

HUBUNGAN POLIMORFISME GEN TLR 9 (RS5743836) DAN TLR 2 (RS3804099 DAN RS3804100) DENGAN PEMBENTUKAN ANTI-HBS PADA ANAK PASCAVAKSINASI HEPATITIS B

INA ROSALINA

Universitas Padjadjaran

email korespondensi: inar@bdg.centrin.net.id

Abstrak

Saat ini penyakit hepatitis B masih merupakan masalah kesehatan diseluruh dunia karena dapat menyebabkan penyakit hati kronik sampai karsinoma hepatoseluler. Salah satu pencegahan yang sangat penting adalah dengan memberikan vaksinasi pada bayi sesuai program. Namun sekitar 5-10% orang sehat gagal menghasilkan jumlah antibody protektif pascavaksinasi hepatitis B, artinya titer anti-HBs yang didapat < 10 mIU/mL, sehingga mudah tertular virus hepatitis B. Salah satu faktor penyebabnya adalah gangguan toll like receptor. Penelitian ini bertujuan untuk melihat hubungan polimorfisme *gen toll like receptor* 9 dan 2 dengan pembentukan anti HB-s pada anak pascavaksinasi hepatitis B. Pada saat pengambilan darah, subjek dalam keadaan sehat, berat lahir > 2500 gr, dan sudah mendapatkan vaksinasi hepatitis B sesuai program. Penelitian *crosssectional* dilakukan selama periode 2010 sampai 2012. Didapatkan 162 bayi terdiri dari laki-laki 82 orang (50,6%), perempuan 80 orang (49,4%), dengan rentang usia 6-13.2 bulan (median 11.3). Dilakukan pencatatan karakteristik, usia, jadwal vaksinasi, berat badan, dan pemeriksaan fisik sebelum dilakukan pengambilan darah. Dilakukan pemeriksaan titer anti-HBs, dan pemeriksaan TLR 9 dengan restriksi enzim BstNI dan TLR 2 dengan menggunakan enzim MwoI dan MspI, yang sebelumnya dilakukan isolasi DNA. Analisis statistik *genotype* memakai *chi square* dan untuk *haplotype* memakai uji statistik HAPSTAT. Hasil yang diperoleh 15 orang (9,4%) titer anti HBs < 10mIU/mL (<2.00 – 8.45mIU/mL sebagai nonrespons, berdasarkan angka ini didapat prevalensi non respons 9,4% (95% CI: 9,86-13,9%). Kelompok dengan kadar anti HBs < 10- 100 mIU/mL sejumlah 144 orang (90,6%) disebut sebagai respons. Deteksi polimorfisme TLR9 -1237 T/C (rs5743836 T/C) dengan enzim BstNi. ditemukan 6 orang pada subjek yang respons. Deteksi polimorfisme gen TLR2 (rs3804099) dengan enzim restriksi MwoI ditemukan pada 20 orang subjek respons, sedangkan dengan enzim restriksi MspI pada gen TLR2 (rs3804100) didapatkan 1 (100%) mutasi *heterozygote* pada subjek respons. Dari ketiga *haplotype* tersebut terlihat adanya hubungan dengan pembentukan anti HBs pasca vaksinasi Hepatitis B.

Kata Kunci: nonrespons, anti-HBs, TLR 9, TLR 2

Abstract

Current hepatitis B remains a worldwide health problem because it can cause chronic liver disease to hepatocellular carcinoma. One of the most important prevention is to vaccinate infants according to program. However, approximately 5-10% of healthy people fail to produce protective antibodies to the hepatitis B pasca vaccination, mean anti-HBs titers obtained <10 mIU/mL, are vulnerable to viral hepatitis B. One of the contributing factors is the disruption toll like receptor. This study aims to determine the Relation of polymorphisms gene toll like receptor 9 and 2 to the formation of anti-HBs in children pasca vaccination hepatitis B. At the time of blood sampling, the subjects were in good health, birth weight > 2500 g, and had a hepatitis B vaccination according to the program. Crosssectional study conducted during the period 2010 to 2012. Obtained consisted of 162 infant boys 82 (50.6%) boys, 80 (49.4%) girls, with an age range 6-13.2 months (median 11.3). Were recorded characteristics, age, vaccination schedule, weight, and physical examination prior to blood sampling. Examination of anti-HBs titers, and examination of TLR 9 by restriction enzymes BstNI and TLR 2 by using the enzyme MwoI and MspI, which previously carried out DNA isolation. Statistical analysis using chi square for genotype and to use statistical tests HAPSTAT haplotype. The results obtained by 15 people (9.4%) anti-HBs titers <10mIU/mL (<2.00 - 8.45mIU/mL as non-response, based on the number of non response is obtained prevalence 9.4% (95% CI: 9.86 to 13, 9%). group with anti-HBs levels <10-100 mIU / mL a number of 144 people (90.6%) referred to as a response. Detection of polymorphisms TLR9 -1237 T / C (rs5743836 T / C) with the enzyme BstNi. Found 6 the response of people on the subject. Detection of TLR2 gene polymorphism (rs3804099) with an enzyme found in 20 restrictions MwoI the subject response, whereas with the enzyme MspI restriction on TLR2 gene (rs3804100) obtained 1 (100%) heterozygote mutation in subject responses. Of the three haplotype The visible presence of an effect on the formation of anti-HBs after hepatitis B vaccination.

Keywords: non-response, anti-HBs, TLR 9, TLR 2

Pendahuluan

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus hepatitis B (VHB) sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan dunia, karena dapat mengakibatkan penyakit hati serius mulai dari hepatitis fulminan sampai karsinoma hepatoseluler. Diperkirakan sekitar 2 miliar penduduk dunia pernah terinfeksi virus hepatitis B, dan 360 juta orang sebagai pengidap (*carier*) HBsAg dan 220 juta (78%) diantaranya terdapat di Asia. Lima ratus ribu hingga 750 ribu orang diduga akan meninggal karena sirosis hepatis atau berkembang menjadi kanker hati.

Angka kejadian (*prevalensi*) hepatitis B kronik di Indonesia mencapai hingga 5-10% dari total penduduk, atau setara dengan 13,5 juta penderita. Jumlah ini membuat Indonesia termasuk daerah endemis sedang

sampai tinggi (3-17%), dan menjadi negara ke 3 Asia yang penderita hepatitis B kroniknya paling banyak.

Vaksinasi merupakan strategi paling efektif dan aman untuk mengendalikan serta eradikasi infeksi VHB. Indonesia telah melaksanakan pemberian vaksinasi hepatitis B secara rutin dalam Program Pengembangan Immunisasi (PPI) sejak tahun 1992.

Vaksin Hepatitis B yang digunakan saat ini berasal dari antigen permukaan virus hepatitis B (*surface antigen*/HBsAg), dibuat dengan teknik rekombinan DNA yaitu dengan menginsersi gen S virus hepatitis B. Vaksin HB mengandung protein HBsAg yang mampu menginduksi respon imun sel inang sehingga terbentuk anti-HBs, yaitu sebagai komponen antibodi secara khusus yang mampu menghambat penempelan

virus dan masuknya VHB kedalam sel inang.⁸ Seroproteksi didapatkan bila kadar antibodi HBs (*hepatitis B surface*) > 10 mIU/mL. Namun hasil penelitian di beberapa negara didapatkan sekitar 5-10% orang sehat gagal menghasilkan jumlah antibodi protektif pascavaksinasi hepatitis B sesuai program. Keadaan tersebut dikatakan nonrespons artinya kadar anti-HBs yang terbentuk di bawah ambang protektif yaitu < 10 mIU/mL. 6,8-10 Penelitian Yuwono di Bandung, melaporkan setelah mendapat vaksinasi hepatitis B 3 kali pemberian, serokonversi terhadap anti-HBs pada bayi yang lahir dari ibu nonkarier sekitar 60,6%, dan serokonversinya meningkat sekitar 63,2% pada bayi yang lahir dari ibu karier dan nonkarier.

Penyebab terjadinya kegagalan terbentuknya respon imun atau nonrespons pascavaksinasi hepatitis B, dapat berasal dari faktor kualitas/kuantitas vaksin atau dari faktor penjamunya sendiri. Faktor yang berhubungan dengan vaksin seperti cara penyimpanan, dosis, jadwal dan cara/lokasi pemberian serta adjuvan yang dipakai. Faktor penjamu seperti penyakit imunodefisiensi, malnutrisi, sedang mengkonsumsi obat kortikosteroid, mutasi dari virus, bahkan ditemukan adanya kelainan faktor genetik atau kegagalan respon imun penjamu. Antigen (vaksin HB atau VHB) yang masuk tubuh akan dipresentasikan oleh antigen presenting cells (APC) kepada sel T helper (CD4) spesifik yang mengenali kompleks molekul HLA II dan peptida HbsAg pada permukaan APC.¹¹ Hasil penelitian Jafarzadeh, dkk 2003, bahwa kegagalan terbentuknya respon antibodi terhadap vaksin hep B karena adanya disfungsi dari APC dan defek pada sel T.

Menurut beberapa peneliti salah satu sebab terjadinya kegagalan terbentuknya anti-HBs yaitu adanya polimorfisme pada Toll like receptor (TLR). Dikatakan TLR berperan penting dalam meningkatkan respon imun innate merupakan salah satu alat yang terdapat pada sel dendrit (SD). Melalui *pattern recognition receptors* (PRRs) TLR berperan mendeteksi atau mengenal berbagai macam komponen struktur antigen (bakteri, virus, jamur, dll) yang masuk tubuh sehingga menghasilkan suatu signaling untuk aktivasi dari respon imun inate melalui aktivasi dan transkripsi faktor NF- κ B yang merupakan regulator utama dari respons imun maupun proses inflamasi. Pada manusia dikenal 10 famili TLR (TLR 1-10) dengan fungsi yang berbeda-beda dalam pengenalan imun inate. Apabila terjadi polimorfisme pada TLR, maka tidak akan terbentuk respons inate dengan sempurna, yang berhubungan dengan patofisiologi di hati khususnya TLR 9 dan TLR 2.

Penelitian menggunakan *TLR9-deficient mice* (TLR9 -/-), membuktikan bahwa TLR 9 merupakan reseptor dari CpG-DNA viral maupun bakterial atau terhadap *synthetic CpG containing Oligodeoxynucleotides* (CpG-ODN), selanjutnya menginduksi sekresi sitokin. Penelitian Davis dkk, terhadap mencit dengan *polimorfisme TLR 9*, memperlihatkan fenotip nonresponsif terhadap CpG-DNA dan CpG-ODN. Penelitian Jia dkk, di Cina mendapatkan polimorfisme gen TLR9 berhubungan dengan pasien sirosis hepatis. Hal ini membuktikan dengan adanya polimorfisme TLR 9, ternyata orang tersebut sangat rentan terhadap infeksi HB.

Selain polimorfisme TLR 9, polimorfisme TLR 2 juga berpengaruh terhadap timbulnya respon inate. Gen TLR2 terdapat pada transmembran sel dan mempunyai

reseptor yang dapat mengenali VHB, TLR 2 terdapat pada sel kuppfer dan hepatosit. Penelitian terdahulu mendapatkan polimorfisme TLR2 di rs 3804099 C/T dan rs3804100 C/T ditemukan pada pasien sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler²¹ Hal ini membuktikan dengan adanya polimorfisme TLR 2, manusia sangat rentan terhadap VHB.

Mengingat besarnya peran TLR dalam timbulnya respon imun inate, maka beberapa hal yang mengganggu fungsi TLR dan sel dendritik dalam mengenal, maturasi, migrasi, serta fungsi lainnya akan secara langsung memberikan efek pada sel T CD4 dan sel B, sehingga akan menghambat pembentukan antibodi terhadap antigen vaksin hepatitis B tersebut. Pada orang normal sel T CD4 memacu sel B menjadi sel plasma melalui mediator IL2. Sel plasma akan mengeluarkan IgG spesifik terhadap HBsAg yang disebut anti-HBsAg IgG yang dikenal sebagai anti-HBs.

Penelitian Ryckman, dkk mengatakan bahwa setiap genotip saling berhubungan atau mempunyai linkage disequilibrium, sehingga dalam melihat hubungan analisis antar gen (*haplotype*) dapat di analisis dengan statistik haplotype, karena produk protein dari gene kandidat terjadi di rantai polipeptida yang bergantung kepada kombinasi asam amino, prinsip dari populasi genetik memperlihatkan bahwa variasi dalam populasi strukturnya tidak dapat dipisahkan dari haplotype dan power statistik dari tes hubungan dengan data phased akan lebih jelas karena lebih terfokus. Terlihat bahwa utk melihat hubungan polimorfisme TLR 9 dan TLR 2 dengan timbulnya anti HBs dapat menggunakan analisis haplotype.

Sampai saat ini belum pernah diteliti mengenai hubungan polimorfisme gen TLR 9 dan gen TLR 2 dengan timbulnya anti HBs pada anak sehat, tetapi baru dilakukan terhadap binatang percobaan dan pada orang yang sudah menderita sirosis dan karsinoma hepatoseluler. Dengan penelitian ini diharapkan akan memberikan informasi yang lebih lengkap mengenai penyebab terjadinya kegagalan dalam pembentukan respons imun dan diharapkan dapat dirancang vaksin baru yang efektif untuk anak nonresponder dengan kelainan tersebut.

Metode

Subjek penelitian adalah bayi yang tidak sakit usia 12 bulan \pm 30 hari yang datang dan kontrol ke puskesmas (yang ditunjuk) dan sudah mendapat 4x vaksinasi hepatitis B sesuai program, orang tua/wali telah menyetujui anaknya turut serta dalam penelitian setelah diberi penjelasan dan menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Kriteria Inklusi penelitian bayi sehat usia sekitar 9 -12 bulan yang lahir dengan berat badan lahir > 2.500 g, aterm, cukup bulan, sesuai masa kehamilan, lahir dari ibu sehat, bayi telah mendapat vaksinasi hepatitis B 4x (sesuai program), tidak sedang konsumsi obat kortikosteroid, rute dan lokasi suntikan vaksinasi hepatitis B di anterolateral paha. Kriteria eksklusi adalah Ibu merokok selama kehamilan.

Ukuran sampel ditentukan dengan analisis yang akan menguji Hipotesis 1,2,3 dan 4. Penelitian ini terdapat 4 hipotesis Hipotesis1 menentukan polimorfisme gen TLR 9 (rs5473836) berhubungan dengan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi hepatitis B. Hipotesis 2 menentukan Polimorfisme gen

TLR2 (rs3804099) berhubungan dengan kegagalan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi hepatitis B. Hipotesis 3 menentukan polimorfisme gen TLR2 (rs193205139) berhubungan dengan kegagalan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi hepatitis B. Hipotesis 4 menentukan haplotype TLR 9 (rs5473836) dan TLR 2 (rs3804099 dan rs193205139) berhubungan dengan timbulnya anti HBs pada anak pasvaksinasi hepatitis B.

Pemilihan sampel secara *consecutive sampling*, didasarkan urutan datang ke puskesmas yang ditunjuk, kemudian dilakukan pemeriksaan darah untuk menentukan kadar anti-HBs, dan menentukan polimorfisme TLR9 dan TLR 2 dengan menggunakan teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

Variabel bebas pada penelitian ini adalah *polimorfisme gen Toll like receptor 9 dan Toll like receptor 2 dan haplotype TLR 9* (rs5743838), TLR2 (rs3804099), TLR2 (rs3804100). Variabel tergantung berupa: anti-HBs <10 mIU/mL dan anti-HBs > 10 mIU/mL dan Kadar anti-HBs TLR9 dan TLR 2, serta Variabel perancu adalah umur.

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan di Puskesmas Pasirkaliki dan Puskesmas Ciumbleuit dan Laboratorium Unit Penelitian Krdokteran FK UNPAD. Penelitian dilaksanakan sejak agustus 2010 sampai Maret 2012.

Analisis statistik untuk menguji hipotesis 1,2 dan 3 menggunakan *test Chi-Square*, sedangkan hipotesis 4 menggunakan analisis statistik haplotype.

Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran RS Dr. Hasan Sadikin no 55/FKUP-RSHS/KEPK/Kep/EC/2010.

Hasil dan Pembahasan

Dari 187 anak yang bersedia ikut penelitian, pada pemeriksaan awal sebanyak 24 penderita tidak dapat dimasukan kedalam penelitian karena bayi dalam keadaan sakit batuk pilek, panas, mencret, usia melebihi ketentuan dan jumlah imunisasi yang tidak sesuai kriteria, sehingga ada 163 bayi yang memenuhi kriteria inklusi. Namun pada tahap pemeriksaan laboratorium selanjutnya didapatkan darah lisis sebanyak 1 bayi, sehingga tidak dapat dilanjutkan penelitian. Terlihat dari Kartu menuju Sehat, bahwa imunisasi hepatitis B yang dilaksanakan sudah 4 kali, mulai dari segera setelah lahir. Jadi jumlah yang dapat diperiksa berjumlah 162 bayi, dan selanjutnya diikutsertakan dalam penelitian. Pada saat akan dilakukan pemeriksaan lanjutan 3 sampel darah mengalami lisis sehingga hanya terdapat 159 sampel yang dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Hasil penelitian selengkapnya diuraikan dibawah ini.

Karakteristik	n (=162)	%
Jenis Kelamin		
Laki-laki	82	50,6
Perempuan	80	49,4
Usia (bulan)		
Median	11.3	
Rentang	6-13.2	

Usia anak sekitar 6-13.2 (median11.3) bulan. Usia disini menjelaskan bahwa anak tersebut sudah mendapatkan imunisasi hepatitis B 4 kali sesuai program.

Tabel 2. Pemeriksaan Kadar Anti-HBs (n =159)

	Non Respons	Respon
Anti HBs (mIU/ml)	<10	=10
n(%)		
Jumlah bayi	15 (9,4)	144 (90,6)

Subjek non respon berjumlah 9,4 %

Tabel 4.3. Perbedaan Frekuensi Genotip TLR 9 Berdasarkan Kelompok Respon dan Non Respon (n=159)

Frekuensi		Reaktivitas		*p
		Non Respons n (%)	Respon n (%)	
Genotip normal	CC	138 (90,2)	15 (9,8)	0.420
Genotip polimorfisme	TT	6 (100)	0 (,0)	

*p = chi kuadrat

Menunjukkan bahwa genotip polimorfisme TT tidak bermakna dan tidak didapatkan pada subjek non-respon

Tabel 4. Rata-rata Kadar Anti- Hbs berdasarkan Genotip CC dan TT

Frekuensi		Kadar anti-HBs	
		Jumlah Rata-rata (mIU/mL)	Median
Genotip normal	C/C	440.8	339.4
Genotip polimorfisme	T/T	563.2	546.3

Jumlah rata-rata kadar anti-HBs didapatkan lebih tinggi pada subjek yang mengalami polimorfisme (TT)

Tabel 5. Perbedaan Frekuensi Genotip TLR 2 Berdasarkan Kelompok Respon dan Non Respon (n=159)

Frekuensi		Reaktivitas		*p
		Respons n (%)	Non Respon n (%)	
Genotip normal	CC	124 (89,2)	15 (10,8)	0.394
Genotip polimorfisme	TT	20 (100)	0 (,0)	

*p= Chi kuadrat

Menunjukkan bahwa polimorfisme gen TLR2 tidak bermakna

Tabel 6. Kadar Anti-HBs pada TLR 2 Berdasarkan Frekuensi Genotip CC dan TT

Frekuensi		Kadar anti-HBs	
		Jumlah Rata-rata (mIU/mL)	Median
Genotip normal	CC	438.8	323.9
Genotip polimorfisme	TT	491.5	445.6

Jumlah rata-rata kadar anti-HBs didapatkan lebih tinggi pada subjek yang mengalami polimorfisme (TT)

Tabel 7. Perbedaan Frekuensi Genotip TLR 2 Berdasarkan Kelompok Respon dan Non Respon (n=159)

Frekuensi	Reaktifitas	Reaktifitas		*p
		Respon n (%)	Non Respon n (%)	
Genotip normal	GG	143 (90,5)	15 (9,5)	0.906
Genotip polimorfisme	AA	1 (100)	0 (,0)	

*p = chi kuadrat

didapatkan polimorfisme (AA) tidak bermakna

Tabel 8. Hubungan Genotip dengan Timbulnya Kadar Anti HBs (n=159)

Frekuensi	Estimate	*P
Genotip normal	CCC	10.6321
Genotip normal	CCC*age	-11.9786

Uji HAPSTAT

didapatkan hasil bahwa yang muncul adalah haplotype kombinasi *wild type* CCC dan secara statistik dikatakan haplotype berhubungan dengan kadar anti HBs. Terlihat juga bahwa usia berhubungan dengan kadar anti HBs, makin muda pengambilan kadar anti HBs akan didapatkan hasil yang lebih kecil (estimate: -11.9786). Hasil P = 0.979 menunjukkan bila dari suatu populasi diambil 100 sampel, maka 97 sampel akan ditemukan hasil yang sama dengan penelitian ini, demikian pula kalau didapat kan P= 0.766 artinya dari suatu populasi diambil 100 sampel, maka 76 sampel akan ditemukan hasil yang sama dengan penelitian ini.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terlihat kelompok nonrespon sebanyak 15, artinya bahwa anak tersebut gagal untuk mengembangkan imun protektif, artinya anak tersebut dapat tertular penyakit hepatitis B yang dapat menjadi kronik sampai terjadi karsinoma hepatoseluler. Kemungkinan lain anak tersebut sebagai karier hepatitis B yang dapat menularkan terhadap sesama. Namun faktor penyebab terjadinya nonrespons pada penelitian ini belum diketahui penyebabnya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih mendalam terhadap 15 subjek nonrespon tersebut.

Pada penelitian ini hasil menunjukkan bahwa polimorfisme TLR 9 dan TLR 2 genotip TT terdapat pada subjek yang anti HBs nya lebih dari 10 mIU/mL. Hal ini menjelaskan bahwa tidak hanya di reseptor awal saja yang berperan tetapi juga dalam prosesing antigennya, bagaimana presentasinya dan diferensiasi dan maturasi dari limfosit sangat berperan terhadap lama dan intensitas proteksi respon imun humoral terhadap vaksin hepatitis.

Hasil rata-rata kadar anti HBs pada subjek yang polimorfisme (TT) lebih besar dari jumlah rata2 anti-HBs pada subjek yang tidak terdapat polimorfisme hal ini memperlihatkan bahwa pada subjek yang terdapat polimorfisme TLR9 dan TLR 2 berusaha untuk menjaga keseimbangan tubuhnya sehingga akan melakukan kompensasi dengan berusaha meningkatkan sitokin yang berhubungan dengan respon imun tubuh, agar kadar anti HBs nya didapatkan lebih meningkat.

Kemungkinannya gen yang mengalami polimorfisme mengubah afinitas atau daya reseptor terhadap antigen vaksin dibandingkan dengan yang tidak mutasi, sehingga dengan *attachment* dari reseptor menjadi lebih imunogenik. Kemungkinan lain melibatkan aktivitas yang tergantung pada proteosom, yaitu merupakan suatu protease multi subunit yang melakukan degradasi berbagai protein sitoplasmik dan protein inti yang sebelumnya telah ditandai oleh mekanisme poliubiquitinasi. Berdasarkan dugaan di atas maka, mengapa titer anti-HBs justru ditemukan sangat tinggi pada individu yang memiliki polimorfisme.

Pemeriksaan untuk melihat polimorfisme pada gen TLR 2 dan TLR 9, pada penelitian ini adalah menggunakan pemeriksaan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), suatu pemeriksaan teknik biologi molekular untuk membandingkan DNA dari 2 sampel. Digunakan enzim khusus yang pada penelitian ini untuk gen TLR 9 menggunakan enzim BstnI dan untuk TLR2 menggunakan 2 macam enzim yaitu MwoI dan enzim MspI, karena untuk melihat titik lokasi ditempat yang berlainan. Kekurangannya dari pemeriksaan RFLP banyak faktor yang mempengaruhi, seperti sebagai kontrol nya, dan angka kesalahan pemeriksaan sekitar 3%. Sehingga harus di cek lagi dengan sekuensing sebagai gold standar. Umumnya dilakukan pada penelitian yang angka kejadiannya diatas 5 %. Dapat dikatakan bahwa penelitian ini menggunakan teknik RFLP sesuai indikasi. Pemeriksaan TLR2 dengan menggunakan enzim yang berbeda yaitu MspI, untuk melihat polimorfisme dititik yang lain. Ternyata didapatkan polimorfisme hanya 1 orang yaitu AA pada anak yang respons.

Terlihat bahwa setelah di uji dengan haplotype statistik terhadap ketiga genotip yang sudah diketahui sebelumnya yaitu pada TLR9 rs5743836, pada TLR2 rs3804099 dan rs3804100 menunjukkan bahwa terbukti haplotype (CCC, CCC*age) terbukti bahwa haplotype kombinasi *wild type* berhubungan dengan kadar anti HBs. Terlihat juga bahwa usia mempengaruhi kadar anti HBs, makin muda usia pemeriksaan kadar anti HBs, kemungkinan hasilnya lebih kecil (estimat = -11.9786). Hasil P = 0.979 menunjukkan bila dari suatu populasi diambil 100 sampel, maka 97 orang sampel akan mendapatkan hasil yang sama dengan penelitian ini, demikian pula kalau didapat kan P= 0.766 berarti apabila dari suatu populasi diambil 100 sampel, maka 76 orang akan mendapatkan hasil yang sama dengan penelitian ini.

Penelitian Ryckman, dkk, respon imun terhadap vaksinasi hepatitis B berhubungan dengan haplotype 3 SNP (rs353644, rs353630,rs7937602) lebih signifikan dari pada dihubungkan dengan lokus tunggal, dan menjelaskan bahwa haplotype merupakan prediksi terbaik untuk melihat hubungan dengan titer anti-HBs daripada marker genotype. Dikatakan bahwa analisis haplotype dapat melihat hubungan antar gen yang tidak dapat ditemukan dengan analisis genotip.

Terlihat bahwa setiap gen saling berhubungan atau mempunyai *linkage disequilibrium*, sehingga dalam melihat hubungan antar gen lebih baik memakai analisis haplotype, karena: produk protein dari gene kandidat terjadi di rantai polipeptida yang tergantung dari kombinasi asam amino, prinsip dari populasi genetik memperlihatkan bahwa variasi dalam populasi strukturnya tidak dapat dipisahkan dari haplotype, power statistik dari tes hubungan dengan data phased akan lebih jelas karena lebih terfokus.

Keterbatasan Penelitian :

1. Tidak dilakukan pemeriksaan anti HBsAg pada ibu-ibu yang diketahui anaknya mempunyai titer Anti HBs <10 mIU/mL
2. Tidak dilakukan challenge 1 kali vaksin pada anak yang nonrespons
3. Untuk melihat prevalensi respons dan nonrespons diperlukan sampel lebih banyak.
4. Penelitian ini hanya melihat polimorfisme pada satu lokus, seharusnya dilakukan terhadap lebih dari 3 lokus

Simpulan

1. Polimorfisme *gen Toll Like Receptor 9* (rs5473836) tidak berhubungan dengan kegagalan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi hepatitis B
2. Polimorfisme TLR 2 (rs3804099) tidak berhubungan dengan kegagalan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi hepatitis B.
3. Polimorfisme TLR 2 (rs3804100) tidak berhubungan dengan pembentukan respon imun pada anak pascavaksinasi Hepatitis B.
4. Haplotype kombinasi TLR9 rs5743836, TLR2 rs3804099 dan TLR2 rs3804100 berhubungan dengan kadar anti Hbs.
5. Prevalensi anak yang nonrespons didapatkan 9.4% walaupun sudah divaksinasi hepatitis B sesuai program yang dianjurkan
6. Polimorfisme gen TLR 9 dan TLR 2 didapatkan pada anak yang mempunyai kadar anti HBs yang tinggi

Daftar Pustaka

Beasley RP. *Hepatitis B virus the etiologic agent in hepatocellular carcinoma: epidemiologic considerations*. Hepatology. 1982;2: 21S-26S.

Khoury ME, Do Santos FA. *Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation*. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo. 2004;59(4):216-24.

World Health Organization. *Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Hepatitis B*. Geneva. 2002.

Subdit Imunisasi Ditjen PPM-PL, Departemen Kesehatan RI. 2002.

Marolis HS, Alter MJ, Hadler SC. *Hepatitis B: Evolving epidemiology and implications for control*. Semin Liv Dis. 1991;11: 84-92.

Hileman. *Plasma Derived Hepatitis B vaccine. Dalam: Hepatitis B vaccines in Clinical Practise*. Ad Ellis WR. Marcel Dekker. New York.1993.

World Health Organization, UNICEF, The World Bank. *State of the World's Vaccines and Immunization*. Geneva.WHO. 2002.

Brown SC, Stanley C, Howard CR. *Antibody responds to recombinant and plasma derived hepatitis B vaccine*. Br Med J.

1986;292(6514):159-161.

Kimman TG, Vandebriel RJ, Hoebee B. *Genetic Variation in the Response to Vaccination*. Comm Genet. 2007;10:201-217.

Craven DE, Awdeh ZL, Kunches LJ, Junis EJ, Dienstag JL, Werner BG. *Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine in health workers. Result of Vaccination and Genetic Typings*. Ann Intern Med.1986;105;356-360.

Yuwono D. *The impact of hepatitis B recombinant immunization against vertical infection among infants in Bandung, West Java*. Badan Litbang Kesehatan. 2001.

Zuckerman JN, Cockcroft A, Zuckerman AJ. *Site of injection for vaccination*. BMJ.1992;305:1158.

Alper CA, Kruskall MS, Bagley MD, dkk. *Genetic prediction of non response to hepatitis B Vaccine*. N Engl J Med.1989; 321(11):708-712.

Poland GA, Jacobson RM: *The genetic basis variation in antibody response to vaccines*. Curr Opin Pediatr.1998;10:208-215.

Van Duin D, Medshitov R, Shaw AC. *Triggering TLR Signaling in Vaccination*. Trends in Immunology. 2006;27(1):49-55.

Takeda K, Akira S. *TLR Signaling Pathway*. Seminar in Immunology. 2004;16:3-9.

Jiunn-Liu Ko. *Dendritic cell, Toll like receptor and the Immune system*. Journal of Cancer Molecules. 2006;2(6):213-215.

Jia N, Xie Q, Lin L, Gui H, Wang H, Jiang S, dkk. *Common variant of TLR9 gene influence the clinical course of HBV infection*. Molecular medicine report. 2009;2:277-281.

Davis LD, Weeranta R, Waldschmidt JT, Tygrett L, Shrorr J, Kieg M. *CpG DNA Is a Potent Enhancer os Specific Immunity in Mice Immunized with Recombinant Hepatitis B Surface Antigen*. The Journal Of Immunology. 1998;160:870-876.

Chuang TH, Lee J, Kline L. *Toll Like Receptor 9 mediated CpG-DNA signaling*. J Leukoc Biol. 2002;71:538-544.

Nascimento LO, Massari P, Wetzler LM. *The Role of TLR2 in infection and immunity*. www.frontiersin.org. Review Article. Published: 18 April 2012.

Kurose SK, Akbar F, Yamamoto K, Onji M. *Production of antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) by murine hepatitis B virus carriers: neonatal tolerance versus antigen presentation by dendritic cells*. Immunology. 1997;92 (4):494-500.

Ryckman K, Fielding K, Hill AV. *Host genetic factors and vaccine induced immunity to HBV Infection: haplotype Analysisis*.

Clark.AG. *The Role of Haplotypes in Candiddate Gene Studies*. Genetic Epidemiology. 2004;27:321-333.