

Pendahuluan

Infeksi virus dengue merupakan salah satu penyakit tropis yang memiliki spektrum klinis luas, mulai dari Dengue Fever (DF) yang bersifat ringan hingga Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) yang dapat berkembang menjadi kondisi berat dengan kebocoran plasma, gangguan hemostasis, dan risiko syok. Salah satu tantangan utama dalam penanganan dengue adalah kesulitan membedakan pasien yang akan berkembang menjadi DHF pada fase awal infeksi, ketika gejala klinis masih serupa dengan DF maupun penyakit febril lainnya.

Perkembangan teknologi ekspresi gen memungkinkan identifikasi perubahan molekuler yang terjadi selama infeksi. Profil ekspresi gen pada Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) dapat mencerminkan respons imun inang terhadap infeksi virus dengue. Perubahan pada jalur respon imun bawaan (innate immune response), inflamasi, dan apoptosis diduga berperan dalam menentukan progresi penyakit menuju bentuk yang lebih berat.

Dataset GSE18090 menyediakan data ekspresi gen dari pasien pada fase akut awal infeksi dengue yang kemudian berkembang menjadi DF atau DHF, serta dibandingkan dengan pasien demam non-dengue (ND). Dataset ini memberikan peluang untuk menganalisis perbedaan pola ekspresi gen yang berkaitan dengan tingkat keparahan penyakit dan potensi biomarker prediksi klinis.

Tujuan analisis ini adalah untuk mengidentifikasi gen-gen yang diekspresikan secara berbeda antara kelompok DF, DHF, dan ND menggunakan pendekatan diferensial ekspresi gen melalui GEO2R. Menentukan gen yang berpotensi berperan dalam mekanisme patogenesis dengue, khususnya yang berkaitan dengan perkembangan dari DF menjadi DHF, serta mengevaluasi potensi profil ekspresi gen sebagai biomarker molekuler untuk memprediksi keparahan infeksi dengue pada tahap awal penyakit.

Metode

Penelitian ini menggunakan dataset GSE18090 yang diperoleh dari database Gene Expression Omnibus (GEO). Dataset tersebut dianalisis menggunakan platform GPL570 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array), yang mampu mengukur ekspresi sekitar 54.000 probe gen manusia. Sampel yang digunakan terdiri dari 26 pasien yang berasal dari satu kohort klinis di Brasil dan dikumpulkan pada fase akut awal infeksi. Sampel berupa Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) yang mencerminkan respons imun sistemik terhadap infeksi.

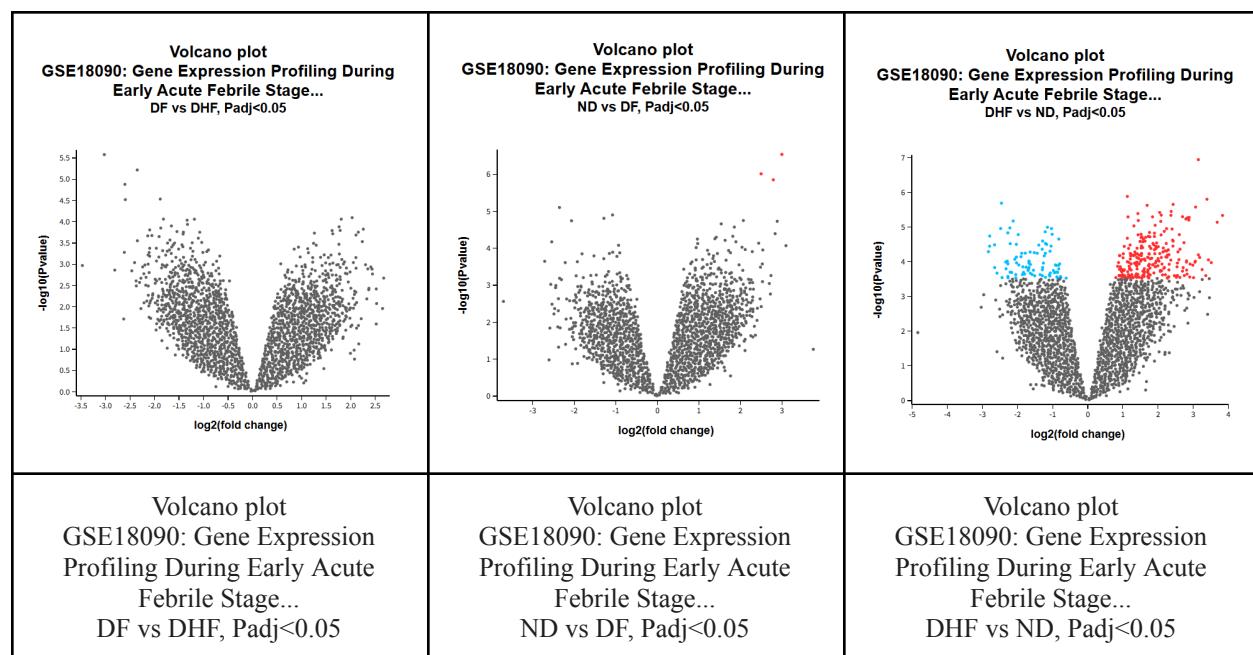
Berdasarkan diagnosis klinis, sampel dikelompokkan ke dalam tiga kategori, yaitu Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) sebanyak 10 sampel, Dengue Fever (DF) sebanyak 8 sampel, dan Non-Dengue febrile illness (ND) sebanyak 8 sampel. Pengelompokan ini dilakukan untuk memungkinkan analisis perbedaan ekspresi gen baik antara pasien dengue dan non-dengue maupun antara tingkat keparahan infeksi dengue. Analisis diferensial ekspresi dilakukan melalui pendekatan perbandingan berpasangan (pairwise comparison), yaitu ND dibandingkan dengan DF, ND dibandingkan dengan DHF, serta DF dibandingkan dengan DHF.

Analisis data dilakukan menggunakan fitur GEO2R yang berbasis pada paket statistik limma (Linear Models for Microarray Data) dalam lingkungan R. Data telah mengalami transformasi log2 secara

otomatis oleh sistem GEO2R. Model linear digunakan untuk menguji perbedaan ekspresi gen antar kelompok, dan nilai p yang diperoleh dikoreksi menggunakan metode Benjamini-Hochberg untuk mengontrol false discovery rate (FDR). Gen dinyatakan signifikan apabila memiliki nilai adjusted p-value (adj.P.Val) kurang dari 0,05. Nilai log2 fold change (logFC) digunakan untuk menentukan arah perubahan ekspresi gen, di mana nilai positif menunjukkan peningkatan ekspresi pada kelompok pertama dalam perbandingan, sedangkan nilai negatif menunjukkan peningkatan pada kelompok kedua.

Hasil

Berdasarkan analisis diferensial ekspresi gen antara kelompok ND, DF, dan DHF mengidentifikasi sebanyak 35 gen yang signifikan secara statistik dengan nilai adj.P.Val < 0.05. Temuan ini menunjukkan adanya perbedaan molekuler yang nyata antara dengue ringan dan dengue berat pada fase akut awal infeksi.

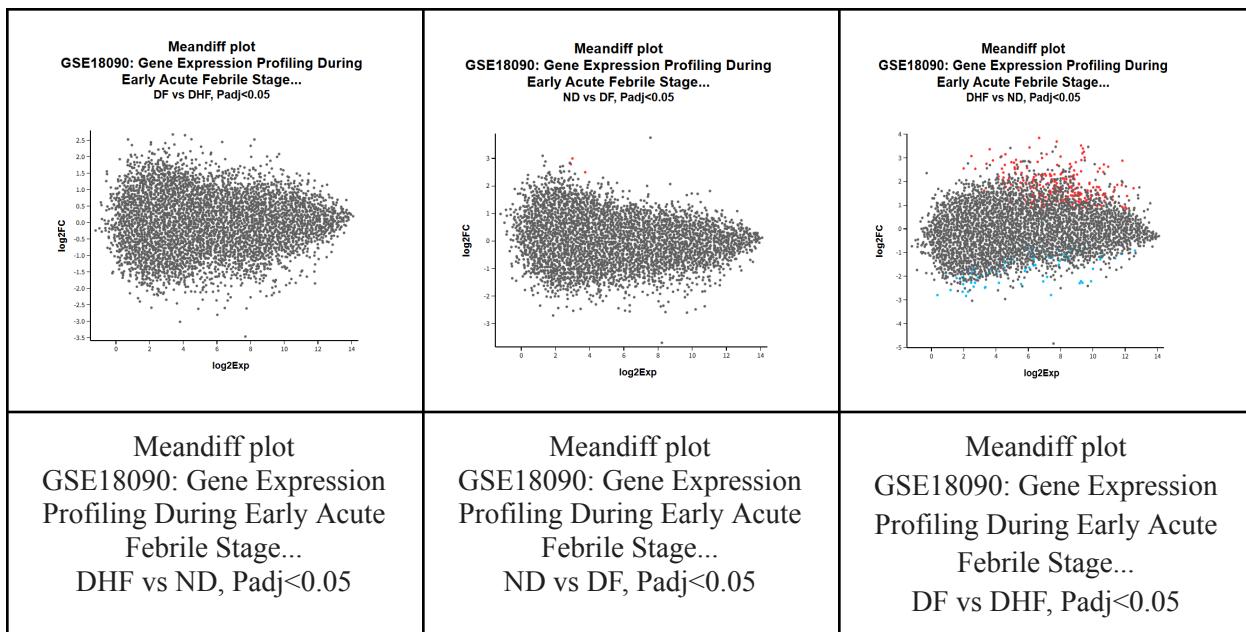


Pada perbandingan DF vs DHF, volcano plot menunjukkan jumlah gen signifikan yang relatif terbatas dengan distribusi titik yang sebagian besar berada di sekitar nilai log2 fold change mendekati nol. Hal ini menunjukkan bahwa pada fase akut awal infeksi, perbedaan ekspresi gen antara dengue ringan (DF) dan dengue berat (DHF) belum terlalu mencolok secara statistik. Kondisi ini dapat mengindikasikan bahwa perubahan molekuler yang berkontribusi terhadap progresi menuju DHF belum sepenuhnya berkembang pada waktu pengambilan sampel. Dengan demikian, meskipun terdapat sejumlah gen yang berbeda secara signifikan, pola global ekspresi gen antara DF dan DHF masih relatif serupa pada tahap awal penyakit.

Pada perbandingan ND vs DF, volcano plot menunjukkan hanya sedikit gen yang melewati ambang signifikansi (adj.P.Val < 0.05), dengan sebagian besar titik tetap berada dalam area tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa secara molekuler, ekspresi gen pada pasien dengue ringan (DF) pada fase awal relatif tidak jauh berbeda dibandingkan pasien dengan demam non-dengue (ND). Temuan ini dapat mengindikasikan bahwa respons imun awal pada DF belum sepenuhnya menunjukkan aktivasi

khas infeksi dengue yang kuat, atau bahwa perubahan ekspresi gen yang spesifik terhadap dengue ringan masih terbatas pada subset gen tertentu.

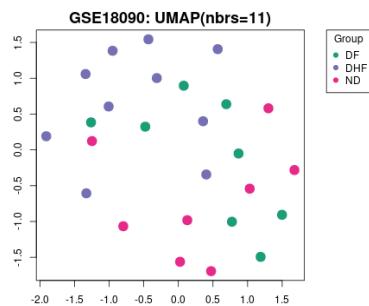
Sebaliknya, pada perbandingan DHF vs ND terlihat perbedaan yang jauh lebih jelas. Volcano plot menunjukkan banyak gen yang mengalami peningkatan maupun penurunan ekspresi secara signifikan, dengan distribusi titik berwarna yang menyebar pada kedua sisi sumbu log₂ fold change. Hal ini menandakan adanya perubahan molekuler yang substansial antara pasien dengue berat dan pasien demam non-dengue. Peningkatan jumlah gen signifikan pada perbandingan ini menunjukkan bahwa DHF ditandai oleh aktivasi respons imun dan regulasi gen yang lebih kuat dibandingkan kondisi febril non-dengue. Temuan ini mendukung bahwa infeksi dengue berat memiliki signature ekspresi gen yang lebih khas dan berbeda secara biologis.



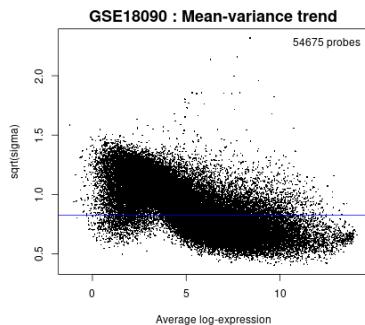
Pada MA plot DF vs DHF terlihat bahwa hampir seluruh titik berada di sekitar nilai log₂ fold change mendekati nol, dan tidak terlihat banyak titik berwarna yang menandakan gen signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan ekspresi gen antara DF dan DHF pada fase akut awal relatif kecil dan tidak dominan pada tingkat ekspresi tertentu. Distribusi titik yang simetris di sekitar nol juga menunjukkan bahwa tidak terdapat bias sistematis terhadap gen dengan ekspresi tinggi maupun rendah. Secara biologis, hal ini mengindikasikan bahwa pada tahap awal infeksi, perbedaan molekuler antara dengue ringan dan berat belum menunjukkan pemisahan yang sangat kuat.

Pada perbandingan ND vs DF, MA plot menunjukkan hanya sedikit gen signifikan (titik berwarna), dan sebagian besar gen tetap terdistribusi di sekitar log₂FC = 0. Perbedaan ekspresi antara ND dan DF tampak minimal dan tidak terkonsentrasi pada tingkat ekspresi tertentu. Hal ini dapat mengindikasikan bahwa pada fase awal, dengue ringan belum menunjukkan perubahan molekuler yang sangat berbeda dibandingkan kondisi demam non-dengue. Dengan kata lain, respons imun awal pada DF mungkin masih berada pada tingkat yang relatif mirip dengan respons terhadap infeksi febril lainnya.

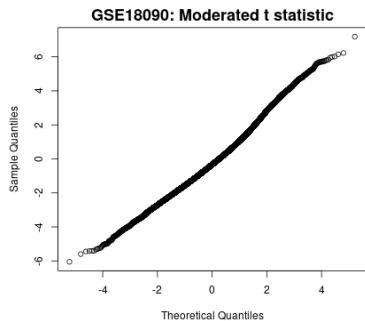
Pada perbandingan DHF vs ND terlihat perbedaan jelas. Banyak titik berwarna (merah dan biru) menyebar di atas dan di bawah garis nol, menunjukkan adanya gen yang mengalami peningkatan dan penurunan ekspresi secara signifikan. Gen-gen signifikan tersebut muncul pada berbagai tingkat ekspresi (baik rendah maupun tinggi), menandakan bahwa perubahan molekuler pada DHF bersifat luas dan tidak terbatas pada subset gen dengan ekspresi tertentu saja. Hal ini menunjukkan bahwa dengue berat ditandai oleh perubahan regulasi gen yang lebih kuat dibandingkan pasien non-dengue, mendukung adanya signature molekuler khas pada DHF.



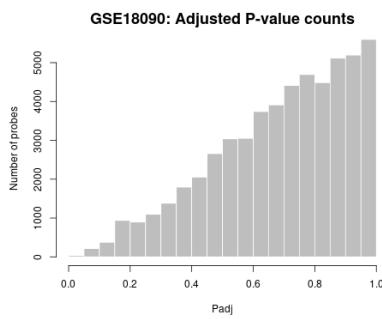
Analisis UMAP menunjukkan bahwa distribusi sampel dari kelompok DF, DHF, dan ND tidak membentuk pemisahan klaster yang sangat jelas. Titik-titik dari ketiga kelompok masih saling bercampur, mengindikasikan bahwa secara global profil ekspresi gen antar kelompok belum sepenuhnya terpisah pada fase akut awal infeksi. Temuan ini menunjukkan bahwa perbedaan molekuler kemungkinan hanya terjadi pada subset gen tertentu, sebagaimana teridentifikasi dalam analisis diferensial ekspresi.



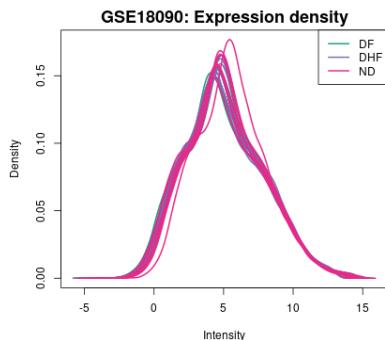
Plot mean–variance menunjukkan hubungan antara rata-rata log-expression dan standar deviasi ($\text{sqrt}(\sigma)$) dari 54.675 probe. Terlihat bahwa variabilitas gen cenderung lebih tinggi pada tingkat ekspresi rendah dan menurun pada ekspresi yang lebih tinggi, membentuk pola tren menurun. Garis biru menunjukkan estimasi tren varians yang digunakan oleh model limma untuk melakukan moderasi statistik. Pola ini normal pada data microarray dan menunjukkan bahwa pendekatan moderasi varians telah diterapkan dengan baik untuk menstabilkan estimasi varians antar gen.



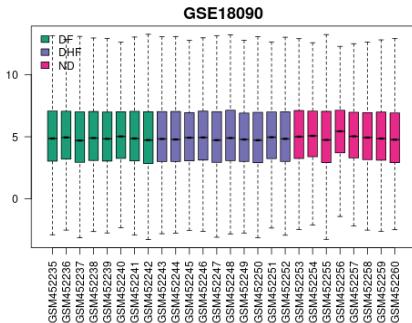
Plot ini memperlihatkan distribusi nilai moderated t-statistic terhadap distribusi teoritis normal. Sebagian besar titik mengikuti garis diagonal, menandakan bahwa asumsi distribusi statistik terpenuhi dan model limma bekerja dengan baik. Namun terdapat penyimpangan di bagian ekor atas dan bawah, menunjukkan adanya gen dengan nilai t yang ekstrem. Gen-gen pada bagian ekor ini kemungkinan merupakan gen yang berbeda secara signifikan antara kelompok yang dibandingkan.



Histogram adjusted p-value menunjukkan bahwa sebagian besar probe memiliki nilai adj.P.Val mendekati 1, sedangkan hanya sebagian kecil berada di rentang rendah (<0,05). Hal ini menunjukkan bahwa dari puluhan ribu probe yang diuji, hanya sebagian kecil yang benar-benar signifikan setelah koreksi multiple testing. Distribusi ini normal dalam analisis ekspresi gen karena sebagian besar gen memang tidak berubah secara signifikan antar kelompok.

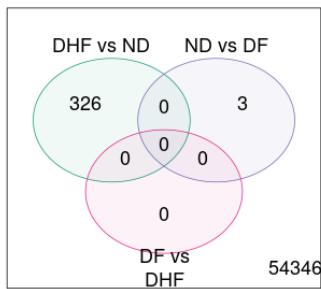


Plot density menunjukkan distribusi intensitas ekspresi untuk kelompok DF, DHF, dan ND. Kurva ketiga kelompok hampir sepenuhnya tumpang tindih, menandakan bahwa distribusi global ekspresi gen antar sampel relatif seragam. Hal ini menunjukkan bahwa proses normalisasi data berjalan baik dan tidak terdapat bias sistematis antar kelompok sebelum dilakukan analisis diferensial.



Boxplot memperlihatkan distribusi median dan kuartil ekspresi untuk masing-masing sampel (GSM). Median antar sampel berada pada kisaran yang hampir sama (sekitar log2 intensitas 4–6), menunjukkan konsistensi antar sampel dan tidak adanya outlier ekstrem. Ini menandakan kualitas data baik dan layak untuk analisis diferensial ekspresi.

GSE18090: limma, Padj<0.05



Venn diagram menunjukkan jumlah gen signifikan pada tiap comparison. Perbandingan DHF vs ND menghasilkan 326 gen signifikan, ND vs DF menghasilkan 3 gen signifikan, dan DF vs DHF tidak menghasilkan gen signifikan (0 gen). Tidak terdapat gen yang overlap antar comparison. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan molekuler paling kuat terjadi antara DHF dan ND, sedangkan perbedaan antara DF dan DHF sangat minimal pada fase akut awal. Secara biologis, ini mengindikasikan bahwa perubahan ekspresi gen lebih mencerminkan status infeksi berat dibandingkan progresi ringan ke berat.

Kesimpulan

Analisis dataset GSE18090 menunjukkan bahwa perbedaan ekspresi gen paling signifikan terjadi pada perbandingan DHF vs ND dengan 326 gen berbeda secara signifikan ($\text{adj.P.Val} < 0.05$), sedangkan ND vs DF hanya menghasilkan 3 gen signifikan dan DF vs DHF tidak menunjukkan gen signifikan. Hasil ini mengindikasikan bahwa perubahan molekuler paling jelas terjadi antara dengue berat dan kondisi non-dengue, sementara perbedaan antara dengue ringan dan berat pada fase akut awal masih terbatas.

Visualisasi melalui volcano plot, MA plot, dan UMAP mendukung temuan tersebut, dengan perbedaan paling menonjol pada DHF vs ND. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa dengue berat memiliki signature ekspresi gen yang lebih khas dibandingkan demam non-dengue, serta berpotensi menjadi dasar identifikasi biomarker molekuler untuk infeksi dengue berat.