

LAPORAN PRAKTIKUM BIOINFORMATIKA: GENE ONTOLOGY (OG) DAN KEGG PATHWAY TERHADAP CONTOH KASUS PENYAKIT DENGUE

Dibuat oleh: Bimo Hadi Permana (NPM. 2306157103) Kelas C Bioinformatika

Dengue adalah penyakit infeksi virus Flaviviridae yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Aedes aegypti* atau *Aedes albopictus*. Penyakit ini disebabkan oleh salah satu dari empat serotipe virus dengue (DENV-1 hingga DENV-4) yang menginfeksi awal makrofag dan sel dendritik setelah itu membajak sel inang untuk menghasilkan virus lain. Klasifikasi klinis dengue telah mengalami perubahan seiring waktu. Menurut pedoman WHO tahun 1997, dengue diklasifikasikan menjadi tiga kategori: Dengue Fever (DF), Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), dan Dengue Shock Syndrome (DSS). DF adalah bentuk klasik dengan gejala demam dan nyeri, sedangkan DHF ditandai oleh demam, trombositopenia, manifestasi perdarahan, dan kebocoran plasma yang dapat menyebabkan akumulasi cairan di rongga tubuh. DSS merupakan bentuk paling parah dengan gejala syok akibat kebocoran plasma yang signifikan. ND dapat merujuk pada Non Dengue atau tidak terjangkau penyakit dengue sebagai pembanding. Penting untuk memahami klasifikasi ini untuk memastikan diagnosis yang tepat dan penanganan yang efektif terhadap pasien dengue (Nascimento dkk., 2009: 1).

Tujuan praktikum, yaitu mengetahui hasil analisis (koleksi, komparasi dan mengerti data) dasar bioinformatika untuk kasus pasien kontrol (ND) dan penderita (DF dan DHF) penyakit dengue dalam tingkat ekspresi gen, serta pembuatan visualisasi dan interpretasi data hasil pengumpulan dataset untuk solusi vaksin dengan tools GEO, GEO2R, g:Profiler dan KEGG .

1. Pencarian dan Pengunduhan Data Ekspresi Gen Publik

Bahan dari praktikum bioinformatika, yaitu query dataset GSE18090 Homo sapiens dengan menggunakan platform GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array, yaitu mikroarray dengan complete coverage genom manusia U133 dengan 6.500 gen hasil analisis, dengan lebih 47.000 transkrip seluruh oligonukleotida pendek (probe), dibuat oleh Affymetrix dengan tipe teknologi in situ oligonukleotida. Cara kerja hibridisasi antara cDNA target dari sampel biologis dengan probe yang telah ditanamkan pada permukaan chip. Setiap probe set dirancang secara spesifik untuk mengukur ekspresi satu transkrip unik, memungkinkan deteksi yang sensitif dan spesifik dari ekspresi gen dalam berbagai kondisi biologis, termasuk penyakit seperti infeksi virus dengue. Dibuat dari library files (CDF/CLF/PGF) dan anotasi sekuens probe lalu disimpan dalam repositori data GEO NCBI, dan platform GPL570 dapat dianalisis dengan R (bioconductor) atau GEO2R (GEO NCBI, 2003).

Penelitian berdasarkan publikasi Nascimento dkk. (2009), di negara Brazil. Untuk pembagian menjadi 3 kelompok masing-masing 1981 gen, yaitu DF, DHF dan ND. Jumlah dari pasien DHF 10 orang dan DF 8 orang serta ND 8 orang. Untuk kategori pasien, yaitu DF+DHF dengan jumlah 18 orang serta kategori kontrol (negatif), yaitu ND dengan jumlah 8 orang, karenanya total sampel keseluruhan adalah 26 sampel. Dengan beberapa catatan pada pasien DHF tidak adanya tanda vaskulopati (haruslah ada) dan gejala penyakit sewaktu sampel digunakan pada karakterisasi fungsi genomik. Dikumpulkan pada waktu 5 hari penyakit dan tidak adanya gejala flu selama 2-3 hari setelah penerimaan. Pasien DF, DHF dan ND disamakan untuk variabel kontrol, yaitu umur, gender, sejarah infeksi dengue dan gejala hari penyakit.

2. Identifikasi Gen yang Terekspresikan Diferensial (DEGs)

Apply adjustment to the P-values. [More...](#)
☒ Benjamini & Hochberg (False discovery rate)
☐ Benjamini & Yekutieli
☐ Bonferroni
☐ Holm

Apply log transformation to the data. [More...](#)
☒ Auto-detected
☐ Yes
☐ No

Apply limma precision weights (vooma). [More...](#)
☒ Yes
☐ No

Force normalization. [More...](#)
☐ Yes
☒ No

Category of Platform annotation to display on results.
☒ Submitter supplied
☐ NCBI generated

Plot displays. [More...](#)
Significance level cut-off (enter number between 0 and 1)

Log 2 fold change threshold

Volcano and Mean-difference plot contrasts (select up to 5)
1 selected (clear)
☒ Control vs Penderita

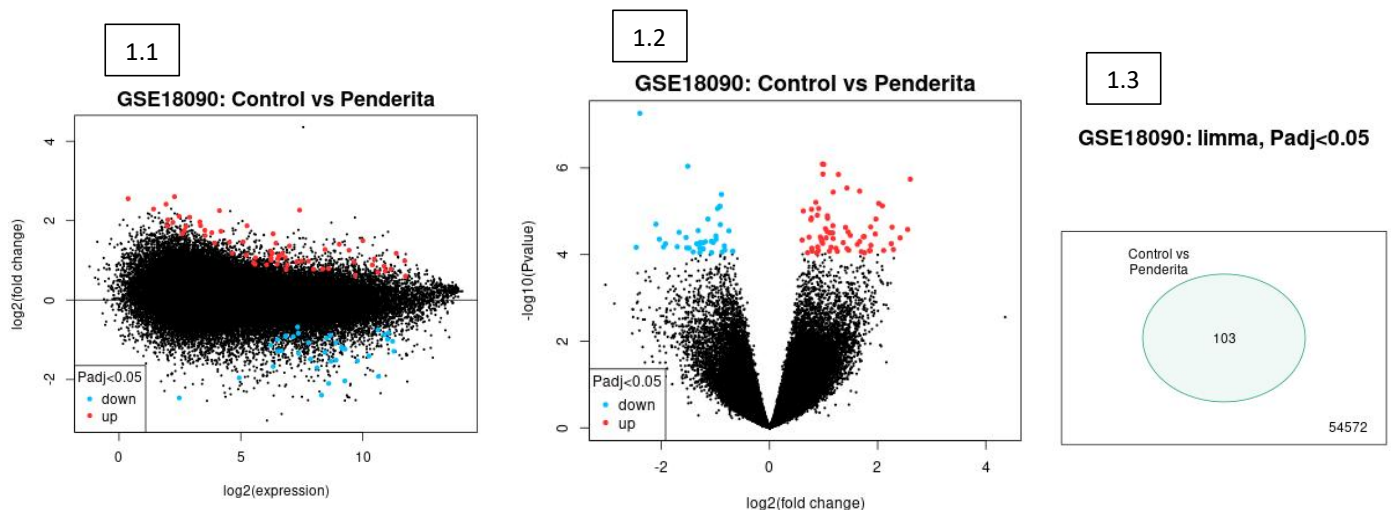
Gambar 1. Parameter untuk GEO2R pada filter kontrol (ND) dan perlakuan (DF+DHF)

Berdasarkan Gambar 1, digunakan beberapa parameter, seperti p-values Benjamin dan Hochberg dalam penentuan nilai penemuan salah dan termasuk ke default (direkomendasikan sistem) karena menghasilkan keseimbangan baik antara gen signifikan secara statistika dan limitasi terhadap positif palsu. Log transformasi digunakan untuk menghindari outlier dan data lebih representatif serta biasa digunakan untuk limma. Presisi limma (vooma) adalah fungsi estimati hubungan rata-rata dan variansi dan digunakan untuk komputasi pada bobot tingkat observasional. Data yang digunakan untuk praktikum ini adalah 26 sampel sehingga tidak memenuhi syarat normalitas ($n > 30$) sehingga tidak dipilih (tidak direkomendasikan). Lalu digunakan stok submitter agar berasal dari anotasi asal dan tidak menggunakan tools NCBI karena menggunakan up-to-date anotasi dan membuat hasil berbeda dengan seharusnya. Signifikansi 0,05 sebagai signifikansi ideal statistik dan log2FC 0 sebagai threshold up-down regulated gene (NCBI, 2024: 1).

Group	Accession	Title	Source name	Gender	Age	Days of symptoms	Igm	Igg	Pcr/virus isolation
Penderita	GSM452235	DF Patient 1	PBMCs from DF patient	female	30	3	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452236	DF Patient 2	PBMCs from DF patient	female	40	4	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452237	DF Patient 3	PBMCs from DF patient	male	45	6	Pos	Pos	Pos
Penderita	GSM452238	DF Patient 4	PBMCs from DF patient	male	53	4	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452239	DF Patient 5	PBMCs from DF patient	female	29	5	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452240	DF Patient 6	PBMCs from DF patient	male	27	1	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452241	DF Patient 7	PBMCs from DF patient	male	44	5	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452242	DF Patient 8	PBMCs from DF patient	female	23	7	Pos	Neg	Pos
Penderita	GSM452243	DHF Patient 1	PBMCs from DHF patient	male	41	3	Neg	Pos	Pos
Penderita	GSM452244	DHF Patient 2	PBMCs from DHF patient	female	41	8	Pos	Neg	Pos
Penderita	GSM452245	DHF Patient 3	PBMCs from DHF patient	female	84	8	Pos	Pos	Pos
Penderita	GSM452246	DHF Patient 4	PBMCs from DHF patient	female	26	7	Pos	Neg	Pos
Penderita	GSM452247	DHF Patient 5	PBMCs from DHF patient	male	19	7	Pos	Neg	Pos
Penderita	GSM452248	DHF Patient 6	PBMCs from DHF patient	female	22	4	Neg	Neg	Pos
Penderita	GSM452249	DHF Patient 7	PBMCs from DHF patient	male	36	8	Pos	Pos	Pos
Penderita	GSM452250	DHF Patient 8	PBMCs from DHF patient	female	35	5	Pos	Pos	Pos
Penderita	GSM452251	DHF Patient 9	PBMCs from DHF patient	female	21	7	Pos	Neg	Pos
Penderita	GSM452252	DHF Patient 10	PBMCs from DHF patient	female	21	5	Pos	Neg	Pos
Control	GSM452253	ND Patient 1	PBMCs from ND patient	male	41	4	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452254	ND Patient 2	PBMCs from ND patient	male	25	8	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452255	ND Patient 3	PBMCs from ND patient	male	47	4	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452256	ND Patient 4	PBMCs from ND patient	male	54	4	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452257	ND Patient 5	PBMCs from ND patient	female	23	6	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452258	ND Patient 6	PBMCs from ND patient	female	19	6	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452259	ND Patient 7	PBMCs from ND patient	female	30	2	Neg	Neg	Neg
Control	GSM452260	ND Patient 8	PBMCs from ND patient	female	64	4	Neg	Neg	Neg

Gambar 2. Hasil pengelompokkan kontrol dan perlakuan dan indikator hari gejala, igm, igg dan isolasi virus penyakit dengue

Berdasarkan Gambar 2, terdapat hasil yang cukup menarik sebagai perbandingan karena dapat diketahui bahwa pada pasien kontrol (negatif/ND) memiliki hasil igG, igM dan isolasi PCR virus negatif. Lalu untuk pasien (penderita) DF memiliki kecenderungan hasil positif igG (7 dari 8 data) dan negatif igM (6 dari 8 data). Setelah itu, untuk pasien (penderita) DHF memiliki kecenderungan hasil positif igM (8 dari 10 data) dan belum diketahui hasil pasti untuk igG, namun condong hasil negatif (6 dari 10 data). Maka apabila yang diperujikan adalah komparasi kontrol dan pasien dapat dengan mudah diketahui sangkut paut dari ekspresi gen igG dan igM yaitu imunoglobulin (antibodi) yang diproduksi tubuh sebagai gen yang jadi fokus utama.



Keterangan gambar: 3.1. Diagram Mean Average (MA) plot; 3.2. Diagram volcano plot; 3.3. Diagram venn jumlah gen signifikan (di dalam lingkaran) dan gen tidak signifikan (di luar lingkaran)

Gambar 3. Hasil GEO2R terhadap perbandingan pasien kontrol (ND) dan perlakuan (DF+DHF) penyakit dengue
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Pembahasan hasil Gambar 3, untuk bagian Gambar 3.1 dan Gambar 3.2 untuk perbedaan ekspresi gen-gen (DEGs) memiliki kesamaan untuk log2FC (Fold Change) (sumbu-Y 3.1 dan sumbu-X 3.2) titik berwarna merah adalah untuk gen up-regulated dengan indikator melebihi threshold 0 dan $P_{adj} < 0,05$. Gambar 3.1 memiliki log2 (sumbu-X) sebagai jarak ekspresi gen dan Gambar 3.2 memiliki $-\log_{10}$ untuk memperhitungkan p-value. Lalu Gambar 3.3 menyimpulkan bahwa terdapat 103 gen yang berperan dalam perbandingan pasien kontrol dan penderita serta 54572 gen yang tidak berperan signifikan dalam perbandingan pasien kontrol dan penderita.

Preparasi untuk analisis Gene Ontology (GO), didapatkan hasil dari penggunaan Ms. Excel sebagai alat bantu untuk men-sorting, didapatkan hasil termasuk yang paling tinggi (2,603) dan paling rendah (-2,465) pada daftar logFc dan dicari top 100 (total keseluruhan 250), diharapkan hasil tersebut sesuai dengan gen yang menjadi penyebab dengue. Bahan-bahan top 100 dari gen down-regulated dan up-regulated digunakan karena angka yang menampilkan pada gen yang berperan aktif terhadap penyakit dengue, yaitu 103 gen. Secara statistika, tidak diambil terlalu banyak (jumlah gen > 100) karena akan menciptakan information overload dan

banyak data yang tidak perlu masuk ke dalam programming komputer. Lalu diambil tidak terlalu sedikit agar data representatif dan mendapatkan pool gene yang sesuai.

Data yang diperlukan harus dalam bentuk kode simbol bukan dalam bentuk format ENSG, apabila data dalam format ENSG tidak akan dapat diproses pada langkah selanjutnya dan harus dikonversi dengan BioMart Ensembl. Data gen yang diperlukan dalam bentuk data vertikal tanpa ada titik dan garis karena pada analisis Gene Ontology (GO) akan sulit diidentifikasi tool-nya.

❖ Perbandingan Hasil:

Terdapat 103 gen yang diekspresikan dapat menjadi indikator dengue (penderita) atau non-dengue (kontrol). Terdapat peran imunoglobulin (antibodi) pada sistem imunitas penyakit dengue sehingga diekspresikan.

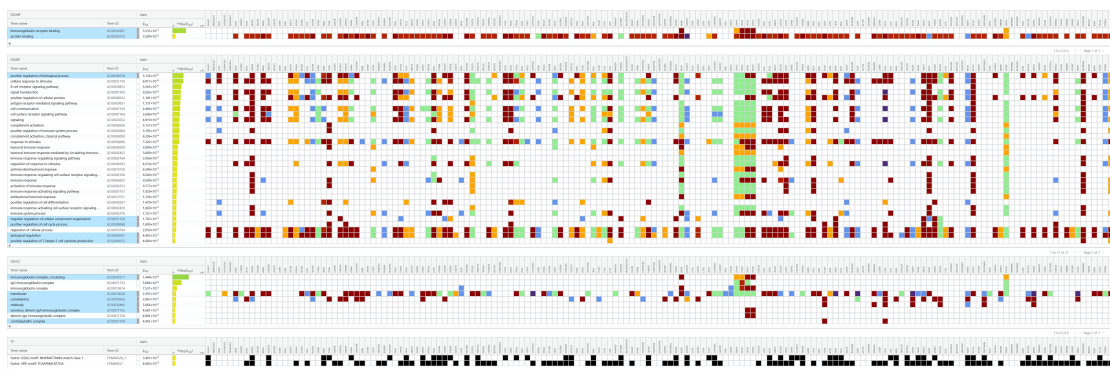
3. Analisis Gene Ontology (GO)

GO menggunakan hasil preparasi sebelumnya berupa simbol gen yang berasal dari up-regulated digabung dengan down-regulated masing-masing top100 masuk ke dalam situs g:Profiler (atau DAVID) antarmuka lebih sederhana. Setelah itu dimasukkan gen yang ingin dianalisis.



Gambar 4. Hasil overview untuk GO g:GOST pada g:Profiler untuk gen-gen yang telah terekspresikan sebelumnya yang sudah dianalisis

Hasil GO:gGOST terdapat peran dari gen yang GO:MF (immunoglobulin receptor binding), GO:BP (aktivasi respon imun) dan GO:CC (immunoglobulin complex, circulating dan endoplasmic reticulum) yang memiliki query Padj lebih rendah dibandingkan dengan yang lain (warna hijau tua). Semua nama struktur tersebut berekspresi aktif dalam menangani masalah virus dengue.



Gambar 5. Hasil detail dari query gen GSE18090 untuk analisis GO

initial alias	converted alias	name	description	namespace
GO:0034987	ENSG00000000938	FGR	FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3697]	GO
GO:0034987	ENSG00000117322	CR2	complement C3d receptor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2336]	GO
GO:0034987	ENSG00000132465	JCHAIN	joining chain of multimeric IgA and IgM [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5713]	GO
GO:0034987	ENSG00000166527	CLEC4D	C-type lectin domain family 4 member D [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14554]	GO
GO:0034987	ENSG00000182511	FES	FES proto-oncogene, tyrosine kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3657]	GO

Gambar 6. GO:GG imunoglobulin reseptor binding

initial alias	converted alias	name	description	namespace
GO:0002253	ENSG00000000003	TSPAN6	tetraspanin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11858]	GO
GO:0002253	ENSG00000000938	FGR	FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3697]	GO
GO:0002253	ENSG00000000971	CFH	complement factor H [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4883]	GO
GO:0002253	ENSG00000004139	SARM1	sterile alpha and TIR motif containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17074]	GO
GO:0002253	ENSG00000004468	CD38	CD38 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1667]	GO

GO:0002253	ENSG00000068079	IFI35	interferon induced protein 35 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5399]	GO
------------	-----------------	-------	--	----

Gambar 7. GO:BP Respon imun

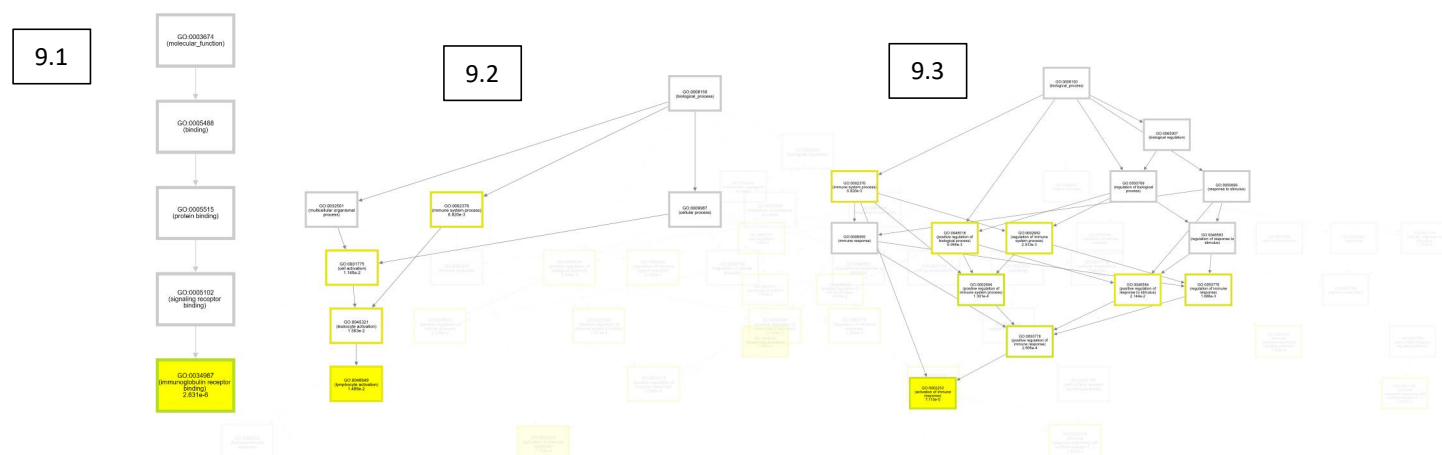
initial alias	converted alias	name	description	namespace
GO:0042571	ENSG00000132465	JCHAIN	joining chain of multimeric IgA and IgM [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5713]	GO
GO:0042571	ENSG00000162896	PIGR	polymeric immunoglobulin receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8968]	GO
GO:0042571	ENSG00000188211	NCR3LG1	natural killer cell cytotoxicity receptor 3 ligand 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:42400]	GO
GO:0042571	ENSG00000211890	IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:...	GO
GO:0042571	ENSG00000211891	IGHE	immunoglobulin heavy constant epsilon [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5522]	GO

Gambar 8. GO:CC Imunoglobulin complex

Untuk pemilihan gen oleh sistem seperti pada Gambar 6, termasuk pada serangkaian sistem imun, seperti pada GO:BP yang terdiri dari antibodi IgA dan IgM memiliki hubungan yang erat dengan sel darah putih karena keduanya diproduksi oleh sel B, yaitu jenis limfosit yang merupakan bagian dari sistem imun adaptif. Ketika tubuh mengalami infeksi, termasuk oleh virus seperti dengue, sel B akan teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang kemudian menghasilkan antibodi. IgM merupakan antibodi pertama yang muncul dalam fase akut infeksi, sedangkan IgA banyak ditemukan pada permukaan mukosa dan berperan penting dalam pertahanan lokal. Kedua jenis antibodi ini tidak hanya menunjukkan keberadaan infeksi, tetapi juga berinteraksi aktif dengan sel darah putih lainnya. Misalnya, IgM dan IgA dapat membentuk kompleks imun yang dikenali oleh makrofag dan neutrofil untuk fagositosis, atau merangsang sel natural killer (NK) melalui mekanisme sitotoksitas yang bergantung pada antibodi (ADCC). Selain itu, IgM juga sangat efisien dalam mengaktifkan sistem komplemen, yang merekrut lebih banyak leukosit ke lokasi infeksi (lanjutan KEGG untuk lebih jelasnya). Oleh karena itu, keberadaan dan peningkatan kadar IgA dan IgM dalam darah dapat menjadi indikator bahwa sistem imun, khususnya sel darah putih, sedang aktif merespons patogen (Janeway dkk., 2012: 3).

Interferon (Gambar 6 dan Gambar 7) adalah kelompok protein sitokin yang disekresikan oleh sel tubuh sebagai respons awal terhadap infeksi virus, termasuk virus dengue. Interferon berfungsi untuk menghambat replikasi virus, meningkatkan presentasi antigen, serta mengaktifkan sel-sel imun seperti natural killer (NK) dan makrofag. Terdapat beberapa jenis interferon, di antaranya interferon tipe I (seperti IFN- α dan IFN- β) yang diproduksi oleh sebagian besar sel tubuh dan berperan penting dalam respons antivirus awal, serta interferon tipe II (IFN- γ) yang diproduksi oleh sel NK dan limfosit T untuk mengaktivasi makrofag dan memperkuat imunitas adaptif. Dalam konteks infeksi dengue, interferon memiliki peran protektif pada fase awal dengan menghambat replikasi virus. Namun, virus dengue telah mengembangkan mekanisme untuk menghindari respons ini, salah satunya dengan menekan jalur pensinyalan JAK-STAT melalui protein NS5 virus. Studi transkriptomik menunjukkan bahwa ekspresi gen interferon-stimulated genes (ISGs) berbeda antara pasien dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) (penderita), dan non-dengue (ND) (kontrol), yang mencerminkan kompleksitas interaksi antara virus dan

sistem imun. Pada kasus infeksi berat, disregulasi produksi interferon dapat berkontribusi pada terjadinya peradangan sistemik dan kerusakan vaskular. Oleh karena itu, interferon merupakan komponen kunci dalam memahami patogenesis dan respons imun terhadap infeksi dengue (Green dkk., 2014: 1148).



Keterangan gambar: 9.1. imunoglobulin reseptor binding; 9.2. Aktivasi limfosit; 9.3. Aktivasi respon imun

Gambar 9. Hasil GO:MF dan GO:BP dari g:Profiler fitur g:GOST untuk konteks GO

Adanya aktivasi sel B dan sel T sebagai aktivitas sel limfosit oleh respon adaptif imun tubuh. Pada Gambar 9.1, diketahui adanya fungsi molekuler sehingga imunoglobulin reseptor binding dibuat dan memicu respons imunitas. Adanya virus memicu antigen dan berikatan dengan sel B (limfosit naive) dan memicu aktivasi sel B. Setelah itu terbentuknya limfoblas, dan membuat sel B memori dan sel B lainnya. Sel B lain tersebut menjadi sel plasma yang dihasilkan banyak antibodi. Pertama kali respons imun membuat sel limfosit setelah itu sel B dan antibodi dihasilkan sel B (sel plasma) (Hubbard & Binder, 2016: 320).

Dari hasil analisis Gene Ontology (GO) yang saya lakukan, terlihat bahwa sebagian besar istilah dalam kategori Biological Process (BP) yang signifikan mengarah pada aktivasi sistem kekebalan tubuh. Sejumlah gen yang mengalami peningkatan ekspresi (upregulated) berasosiasi dengan proses seperti “respon terhadap interferon-alpha”, “jalur sinyal interferon tipe I”, serta “respons imun bawaan”. Hal ini menunjukkan bahwa infeksi dengue memicu respons imun bawaan secara aktif, yang merupakan langkah awal tubuh dalam menghadapi infeksi virus. Interferon tipe I diketahui memainkan peran penting dalam menghambat replikasi virus serta mengaktifkan sel-sel efektor seperti natural killer (NK) cells dan makrofag. Selain itu, saya juga mengidentifikasi istilah-istilah seperti “respons imun adaptif”, “aktivasi sel B”, dan “jalur pensinyalan yang dimediasi reseptor antigen”, yang mengindikasikan bahwa sistem kekebalan adaptif ikut berperan. Ini kemungkinan besar terjadi karena waktu pengambilan sampel berada pada tahap infeksi yang lebih lanjut, ketika tubuh mulai membentuk antibodi melalui aktivasi sel B dan sel T.

Di sisi lain, sejumlah gen yang mengalami penurunan ekspresi (downregulated) berkaitan dengan proses seperti “proses metabolik seluler” dan “homeostasis sel”. Penurunan ini dapat diinterpretasikan sebagai upaya sel untuk mengalihkan energi dan sumber daya dari fungsi fisiologis normal menuju mekanisme pertahanan tubuh menghadapi infeksi. Secara keseluruhan, pola ini mencerminkan ciri khas respons tubuh terhadap infeksi virus akut, yaitu dengan mengaktifkan pertahanan imun secara

menyeluruh sambil menekan fungsi-fungsi homeostatik demi memfokuskan upaya pada eliminasi patogen.

```

version      e112_eg59_p19_25aa4782
date         5/18/2025, 10:41:06 AM
organism     hsapiens
query length 213
all results  false
ordered      false
no ie        false
sources      GO:MF, GO:CC, GO:BP, KEGG, REAC, TF, MIRNA, HPA, CORUM, HP, WP
multiquery   false
numeric ns   ENTREZGENE_ACC
domain scope annotated
measure underrepresentation false
significance threshold method g_SCS
user threshold 0.05
no evidences false
highlight results true
  
```

Gambar 11. Info query dengan total panjang yaitu 213 query

❖ Perbandingan Hasil:

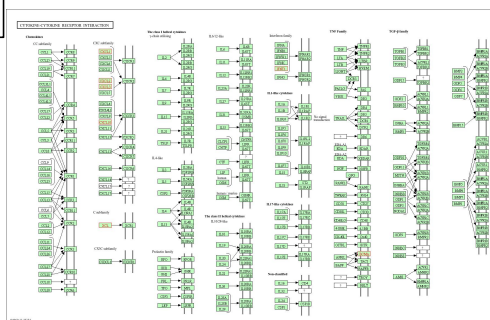
Virus memicu adanya antigen yang menginduksi adanya sel limfosit dan sel B. Sel B menghasilkan antibodi (imunoglobulin). Perbandingan antara kontrol (ND) dan penderita (DF dan DHF) dapat dideteksi dengan melihat adanya IgM, IgA dan IgG yang dihasilkan sel plasma seperti pada DEGs.

4. Pemetaan Jalur KEGG Pathway

hsa01100 Metabolic pathways (16)
 hsa04921 Oxytocin signaling pathway (6)
 hsa04060 Cytokine-cytokine receptor interaction (6)
 hsa04024 cAMP signaling pathway (5)
 hsa04115 p53 signaling pathway (4)
 hsa04062 Chemokine signaling pathway (4)
 hsa04061 Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor (4)
 hsa04510 Focal adhesion (4)
 hsa04810 Regulation of actin cytoskeleton (4)
 hsa04657 IL-17 signaling pathway (4)

Gambar 11. Info query KEGG pathway

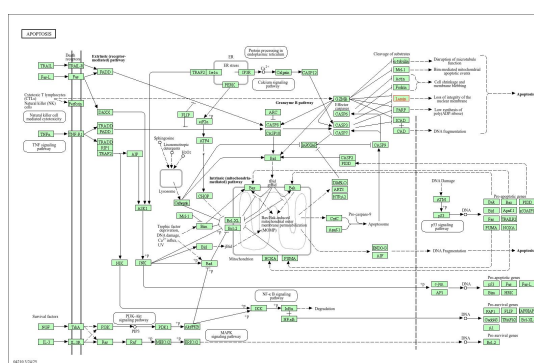
12.1



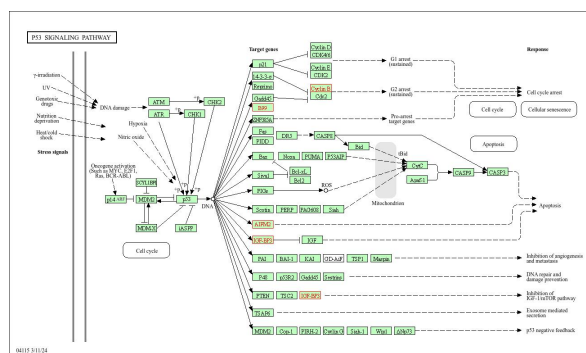
Berdasarkan hasil analisis jalur KEGG yang saya peroleh, beberapa pathway teratas yang diperkaya menunjukkan keterlibatan yang kuat dengan respons imun terhadap infeksi virus. Jalur "Cytokine-cytokine receptor interaction" menempati posisi ketiga paling atas, yang mengindikasikan bahwa terdapat aktivasi tinggi berbagai sitokin seperti IL-1, IL-6, dan gen-gen yang diinduksi interferon. Hal ini menunjukkan terjadinya komunikasi intensif antar sel imun melalui interaksi ligan-reseptor yang memediasi peradangan dan imunitas antiviral.

Selain itu, munculnya jalur "Toll-like receptor signaling", khususnya yang mencakup TLR3 dan TLR7 (reseptor yang mengenali RNA virus), menunjukkan bahwa sistem imun bawaan mengenali keberadaan virus dengue dan mengaktifkan jalur downstream seperti MyD88, TRIF, serta NF- κ B. Aktivasi jalur ini mendukung produksi sitokin proinflamasi dan interferon tipe I (IFNT1) (Gambar 12).

Jalur "Jak-STAT signaling" juga muncul secara signifikan, yang sejalan dengan aktivasi sinyal downstream dari reseptor sitokin. Ini mengindikasikan bahwa sel-sel yang terlibat merespons sinyal sitokin melalui fosforilasi dan translokasi STAT ke inti untuk menginduksi ekspresi gen imun.



Gambar 13. Jalur apoptosis



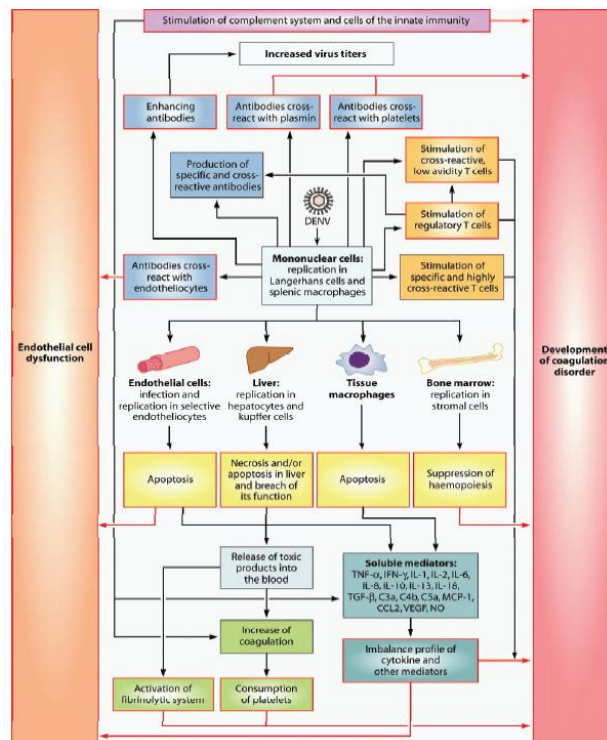
Gambar 14. Jalur persinyalan p53

Setelah itu, terdapat pula jalur "Apoptosis" (Gambar 13) mengacu pada apoptosis oleh lamin akibat kehilangan integritas membran nukleus dan "p53 signaling" (Gambar 14) mengacu pada apoptosis oleh AIFM2 dan istirahat pembelahan oleh siklin B pada fase G2. Ini dapat menunjukkan bahwa sel-sel yang terinfeksi virus atau yang terkena efek inflamasi mengalami regulasi terhadap kematian sel terprogram. Mekanisme ini bisa berperan ganda, sebagai strategi pertahanan untuk membatasi replikasi virus, atau justru sebagai penyebab tambahan kerusakan jaringan.

❖ Perbandingan Hasil:

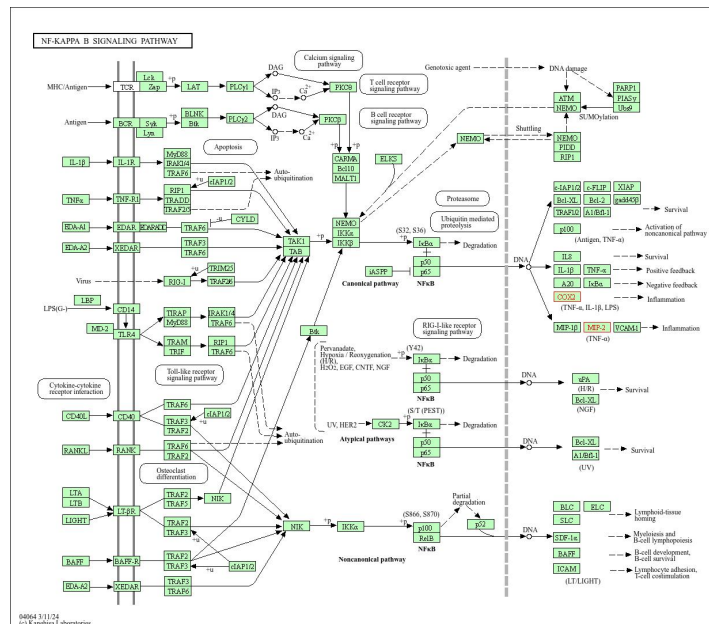
Ekspresi gen yang membedakan penderita (DF+DHF) dan kontrol (ND) terletak pada seberapa viable untuk dapat memproduksi efek antiviral dan reseptor sitokin-sitokin, seperti interferon, dan pengaktifan imun sel T dan NK.

5. Konteks Immunologi dengue



Gambar 15. Jalur patogenesis dengue
[Sumber: Lardo, 2013: 657]

Berdasarkan pendekatan transkriptomik terhadap patogenesis DHF dengan komplikasi, pola ekspresi gen menunjukkan aktivasi kuat sistem imun bawaan pada tahap awal infeksi. Virus dengue terutama menginfeksi makrofag dan sel Langerhans, dengan replikasi aktif di jaringan limpa dan hati.



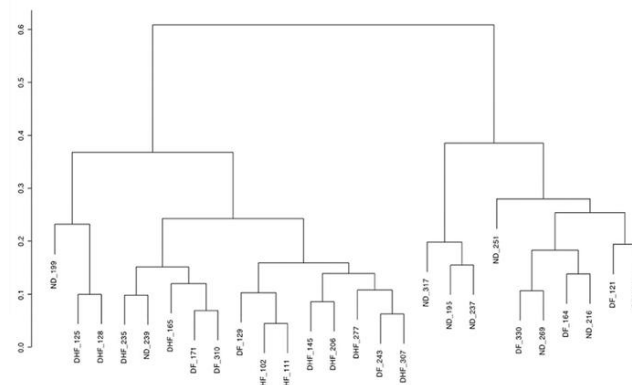
Gambar 16. Jalur persinyalan NF-Kappa B

Analisis menunjukkan peningkatan ekspresi gen yang berhubungan dengan aktivasi sel T, termasuk jalur pensinyalan interferon ($\text{IFN-}\alpha/\gamma$) dan peningkatan sitokin proinflamasi (jalur seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, serta kemokin seperti CCL2 (MCP-1) dan VEGF, yang berkontribusi terhadap disfungsi endotel dan permeabilitas vaskular.

Selain itu, ekspresi gen yang berkaitan dengan antibodi dan respons imun adaptif juga meningkat, mencerminkan fenomena antibody-dependent enhancement (ADE), di mana antibodi justru memfasilitasi infeksi ulang dan memperburuk replikasi virus. Dalam tahap lanjut, teridentifikasi regulasi positif terhadap jalur apoptosis dan gangguan fungsi endotel, yang berkontribusi pada kebocoran plasma. Gen yang terlibat dalam komplemen (C3a, C4b, C5a) dan koagulasi juga mengalami disregulasi, sejalan dengan temuan klinis berupa gangguan hemostasis dan trombositopenia.

Berdasarkan Gambar 15, pada jaringan hati dan sumsum tulang, teramati ekspresi gen yang terkait dengan kematian sel (apoptosis/nekrosis), penurunan fungsi detoksifikasi, serta penekanan jalur hematopoiesis, yang memperburuk gangguan koagulasi dan menurunkan produksi sel darah. Secara keseluruhan, data transkriptomik mendukung bahwa perjalanan imunopatogenesis DHF melibatkan aktivasi berlebihan sistem imun, respons silang antibodi, infeksi endotel, serta disregulasi sitokin dan jalur koagulasi, yang semuanya saling berkaitan dalam memperberat manifestasi klinis DHF dengan komplikasi.

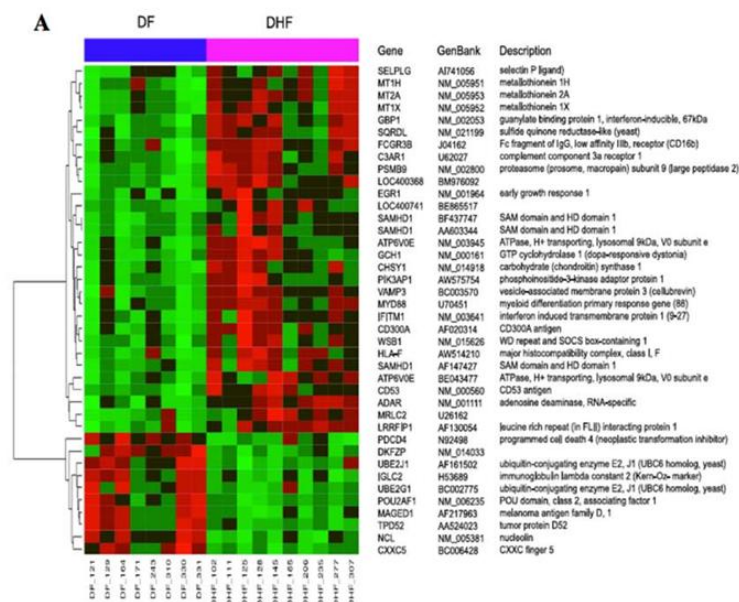
6. Perbedaan DF vs DHF



Gambar 17. Diagram dendrogram sebagai hierarki pengelompokkan 1981 gen pasien dan kontrol untuk penyakit dengue
[Sumber: Nascimento dkk., 2009: 5]

Hasil dendrogram untuk penelitian sebagai pre-processing oleh Nascimento dkk. (2009: 4) untuk penelitian lanjutannya. Seperti terlihat pada Gambar 17, terdapat pengelompokkan besar dari batas 0,4 pada sumbu-Y, dengan pengelompokkan bagian kanan hanya untuk sampel ND dan 4 sampel DF, sedangkan bagian kiri untuk seluruh sampel DHF dan sepasang sampel ND (ND_199 adalah outlier). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan untuk sampel DF dan DHF yang cukup terbagi pada 2 grup besar yang berbeda (Nascimento dkk., 2009: 5).

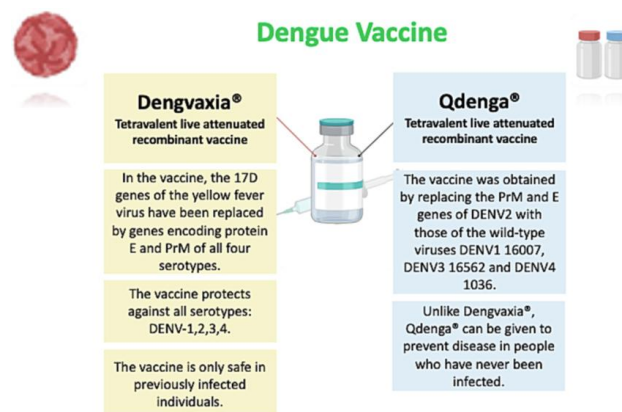
Berdasarkan Gambar 2, terdapat perbedaan pola antibodi IgM dan IgG antara pasien DF (Dengue Fever) dan DHF (Dengue Hemorrhagic Fever). Sebagian besar pasien DHF menunjukkan hasil IgM positif (8 dari 10 pasien), yang mengindikasikan adanya respons imun akut terhadap infeksi dengue, serta kemungkinan mereka berada pada fase awal infeksi atau mengalami infeksi sekunder yang lebih berat. Sementara itu, pasien DF lebih banyak menunjukkan IgM negatif (6 dari 8 pasien), tetapi justru sebagian besar (7 dari 8 pasien) memiliki IgG positif. Pola ini mencerminkan bahwa pasien DF umumnya berada pada fase penyembuhan atau telah mengalami infeksi sekunder ringan sebelumnya. Setelah itu, berdasarkan informasi tambahan di halaman pertama, diketahui bahwa belum adanya respon 2-3 hari yang menandakan virus sudah dapat men-hijack inang setelah waktu tersebut.



Gambar 17. Diagram heatmap pasien DF dan DHF untuk ekspresi gen
[Sumber: Nascimento dkk., 2009: 11]

Kuantifikasi qPCR menunjukkan bahwa ekspresi gen PSMB9, MT2A, HLA-F, dan C3aR1 lebih tinggi pada pasien dengue fever (DF) dibandingkan pasien dengue hemorrhagic fever (DHF). Hasil ini mengonfirmasi pola ekspresi yang sebelumnya telah diamati pada kumpulan awal sampel pasien dalam studi mikroarray (Nascimento dkk., 2009: 14). Secara fungsional, PSMB9 merupakan komponen dari imunoproteasom yang berperan dalam pemrosesan antigen virus untuk dipresentasikan melalui MHC kelas I, sehingga penting dalam respons imun sel-T terhadap infeksi (Rock dkk., 2002). MT2A berperan dalam perlindungan seluler terhadap stres oksidatif, yang umumnya meningkat selama infeksi virus (Theocharis dkk., 2003). Gen HLA-F adalah bagian dari kompleks MHC kelas I non-klasik yang memiliki peran dalam regulasi sel NK dan toleransi imun (Goodridge dkk., 2010). Sementara itu, C3aR1 adalah reseptor dari komponen komplemen C3a yang terlibat dalam aktivasi respon inflamasi bawaan (Klos dkk., 2009). Peningkatan ekspresi keempat gen ini pada pasien DF dibandingkan DHF (keempat gen terekspresikan dengan lebih rendah) mengindikasikan bahwa aktivasi imun bawaan dan pengolahan antigen yang lebih cepat serta regulasi stres seluler yang lebih baik dapat menjadi faktor pelindung yang mencegah progresi ke bentuk penyakit dengue berat.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa lemahnya aktivasi imun awal dapat menjadi faktor yang berkontribusi terhadap progresi penyakit ke derajat yang lebih berat. Hal ini memberikan implikasi penting bagi pengembangan vaksin dengue, dengan respons imun yang dibentuk seharusnya mampu menstimulasi aktivasi imun awal yang cukup kuat namun tetap terkontrol. Oleh karena itu, infeksi dapat ditangani lebih efektif oleh sistem imun sebelum berkembang menjadi bentuk penyakit yang berat.



Gambar 18. Dua vaksin dengue dan komposisinya
[Sumber: Procopio, 2024: 3]

Saat ini (Gambar 18), hanya terdapat dua vaksin dengue yang telah disetujui secara resmi, yaitu Dengvaxia® (CYD-TDV) dan Qdenga® (TAK-003), keduanya merupakan vaksin tetavalen hidup yang dilemahkan dan menargetkan keempat serotipe virus dengue (DENV1–4). Dengvaxia®, yang disetujui FDA pada 2015, hanya direkomendasikan untuk anak usia 9–16 tahun yang sebelumnya sudah pernah terinfeksi dengue, karena pada individu yang belum pernah terinfeksi, vaksin ini justru dapat meningkatkan risiko infeksi berat hingga tiga tahun setelah pemberian. Sementara itu, Qdenga® dapat diberikan kepada anak mulai usia 4 tahun hingga

dewasa, baik yang sudah maupun belum pernah terinfeksi dengue sebelumnya. Dibandingkan Dengvaxia®, Qdenga® memiliki cakupan penggunaan yang lebih luas dan lebih aman bagi populasi umum. Meskipun demikian, tantangan vaksin dengue ideal masih ada, seperti perlunya perlindungan terhadap semua serotipe sekaligus mencegah risiko antibody-dependent enhancement (ADE) (Procopio, 2024: 4).

Virus dengue sulit ditemukan obatnya karena kompleksitas biologis dan tantangan imunologis yang unik. Salah satu faktor utama adalah keberadaan empat serotipe virus (DENV-1 hingga DENV-4), dengan infeksi oleh satu serotipe tidak memberikan perlindungan jangka panjang terhadap serotipe lainnya. Bahkan, infeksi sekunder justru dapat memperparah penyakit melalui mekanisme ADE, yaitu kondisi di mana antibodi dari infeksi sebelumnya justru membantu virus menginfeksi sel imun seperti monosit dan makrofag, memperburuk gejala hingga menjadi dengue berat. Virus dengue juga bereplikasi sangat cepat pada fase awal infeksi, sehingga obat harus diberikan pada waktu yang sangat sempit sebelum gejala berat muncul, padahal banyak pasien baru mencari pertolongan setelah fase kritis terlewati. Tantangan lain adalah risiko efek samping obat yang tinggi, karena sistem imun pasien sangat sensitif dan mudah menjadi hiperaktif. Kombinasi dari semua faktor ini membuat pengembangan obat antivirus untuk dengue menjadi sangat kompleks dan sampai saat ini belum ada yang benar-benar berhasil, sehingga penanganan masih berfokus pada pencegahan lewat vaksin dan terapi suportif (Martina dkk., 2009; Modhiran dkk., 2015).

7. Kesimpulan Singkat

Analisis GO memperlihatkan dominasi proses antiviral dan inflamasi (respon imun, regulasi positif sitokin dan imunoglobulin), yang diperkuat oleh hasil analisis KEGG melalui aktivasi jalur interferon I, toll-like receptor signaling (efek antiviral), jalur NF-Kappa B (inflamasi) dan jalur persinyalan p53 (apoptosis dan stop pembelahan). Hal ini menunjukkan bahwa vaksin dengue yang ideal harus mampu mengaktifkan jalur imun bawaan antivirus secara efektif. Selain itu, ditemukannya keterlibatan jalur sel B (dikontrol untuk vaksin agar tidak terjadi antibody-dependent enhancement) dan T menegaskan pentingnya pembentukan antibodi yang kuat serta memori imun adaptif jangka panjang dalam efektivitas vaksin, seperti Dengvaxia® dan Qdenga®.

Dalam konteks kontrol (ND) dan penderita (DF+DHF) didapatkan hasil untuk penderita terhadap produksi antibodi dan terdapat pemicu respon imun adaptif serta pengurangan sumber metabolis untuk diarahkan ke imunitas, sedangkan kontrol tidak memproduksi antibodi dan tubuh dalam keadaan normal. Dalam konteks DF dan DHF didapatkan hasil bahwa terdapat respon beberapa gen (contohnya PSMB9, MT2A, HLA-F, dan C3aR1) yang berkaitan dengan imunitas lebih lemah (di awal) pada DHF dibandingkan dengan DF dan gen pro-apoptosis lebih tinggi pada DHF dibandingkan DF.

Daftar Pustaka

- GEO NCBI. 2023. Platform GPL570.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL570>, diakses pada 16 Mei 2025 pada pk. 23.54 WIB.
- Green, A. M., & Beatty, P. R., Harris, E. 2014. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. *J Mol Biol* **426**(6): 1148–1160.
- Halstead, S.B. 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in Virus Research* **60**: 421–467.
- Hubbard, J.A. & D.K. Binder. 2016. Chapter 13 - Inflammation dari Astrocytes and Epilepsy. *Academic Press*: 313-342 hlm.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. 2012. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 8th ed. Garland Science.
- Katzelnick, L.C., dkk. 2017. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* **358**(6365): 929–932.
- Lardo, S. 2013. Penatalaksanaan Demam Berdarah Dengue. *CDK-208* **40**(9): 656-660.
- Martina, B.E.E., Koraka, P., & Osterhaus, A.D.M.E. 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews* **22**(4): 564–581.
- Modhiran, N., dkk. 2015. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Science Translational Medicine* **7**(304).
- Nascimento EJ, Braga-Neto U, Calzavara-Silva CE, Gomes AL dkk. 2009. Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome. *PLoS One* **4**(11):e7892.
- NCBI. 2024. About GEO2R.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/geo2r.html#vooma>, diakses pada 17 Mei 2025 pada pk. 01.54 WIB.
- Procopio, A., C. Simona, L. Emanuela, M. Matteo, T., Bruno, C. Carlotta, U. Andrea & R. Paola. 2024. Integrated One Health Strategies in Dengue. *One Health* **18**. 10.1016/j.onehlt.2024.100684.
- Scriba, T.J., dkk. 2020. Challenges in dengue drug discovery and development. *Trends in Microbiology* **28**(11): 891–903.