ <40 ■ 40-50 ■ 50-80 ■ 80-200 ■ >=200

Query

1 150 300 450 600 750

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	Identical
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8 clone CH17.NC94, complete sequence	1400	1400	99%	0
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens microcephalin 1 (MCPH1), RefSeqGene on chromosome 8	1395	1395	99%	0
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens angiotensinogen 2 (ANGPT2), RefSeqGene on chromosome 8	1395	1395	99%	0
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8 clone RP11-162J2, complete sequence	1395	1395	99%	0
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens chromosome 8 clone CH17.u4.21, complete sequence	1393	1383	99%	0

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next ▲ P

Homo sapiens angiotensinogen 2 (ANGPT2), RefSeqGene on chromosome 8
 Sequence ID: [NG_029483.1](#) Length: 70613 Number of Matches: 1

Range 1: 46589 to 47346 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1395 bits(755)	0.0	757/758(99%)	0/758(0%)	Plus/Plus

```

Query 3      GGACCAATGGGGTACCTTTCTCTGTGTATGCAATAGCTGCAATGacataacatata 62
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46589  GGACCAATGGGGTACCTTTCTCTGTGTATGCAATAGCTGCAATGACATACATATAT 46648

Query 63      gcttataagctttacatataacacacatttatatatctaaaccttcagcaagtttcaga 122
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46649  GCTTATAAGCTTTACATATAACACACATTATATATCTAACTTCAGCAAGTTTCAGA 46708

Query 123     GAATCCTTAGGGCTCTGGTAACATCATATCTACTTATAACCACTACAATATCTTAACAGA 182
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46709  GAATCCTTAGGGCTCTGGTAACATCATATCTACTTATAACCACTACAATATCTTAACAGA 46768

Query 183     GTACCTTGGAGAGTGAAGATTCAATAAATATAAATATTTCAATAGATAGCTTCACT 242
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46769  GTACCTTGGAGAGTGAAGATTCAATAAATATAAATATTTCAATAGATAGCTTCACT 46828

Query 243     AACTAACAAATCTTTTCTTACAAGTTCTTASAAAAGAGGCTGACTATGGAAGACA 302
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46829  AACTAACAAATCTTTTCTTACAAGTTCTTASAAAAGAGGCTGACTATGGAAGACA 46888

Query 303     AGCACATATCCCACTACAGTCAATAAAGAGAGAGAAAGTCACTACAGGTTTAGTAT 362
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46889  AGCACATATCCCACTACAGTCAATAAAGAGAGAGAAAGTCACTACAGGTTTAGTAT 46948

Query 363     CCAAGCAAAATCCCATCTTGGAGACTAGAAAAAAAAAATAGTACTGCCACGGTGAATA 422
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 46949  CCAAGCAAAATCCCATCTTGGAGACTAGAAAAAAAAAATAGTACTGCCACGGTGAATA 47008

Query 423     ATTCACTTCTTCAAGGACGCAACATGATTCATGGAGACAGTAAATACTTACTGACTA 482
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47009  ATTCACTTCTTCAAGGACGCAACATGATTCATGGAGACAGTAAATACTTACTGACTA 47068

Query 483     TGAATGCCACATCAAACTGTAAGTTACATATCATGCTTCTTCAGGTTAATAACCTTT 542
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47069  TGAATGCCACATCAAACTGTAAGTTACATATCATGCTTCTTCAGGTTAATAACCTTT 47128

Query 543     AGTCATAAACACTCAAAAGACTAAAAAATTCACCTTTCAGAAAAGGCGCTATTTCCT 602
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47129  AGTCATAAACACTCAAAAGACTAAAAAATTCACCTTTCAGAAAAGGCGCTATTTCCT 47188

Query 603     CAGATATTTGAGTGAATATCTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 662
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47189  CAGATATTTGAGTGAATATCTTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT 47248

Query 663     ATCTTACTTAAATATATGACCAACACCCCAACCACTCTTTCATTCATCCCACTAA 722
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47249  ATCTTACTTAAATATATGACCAACACCCCAACCACTCTTTCATTCATCCCACTAA 47308

Query 723     GAGCGCTGTTTATGTTTCCATCATGATTAATG 782
            |||..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|..|
Sbjct 47309  GAGCGCTGTTTATGTTTCCATCATGATTAATG 47368
  
```

[Related Information](#)
[Map Viewer](#) - [align](#)

Gambar 5.5. Hasil BLAST

Pada Gambar 5.5 terlihat bahwa setelah dilakukan BLAST, produk PCR ANGPT-2 exon 4 dari subjek penelitian adalah benar merupakan produk homo sapiens gen ANGPT-2 yang berada di kromosom 8 dengan akurasi 99%.

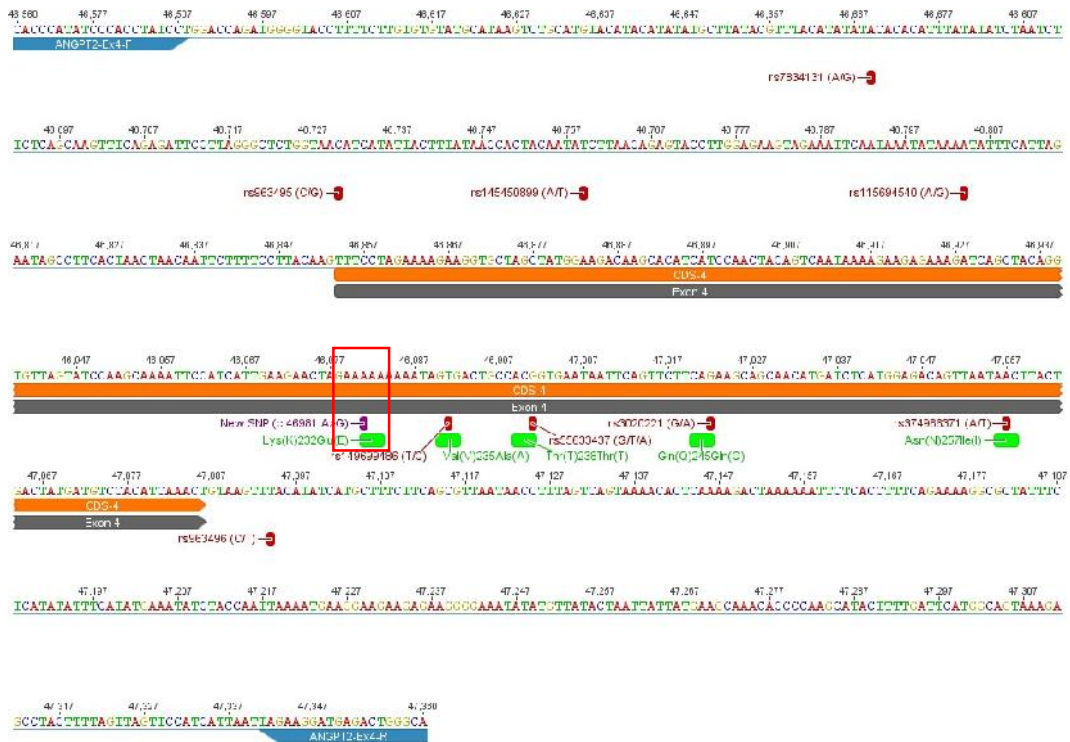
Hasil sekuensing gen ANGPT-2 dapat dilihat pada gambar 5.8, sekuensing dilakukan pada semua sampel penelitian. Jumlah SNP dengan GMAF $\geq 0,01$ yang terdaftar di dbSNP NCBI adalah sebanyak 7 SNP (Gambar 5.4). Setelah dilakukan sekuensing pada semua sampel penelitian didapatkan 10 SNP. Tambahan 3 SNP lainnya adalah 2 SNP dengan GMAF $< 0,01$ dan 1 SNP baru dengan GMAF belum diketahui (Tabel 5.5).

Tabel 5.5. Karakteristik SNP Hasil Sekuensing Gen ANGPT-2

Jenis SNP	Lokasi	Urutan Basa ke-	Perubahan Alel	Perubahan asam amino	Jenis mutasi
rs7834131	Intron 3	121	A/G	Tidak berubah	<i>Silent mutation</i>
rs 963495	Intron 3	149	C/G	-	-
rs145450899	Intron 3	159	A/T	Tidak berubah	<i>Silent mutation</i>
rs115694540	Intron 3	174	A/G	Tidak berubah	<i>Silent mutation</i>
4 c.46981*	Exon 4	232	A/G	Lys – Glu	
rs149699486	Exon 4	235	T/C	Val – Ala	
rs55633437	Exon 4	238	G/T	Tidak berubah	<i>Silent mutation</i>
rs3020221	Exon 4	245	G/A	Tidak berubah	<i>Silent mutation</i>
rs374966371	Exon 4	257	A/T	Asn – Ile	
rs963496	Intron 4	269	C/T	-	-

*SNP baru

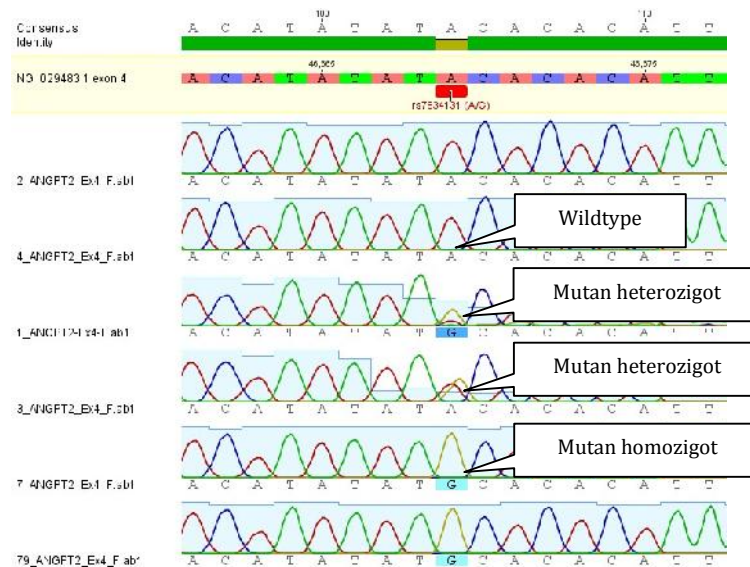
Tabel 5.5 menunjukkan karakteristik SNP yang ditemukan dari hasil sekuensing gen ANGPT-2, sebanyak 5 SNP berada di exon 4, yaitu: 4c.46981, rs149699486, rs55633437, rs3020221, rs374966371, 4 SNP berada di intron 3 yaitu: rs7834131, rs963495, rs145450899, rs115694540, dan 1 SNP berada di intron 4 yaitu rs963496.



Gambar 5.6. Hasil Sekuensing Gen ANGPT-2 Exon 4 Menggunakan Primer yang Telah Didisain

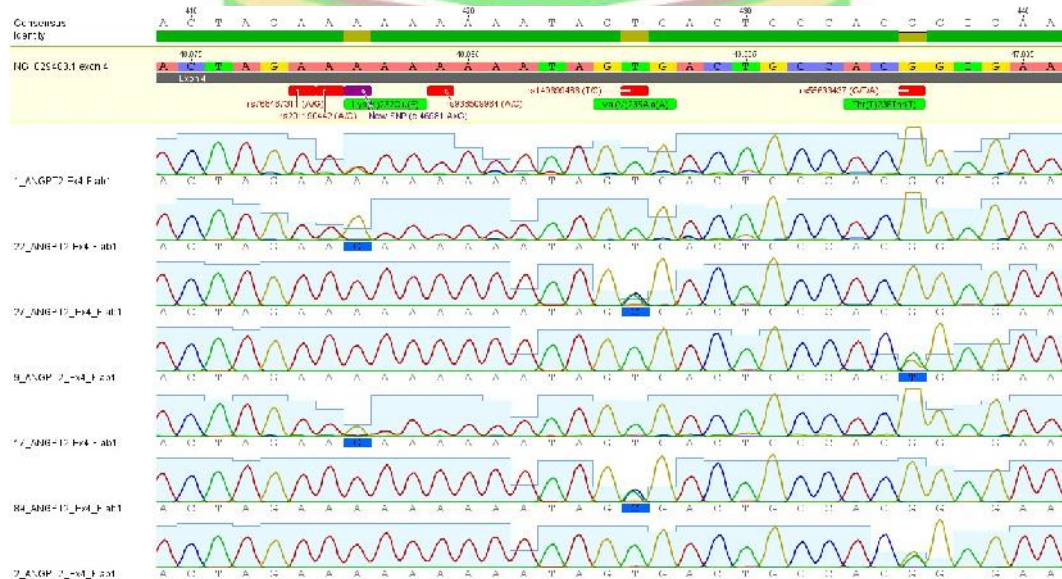
Pada Gambar 5.6 terlihat bahwa setelah dilakukan sekuensing ditemukan polimorfisme pada 3 SNP lain di sepanjang daerah amplifikasi primer ANGPT-2-Exon4-F dan primer ANGPT-2-Exon4-R. Dua SNP adalah SNP yang telah terdaftar di NCBI tetapi dengan GMAF < 0,01 (rs149699486 dan rs374966371), sedangkan 1 SNP lainnya adalah SNP baru yang belum terdaftar di NCBI yaitu 4c.46981 yang berlokasi pada urutan basa ke 232 (ditandai dengan kotak merah di gambar 5.6). Pada SNP ini terjadi mutasi berupa perubahan alel A menjadi alel G, perubahan alel tersebut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang dihasilkan yaitu dari lysin menjadi glutamate (Lys(K)232Glu(E)). Selain itu, juga ditemukan perubahan asam amino pada 2 SNP lainnya yang juga mengalami mutasi yaitu, SNP rs149699486 (T/C) terjadi perubahan asam amino valin menjadi alanin (Val(V)235Ala(A)), dan SNP rs374966371 (A/T) terjadi

perubahan asam amino asparagin menjadi isoleusin (Asn(N)257Ile(I)). Untuk mendeteksi SNP pada hasil sekuensing, sekuen seluruh sampel diujarkankan dengan gen referensi ANGPT2 (NG_029483.1) menggunakan multiple alignment dengan bantuan software Geneious (Gambar 5.7 - 5.12)



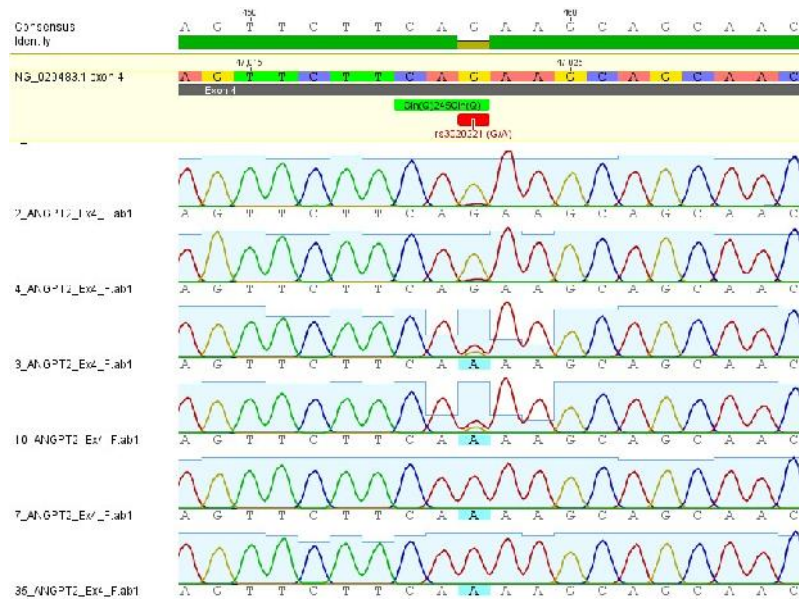
Gambar 5.7 *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing SNP rs7834131 (A/G)

Pada Gambar 5.7 terlihat adanya polimorfisme pada SNP rs7834131 (A/G) berupa polimorfisme heterozigot (AG) dan homozigot (GG), *wildtype* berupa AA.



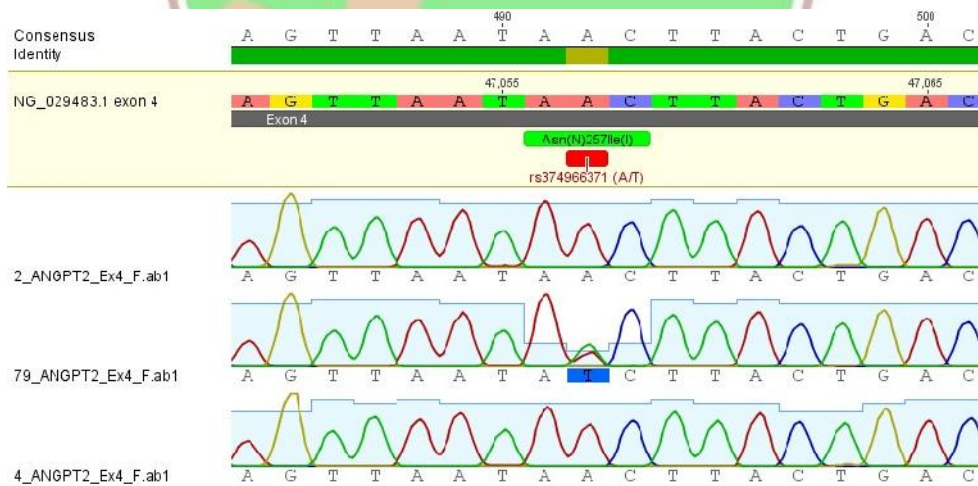
Gambar 5.8. *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing SNP Terbaru 4c.46981 A>G (ungu), rs149699486 (T/C), rs55633437 (G/T)

Pada Gambar 5.8 diatas terlihat adanya polimorfisme pada SNP 4c.46.981 A>G berupa polimorfisme heterozigot (AG), homozigot (GG), *wildtype* berupa AA.



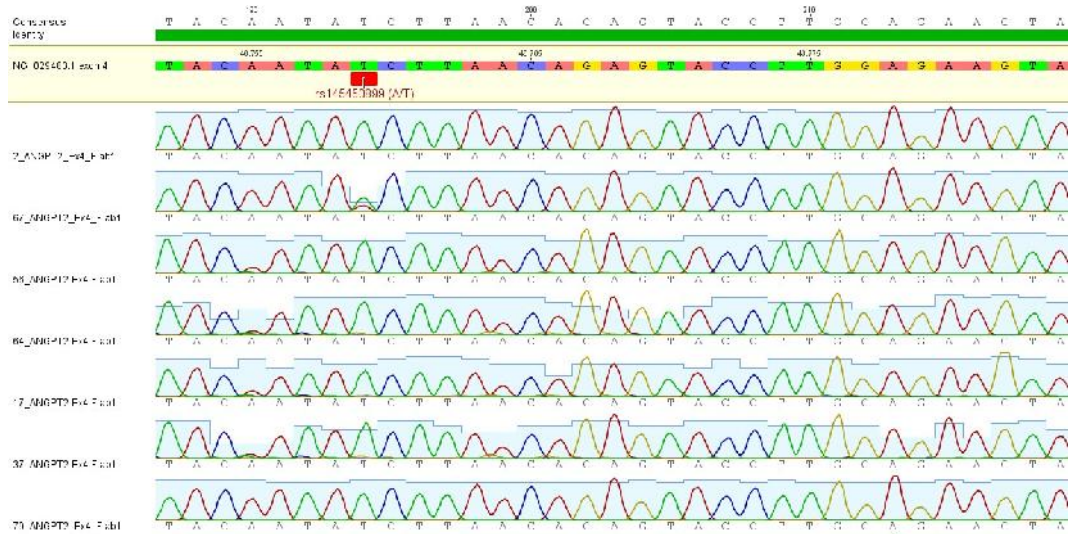
Gambar 5.9. *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing SNP rs3020221(G/A)

Pada Gambar 5.9 diatas terlihat adanya polimorfisme pada SNP rs3020221(G/A) berupa polimorfisme heterozigot (GA), homozigot (AA), *wildtype* berupa GG.



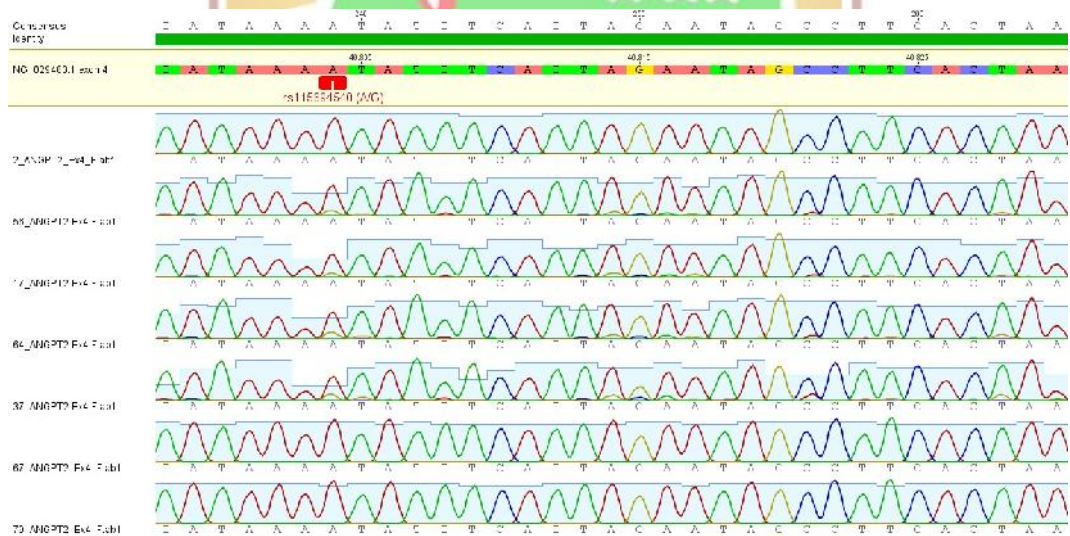
Gambar 5.10. *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing rs374966371 (A/T)

Pada Gambar 5.10 diatas terlihat adanya polimorfisme pada SNP rs374966371 (A/T) berupa polimorfisme heterozigot (AT), homozigot (TT), dan *wildtype* (AA).



Gambar 5.11. *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing rs14545089 (A/T)

Pada Gambar 5.11 diatas terlihat adanya polimorfisme pada SNP rs14545089 (A/T) berupa polimorfisme heterozigot (AT), homozigot (TT), dan *wildtype* (AA).



Gambar 5.12. *Multiple Alignment* Hasil Sekuensing rs115694540 (A/G)

Pada Gambar 5.12 diatas terlihat adanya polimorfisme pada SNP rs115694540 (A/G) berupa polimorfisme heterozigot (AG), homozigot (GG), dan *wildtype* berupa AA.

5.5 Polimorfisme Gen ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Penelitian ini membuktikan adanya polimorfisme gen ANGPT-2 pada pasien anak dengan infeksi virus dengue. Pemeriksaan sekuensing pada exon-4 gen ANGPT-2 menghasilkan 10 SNP, dan 1 SNP merupakan SNP baru yang ditemukan yaitu 4c.46981. Pada 108 subjek yang diperiksa, 57 subjek mengalami mutasi (52,77%), dengan masing-masingnya ada yang mengalami 1,2 atau 3 mutasi dengan SNP yang berbeda. Distribusi mutasi dapat dilihat pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Distribusi Mutasi *Genotype* Gen ANGPT-2 Berdasarkan Motif SNP dan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Motif SNP	Genotip	Tingkat Keparahan Penyakit Infeksi Dengue					
		DD n=34		DBD n=39		SSD n=35	
		n	%	n	%	n	%
rs 7834131	AG (Mutan Heterozigot)	5	14,7	6	15,38	10	28,57
	GG (Mutan Homozigot)	0	0	2	5,12	0	0
	AA (Wild Type)	29	85,3	31	79,50	25	71,43
rs 963495	CG (Mutan Heterozigot)	0	0	0	0	0	0
	GG (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	CC (Wild Type)	34	100	39	100	35	100
rs 145450899	TA (Mutan Heterozigot)	0	0	0	0	1	2,85
	AA (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	TT (Wild Type)	34	100	39	100	34	97,15
rs115694540	AG (Mutan Heterozigot)	3	8,82	3	7,69	3	8,57
	GG (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	AA (Wild Type)	31	91,18	36	92,31	32	91,43
4 c.46981	AG (Mutan Heterozigot)	1	2,94	3	7,69	3	8,57
	GG (Mutan Homozigot)	2	5,88	0	0	0	0
	AA (Wild Type)	31	91,17	36	92,31	32	91,43
rs149699486	TC (Mutan Heterozigot)	1	2,94	0	0	1	2,85
	CC (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	TT (Wild Type)	33	97,06	39	100	34	97,15
rs55633437	GT (Mutan Heterozigot)	7	20,58	6	15,38	3	8,57
	TT (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	GG (Wild Type)	27	79,42	33	84,62	32	91,43
rs3020221	GA (Mutan Heterozigot)	11	32,35	10	25,64	10	28,57
	AA (Mutan Homozigot)	1	2,94	3	7,69	3	8,57
	GG (Wild Type)	22	64,70	26	66,67	22	62,85
rs 374966371	AT (Mutan Heterozigot)	0	0	1	2,56	0	0
	TT (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	AA (Wild Type)	34	100	38	97,44	35	100
rs 963496	TC (Mutan Heterozigot)	0	0	0	0	0	0
	CC (Mutan Homozigot)	0	0	0	0	0	0
	TT (Wild Type)	34	100	39	100	35	100

Berdasarkan Tabel 5.6, mutasi ditemukan pada 8 dari 10 SNP yang diperiksa, yaitu pada SNP rs3020221 (35,18%), rs7834131 (19,44%), rs55633437 (14,81%), rs115694540 (8,33%), 4c.46981 (8,33%), rs149699486 (1,85%), rs145450899 (0,92%). Dua SNP yaitu: rs963495 dan rs963496 sama sekali tidak ditemukan mutasi. Sebagian besar mutasi merupakan mutasi heterozigot. Mutasi homozigot ditemukan pada 3 SNP yaitu; rs7834131 (ditemukan 2 mutasi homozigot pada kelompok DBD), 4c.46981 (2 mutasi homozigot pada kelompok DD), dan rs3020221 (1 mutasi homozigot pada kelompok DD, 3 pada kelompok DBD dan 3 pada kelompok SSD).

5.6 Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dan Kadar ANGPT-2

Hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan kadar ANGPT-2 dapat terlihat pada Tabel 5.7. Pada setiap kelompok terdapat beberapa nilai ekstrim kadar ANGPT-2, nilai ekstrim ini yang menunjukkan distribusi data tidak normal, hal ini dibuktikan dengan uji Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$), sehingga data kadar ANGPT-2 ditampilkan berupa median bukan rerata, dan untuk uji kemaknaan digunakan uji Mann-whitney. Nilai median kadar ANGPT-2 pada kelompok mutan dan normal pada masing masing SNP dapat dilihat pada Tabel 5.7. Hanya 5 SNP yang dapat diuji karena pada 5 SNP lagi ada yang tidak terjadi mutasi dan ada yang jumlah mutasinya sangat sedikit.

Tabel 5.7. Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Kadar ANGPT-2

SNP	Alel	n=108	Kadar ANGPT-2 (pg/ml) Median (minimum- maksimum)	Nilai p
rs7834131 (A/G)	Mutan	23	1075,962 (112,09-2567,49)	0,012
	Normal (Wild type)	85	550,26 (58,52-6310,49)	
rs115694540 (A/G)	Mutan	9	1020,95 (88,29-1561,49)	0,645
	Normal (Wild type)	99	597,13 (58,52-6310,49)	
4c.46981 ((A/G)	Mutan	9	1020,95 (88,29-1561,49)	0,645
	Normal (Wild type)	99	597,13 (58,52-6310,49)	
rs55633437 (G/T)	Mutan	16	556,38 (79,36-2848,65)	0,318
	Normal (Wild type)	92	603,24 (58,52-6310,49)	
rs3020221 (G/A)	Mutan	38	887,48 (109,12-3845,02)	0,073
	Normal (Wild type)	70	554,39 (58,52-6310,49)	

*Uji Mann-Whitney

Tabel 5.7 menunjukkan bahwa peningkatan kadar ANGPT-2 berhubungan dengan adanya mutasi pada SNP rs7834131. Kadar ANGPT-2 pada kelompok mutan rs7834131 lebih tinggi dibandingkan kelompok yang normal atau *wild type*, dan perbedaan ini secara statistik bermakna ($p < 0,05$). Pada kelompok mutan rs115694540, 4c.46981, dan rs3020221 kadar ANGPT-2 juga lebih tinggi dibandingkan kelompok normal (*wildtype*), namun secara statistik tidak berbeda bermakna. Pada rs55633437 kadar ANGPT-2 hampir sama antara kelompok mutan dengan normal (*wildtype*) dan secara statistik tidak berbeda bermakna.

Adanya mutasi *genotype*A/G pada rs7834131 berhubungan dengan peningkatan kadar ANGPT-2 pada subjek penelitian dengan infeksi virus dengue. Nilai median kadar ANGPT-2 pada kelompok yang mengalami mutasi lebih tinggi dibandingkan yang tidak mengalami mutasi yaitu 1075,962 (112,09-2567,49) pg/mL vs 550,26 (58,52-6310,49) pg/mL, dan secara statistik perbedaan ini bermakna ($p < 0,05$).

Tabel 5.8. Efek Mutasi A/G terhadap Peningkatan Kadar ANGPT-2 pada rs7834131

DD		DBD		SSD	
No sampel	Kadar ANGPT-2 (pg/mL)	No sampel	Kadar ANGPT-2 (pg/mL)	No sampel	Kadar ANGPT-2 (pg/mL)
3	1477,36	43	1179,88	74	896,65
5	112,09	51	1075,96	77	1247,12
13	1587,39	55	209,99	78	1020,95
32	1895,07	56	555,54	79	906,73
34	588,98	60	295,57	81	1687,23
		69	478,95	85	597,13
		71	1041,32	92	1359,18
		72	1165,61	99	2567,46
				105	1498,85
				108	1937,85
Median	397,45 (64,48-1895,07)		558,52 (79,36-2797,71)		1393,82 (58,52-6310,49)

Tabel 5.8 menunjukkan efek mutasi A/G terhadap peningkatan kadar ANGPT-2 jelas terlihat pada sampel di kelompok DD, 4 dari 5 sampel yang mengalami mutasi pada kelompok DD memiliki kadar ANGPT-2 diatas nilai median kelompok serta 3 diantaranya merupakan nilai ekstrim yang tertinggi di kelompok DD (sampel 3; 1477,364 pg/mL, sampel 13;1587,392 pg/mL, dan sampel 32;1895,066 pg/mL).

5.7 Hubungan Mutasi rs 7834131 dengan Kadar ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Untuk mengetahui pengaruh spesifik mutasi rs7834131 terhadap kadar ANGPT-2 maka selanjutnya dilakukan analisis statistik menurut kelompok derajat keparahan penyakit. Hasil uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data kadar ANGPT-2 tiap kelompok penyakit (DD, DBD dan SSD) terdistribusi tidak normal ($p < 0,05$, *Shapiro-Wilk Test*) sehingga uji yang dipilih adalah uji Mann-Whitney.

Tabel.5.9. Hubungan Mutasi rs7834131 dengan Kadar ANGPT-2 pada Berbagai Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Kelompok		n=108	Kadar ANGPT-2 (pg/ml) Median (minimum- maksimum)	Nilai p
DD	Mutan	5	1477,36 (112,09-1895,07)	0,044
	Normal(<i>Wild type</i>)	29	263,88 (64,48-965,93)	
DBD	Mutan	8	798,43(209,9-1179,88)	0,543
	Normal (<i>Wild type</i>)	31	558,519 (79,36-2797,71)	
SSD	Mutan	10	1303,15(597,13-2567,47)	0,855
	Normal (<i>Wild type</i>)	25	1503,85 (58,52-6310,49)	

*Uji Mann-Whitney

Tabel 5.9 memperlihatkan pada kelompok DD yang mengalami mutasi (mutan) kadar ANGPT-2 meningkat dibandingkan yang tidak mengalami mutasi (*wild type*), dan perbedaan tersebut bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Pada kelompok DBD nilai median kadar ANGPT-2 lebih tinggi pada kelompok mutasi dibandingkan yang tidak mengalami mutasi (*wild type*), namun perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Pada kelompok SSD, nilai median kadar ANGPT-2 pada kelompok mutasi justru lebih rendah dibandingkan kelompok yang tidak bermutasi, namun secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$).

5.8 Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Untuk mengetahui hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue, maka selanjutnya dilakukan analisis statistik menurut kelompok derajat keparahan penyakit. Polimorfisme gen ANGPT-2 menurut tingkat keparahan penyakit dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10. Polimorfisme Gen ANGPT-2 Berdasarkan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Motif SNP	Mutasi	Tingkat Keparahan Penyakit						Nilai p
		DD n=34		DBD n=39		SSD n=35		
		n	%	n	%	n	%	
rs 7834131	Ya	5	21,7	8	34,8	10	43,5	0,368*
	Tidak	29	34,1	31	36,5	25	29,4	
rs115694540	Ya	3	33,3	3	33,3	3	33,3	0,972**
	Tidak	31	31,3	36	36,4	32	32,3	
4c.46981	Ya	3	33,3	3	33,3	3	33,3	0,972**
	Tidak	31	31,3	36	36,4	32	32,3	
rs55633437	Ya	7	43,8	6	37,5	3	18,8	0,37*
	Tidak	27	29,3	33	35,9	32	34,8	
rs3020221	Ya	12	31,6	13	34,2	13	34,2	0,943*
	Tidak	22	31,4	26	37,1	22	31,4	

*Uji Chi-Square 2x3, ** Uji Mann-whitney

Tabel 5.10 memperlihatkan hubungan mutasi pada gen ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit. Dari 10 SNP, hanya 5 SNP yang memenuhi syarat uji statistik. Hubungan polimorfisme pada SNP rs7834131, rs55633437 dan rs3020221 dengan tingkat keparahan penyakit diuji menggunakan uji Chi-square, karena nilai *minimum expected count* > 5 yaitu : (rs7834131; 7,24, rs55633437; 5,04 dan rs3020221; 11,96). Dua SNP lainnya (rs115694540 dan 4c.46981) menggunakan uji Mann-whitney. Kedua SNP tersebut tidak memenuhi syarat uji Chi-square karena terdapat 33% sel yang memiliki nilai dibawah 5 (nilai *minimum expected count* < 5), walaupun setelah dilakukan penggabungan sel (DBD dan SSD) tetap terdapat 25% sel yang memiliki nilai dibawah 5, sehingga uji yang tepat adalah menggunakan uji Mann-whitney.

Polimerfisme yang terjadi pada gen ANGPT-2 tidak memengaruhi tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Hal ini terlihat dari distribusi 5 SNP yang bermutasi pada masing-masing kelompok DD, DBD dan SSD hampir sama dan secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik klinis subjek penelitian berupa jenis kelamin, usia, status gizi, dan lama demam tidak berbeda bermakna antar ketiga kelompok tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Usia 5-10 tahun merupakan kelompok usia terbanyak yang menderita infeksi virus dengue pada penelitian ini. Hal ini sesuai dengan penelitian Sumarmo (2002) yang mendapatkan bahwa di Indonesia pasien DBD terbanyak adalah umur 5-11 tahun dan penelitian Mayetti (2010) juga mendapatkan usia 5-10 tahun merupakan kelompok paling banyak menderita DBD dibanding kelompok usia lainnya. Sama dengan penelitian ini, tidak terdapat perbedaan usia yang bermakna secara statistik antar ketiga kelompok tingkat keparahan penyakit.

Penelitian ini menunjukkan tidak terdapat hubungan antara infeksi virus dengue dengan jenis kelamin, demikian juga tidak terdapat hubungan antara ketiga kelompok tingkat keparahan penyakit dengan jenis kelamin. Hal ini sama dengan penelitian Sumarmo (2002) yang menyatakan tidak terdapat perbedaan jenis kelamin pada pasien DBD. Penelitian Ditjen PP & PL Depkes RI pada tahun 2008 juga memperlihatkan hasil yang sama dimana tidak terdapat perbedaan jenis kelamin pada anak yang menderita infeksi virus dengue. (Ditjen PP & PL, 2012).

Proporsi pasien infeksi virus dengue pada penelitian ini lebih banyak pada kasus gizi baik dibandingkan dengan gizi kurang dan gizi lebih. Secara keseluruhan jumlah pasien dengan gizi baik lebih banyak pada penyakit yang

berat (DBD dan SSD) dibandingkan pada gizi kurang maupun gizi lebih (obesitas), namun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara status gizi dengan tingkat keparahan penyakit. Hal ini sama dengan penelitian meta analisis yang dilakukan oleh Trang *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa kejadian DBD lebih sering terjadi pada anak dengan imunokompeten dan anak dengan status gizi baik, namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara status gizi dengan kejadian infeksi virus dengue. Sampai saat ini hubungan status gizi dengan infeksi virus dengue masih dalam perdebatan dan membutuhkan penelitian lebih lanjut. Hal yang sama juga didapatkan pada penelitian Setiati *et al.* (1997) DBD dan SSD jarang terjadi pada anak dengan gizi kurang. Respons inflamasi yang kuat merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya DBD dan SSD. Penelitian oleh Maron *et al.* (2010) mendapatkan gizi kurang dapat menekan respons imun yang diperantarai oleh sel sehingga menurunkan risiko keparahan penyakit infeksi virus dengue.

Kadar hemoglobin, hematokrit, dan trombosit akan berubah sesuai dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue. Semakin berat infeksi virus dengue yang terjadi, akan menyebabkan peningkatan kadar hemoglobin dan hematokrit serta penurunan kadar trombosit yang bermakna secara statistik. Penelitian ini mendapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna kadar hemoglobin, hematokrit dan trombosit antar ketiga kelompok berdasarkan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi dengue. Perbedaan kadar hematokrit yang bermakna menunjukkan terjadi kebocoran plasma pada kelompok penyakit yang lebih berat yang menyebabkan risiko terjadinya syok hipovolemik. Gangguan hematologis pada pasien yang terinfeksi virus dengue akan berubah mulai pada hari ketiga

demam dan akan kembali normal pada hari ke 11. (Sumarmo, 2002). Pada penelitian ini jumlah trombosit lebih rendah pada kelompok dengan tingkat keparahan penyakit yang lebih berat (DBD dan SSD). ANGPT-1 diproduksi oleh sel perisit dan sel otot polos dan jumlahnya juga banyak ditemui didalam trombosit. Keadaan trombositopenia ini akan mengakibatkan jumlah ANGPT-1 menurun sehingga terjadi ketidakseimbangan antara kadar ANGPT-1 dan ANGPT-2 pada plasma yang berperan dalam kebocoran plasma pada penyakit yang lebih berat (DBD dan SSD).

Kebocoran vaskular merupakan faktor utama yang membedakan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Kebocoran vaskular pada DBD terjadi akibat peningkatan permeabilitas kapiler yang bersifat sementara dan berlangsung tidak lebih dari 48 jam yang kemudian diikuti dengan resolusi spontan. Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan erat antara disfungsi endotel dan peningkatan permeabilitas vaskular yang menyebabkan kebocoran plasma, elektrolit dan protein. Penelitian lain menunjukkan bahwa kebocoran plasma tersebut bersifat sementara tanpa cedera endotel sehingga memunculkan teori lain adanya keterlibatan mediator inflamasi yang mencetuskan peningkatan permeabilitas vaskular (Srikiatkhachorn *et al.*, 2007). Kebocoran plasma ini terbukti dengan adanya peningkatan kadar hematokrit, penurunan kadar natrium, dan terdapatnya cairan di dalam rongga serosa, terutama berupa efusi pleura dan asites (Jessie *et al.*, 2004). Sitokin seperti TNF- α meningkat dalam infeksi virus dengue menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular, selain itu terdapat peranan antigen DENV-NS1 dan mediator lemak seperti PAF. NS1 merusak

lapisan glikokaliks dengan merusak heparin sulfat (Malavige et al., 2017 dan Guardo et al., 2016)

Penelitian ini mendapatkan kejadian infeksi primer lebih banyak dan berbeda bermakna pada kelompok DD dibandingkan DBD dan SSD. Hal ini mendukung teori *secondary heterolog infection* yang menyatakan bahwa pada infeksi sekunder terjadi kebocoran plasma yang menyebabkan manifestasi klinis yang lebih berat (DBD dan SSD). (Soegijanti, 2010)

6.2 Hubungan Kadar ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Penelitian ini mendapatkan adanya peningkatan kadar ANGPT-2 yang bermakna seiring dengan meningkatnya keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Hasil yang didapat pada penelitian ini hampir sama dengan yang didapat oleh Rampengan yang melaporkan bahwa ANGPT-2 berperan dalam patogenesis kebocoran vaskular yang bersifat transien pada DBD, peningkatan ANGPT-2 menyebabkan instabilitas pembuluh darah sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya kebocoran vaskular. Terjadi peningkatan yang bermakna kadar ANGPT-2 pada subjek penelitian dengan DBD dan SSD namun tidak pada subjek penelitian dengan DD. Rata-rata kadar ANGPT-2 plasma pada kelompok DD pada saat awal rawatan adalah 2.468,21(SD 1.534,55) pg/ml, pada kelompok DBD 3.194,95 (SD 1.572,02) pg/ml, dan pada kelompok SSD 4.005,32 (1.706,43) pg/ml. Kadar ANGPT-2 menurun secara signifikan baik pada kelompok DD, DBD dan SSD setelah 48 jam rawatan (Rampengan *et al.*, 2015).

Literatur yang menuliskan kadar normal dari ANGPT-2 pada anak sepanjang pengetahuan peneliti sampai saat ini belum ada. Penelitian oleh Wan RG et al., (2011), pada dewasa yang membandingkan kadar ANGPT-2 pasien kanker pankreas lebih tinggi daripada pasien pankreatitis dan kontrol. Kadar ANGPT-2 pasien kontrol adalah $1075.6 \pm 228,2$ ng/l. Chong AY et al. (2004), meneliti kadar ANGPT-2 lebih tinggi pada pasien dengan gagal jantung akut dibandingkan dengan kronik dan kontrol. Kadar ANGPT-2 pada kontrol adalah 5 ng/ml.

Roviezzo *et al.*(2005) menyimpulkan bahwa ANGPT-2 menginduksi pembentukan edema pada cakar tikus dan efek ini dihambat oleh bentuk larut dari reseptor Tie2 atau ANGPT-1. Sementara kadar NO dan prostaglandin E₂ tidak mengalami peningkatan yang menunjukkan bahwa aksi dari ANGPT-2 tidak memengaruhi mediator ini. ANGPT-2 menstimulasi ekstravasasi sel dengan cairan minimal tetapi dalam keadaan inflamasi yang masih berlangsung akan mengurangi infiltrasi seluler jaringan.

Mekanisme peningkatan kadar ANGPT-2 dan kebocoran plasma merupakan suatu kaskade yang kompleks. ANGPT-2 akan menyebabkan instabilitas integritas sel endotel dan menyebabkan kebocoran plasma setelah ANGPT-2 dilepaskan dari WPB akibat adanya stimulus baik berupa sitokin pro inflamasi, trombin, aktivasi leukosit dan trombosit, perubahan sirkulasi atau berkurangnya oksigenasi jaringan. ANGPT-2 yang dilepaskan akan berikatan dengan reseptor Tie-2, menyebabkan defosforilasi reseptor Tie-2 sehingga menghambat pelepasan signal ANGPT-1/Tie-2. ANGPT-2 tidak menyebabkan aktivasi reseptor, sehingga *cascade* aktivasi sinyal PI3K dan Ras *pathway* seperti

yang diakibatkan oleh ANGPT-1 tidak terjadi apabila reseptor Tie-2 diduduki oleh ANGPT-2. Hal ini akan berdampak tidak terbentuknya sinyal migrasi, sinyal anti permeabilitas dan anti inflamasi pada sel endotel sehingga memudahkan terjadinya kebocoran plasma (Thomas, 2008; Lukasz, 2012).

6.3 Hubungan Kadar VEGF dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah glikoprotein proangiogenik yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, dan *survival rate* sel endotel, namun VEGF juga dikenal sebagai *inducer* kuat yang menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular, menstimulasi vasodilatasi dan menginduksi fenestra pada sel endotel secara *in vivo* dan *in vitro* dan turut berperan terhadap terjadinya kebocoran plasma (Srikiatkachornet *al.*, 2007). Disfungsi endotel dipercaya memainkan peranan penting dalam patogenesis kebocoran plasma, Van de Weg *et al.* (2014) menyimpulkan pada penelitiannya terdapat peningkatan ANGPT-2, endothelin-1 dan MMP-2 serta penurunan kadar VEGFR-2 yang secara bermakna berhubungan dengan kebocoran plasma.

Literatur yang menuliskan kadar normal dari VEGF pada anak sepanjang pengetahuan peneliti sampai saat ini belum ada. Chong AY *et al.* (2004), membandingkan kadar VEGF pada pasien gagal jantung yang mendapatkan kadar VEGF pada pasien dengan gagal jantung akut lebih tinggi dibandingkan pada gagal jantung kronik dan kontrol. Kadar VEGF pada kontrol adalah 250 pg/ml.

Eksresi VEGF dipicu oleh berbagai faktor. Faktor utama yang merangsang VEGF adalah hipoksia jaringan/sel sedangkan faktor lainnya adalah estrogen, *nitric oxide* (NO), serta faktor pertumbuhan (*fibroblast growth factor-4*,

(PDGF), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor beta*(TGF- β), *keratinocyte growth factor*, interleukin (IL)-6, IL-1 β , dan *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) (Brkovic,2006). Andersen et al., 2014, meneliti marker kerusakan jaringan pada infeksi Hantavirus salah satunya VEGF. VEGF mengalami peningkatan yang merupakan penanda terjadinya *remodeling* dan perbaikan dari vaskular.

Kadar VEGF dilaporkan meningkat signifikan pada pasien DBD dan SSD dibandingkan kontrol (Srikiatkachorn *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2005) namun penelitian lain melaporkan kadar plasma VEGF lebih rendah pada kelompok DD dan DBD dibandingkan kontrol. (Seet R, 2009; Rathakrishnan, 2012). Pada infeksi virus dengue terjadi peningkatan kadar VEGFR2 sebagai reseptor perlekatan VEGF pada sel endotel. Namun pada penelitian Seet R (2009) ini tidak dilakukan pemeriksaan kadar VEGFR2, sehingga hal ini merupakan salah satu alasan rendahnya kadar VEGF pada penelitian ini karena kemungkinan telah terjadinya binding VEGF dengan VEGFR2 pada permukaan sel endotel. Pada penelitian ini kadar VEGF cenderung meningkat sesuai dengan tingkat keparahan penyakit namun tidak berbeda bermakna secara statistik. Hal ini sejalan dengan penelitian di Thailand yang dilakukan terhadap 31 penderita DD dan 37 penderita DBD yang menyatakan bahwa kebocoran plasma pada penderita DBD tidak dapat diterangkan oleh peningkatan VEGF (Tseng *et al.*, 2005). Peningkatan kadar VEGF diaktivasi oleh proses fibrinolisis yang terlihat dari adanya hubungan yang bermakna antara peningkatan VEGF plasma dengan peningkatan D-dimer.

Lesmes et al. (2008), meneliti peranan VEGF dan ANGPT-2 terhadap kebocoran vaskular pada mencit dengan sirosis menyimpulkan terdapat

peningkatan ekspresi VEGF-A dan ANGPT-2 di mesenterium mencit dengan sirosis. Blokade terhadap VEGFR2 bermakna menurunkan kebocoran plasma dan hepar pada mencit dengan sirosis. Peningkatan kadar VEGF yang tidak bermakna pada penelitian ini kemungkinan juga disebabkan oleh adanya blokade terhadap ekspresi VEGFR2 yang tidak diteliti pada penelitian ini. Blokade terhadap ekspresi VEGFR2 menghambat aktivitas VEGF dalam menyebabkan kebocoran plasma.

6.4 Polimorfisme Gen ANGPT-2

Gen ANGPT-2 tersusun atas 498 asam amino dan berlokasi pada kromosom 8p23.1, dengan panjang 63.613 bp terdiri dari 9 exon dan 8 intron. Polimorfisme umumnya terjadi pada urutan basa 759, 1087 dan 1233 yang berlokasi pada exon 2, 4 dan 5 (Ward *et al.*, 2001). Pemeriksaan polimorfisme gen ANGPT-2 pada penelitian ini difokuskan pada region exon 4. Beberapa alasan memilih exon 4 adalah sebagai berikut: (1) Exon 4 merupakan region yang banyak diteliti sebelumnya karena merupakan daerah yang sangat polimorfik. Ward *et al.* (2001) melaporkan bahwa gen ANGPT-2 memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi. Beberapa penelitian terdahulu seperti penelitian Pietrowski *et al.* (2003) menggunakan primer exon 4 untuk mendeteksi polimorfisme gen ANGPT-2 pada wanita yang mengalami keguguran berulang, demikian juga dengan Onen *et al.* (2007) yang menggunakan primer exon 4 untuk mendeteksi polimorfisme gen ANGPT-2 pada kanker prostat sporadik. (2) Disamping itu region exon 4 memiliki SNP yang lebih banyak dibanding region

lainnya dengan frekuensi alel minor yang cukup besar (Pietrowski *et al.*, 2003; Onen *et al.*, 2007).

Exon 4 dimulai dari nukleotida ke 46.854 – 47.086 dengan panjang 232 bp. Exon 4 berperan dalam mengkode ujung terminal N, *coiled coil domain*, dan sebahagian *hinge region*. Pada penelitian ini dilakukan sekuensing mulai dari intron 3, exon 4 sampai intron 4. Hasil sekuensing menunjukkan adanya polimorfisme pada 8 dari 10 SNP yang terdapat di sepanjang region tersebut. Sembilan SNP yang diperiksa merupakan SNP lama yang sudah dikenal dan pada penelitian ini juga ditemukan 1 SNP baru yang belum terdaftar di NCBI yaitu 4c.46981 yang berlokasi di exon 4 pada urutan basa ke 232.

Terdapat beberapa macam bentuk polimorfisme, diantaranya “*Single Nucleotide Polymorphism*” (SNP) dan “*Variable Number of Tandem Repeat*” (VNTR). Jenis polimorfisme yang sering terjadi adalah SNP, yang dapat berupa substitusi, delesi atau insersi dari sebuah nukleotida tunggal. Dinyatakan SNP bila hanya terdapat perubahan satu nukleotida pada alel yang terlibat. Pada penelitian ini polimorfisme yang terjadi adalah dalam bentuk SNP berupa substitusi basa. Mutasi yang terbanyak bersifat heterozigot. Mutasi G/A (rs 3020221) merupakan bentuk mutasi yang paling banyak ditemukan pada penelitian ini (32,3% pada kelompok DD, 25,64% pada kelompok DBD dan 28,57% pada kelompok SSD), disusul mutasi A/G pada rs7834131 (14,7% pada kelompok DD, 15,38% pada kelompok DBD dan 28,57% pada kelompok SSD), mutasi G/T pada rs55633437 (20,58% pada kelompok DD, 15,38% pada kelompok DBD dan 8,57% pada kelompok SSD), serta mutasi A/G pada rs115694540, dan 4c.46981). Selain mutasi heterozigot, pada penelitian ini juga ditemukan mutasi homozigot.

Mutasi homozigot ditemukan pada 3 SNP yaitu; rs7834131 (ditemukan 2 mutasi homozigot pada kelompok DBD), 4c.46981 (2 mutasi homozigot pada kelompok DD), dan rs3020221 (1 mutasi homozigot pada kelompok DD, 3 pada kelompok DBD dan 3 pada kelompok SSD). Mutasi pada beberapa SNP menyebabkan terjadinya perubahan asam amino yang dihasilkan yaitu pada SNP 4c.46981 (G/A) terjadi perubahan asam amino dari lysin menjadi glutamate (Lys(K)232Glu(E)), pada SNP rs149699486 (T/C) terjadi perubahan asam amino valin menjadi alanin (Val(V)235Ala(A)), dan pada SNP rs374966371 (A/T) terjadi perubahan asam amino asparagin menjadi isoleusin (Asn(N)257Ile(I)).

Penelitian ini hampir sama dengan penelitian Pietrowski *et al.* (2003) mengenai polimorfisme ANGPT-2 pada wanita dengan abortus idiopatik berulang yang menunjukkan polimorfisme mutasi G/A merupakan jenis mutasi yang paling banyak ditemukan pada exon 4 gen ANGPT-2, mutasi ini diyakini dapat menyebabkan perubahan ekspresi protein dan menghambat proses angiogenesis.

6.5 Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Kadar ANGPT-2

Adanya mutasi *genotype*A/G pada rs7834131 berhubungan dengan peningkatan kadar ANGPT-2 pada sampel anak dengan infeksi virus dengue. Nilai median kadar ANGPT-2 pada kelompok yang mengalami mutasi lebih tinggi dibandingkan yang tidak mengalami mutasi dan secara statistik perbedaan ini bermakna. Efek mutasi A/G terhadap peningkatan kadar ANGPT-2 jelas terlihat pada sampel di kelompok DD, 4 dari 5 sampel yang mengalami mutasi pada kelompok DD memiliki kadar ANGPT-2 diatas nilai median kelompok serta

3 diantaranya merupakan nilai ekstrim yang tertinggi di kelompok DD pada sampel 32, 13 dan 3.

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa mutasi A/G pada rs7834131 menyebabkan peningkatan yang bermakna kadar ANGPT-2 pada kelompok DD, sedangkan pada kelompok DBD tidak bermakna, sebaliknya pada kelompok SSD kadar ANGPT-2 pada kelompok mutasi justru lebih rendah dibandingkan yang tanpa mutasi walaupun secara statistik perbedaan tersebut tidak bermakna. Hal ini membuktikan bahwa peningkatan kadar ANGPT-2 akibat mutasi A/G pada rs7834131 diduga bersifat protektif mencegah terjadinya *leakage*. Artinya semakin tinggi kadar ANGPT-2 yang disebabkan adanya mutasi pada rs7834131 akan mencegah terjadinya kebocoran plasma sehingga akan mencegah pasien jatuh pada kondisi yang parah yaitu DBD atau SSD. Hal ini mungkin disebabkan oleh mutasi yang menyebabkan perubahan fungsi dari ANGPT-2, walaupun jumlah yang dilepaskan tetap tinggi tetapi kemampuannya dalam berikatan dengan Tie-2 terganggu.

6.6 Hubungan Polimorfisme Gen ANGPT-2 dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue

Penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi atau polimorfisme pada gen ANGPT-2 tidak berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit. Hal ini terlihat dengan mutasi yang terjadi merata pada semua kelompok, baik kelompok DD, DBD atau SSD dan secara statistik tidak terlihat perbedaan yang bermakna.

Beberapa penelitian terdahulu mendapatkan hasil yang bervariasi tentang peranan faktor genetik pada infeksi virus dengue. Pemeriksaan SNP pada gen MBL2, TNF- α , Fc γ reseptor, CTLA-4, TGF- β 1, HPA, DC-SIGN, TAP, VDR dan

JAK1 berhubungan dengan tingkat proteksi, kerentanan dan tingkat keparahan infeksi dengue, sedangkan pemeriksaan SNP pada gen IL-4, IL-1RA, IFN- γ , IL-6, TLR4 dan IL-10 tidak berhubungan dengan tingkat keparahan infeksi virus dengue. (Harapan *et al.*, 2013)

Penelitian ini sepanjang pengetahuan peneliti merupakan penelitian pertama yang memeriksa polimorfisme genetik gen ANGPT-2 pada pasien anak yang terinfeksi virus dengue. Beberapa penelitian lain tentang polimorfisme gen ANGPT-2 pada penyakit lain memberikan hasil yang berbeda. Su L *et al.* (2009) melaporkan dari 9 tSNP gen ANGPT-2 yang diperiksa hanya 1 tSNP (rs2515475) yang berhubungan dengan peningkatan risiko menderita ARDS. Demikian juga penelitian Heet *al* (2012) yang mendapatkan bahwa hanya 1 dari 3 mutasi yang berhubungan dengan meningkatnya risiko menderita diabetes melitus (DM) tipe-2 serta berhubungan dengan onset munculnya nefropati diabetik, (genotype 1233A/G), sedangkan 2 mutasi lainnya (genotip 759T/G dan 1078A/G) tidak memiliki hubungan dengan risiko menderita DM tipe-2. Namun pada beberapa studi mutasi G/A tidak berhubungan dengan kejadian DM tipe 2. Penelitian Pietrowski *et al.* (2003) mendapatkan polimorfisme G/A pada exon-4 gen ANGPT-2 tidak berhubungan dengan kejadian keguguran berulang idiopatik pada populasi wanita kulit putih di daerah Eropa tengah. Polimorfisme G/A juga tidak berhubungan dengan kejadian IUFD pada populasi kaukasian (Huber *et al.*, 2005), dan juga tidak berhubungan dengan peningkatan risiko kanker ginekologi di Turki (Konac *et al.*, 2007). Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian ini bahwa polimorfisme G/A tidak berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit infeksi virus dengue pada anak. Dari beberapa penelitian yang ada terlihat bahwa

polimorfisme gen bisa memperberat, memproteksi, atau tidak memengaruhi sama sekali tingkat keparahan penyakit. Pada penelitian ini polimorfisme gen ANGPT-2 tidak berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit, meskipun ditemukan peningkatan kadar ANGPT-2 yang bermakna. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya pengaruh promotor gen yang dapat bersifat *upregulation* ataupun *downregulation* terhadap kinerja ANGPT-2 yang dihasilkan. Penelitian ini terbatas hanya pada exon 4 dan tidak dilakukan pada daerah promotor. Promotor adalah urutan DNA spesifik yang berperan dalam mengendalikan transkripsi gen struktural dan terletak disebelah hulu (*upstream*) dari bagian struktural suatu gen.

Tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue ditentukan oleh berat ringannya kebocoran plasma yang terjadi. Proses kebocoran plasma berawal dari cedera endotel dan melibatkan interaksi faktor lain yang bersifat sangat kompleks. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya mutasi A/G pada rs7834131 akan berhubungan dengan peningkatan kadar ANGPT-2, tetapi adanya mutasi pada gen ANGPT-2 tidak berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Hal ini memperkuat dugaan bahwa mutasi A/G pada rs7834131 bersifat protektif terhadap kebocoran plasma dan terdapat faktor lain yang tidak diteliti pada penelitian ini yang menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2 yang lebih berperan memicu kebocoran plasma pada pasien infeksi virus dengue.

Mekanisme *signaling* efek protektif peningkatan kadar ANGPT-2 terhadap kebocoran plasma ini belum sepenuhnya dipahami dan masih butuh penelitian lebih lanjut. Penelitian *in vivo* pada mencit menunjukkan bahwa peningkatan kadar ANGPT-2 memiliki efek yang sama dengan ANGPT-1 yaitu menghambat

terjadinya kebocoran plasma. Peningkatan kadar ANGPT-2 akan mengaktifkan sinyal Tie2/Akt yang menghambat ekspresi gene FOXO-1 sehingga mencegah terjadinya kebocoran plasma (Daly *et al.*, 2006)

Beberapa teori terbaru menunjukkan bahwa kebocoran plasma terjadi akibat degradasi atau kerusakan glikokaliks yang melapisi permukaan endotel (Reitsma *et al.*, 2007; Schott U *et al.*, 2016). Angiopoeitin-2 menyebabkan sekresi heparanase pada glicocalix yang menyebabkan terjadinya kebocoran plasma dan ekstravasasi leukosit. Degradasi glikokaliks dapat dicetuskan oleh peningkatan ANGPT-2 yang menginduksi pelepasan enzim heparanase melalui aktivasi jalur MLCK, Rho-kinase dan *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. Efek kebocoran plasma akibat ANGPT-2 akan terjadi hanya apabila ANGPT-2 berikatan dengan reseptor Tie-2 sehingga terjadi aktivasi cascade selanjutnya. Beberapa studi juga menunjukkan kebocoran plasma dapat dicegah pada beberapa kondisi berikut yaitu; apabila reseptor Tie2 ditempati oleh ligand selain ANGPT-2, atau delesi gen ANGPT-2 (Lukasz *et al.*, 2017). Pada penelitian ini mutasi rs7834131 menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2 pada kelompok DD, namun peningkatan ini tidak menyebabkan kebocoran plasma. Hal ini diduga bahwa mutasi tidak hanya menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2, namun mungkin juga mengubah kinerja ANGPT-2 sehingga tidak efektif berikatan dengan reseptor Tie-2 yang menyebabkan tidak terjadinya pelepasan heparanase sehingga struktur glikokaliks tetap utuh. Kumpers *et al.* (2011), mendapatkan bahwa perlindungan terhadap kebocoran plasma disebabkan oleh stimulasi Tie-2, ANGPT-2 eksogen, atau delesi genetik dari ANGPT-2 pada berbagai model sepsis sebagian disebabkan oleh pertahanan glikokaliks.

6.7. Keterbatasan dan Kebaruan (Novelty) Penelitian

Keterbatasan penelitian

Penelitian ini memiliki keterbatasan antara lain tidak dilakukannya pemeriksaan serotipe virus dengue, NS1 dan *viral load* yang mungkin ikut memengaruhi tingkat keparahan penyakit dan kadar ANGPT-2 serta VEGF. Penelitian ini hanya meneliti 1 exon yaitu exon 4 yang terdapat pada gen ANGPT-2, padahal masih ada exon 2 dan 5 yang pada penelitian terdahulu juga dianggap sebagai daerah yang polimorfik. Penelitian ini juga tidak meneliti karakteristik promotor sebagai elemen regulator ekspresi gen ANGPT-2.

Kebaruan (Novelty) Penelitian

Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat polimorfisme gen ANGPT-2 pada anak dengan infeksi virus dengue. Polimorfisme ditemukan pada 8 dari 10 SNP yang diperiksa, dan ditemukan 1 SNP baru yang belum terdaftar sebelumnya di NCBI, yaitu SNP 4c.46981 yang berada pada urutan basa ke 232. Ditemukannya satu tambahan SNP 4c.46981 ini akan memperkaya informasi titik SNP pada cakupan exon 4 gen ANGPT-2 (A/G). SNP baru ini mengalami mutasi pada beberapa subjek penelitian di setiap tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue. Mutasi A/G pada SNP rs7834131 menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2 yang diduga bersifat protektif terhadap kebocoran plasma, hal ini menunjukkan bahwa terdapat faktor lain yang dapat menghambat ANGPT-2 dalam menyebabkan terjadinya kebocoran plasma seperti adanya lapisan glikokaliks yang melindungi endotel yang tidak diteliti pada penelitian ini.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Terdapat hubungan antara kadar ANGPT-2 dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.
2. Terdapat kecenderungan peningkatan kadar VEGF sesuai dengan tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.
3. Terbukti adanya polimorfisme gen pada anak dengan infeksi virus dengue. Polimorfisme ditemukan pada 8 dari 10 SNP, dan ditemukan satu SNP baru yaitu 4c.46981.
4. Terdapat hubungan polimorfisme gen ANGPT-2 pada mutasi A/G pada rs7834131 dengan peningkatan kadar ANGPT-2 pada kelompok pasien demam dengue.
5. Polimorfisme gen ANGPT-2 pada SNP rs7834131 diduga bersifat protektif terhadap tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek SNP yang baru ditemukan (4c.46981) terhadap infeksi virus dengue.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme *signaling* yang menyebabkan peningkatan kadar ANGPT-2 oleh

rs7834131 pada infeksi virus dengue bersifat protektif terhadap kebocoran plasma

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan pemeriksaan *serotype* virus dengue, NS1 dan *viral load* yang mungkin ikut memengaruhi tingkat keparahan penyakit akibat infeksi virus dengue pada anak
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap gen ANGPT-2 menggunakan primer exon 2 dan exon 5
5. Perlu dilakukan penelitian polimorfisme gen ANGPT-2 di daerah promotor
6. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang peranan faktor lain seperti glikokaliks yang melindungi endotel dari kebocoran plasma yang disebabkan oleh peningkatan ANGPT-2.



DAFTAR PUSTAKA

- Albert PR. (2011). What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *J Psychiatry Neurosci*,36,363-365.
- AlconS, TalarminA, DebruyneM, FalconarA, Deubel V,Flamand M, (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*,40,376-381.
- Almodovar CR, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P, (2009). Role and therapeutic potential of VEGF. *Physiological Review*,89,607-648.
- Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz A, (1997). Activation of endothelial cells via antibody enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*,71,4226-4232.
- Andersen AMC, Thunberg T, Ahlm C, (2014). Endothelial activation and repair during hantavirus infection : association with disease outcome. *OFID*, 1,1-9
- BarreroPR, MistchenkoAL, (2008). Genetic analysis of dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Research*,135,83–88.
- Barton WA, Tzvetkova D, Nikolov DB, (2005). Structure of the angiopoietin-2 receptor binding domain and identification of surface involved in Tie2 recognition. *Structure*,15,825-832.
- Blanton RE, Silva LK, Morato VG, Parrado AR, Dias JP, MeloPRS, et al. (2008). Genetic ancestry and income are associated with Dengue Hemorrhagic Fever in a highly admixed population. *Eur J Human Genet*,16,762-765.
- Brkovic A, Sirois MG,(2006). Vascular Permeability Induced by VEGF Family Members in role of endogenous PAF and NO synthesis. *J Cell Biochem*,100,727-737.
- Cabello-Gutierrez C, Manjarrez-Zavala ME, Huerta-Zepeda A, Cime-Castillo J, Monroy-Martinez V, Correa BB, *et al.* (2009). Modification of the cytoprotective protein C pathway during dengue virus infection of human endothelial vascular cells. *Thromb Haemost*,101,916-928.

- Carvalho CX, Gibson G, Brasil P, Ferreira, RX, Santos R, Cruz OG, *et al.* (2013). Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. *Infection Genetics and Evolution*,20,197-205.
- Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Lip GYH. (2004). Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. *Research gate*.08.
- Daly C, Thurston G, (2012). The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway. *Old Spring Harb Perspect Med*.
- Dalrymple NA, Mackow ER, (2012). Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in Virology*,2,1-8.
- DarwishTN, Alias YB, Khor SM, (2015). An introduction to dengue-disease diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*,67,45-55.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, *et al.* (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell*,87,1161-1169.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, Limpitikul W, *et al.* (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, 328, 745-748.
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnan MG,(2008). The role adherens junctions and veadherin in control of vascular permeability. *JCS*,121,2115-2122.
- Dewi R, (2005). Gambaran klinis demam berdarah dengue dan faktor resiko yang memprediksi terjadinya renjatan. Tesis. Jakarta Dept IKA FKUI,1,1-10.
- Dharma R, Hadinegoro SR, Priatini I, (2006). Disfungsi endotel pada demam berdarah dengue. *Makara Kesehatan*,10,17-23.
- Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan (2012). Laporan akuntabilitas kinerja DITJEN PP dan PL tahun 2012.
- Djamiatun K, Van der Ven AJ, de Groot PG, Faradz SM, Hapsari D, *et al.* (2012). Severe dengue is associated with consumption of von willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13. *PLoS Negl Trop Dis*,6,16-28.
- Dusart P, Labeau B, Lagathu G, (2006). Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*,13,1185-1189.

- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. 2002. Spatial and Temporal Circulation of Dengue Virus Serotypes: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. *American Journal of Epidemiology*,156,52-59.
- Eppy, (2012). Aspek genetik demam berdarah dengue. *CDK*,39,665-668.
- Garcia CJA, Guzman GFJ, Alejandro QVM, Ruiz MCG, Sachedz HM, Lemarroy CRC,(2010). Dengue hemorrhagic fever in infant after primoinfection. *Bol Med Hosp Infant Mex*,67,355-358.
- Gavard J, Patel V, Gutkind JS, (2008). Angiopoietin-1 prevent vegf-induced endothelial permeability by sequestering src through mdia. *Dev Cell*, 14,25-36.
- Guardo HP, Glasner DR, Harris E, (2016). Dengue virus NS1 disrupts the endothelial glycocalix, leding to hyperpermeability. *Pathog* 12(7), 1-29
- Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, Wahlin K, Suri C, Maisonpierre P, et al. (2000). Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* 184,3,275-284.
- Hadidy AE, Sammak E,KhamisMY, Fawzy AM,(2013). Association between angiopoietin-2 gene polymorphism and pre-eclampsia. *RCOG World Congress*.
- Harapan H, Fajar JK, Wahyuniati N, Anand JR, Nambaru L, Jamil KF, (2013). Non HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*,14,1-11.
- Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. (2001). Haiti: Absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg*,65,180-183.
- Hao J, He XD, (2014). Haplotype analysis of ApoA1 gene and sepsis associated acute lung injury. *Lipids in Health and Disease*,13,1-6.
- Hadinegoro SR, (1996). Telaah endotoksemia pada perjalanan penyakit demam berdarah dengue: perhatian khusus pada syok, produksi TNF-a, dan Interleukin-6 sebagai faktor prediktor demam berdarah dengue berat. disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- He Q, Luo HM, Zhu BS, Tang XH, Jiang LZ. Association of 1233A/G polymorphism of angiopoietin-2gene with type 2 diabetes mellitus and diabetes nephropathy. *Chinese Journal of Medical Genetic*. 2012;29:72-6

- Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marme D, Augustin HG, Fiedler U, (2004). Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *ArteriosclerThromb Vasc Biol*,24,1803-1809.
- Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, *et al.* (2001). Infection of human dendritic cells by Denguevirus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol*,166,1499-1506.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56. 549-80.
- Huber A, Grimm C, Pietrowski D, Zeillinger R, Bettendorf H, Husslein P, *et al.* (2005). An angiopoietin-2 gene polymorphism in unexplained intrauterine fetal death: a multicenter study. *Journal of Reproductive Immunology*,65,47-53.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, *et al.* (2004). Localization of Dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*,189,1411-1418.
- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K, (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*,(2), 257-267.
- Karyanti MR, Uiterwaal CSPM, Kustiastuti R, Hadinegoro SR, Rovers MM, *et al.* (2014). The changing incidence of Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia: a 45-year registry-based analysis. *BMC Infectious Diseases*, 14:412,1-7.
- Kalomenidis I, Kollintza A, Sigala I, Papapetropoulos A, Papiris S, Light RW, Roussos C, (2006). Angiopoietin-2 levels are elevated in exudative pleural effusions. *Chest* 129,5,1259-1266.
- Konac E, Onen HI, Metindir J, Alp E, Biri AA, Ekmekci A, (2007). Lack of association between 460 C/T and 936 C/T of the vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 exon 4 G/A polymorphisms and ovarian, cervical, and endometrial cancers. *DNA and Cell Biology*,26,453-463.
- Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbone I, del Rosario D, Vazquez S, *et al.* (1998). Reemergence of Dengue in Cuba: A 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*,4,89-92.
- Kumarasamy V, Chua SK, Hassan Z, Wahab AH, Chem YK, Mohamad M, *et al.* (2007). Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture Elisa for early diagnosis of acute dengue infection. *Singapore Med J*,48,669-673.

- Kumpers P, Gueler F, David S, Slyke PV, Dumont DJ, Park JK, *et al.* (2011). The synthetic tie2 agonist peptide vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Crit Care*,15,261
- Lan NTP, Hirayama K, (2011). Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical Medicine and Health*,39,73-81.
- Lastere S, Goffard N, Teissier A, Zisou K, (2010). Assessment of NS1 antigen detection tests during DEN-4 epidemic in French Polynesia. *Pacific Public Health Surveillance Network*.
- Lee YR, Liu MT, Lei HY, *et al.* (2006). MCP-1, a highly expressed chemokine in Dengue haemorrhagic fever/ Dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*,87,3623-3630.
- Lesmes PM, Tugues S, Ros J, Varo GF, Ruiz MM, Rodes J, *et al.* (2008). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 play a major role in the pathogenesis of vascular leakage in cirrhosis rats. *BMJ*, 58,1-5
- Libraty DH, Young PR, Pickering D, (2002) High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *JID*,186,1165-1168.
- [Lim HS](#), [Blann AD](#), [Chong AY](#), [Freestone B](#), [Lip GY](#), (2004). Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care*, 12, 2918-24.
- Limonta D, Capo V, Torres G, *et al.* (2007). Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol*,40,50-54
- Lukasz A, Hillgruber C, Oberleithner H, Vihrog KK, Pavenstadt H, Rovas A, *et al.* (2017). Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2. *Cardio Research*, 1,1-10
- Lukasz A, Kumpers P, David S, (2012). Role of angiopoietin/Tie2 in critical illness: promising biomarker, disease mediator, and therapeutic target?. *Scientifica*, 2012,1-8
- Lukasz A, *et al.* (2017). Endothelial glycocalyx breakdown is mediated by angiopoietin-2. *Cardiovasc Res*, 671-680**
- Malamitsi A, Boutsikou T, Economou E, Tzonou A, Makrakis E, Nikolaou KE, *et al.* (2006). Angiopoietin-2 in the perinatal period and the role of intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 85,1,45-48

- Malavige GN, Ogg GS, (2017). Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology*, 151, 261-269
- Maron GM, Clara AW, Diddle JW, Pleites EB, Miller L, McDonald G, (2010). Association between Nutritional Status and Severity of Dengue Infection in Children in El Salvador. *Am J Trop Med Hyg*, 82(20),324-329
- Mayetti. (2010). Hubungan Gambaran Klinis dan Laboratorium Sebagai Faktor Risiko Syok pada Demam Berdarah Dengue. *Sari Pediatri*, 11,367-7
- Megariani, Mariko R, Alkamar A, Putra AE, (2014). Uji diagnostik pemeriksaan antigen nonstruktural 1 untuk deteksi dini infeksi virus dengue pada anak. *Sari Pediatri*,16,(2),122-127
- Michels M., van der Ven A.J., Djamiatun K., Fijnheer R., de Groot P.G., Griffioen, *et al.* (2012). Imbalance of angiopoietin-1 and ANGPT-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation, and vascular stability. *Am J Trop Med Hyg*,87,943-946
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, *et al.* (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*,9,921-927
- Moss A, (2013).The angiopoietin: Tie 2 interaction: a potential target for future therapies in human vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Nimmannitya S.(2008). Dengue haemorrhagic fever: A scourge of South-East Asian Region. Global innovation to fight dengue. 2nd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Phuket: Thailand, 22
- Oliveira MDL, Correia MTS, Diniz FB, (2009). A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis, *Synth. Met*,159,2162-2164.
- Onen HL, Konac E, Eroglu M, Ekmekci A, (2007). Angiopoietin-2 gene polymorphism in sporadic prostate cancer. *Gazi Tip Dergisi Medical Journal*,18,121-126.
- Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, *et al.* (2006). Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *Plos Med*,3,356-369
- Pietrowski D, Tempfer C, Bettebendorf H, Burkle B, Nagele F, Unfried G, *et al.* (2003). Angiopoietin-2 polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fertility and Sterility*,80,1026-1029

- Rampengan NH, Daud D, Waraouw S, Ganda IJ, (2015).Serum angiopoetin 2 as marker of plasma leakage in dengue viral infection. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine*,3,39-43
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan A.M., Ponnampalavanar S., Lum L.C. Cytokine expression profile of dengue patients at different phases. (2012). *Plos One*. 7.1-11
- Reitsma S, Slaff DW, Vink H, Van Zandvoort MA, Egbrink MG, (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Eur J Physiol*,454,345-359
- Rimoin DL, Connor J, Pyeritz RE, Korf BR, (2002). Emery and Rimoin's: Principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone.
- Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G, *et al*. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;314:738-44
- Schott U, Solomon C, Fries D, Bentzer P, (2016). The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*,24,1-8
- Seet R, Chow A, Quek A, Chan YH, Lim E,(2009). Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adult with dengue virus infection: a case –control study. *International journal of Infectious Disease*,13,248-53
- Setiabudi D, (2011). *Kumpulan tips pediatri*. (2nd ed.). Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia
- Setiati TE, Soemantri AG, (1997). Blood lactic acids as a predictor of mortality in severe dengue haemorrhagic fever in drKariadi Hospital–Semarang, Central Java [dissertation]Semarang: Universitas Diponegoro,10-19
- Shen YH, Godlewski J, Zhu J, Sathyanarayana P, Leanert V, Birre J, *et al*. (2003). Cross talk between JNk/SPAK and ERK/MAPK pathways. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278, 267,15-21
- Shepherd SM, Hinfey PB, Shoff WH, (2010). Dengue fever..Retrieved from: <http://www.emedicine.com>
- Silver KL, Kain KC, Liles WC (2007). Endothelialactivation and dysregulation: a common pathway to organ injury in infectious diseases associated with systemic inflammation. 4. 215-22

- Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD, (2009). Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock*,31,348-353
- Soegijanto S, (2010). Patogenesis infeksi virus dengue recent update. *applied Management of Dengue Viral Infection in Children*. 6 November 2010. hal 11-45
- Srikiatkachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanaroj S, Libraty DH, Green S, *et al.* (2007). Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *J Virol*,81,1592-600
- Srikiatkachorn, Anon, Kelley, James F, (2014). Endothelial cells in dengue hemorrhagic fever. *Antiviral research*. 109. 160-70
- Stuttfield E, Ballmer K, (2009). Critical Review:Structure and Function of VEGF Receptors. *IUBMB Life*. 61.915–922
- Su Li, Zhai R, Sheu CC, Gallagher DC, Gong MN, Tejera P, *et al.* (2009). Genetic variants in the ANGPT-2 gene are associated with increased risk of ards. *Intensive Care Med*,35,1024-1030
- Suwandono A, Kosasish H,Nurhayati, (2006). Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever ang dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. *Trans R Soc Trop Med*,100,855-862
- Sumarmo PS, (2002). Infeksi virus dengue. Dalam: Sumarmo PS, Garna H, Hadinegoro SRH, penyunting Buku ajar ilmu kesehatan anak dan penyakit tropis Edisi pertama Jakarta: Balai Penerbit Fakultas kedokteran Universitas Indonesia,176-208
- Taib B, (2009). Penyakit Demam Berdarah Dengue Pada Anak.Majalah ilmiah Unimus,1,50-1
- Thomas M, (2008). Moleculer Mechanism of Angiopoetin 2 mediated destabilization of the vascular endothelium. Disertasi. Program Doktorat Universitas Freiburg.
- Trang NTH, Long NP, Hue TTM, Hung LP, Trung TD, Dinh DN, *etal.* (2016). Association between nutritional status and dengue infection: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*,16,2-11
- Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG. (2005). Elevated levels of plasma VEGF in patient hemorrhagic fever. *FEMS immunology and Medical Microbiology*;43:99-102

- Valenzuale DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, *et al.* (1996). Angiopoeitin 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and human. *ProcNatiAcad Sci*,96,1904-1909
- Van de Weg CAM, Pannuti CS, Van den Ham HJ, de Araujo ESA, Boas LSV, Felix AC, *et al.* (2014). Serum ANGPT-2 and soluble VEGF receptor 2 are surrogate markers for plasma leakage in patients with acute dengue virus infection. *J Clin Virol*,60,328-35
- Waidab W, Suphapeetiporn K, Thisyakorn U, (2008).Pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: from immune to genetics. *J Pediat Infect Dis*,3,221-227
- Wallez Y, Huber P, (2008). Endothelial Adherens and Tight Junctions in Vascular Homeostasis, Inflammation and Angiogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*,1778,794-809
- Wan RG, Chen DB, Lou YG, Wang MF, Zhang QH, Jin DX, *et al.* (2011). Diagnostic value of serum angiopoietin-2 level in pancreatic cancer. *Chinese jour of Oncol*.33.1.47-9
- Ward EG, Grosios K, Markham AF, Jones PF, (2001). Genomic structures of the human angiopoietins show polymorphism in angiopoietin-2. *Cytogenet. Cell Genet*,94,147-154
- Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, Wisnewski SR, Kochanek PM, Carcillo JA, (2000). Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med*,28,2600-7
- World Health Organization.(1999).Dengue haemorrhagicfever : Diagnosis, treatment, prevention and control(2nded). Geneva,1-84
- World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.New edition. Geneva.
- World Health Organization-South East Asia Regional Office.(2011). Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue hemorrhagic fever. India: WHO.
- WHO CDC. (2014). Dengue home. Retrieved from <http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/>.
- Yacoub S, Wills B. (2014). Predicting outcome from dengue. *BMC Med* 12.147.1-10
- Yu Q, Stamenkovic I, (2001). Angiopietin-2 is implicated in the regulation of tumor angiogenesis.*Am J Pathol* 158,2,563-570

Yua X, Seegarb T, Daltonb AC, Robeva DT, Goldgura Y, Rajashankarc KR, *et al.* (2013).Structural basis for angiopoietin-1–mediated signaling initiation. PNAS,110,7205-7210

Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi A, Parikh SM, (2011). Angiopoetin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie-2 signalingin the endothelium. Mol Cell Biol,29,2011-2022



Lampiran 1

Surat Izin Penelitian (*Informed Consent*)

Bapak/ ibu yang terhormat,

Kami dari Kelompok Staf Medis/ Bagian Ilmu Kesehatan Anak RSUP Dr. M. Djamil Padang/ Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang mengharapkan kesediaan Bapak/ Ibu untuk berkenan memberikan izin anak Bapak/ Ibu mengikuti penelitian tentang “Hubungan Polimorfisme Gen dan Kadar Angiopoeitin 2 serta Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue Pada Anak”. Sebelum Bapak/ Ibu mengizinkan anak Bapak/ Ibu untuk ikut serta dalam penelitian ini mohon membaca dengan seksama dan memahami semua informasi di bawah ini.

Infeksi virus Dengue masih merupakan masalah kesehatan utama di seluruh dunia. Dalam 50 tahun terakhir, insiden infeksi virus Dengue meningkat 30 kali lipat. Diperkirakan 50 juta orang terinfeksi setiap tahun dengan angka kematian mencapai 22.000 pertahun. Infeksi dengue disebabkan oleh virus *Dengue* yang dapat menyebabkan demam dengue (DD) atau demam berdarah dengue (DBD)/ *Dengue Shock Syndrome* (DSS). Virus ini ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*.

Patogenesis DBD belum sepenuhnya dipahami. Beberapa sitokin proinflamasi, protein angiogenesis dan reseptor solublenya diduga juga memiliki peranan dalam integritas vaskuler dan kebocoran plasma pada DBD. Salah satu protein angiogenesis yang ikut berperan dalam menjaga integritas *junctional* endotel adalah Angiopoeitin. Penelitian polimorfisme gen angiopoeitin 2 pada

DBD sampai saat ini belum pernah dilakukan, sehingga kami tertarik melakukan penelitian ini, agar mampu diaplikasikan untuk mencegah terjadinya infeksi yang berat.

Keikutsertaan anak Bapak/ Ibu pada penelitian ini sepenuhnya bersifat sukarela. Pemeriksaan darah pada penelitian ini bersifat gratis dan tidak menimbulkan efek samping pada anak. Jika bapak/ ibu memiliki pertanyaan atau merasa tidak nyaman selama penelitian ini berlangsung, bapak/ ibu dapat menghubungi dokter peneliti:

Nama : dr. Mayetti, Sp.A(K) IBCLC
Alamat : Jln Teratai No. 4 Flamboyan Padang Baru
No. HP : 0811669779



Lampiran 2

Formulir Kesiediaan Mengikuti Pemeriksaan

Saya telah membaca informasi mengenai penelitian ini. Saya mengerti tujuan dan manfaat dari penelitian ini. Saya setuju untuk dilakukan tindakan yang disebutkan sebelumnya terhadap anak saya.

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama

..... UNIVERSITAS ANDALAS

Umur

..... tahun

Alamat

:

Adalah orang tua/walidari:

Nama

.....

Umur

..... tahun

Dengan ini memberikan izin anak saya untuk mengikuti prosedur penelitian seperti yang disebut diatas. Demikianlah surat ini saya buat untuk dapat digunakan seperlunya.



Yang memberi izin

()

Lampiran 3

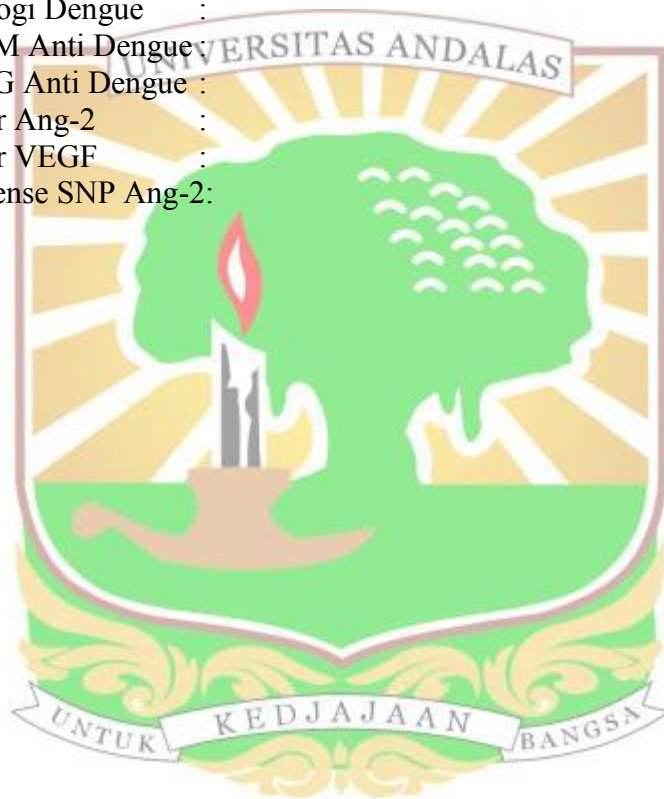
FORMULIR DATA PENELITIAN

Hubungan Polimorfisme dan Kadar Angiopoietin 2 serta Kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* dengan Tingkat Keparahan Penyakit Akibat Infeksi Virus Dengue Pada Anak

A. Data Sampel Penelitian

1. Nama :
2. No MR :
3. Jenis Kelamin :
4. Umur :
5. Suku :
6. Alamat :
7. Nama Ayah :
Umur :
Suku :
Negeri Asal :
Suku Kakek :
Suku Nenek :
8. Nama Ibu :
Umur :
Suku :
Negeri Asal :
Suku Kakek :
Suku Nenek :
9. Alamat :
Telp/HP :
10. Tanggal masuk :
11. Tanggal Pulang :
12. Kondisi Pulang : Sembuh/ Meninggal.
13. Berat badan :
14. Tinggi badan :
15. Status Gizi : Gizi Kurang/ Gizi Baik/ Overweight/ Obesitas
a. BB/U : b. TB/U : c. BB/TB :
16. Lama Demam :
17. Manifestasi Perdarahan : Spontan Uji Torniquete Positif
Jika Perdarahan Spontan :
a. Ptechie/hematom di kulit d. Perdarahan lambung
b. Epistaksis e. Perdarahan intra kranial
c. Melena
18. Tekanan Darah :
19. Nadi :
20. Hepar :
21. *Cappillary refilling Time* :
22. Perabaan Akral :

23. Hemoglobin :
24. Hematokrit :
25. Trombosit :
 - a. $< 50.000/\text{mm}^3$
 - b. $50.000-100.000/\text{mm}^3$
26. Diagnosis :
 - a. Demam Dengue
 - b. Demam Berdarah Dengue
 - c. *Dengue Shock Syndrome*
27. Komplikasi :
 - a. Tidak ada
 - b. Ensefalopati
 - c. DIC
28. Serologi Dengue :
 - a. IgM Anti Dengue
 - b. IgG Anti Dengue
29. Kadar Ang-2 :
30. Kadar VEGF :
31. Sekuense SNP Ang-2:



Lampiran 4

MASTER TABEL PENELITIAN

No	JK	Umur	BB	TB	BB/U	TB/U	BB/TB	Status Gizi
1	lk	9 th 10 bln	24	135	76.2	98.2	82.6	Kurang
2	pr	8 th 3 bl	19	126	74	98	76	Kurang
3	lk	4 th	16	101	100	99	94,1	Baik
4	pr	10 th	34	138	103	100	103	Baik
5	pr	7 th	22	120	100	99	95,6	Baik
6	pr	14 th	31	145	62	90,6	81,57	Kurang
7	lk	8 th 3 bl	30	134	115,4	103,1	103,4	Baik
8	pr	1 th 9 bl	11	78	94	93,97	105,76	Baik
9	pr	11 th 6 bl	49	141	125,64	95,9	138	Overweight
10	pr	4 th	22	98	133	96	146	Obesitas
11	lk	7 th 3 bln	17	119	70.8	96.74	77.7	Kurang
12	lk	5 th 8 bln	18	102	90	88	106	Baik
13	lk	4 th	13	98	81	95	86	Kurang
14	pr	1 th	8,7	75	91,57	101,35	88,77	Kurang
15	lk	6 th	16	114	76,2	99,1	80	Kurang
16	lk	13 th	52	158	115	101,93	108,33	Baik
17	pr	8 th 1 bl	29	130	111,5	101,1	107,4	Baik
18	pr	14 th	81	160	165	100	165	Obesitas
19	lk	4 th	17	102	106,2	102	106,2	Baik
20	pr	4 th 10 bl	16	105	88,9	98,13	94,11	Baik
21	lk	5 th 2 bl	14	99	93	90	93	Baik
22	pr	6 th	20	114	100	100	100	Baik
23	lk	4 th	15	100	93,75	98	93,7	Baik
24	pr	14 th	41	155	82	96,2	85,4	Kurang
25	pr	11 th	35	142	94,5	98,6	97,2	Baik
26	lk	11 th	34	142	94,4	99,3	97,1	Baik
27	lk	8 th	22	125	88	97,6	91,6	Baik
28	lk	9 th	25	130	89,2	97,7	92,5	Baik
29	lk	12 th	29,5	133	77,6	90,5	105,3	Baik
30	pr	9 th	24	129	82,75	96,99	90,56	Baik
31	pr	5 th	15	105	83,3	97,6	85,7	Kurang
32	lk	11 th	21	124	58,3	86,14	87,3	Kurang
33	lk	5 th	18	108	97,3	100	97,3	Baik
34	lk	11 bl	9,5	74	95	100	95	Baik
35	lk	1 th	10	79	96	103	90,9	Baik
36	pr	9 th	38	133	118.7	97.7	121	Obesitas
37	lk	13 th	50	165	108.6	105.1	106.5	Baik
38	lk	2 th	9.5	83	74.2	94	80	Kurang
39	pr	8 th	20	120	80	94.48	90.9	Baik
40	pr	5 th 7 bln	14.5	103	80.5	97	90.6	Baik
41	pr	8 th	38	128	152	100	152	Obesitas
42	pr	6 th	18	115	90	100	90	Baik
43	pr	10 bln	9.5	68	103.2	93.73	117.2	Overweight
44	lk	12 th 10 bln	40	144	90	93	111	Overweight
45	pr	4 th	10	93	66.6	93	71	Kurang

MASTER TABEL PENELITIAN

No	JK	Umur	BB	TB	BB/U	TB/U	BB/TB	Status Gizi
46	pr	5 th 8 bln	16	107	84.2	94.2	88.8	Kurang
47	pr	13 th	41	162	83.67	101.25	74	Kurang

48	pr	7 th	20	110	86,9	90,5	105	Baik
49	lk	5 th 4 bl	18	102	90	88,7	106	Baik
50	lk	8 th	19	123	73	96	79	Kurang
51	pr	9 th	26	130	92,8	97	96	Baik
52	pr	5 th	15	105	75	88,5	100	Baik
53	pr	6 th 2 bln	17	108	85	93	94	Baik
54	lk	8 th	15	116	55,6	88,6	71	Kurang
55	pr	3 th	14	96	100	102	93	Baik
56	lk	4 th	15	105	88,24	98,13	88,24	Kurang
57	pr	7 th	22	126	91,6	100	88	Kurang
58	pr	5 th 1 bl	16	109	88,8	101,4	86,48	Kurang
59	lk	10 th 3 bl	39	136	118	97,8	130	Obesitas
60	lk	2 th	14	91	109,7	106	93	Baik
61	pr	5 th 3 bl	19	113	102,7	103,67	97,44	Baik
62	pr	4 th	15	99	93	98	100	Baik
63	pr	9 th 9 bl	22	136	68,75	99,2	70,97	Kurang
64	lk	9 th 9 bl	42	139	135	100,7	131,25	Overweight
65	pr	8 th	18	127	69	99	72	Kurang
66	lk	6 th 4 bl	16	117	76	101	72	Kurang
67	pr	11 th 2 bl	22	133	59,5	91,7	75,9	Kurang
68	pr	6 th 1 bl	18	109	85,71	93,96	100	Baik
69	lk	13 th 5 bl	30	150	63,83	94,34	75	Kurang
70	pr	8 th	19	109	76	85	105	Baik
71	pr	10 th	26	132	66,7	95,6	78	Kurang
72	pr	2 th 9 bl	19	112	95	99,11	100	Baik
73	pr	3 th 6 bl	11	90	73,3	92,7	84,6	Kurang
74	lk	3 bulan	7	62	116	101	109	Baik
75	pr	8 bl	7	66	85,36	97,05	94,59	Baik
76	pr	5 th 7 bln	16	110	84,2	98,2	86,4	Kurang
77	pr	11 th 4 bln	42	148	107,7	101,4	105	Baik
78	lk	9 th 5 bl	24	126	80	92,6	96	Baik
79	pr	9 th	22	122	73	91	95	Baik
80	lk	4 th	27	109	152,9	105	144	Obesitas
81	lk	3 th	14	98	96	102	93,3	Baik
82	lk	13 th 3 bl	40	152	85,1	96,2	93,02	Baik
83	lk	4 th 6 bln	18	106	105,8	101,9	100,8	Baik
84	lk	1 th 4 bl	8	77	75	96	79,2	Kurang
85	pr	4 th 11 bl	16	112	80,89	105	87	Kurang
86	lk	2 th	13	90	92,8	97,8	100	Baik
87	lk	3 th	13	95	81	94	92,8	Baik
88	lk	5 bl	8	75	86	104	92	Baik
89	lk	7 bl	7,2	65	83,7	93,53	97	Baik
90	lk	12 th 6 bl	33	140	76,7	92	100	Baik
91	pr	10 th	20	130	57	96,4	74	Kurang
92	pr	11 th 1 bl	24	132	64	91,6	85,7	Kurang
93	pr	7 bl	8	70	89,47	102,98	80,95	Kurang

MASTER TABEL PENELITIAN

No	JK	Umur	BB	TB	BB/U	TB/U	BB/TB	Gizi
94	pr	6 th 8 bl	16	122	74,4	102,5	71,1	Kurang
95	pr	4 th 9 bl	16	102	88,8	98,2	100	Baik
96	lk	4 th 3 bl	14	100	82,4	96,2	88	Kurang
97	lk	11 th 7 bl	48	148	123	100	123	Obesitas
98	pr	10 th 10 bl	35	135	97,2	95,07	116,67	Overweight
99	pr	6 th 6 bl	20	122	90,9	102,5	86,9	Kurang

100	lk	5 th	19	112	102,7	100,9	97,4	Baik
101	pr	6 th	16	110	72,7	93,22	72,7	Kurang
102	pr	3 th 9 bl	17	107	106,25	105,9	94	Baik
103	lk	12 th 3 bl	31	145	77,5	96	86	Kurang
104	lk	7 th 8 bl	19,5	115	78	91	92	Baik
105	lk	12 th 1 bl	48	140	104,35	94,28	145,45	Obesitas
106	pr	6 th	15	113	73	99	75	Kurang
107	lk	9 th 2 bl	22	137	91,67	101,48	70,97	Kurang
108	pr	3 th 1 bl	13	92	92,8	96,8	100	Baik



MASTER TABEL PENELITIAN

No	Lama demam	Hb	Ht	Trombosit	Diagnosis	IgM	IgG	VEGF (pg/ml)	ANGPT-2 (pg/ml)
1	6	11,5	35	57,000	DD	(+)	(-)	34,337	186,498
2	4	10,5	33	33,000	DD	(+)	(-)	0,691	88,285
3	5	11,8	35	78,000	DD	(+)	(-)	45,809	1477,364
4	4	12,1	36,1	148,000	DD	(+)	(+)	18,712	409,676
5	5	12,5	38,7	95,400	DD	(+)	(-)	3,780	112,094
6	3	12,2	37	98,000	DD	(+)	(-)	48,439	121,023
7	4	13,4	40,5	174,000	DD	(+)	(+)	9,967	109,118
8	5	13,5	40	44,000	DD	(+)	(+)	16,685	138,880
9	6	14	43	27,000	DD	(+)	(+)	32,255	222,212
10	3	14,1	44,4	126,000	DD	(+)	(-)	14,961	395,412
11	6	11,3	34	72,000	DD	(+)	(-)	29,984	792,739
12	2	10,6	33	247,000	DD	(+)	(+)	51,095	399,488
13	5	11,7	36	50,000	DD	(+)	(+)	42,036	1587,392
14	5	12,1	38	95,000	DD	(+)	(-)	15,711	546,476
15	5	11,9	35	43,000	DD	(+)	(+)	14,961	743,837
16	5	12,8	38	138,000	DD	(+)	(-)	11,212	442,227
17	4	12,1	35	49,000	DD	(+)	(+)	13,461	195,730
18	5	13,9	42	60,000	DD	(+)	(+)	183,867	263,879
19	5	12	40	74,000	DD	(+)	(-)	14,211	452,465
20	4	13,2	36	87,000	DD	(+)	(+)	9,714	607,320
21	6	11,7	34	13,000	DD	(+)	(+)	10,999	100,190
22	5	11	34	60,000	DD	(+)	(-)	183,315	248,998
23	5	12,7	38,1	53,500	DD	(+)	(-)	8,934	225,189
24	5	14,8	49	92,000	DD	(+)	(-)	22,466	173,317
25	5	13,2	41,5	105,000	DD	(+)	(+)	8,934	70,428
26	5	13,4	40,4	94,900	DD	(+)	(-)	48,439	466,258
27	5	12	36	80,000	DD	(+)	(-)	47,392	64,476
28	5	12,4	40	54,400	DD	(+)	(-)	27,574	118,047
29	4	12,2	38	148,000	DD	(+)	(+)	154,991	878,317
30	4	12,5	38	86,000	DD	(+)	(+)	14,211	597,132
31	4	13,2	38	28,000	DD	(+)	(+)	144,189	965,933
32	5	12,6	37	33,000	DD	(+)	(+)	6,718	1895,066
33	5	12,1	37	79,000	DD	(+)	(-)	53,363	599,170
34	5	11,2	34	102,000	DD	(+)	(-)	31,489	588,982
35	3	13	39	24,000	DBD	(+)	(+)	14,211	454,502
36	5	16,9	49	14,000	DBD	(+)	(+)	50,010	183,522
37	2	15,6	48	133,000	DBD	(+)	(-)	5,221	888,505
38	5	13,2	40	72,000	DBD	(+)	(+)	11,212	627,696
39	7	13,1	41	16,000	DBD	(+)	(+)	114,230	582,869
40	4	12,8	39	114,000	DBD	(+)	(+)	18,712	550,268
41	5	13,3	42	101,000	DBD	(+)	(-)	32,255	394,830
42	4	15,1	45	99,000	DBD	(+)	(+)	17,720	121,023
43	5	12,4	37	48,000	DBD	(+)	(-)	11,212	1179,878
44	4	14,4	43	28,000	DBD	(+)	(-)	16,461	864,054

MASTER TABEL PENELITIAN

No	Lama demam	Hb	Ht	Trombosit	Diagnosis	IgM	IgG	VEGF (pg/ml)	ANGPT-2 (pg/ml)
45	6	9.7	29	30,000	DBD	(+)	(+)	10,463	2797,711
46	6	13.2	39	14,000	DBD	(+)	(+)	5,969	951,670
47	3	12.7	36.9	101,000	DBD	(+)	(+)	92,076	680,673
48	6	13.9	41	22,000	DBD	(+)	(+)	93,600	2659,156
49	3	13	39	24,000	DBD	(+)	(+)	23,969	1216,554
50	5	13.7	38.3	30,400	DBD	(+)	(-)	15,711	538,043
51	5	14.3	43	32,000	DBD	(+)	(+)	10,463	1075,962
52	6	10.6	32	14,000	DBD	(+)	(+)	10,463	990,384
53	8	11.9	36	27,000	DBD	(+)	(+)	86,743	1756,511
54	5	12.3	50.5	<50.000	DBD	(+)	(+)	19,463	1100,413
55	2	14	42	<50.000	DBD	(+)	(-)	15,711	209,993
56	4	15.7	48	36,000	DBD	(+)	(+)	64,196	555,542
57	3	14.2	43	36,000	DBD	(+)	(+)	66,990	599,170
58	4	14.8	44.7	44,000	DBD	(+)	(+)	13,065	153,761
59	7	14.3	42	83,000	DBD	(+)	(-)	27,727	395,412
60	7	10.2	31	16,000	DBD	(+)	(-)	290,582	295,571
61	4	13.1	39.5	97,000	DBD	(+)	(+)	9,714	513,592
62	6	9.2	28	82,000	DBD	(+)	(+)	43,730	115,071
63	7	14.7	46	40,000	DBD	(+)	(+)	161,948	784,589
64	5	13.9	40.7	69,900	DBD	(+)	(+)	43,207	388,521
65	4	13.2	41	120,000	DBD	(+)	(+)	5,840	237,093
66	5	11.9	35	86,000	DBD	(+)	(+)	11,516	210,308
67	4	17.3	53	72,000	DBD	(+)	(+)	120,643	79,357
68	5	14.6	42	20,000	DBD	(+)	(+)	39,774	536,005
69	4	14.3	44	85,000	DBD	(+)	(+)	14,211	478,953
70	5	13.1	39	13,000	DBD	(+)	(+)	92,266	558,519
71	6	13.5	41.5	61,000	DBD	(+)	(+)	45,809	1041,323
72	5	13.3	39	25,000	DBD	(+)	(+)	66,232	1165,615
73	5	13.3	41	21,000	DBD	(+)	(+)	48,829	1165,615
74	3	10.3	34	80,000	DSS	(+)	(-)	33,747	896,655
75	5	11.2	32	4,000	DSS	(+)	(+)	23,218	613,433
76	4	14	43	66,000	DSS	(+)	(+)	90,669	716,255
77	3	15.7	46	36,000	DSS	(+)	(+)	30,736	1247,118
78	4	15.7	47	26,000	DSS	(+)	(+)	32,241	1020,947
79	4	11.8	37	63,000	DSS	(+)	(+)	94,930	906,729
80	4	17	51	34,000	DSS	(+)	(-)	41,282	3845,023
81	4	15.5	48	59,000	DSS	(+)	(+)	66,990	1687,234
82	6	17.2	51.6	131,000	DSS	(+)	(+)	0,691	1561,485
83	5	13.8	42	54,000	DSS	(+)	(+)	26,224	1503,852
84	4	11	34	45,000	DSS	(+)	(+)	45,054	1300,095
85	4	14.9	44	103,000	DSS	(+)	(+)	14,211	597,132
86	5	9.1	26	10,000	DSS	(+)	(+)	46,564	6310,486
87	5	10.4	31	43,000	DSS	(+)	(+)	8,965	662,335
88	4	13	32	31,000	DSS	(+)	(-)	254,927	2848,650

MASTER TABEL PENELITIAN

No	Lama demam	Hb	Ht	Trombosit	Diagnosis	IgM	IgG	VEGF (pg/ml)	ANGPT-2 (pg/ml)
89	5	9,8	28	12,000	DSS	(+)	(+)	9,450	3010,875
90	5	13,1	39	12,000	DSS	(+)	(+)	5,969	656,222
91	4	5,6	16	56,000	DSS	(+)	(+)	145,731	1393,823
92	4	9,2	28	17,000	DSS	(+)	(+)	8,216	1359,184
93	4	10,7	33	13,000	DSS	(+)	(-)	177,253	144,832
94	4	16,2	50	32,000	DSS	(+)	(+)	57,144	1571,092
95	5	13,1	43	101,000	DSS	(+)	(+)	17,962	397,450
96	6	12,7	38	27,000	DSS	(+)	(+)	123,336	168,641
97	3	15	46	84,000	DSS	(+)	(+)	228,413	1743,031
98	5	12,6	37	43,000	DSS	(+)	(+)	126,032	58,523
99	5	16,7	53	23,000	DSS	(+)	(+)	15,711	2567,465
100	5	11,7	39	62,000	DSS	(+)	(+)	27,055	171,618
101	5	15,3	48	26,000	DSS	(+)	(+)	5,969	2371,858
102	5	16,6	50	40,000	DSS	(+)	(+)	5,840	210,308
103	6	13,5	41	39,000	DSS	(+)	(+)	5,969	2127,349
104	4	14	42	49,000	DSS	(+)	(+)	36,006	2027,508
105	5	17,1	49	55,000	DSS	(+)	(+)	154,991	1498,848
106	5	17,4	50,7	28,800	DSS	(+)	(+)	150,424	2341,239
107	6	14,5	41	8,000	DSS	(+)	(+)	107,344	2799,748
108	4	11,6	35	80,000	DSS	(+)	(+)	12,711	1937,855



**MASTER TABEL PENELITIAN
GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4**

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Intron rs7834131 (A/G)		Intron rs963495 (C/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
1	AA	wildtype	CC	Wildtype
2	AA	wildtype	CC	Wildtype
3	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
4	AA	Wildtype	CC	Wildtype
5	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
6	AA	Wildtype	CC	Wildtype
7	AA	Wildtype	CC	Wildtype
8	AA	Wildtype	CC	Wildtype
9	AA	Wildtype	CC	Wildtype
10	AA	Wildtype	CC	Wildtype
11	AA	Wildtype	CC	Wildtype
12	AA	Wildtype	CC	Wildtype
13	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
14	AA	wildtype	CC	Wildtype
15	AA	wildtype	CC	Wildtype
16	AA	wildtype	CC	Wildtype
17	AA	wildtype	CC	Wildtype
18	AA	wildtype	CC	Wildtype
19	AA	wildtype	CC	Wildtype
20	AA	wildtype	CC	Wildtype
21	AA	wildtype	CC	Wildtype
22	AA	wildtype	CC	Wildtype
23	AA	wildtype	CC	Wildtype
24	AA	wildtype	CC	Wildtype
25	AA	wildtype	CC	Wildtype
26	AA	wildtype	CC	Wildtype
27	AA	wildtype	CC	Wildtype
28	AA	wildtype	CC	Wildtype
29	AA	wildtype	CC	Wildtype
30	AA	wildtype	CC	Wildtype
31	AA	wildtype	CC	Wildtype
32	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
33	AA	wildtype	CC	Wildtype
34	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
35	AA	wildtype	CC	Wildtype
36	AA	wildtype	CC	Wildtype
37	AA	wildtype	CC	Wildtype
38	AA	Wildtype	CC	Wildtype
39	AA	wildtype	CC	Wildtype
40	AA	wildtype	CC	Wildtype
41	AA	wildtype	CC	Wildtype
42	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	Intron rs7834131 (A/G)		Intron rs963495 (C/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	43	AG	mutan heterozigot	CC
44	AA	wildtype	CC	Wildtype
45	AA	wildtype	CC	Wildtype
46	AA	wildtype	CC	Wildtype
47	AA	wildtype	CC	Wildtype
48	AA	wildtype	CC	Wildtype
49	AA	wildtype	CC	Wildtype
50	AA	wildtype	CC	Wildtype
51	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
52	AA	wildtype	CC	Wildtype
53	AA	wildtype	CC	Wildtype
54	AA	wildtype	CC	Wildtype
55	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
56	GG	mutan homozigot	CC	Wildtype
57	AA	wildtype	CC	Wildtype
58	AA	wildtype	CC	Wildtype
59	AA	wildtype	CC	Wildtype
60	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
61	AA	wildtype	CC	Wildtype
62	AA	wildtype	CC	Wildtype
63	AA	wildtype	CC	Wildtype
64	AA	wildtype	CC	Wildtype
65	AA	wildtype	CC	Wildtype
66	AA	wildtype	CC	Wildtype
67	AA	wildtype	CC	Wildtype
68	AA	wildtype	CC	Wildtype
69	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
70	AA	wildtype	CC	Wildtype
71	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
72	GG	mutan homozigot	CC	Wildtype
73	AA	wildtype	CC	Wildtype
74	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
75	AA	wildtype	CC	Wildtype
76	AA	wildtype	CC	Wildtype
77	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
78	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
79	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
80	AA	wildtype	CC	Wildtype
81	AG	mutan heterozigot	CC	Wildtype
82	AA	wildtype	CC	Wildtype
83	AA	wildtype	CC	Wildtype
84	AA	wildtype	CC	Wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN**GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4**

No	Intron rs145450899 (T/A)		Intron rs115694540 (A/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	85	AG	mutan heterozigot	CC
86	AA	wildtype	CC	wildtype
87	AA	wildtype	CC	wildtype
88	AA	wildtype	CC	wildtype
89	AA	wildtype	CC	wildtype
90	AA	wildtype	CC	wildtype
91	AA	wildtype	CC	wildtype
92	AG	mutan heterozigot	CC	wildtype
93	AA	wildtype	CC	wildtype
94	AA	wildtype	CC	wildtype
95	AA	wildtype	CC	wildtype
96	AA	wildtype	CC	wildtype
97	AA	wildtype	CC	wildtype
98	AA	wildtype	CC	wildtype
99	AG	mutan heterozigot	CC	wildtype
100	AA	wildtype	CC	wildtype
101	AA	wildtype	CC	wildtype
102	AA	wildtype	CC	wildtype
103	AA	wildtype	CC	wildtype
104	AA	wildtype	CC	wildtype
105	AG	mutan heterozigot	CC	wildtype
106	AA	wildtype	CC	wildtype
107	AA	wildtype	CC	wildtype
108	AG	mutan heterozigot	CC	wildtype



MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Intron rs145450899 (T/A)		Intron rs115694540 (A/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
1	TT	wildtype	AA	wildtype
2	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
3	TT	wildtype	AA	wildtype
4	TT	wildtype	AA	wildtype
5	TT	wildtype	AA	wildtype
6	TT	wildtype	AA	wildtype
7	TT	wildtype	AA	wildtype
8	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
9	TT	wildtype	AA	wildtype
10	TT	wildtype	AA	wildtype
11	TT	wildtype	AA	wildtype
12	TT	wildtype	AA	wildtype
13	TT	wildtype	AA	wildtype
14	TT	wildtype	AA	wildtype
15	TT	wildtype	AA	wildtype
16	TT	wildtype	AA	wildtype
17	TT	wildtype	AA	wildtype
18	TT	wildtype	AA	wildtype
19	TT	wildtype	AA	wildtype
20	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
21	TT	wildtype	AA	wildtype
22	TT	wildtype	AA	wildtype
23	TT	wildtype	AA	wildtype
24	TT	wildtype	AA	wildtype
25	TT	wildtype	AA	wildtype
26	TT	wildtype	AA	wildtype
27	TT	wildtype	AA	wildtype
28	TT	wildtype	AA	wildtype
29	TT	wildtype	AA	wildtype
30	TT	wildtype	AA	wildtype
31	TT	wildtype	AA	wildtype
32	TT	wildtype	AA	wildtype
33	TT	wildtype	AA	wildtype
34	TT	wildtype	AA	wildtype
35	TT	wildtype	AA	wildtype
36	TT	wildtype	AA	wildtype
37	TT	wildtype	AA	wildtype
38	TT	Wildtype	AA	wildtype
39	TT	wildtype	AA	wildtype
40	TT	wildtype	AA	wildtype
41	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
42	TT	wildtype	AA	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	Intron rs145450899 (T/A)		Intron rs115694540 (A/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	43	TT	wildtype	AG
44	TT	wildtype	AA	wildtype
45	TT	wildtype	AA	wildtype
46	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
47	TT	wildtype	AA	wildtype
48	TT	wildtype	AA	wildtype
49	TT	wildtype	AA	wildtype
50	TT	wildtype	AA	wildtype
51	TT	wildtype	AA	wildtype
52	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
53	TT	wildtype	AA	wildtype
54	TT	wildtype	AA	wildtype
55	TT	wildtype	AA	wildtype
56	TT	wildtype	AA	wildtype
57	TT	wildtype	AA	wildtype
58	TT	wildtype	AA	wildtype
59	TT	wildtype	AA	wildtype
60	TT	wildtype	AA	wildtype
61	TT	wildtype	AA	wildtype
62	TT	wildtype	AA	wildtype
63	TT	wildtype	AA	wildtype
64	TT	wildtype	AA	wildtype
65	TT	wildtype	AA	wildtype
66	TT	wildtype	AA	wildtype
67	TT	wildtype	AA	wildtype
68	TT	wildtype	AA	wildtype
69	TT	wildtype	AA	wildtype
70	TT	wildtype	AA	wildtype
71	TT	wildtype	AA	wildtype
72	TT	wildtype	AA	wildtype
73	TT	wildtype	AA	wildtype
74	TT	wildtype	AA	wildtype
75	TT	wildtype	AA	wildtype
76	TT	wildtype	AA	wildtype
77	TT	wildtype	AA	wildtype
78	TT	wildtype	AA	wildtype
79	TT	wildtype	AA	wildtype
80	TT	wildtype	AA	wildtype
81	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
82	TT	wildtype	AA	wildtype
83	TT	wildtype	AA	wildtype
84	TT	wildtype	AA	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Intron rs145450899 (T/A)		Intron rs115694540 (A/G)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
85	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot
86	TT	wildtype	AA	wildtype
87	TT	wildtype	AA	wildtype
88	TA	mutan heterozigot	AA	wildtype
89	TT	wildtype	AA	wildtype
90	TT	wildtype	AA	wildtype
91	TT	wildtype	AA	wildtype
92	TT	wildtype	AA	wildtype
93	TT	wildtype	AA	wildtype
94	TT	wildtype	AA	wildtype
95	TT	wildtype	AA	wildtype
96	TT	wildtype	AA	wildtype
97	TT	wildtype	AA	wildtype
98	TT	wildtype	AA	wildtype
99	TT	wildtype	AA	wildtype
100	TT	wildtype	AA	wildtype
101	TT	wildtype	AA	wildtype
102	TT	wildtype	AA	wildtype
103	TT	wildtype	AA	wildtype
104	TT	wildtype	AA	wildtype
105	TT	wildtype	AA	wildtype
106	TT	Wildtype	AA	wildtype
107	TT	wildtype	AA	wildtype
108	TT	wildtype	AG	mutan heterozigot

MASTER TABEL PENELITIAN

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Exon 4 c.46981 (A/G)		Exon rs149699486 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
1	AA	wildtype	TT	wildtype
2	GG	mutan homozigot	TT	wildtype
3	AA	wildtype	TC	mutan heterozigot
4	AA	wildtype	TT	wildtype
5	AA	wildtype	TT	wildtype
6	AA	wildtype	TT	wildtype
7	AA	wildtype	TT	wildtype
8	GG	mutan homozigot	TT	wildtype
9	AA	wildtype	TT	wildtype
10	AA	wildtype	TT	wildtype
11	AA	wildtype	TT	wildtype
12	AA	wildtype	TT	wildtype
13	AA	wildtype	TT	wildtype
14	AA	wildtype	TT	wildtype
15	AA	wildtype	TT	wildtype
16	AA	wildtype	TT	wildtype
17	AA	wildtype	TT	wildtype
18	AA	wildtype	TT	wildtype
19	AA	wildtype	TT	wildtype
20	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype
21	AA	wildtype	TT	wildtype

22	AA	wildtype	TT	wildtype
23	AA	wildtype	TT	wildtype
24	AA	wildtype	TT	wildtype
25	AA	wildtype	TT	wildtype
26	AA	wildtype	TT	wildtype
27	AA	wildtype	TT	wildtype
28	AA	wildtype	TT	wildtype
29	AA	wildtype	TT	wildtype
30	AA	wildtype	TT	wildtype
31	AA	wildtype	TT	wildtype
32	AA	wildtype	TT	wildtype
33	AA	wildtype	TT	wildtype
34	AA	wildtype	TT	wildtype
35	AA	wildtype	TT	wildtype
36	AA	wildtype	TT	wildtype
37	AA	wildtype	TT	wildtype
38	AA	Wildtype	TT	wildtype
39	AA	wildtype	TT	wildtype
40	AA	wildtype	TT	wildtype
41	GG	mutan homozigot	TT	wildtype
42	AA	wildtype	TC	mutan heterozigot

**MASTER TABEL PENELITIAN
GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4**

No	Exon 4 c.46981 (A/G)		Exon rs149699486 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
43	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype
44	AA	wildtype	TT	wildtype
45	AA	wildtype	TT	wildtype
46	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype
47	AA	wildtype	TT	wildtype
48	AA	wildtype	TT	wildtype
49	AA	wildtype	TT	wildtype
50	AA	wildtype	TT	wildtype
51	AA	wildtype	TT	wildtype
52	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype
53	AA	wildtype	TT	wildtype
54	AA	wildtype	TT	wildtype
55	AA	wildtype	TT	wildtype
56	AA	wildtype	TT	wildtype
57	AA	wildtype	TT	wildtype
58	AA	wildtype	TT	wildtype
59	AA	wildtype	TT	wildtype
60	AA	wildtype	TT	wildtype
61	AA	wildtype	TT	wildtype
62	AA	wildtype	TT	wildtype
63	AA	wildtype	TT	wildtype
64	AA	wildtype	TT	wildtype
65	AA	wildtype	TT	wildtype
66	AA	wildtype	TT	wildtype
67	AA	wildtype	TT	wildtype

68	AA	wildtype	TT	wildtype
69	AA	wildtype	TT	wildtype
70	AA	wildtype	TT	wildtype
71	AA	wildtype	TT	wildtype
72	AA	wildtype	TT	wildtype
73	AA	wildtype	TT	wildtype
74	AA	wildtype	TT	wildtype
75	AA	wildtype	TT	wildtype
76	AA	wildtype	TT	wildtype
77	AA	wildtype	TC	mutan heterozigot
78	AA	wildtype	TT	wildtype
79	AA	wildtype	TT	wildtype
80	AA	wildtype	TT	wildtype
81	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype
82	AA	wildtype	TT	wildtype
83	AA	wildtype	TT	wildtype
84	AA	wildtype	TT	wildtype

**MASTER TABEL PENELITIAN
GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4**

No	Exon 4 c.46981 (A/G)		Exon rs149699486 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	85	AG	mutan heterozigot	TT
86	AA	wildtype	TT	wildtype
87	AA	wildtype	TT	wildtype
88	AA	wildtype	TT	wildtype
89	AA	wildtype	TT	wildtype
90	AA	wildtype	TT	wildtype
91	AA	wildtype	TT	wildtype
92	AA	wildtype	TT	wildtype
93	AA	wildtype	TT	wildtype
94	AA	wildtype	TT	wildtype
95	AA	wildtype	TT	wildtype
96	AA	wildtype	TT	wildtype
97	AA	wildtype	TT	wildtype
98	AA	wildtype	TT	wildtype
99	AA	wildtype	TT	wildtype
100	AA	wildtype	TT	wildtype
101	AA	wildtype	TT	wildtype
102	AA	wildtype	TT	wildtype
103	AA	wildtype	TT	wildtype
104	AA	wildtype	TT	wildtype
105	AA	wildtype	TT	wildtype
106	AA	wildtype	TT	wildtype
107	AA	wildtype	TT	wildtype
108	AG	mutan heterozigot	TT	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Exon rs55633437 (G/T)		Exon rs3020221 (G/A)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
1	GG	wildtype	GG	wildtype
2	GG	wildtype	GG	wildtype
3	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
4	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
5	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
6	GG	wildtype	GG	wildtype
7	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
8	GG	wildtype	GG	wildtype
9	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
10	GG	wildtype	GG	wildtype
11	GG	wildtype	GG	wildtype
12	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
13	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
14	GG	wildtype	GG	wildtype
15	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
16	GG	wildtype	AA	mutan homozigot
17	GG	wildtype	GG	wildtype
18	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
19	GG	wildtype	GG	wildtype
20	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
21	GG	wildtype	GG	wildtype
22	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
23	GG	wildtype	GG	wildtype
24	GG	wildtype	GG	wildtype
25	GG	wildtype	GG	wildtype
26	GG	wildtype	GG	wildtype
27	GG	wildtype	GG	wildtype
28	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
29	GT	mutan heterozigot	GA	mutan heterozigot
30	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
31	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
32	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
33	GG	wildtype	GG	wildtype
34	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
35	GG	wildtype	GG	wildtype
36	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
37	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
38	GG	wildtype	GG	wildtype
39	GG	wildtype	GG	wildtype
40	GG	wildtype	GG	wildtype
41	GG	wildtype	GG	wildtype
42	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Exon rs55633437 (G/T)		Exon rs3020221 (G/A)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
43	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
44	GG	wildtype	GG	wildtype
45	GG	wildtype	GG	wildtype
46	GG	wildtype	GG	wildtype
47	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
48	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
49	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
50	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
51	GG	wildtype	AA	mutan homozigot
52	GG	wildtype	GG	wildtype
53	GG	wildtype	GG	wildtype
54	GG	wildtype	GG	wildtype
55	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
56	GG	wildtype	AA	mutan homozigot
57	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
58	GG	wildtype	GG	wildtype
59	GG	wildtype	GG	wildtype
60	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
61	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
62	GG	wildtype	GG	wildtype
63	GG	wildtype	GG	wildtype
64	GG	wildtype	GG	wildtype
65	GG	wildtype	GG	wildtype
66	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
67	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
68	GG	wildtype	GG	wildtype
69	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
70	GG	wildtype	GG	wildtype
71	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
72	GG	wildtype	AA	mutan homozigot
73	GG	wildtype	GG	wildtype
74	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
75	GG	wildtype	GG	wildtype
76	GG	wildtype	GG	wildtype
77	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
78	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
79	GG	wildtype	AA	mutan homozigot
80	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
81	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
82	GG	wildtype	GG	wildtype
83	GG	wildtype	GG	wildtype
84	GG	wildtype	GG	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	Exon rs55633437 (G/T)		Exon rs3020221 (G/A)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	85	GG	wildtype	AA
86	GG	wildtype	GG	wildtype
87	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
88	GT	mutan heterozigot	GG	wildtype
89	GG	wildtype	GG	wildtype
90	GG	wildtype	GG	wildtype
91	GG	wildtype	GG	wildtype
92	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
93	GG	wildtype	GG	wildtype
94	GG	wildtype	GG	wildtype
95	GG	wildtype	GG	wildtype
96	GG	wildtype	GG	wildtype
97	GG	wildtype	GG	wildtype
98	GG	wildtype	GG	wildtype
99	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
100	GG	wildtype	GG	wildtype
101	GG	wildtype	GG	wildtype
102	GT	mutan heterozigot	GA	mutan heterozigot
103	GG	wildtype	GG	Wildtype
104	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
105	GG	wildtype	GA	mutan heterozigot
106	GG	wildtype	GG	wildtype
107	GG	wildtype	GG	wildtype
108	GG	wildtype	AA	mutan homozigot



MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Exon rs374966371 (A/T)		Intron rs963496 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
1	AA	wildtype	TT	wildtype
2	AA	wildtype	TT	wildtype
3	AA	wildtype	TT	wildtype
4	AA	wildtype	TT	wildtype
5	AA	wildtype	TT	wildtype
6	AA	wildtype	TT	wildtype
7	AA	wildtype	TT	wildtype
8	AA	wildtype	TT	wildtype
9	AA	wildtype	TT	wildtype
10	AA	wildtype	TT	wildtype
11	AA	wildtype	TT	wildtype
12	AA	wildtype	TT	wildtype
13	AA	wildtype	TT	wildtype
14	AA	wildtype	TT	wildtype
15	AA	wildtype	TT	wildtype
16	AA	wildtype	TT	wildtype
17	AA	wildtype	TT	wildtype
18	AA	wildtype	TT	wildtype
19	AA	wildtype	TT	wildtype
20	AA	wildtype	TT	wildtype
21	AA	wildtype	TT	wildtype
22	AA	wildtype	TT	wildtype
23	AA	wildtype	TT	wildtype
24	AA	wildtype	TT	wildtype
25	AA	wildtype	TT	wildtype
26	AA	wildtype	TT	wildtype
27	AA	wildtype	TT	wildtype
28	AA	wildtype	TT	wildtype
29	AA	wildtype	TT	wildtype
30	AA	wildtype	TT	wildtype
31	AA	wildtype	TT	wildtype
32	AA	wildtype	TT	wildtype
33	AA	wildtype	TT	wildtype
34	AA	wildtype	TT	wildtype
35	AA	wildtype	TT	wildtype
36	AA	wildtype	TT	wildtype
37	AA	wildtype	TT	wildtype
38	AA	wildtype	TT	wildtype
39	AA	wildtype	TT	wildtype
40	AA	wildtype	TT	wildtype
41	AA	wildtype	TT	wildtype
42	AA	wildtype	TT	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4			
	Exon rs374966371 (A/T)		Intron rs963496 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
43	AA	wildtype	TT	wildtype
44	AA	wildtype	TT	wildtype
45	AA	wildtype	TT	wildtype
46	AA	wildtype	TT	wildtype
47	AA	wildtype	TT	wildtype
48	AA	wildtype	TT	wildtype
49	AA	wildtype	TT	wildtype
50	AA	wildtype	TT	wildtype
51	AA	wildtype	TT	wildtype
52	AA	wildtype	TT	wildtype
53	AA	wildtype	TT	wildtype
54	AA	wildtype	TT	wildtype
55	AA	wildtype	TT	wildtype
56	AA	wildtype	TT	wildtype
57	AA	wildtype	TT	wildtype
58	AA	wildtype	TT	wildtype
59	AA	wildtype	TT	wildtype
60	AA	wildtype	TT	wildtype
61	AA	wildtype	TT	wildtype
62	AA	wildtype	TT	wildtype
63	AA	wildtype	TT	wildtype
64	AA	wildtype	TT	wildtype
65	AA	wildtype	TT	wildtype
66	AA	wildtype	TT	wildtype
67	AA	wildtype	TT	wildtype
68	AA	wildtype	TT	wildtype
69	AA	wildtype	TT	wildtype
70	AA	wildtype	TT	wildtype
71	AA	wildtype	TT	wildtype
72	AA	wildtype	TT	wildtype
73	AA	wildtype	TT	wildtype
74	AA	wildtype	TT	wildtype
75	AT	mutan heterozigot	TT	wildtype
76	AA	wildtype	TT	wildtype
77	AA	wildtype	TT	wildtype
78	AA	wildtype	TT	wildtype
79	AA	wildtype	TT	wildtype
80	AA	wildtype	TT	wildtype
81	AA	wildtype	TT	wildtype
82	AA	wildtype	TT	wildtype
83	AA	wildtype	TT	wildtype
84	AA	wildtype	TT	wildtype

MASTER TABEL PENELITIAN

GENOTYPING GEN ANGPT2 EXON 4

No	Exon rs374966371 (A/T)		Intron rs963496 (T/C)	
	Sekuensing	Ket	Sekuensing	Ket
	85	AA	wildtype	TT
86	AA	wildtype	TT	wildtype
87	AA	wildtype	TT	wildtype
88	AA	wildtype	TT	wildtype
89	AA	wildtype	TT	wildtype
90	AA	wildtype	TT	wildtype
91	AA	wildtype	TT	wildtype
92	AA	wildtype	TT	wildtype
93	AA	wildtype	TT	wildtype
94	AA	wildtype	TT	wildtype
95	AA	wildtype	TT	wildtype
96	AA	wildtype	TT	wildtype
97	AA	wildtype	TT	wildtype
98	AA	wildtype	TT	wildtype
99	AA	wildtype	TT	wildtype
100	AA	wildtype	TT	wildtype
101	AA	wildtype	TT	wildtype
102	AA	wildtype	TT	wildtype
103	AA	wildtype	TT	wildtype
104	AA	wildtype	TT	wildtype
105	AA	wildtype	TT	wildtype
106	AA	wildtype	TT	Wildtype
107	AA	wildtype	TT	wildtype
108	AA	wildtype	TT	wildtype

