

Artikel asli

## SEKRESI INTERLEUKIN-8 (IL-8) DAN HUBUNGANNYA DENGAN TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT INFEKSI DENGUE

\*DM Wihandani, \*NN Ayu Dewi, \*\*Agus Somia

\*Bagian Biokimia FK Unud Denpasar, \*\*Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK Unud/RSUP Sanglah  
Denpasar

e-mail: dmwihandani@yahoo.co.id

ABSTRACT

### INTERLEUKIN-8 (IL-8) SECRETION AND RELATION WITH THE SEVERITY OF DENGUE INFECTION

Elevation of IL-8 was found in many viral infection include dengue infection and related to the increases of illness gradation. The aim of study is to know the secretion of IL-8 and the relation with the severity of the disease that caused by dengue viral infection that hospitalized at Sanglah hospital. There were 58 patients that diagnosed with dengue haemorrhagic fever based on WHO criterion. Those samples consist of 38 patients of DHF grade I (mild) and 20 patients of DHF grade II, III and IV (severe). Serum was taken and then the level of IL-8 was examined by ELISA method with microplate reader in 450 nm wave length (bioMerieux Reader 250). The data was analyze statistically with non parametric measurement. The result showed that there were significant differences of IL-8 level between healthy people (control) and samples, and between mild and severe patients. We conclude that increase of IL-8 level related to severity of dengue viral infection.

Keywords: Interleukin-8, dengue infection, ELISA

### PENDAHULUAN

Demam dengue dan demam berdarah dengue merupakan penyakit virus endemis di negara-negara tropis dan sub tropis. Penyakit ini disebabkan oleh empat serotipe virus dengue yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Virus dengue serotipe 3 merupakan serotipe yang paling dominan dan erat hubungannya dengan kasus yang berat bahkan kematian.<sup>1</sup>

Infeksi virus dengue pada manusia mengakibatkan suatu spektrum manifestasi klinis yang bervariasi antara penyakit paling ringan (*mild undifferentiated febrile illness*), demam dengue (DD), demam

berdarah dengue (DBD/*dengue haemorrhagic fever*) dan demam berdarah dengue disertai renjatan (*dengue shock syndrome/DSS*).<sup>2</sup> Gambaran klinis demam berdarah dengue berat antara lain perdarahan, hepatomegali dan kebocoran plasma. Produksi sitokin dan aktivasi sel T merupakan hal penting dalam patogenesis demam berdarah dengue.<sup>3</sup>

Diperkirakan lebih dari 50 juta infeksi virus dengue terjadi di seluruh dunia setiap tahun.<sup>4</sup> Di Rumah Sakit Sanglah selama 5 tahun (1997 – 2002) didapatkan 6906 kasus DD dan DBD, terbanyak pada awal tahun 2002 (Januari – April, 2379 kasus) atau terjadi peningkatan sekitar sepuluh kali lipat dibandingkan periode yang

sama tahun sebelumnya.<sup>5</sup> Penelitian oleh Mahendra *et al.*<sup>6</sup> pada bulan April 2001 – Maret 2002 didapatkan 1830 pasien DBD, sebanyak 9 kasus datang dengan *grade* 4, sebanyak 7 diantaranya meninggal (*case fatality rate* 0,38%).

Infeksi virus dengue *in vitro* pada sel myeloid ataupun sel endotel manusia dilaporkan dapat memicu sekresi berbagai khemokin seperti MIP-1 $\alpha$ , MIP-1b dan interleukin-8.<sup>7</sup> Pasien dengan infeksi dengue akut dilaporkan mengalami peningkatan ekspresi gen khemokin dalam darah perifer. Hal ini diduga berkontribusi pada inflamasi dan patogenesis penyakit, akan tetapi mekanismenya belum jelas. Peningkatan kadar khemokin dalam sirkulasi berkontribusi terhadap patogenesis penyakit dengue.<sup>8</sup>

Peningkatan kadar interleukin-8 (IL-8) ditemukan pada berbagai infeksi virus termasuk dengue. Peningkatan kadar IL-8 dalam serum dan RNA IL-8 dalam monosit berkaitan dengan peningkatan keparahan demam berdarah dengue. Hal ini menunjukkan bahwa IL-8 kemungkinan memegang peranan penting dalam peningkatan derajat keparahan dan bahkan kematian. Koagulopati intravaskuler yang ditemukan pada demam berdarah dengue kemungkinan juga merupakan efek dari IL-8. Kadar IL-8 lokal yang tinggi juga berkaitan dengan efusi pleura.<sup>9</sup> Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk mencari hubungan antara derajat keparahan infeksi dengue dengan kadar IL-8, sehingga hal ini dapat menjadi indikator yang berguna untuk memperkirakan dampak serius dari infeksi dengue.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian ini merupakan studi *cross sectional* analitik yang dilakukan terhadap penderita infeksi dengue yang dirawat di RS Sanglah. Populasi penelitian adalah penderita infeksi dengue yang dirawat di RS Sanglah Denpasar, yang memenuhi kriteria sebagai berikut: (1) Penderita infeksi dengue yang ditegakkan

berdasarkan kriteria diagnosa kerja DBD menurut WHO tahun 1997 dan hasil serologi dengue positif, (2) Dirawat di RS Sanglah Denpasar dan (3) Bersedia ikut serta dalam penelitian yang dinyatakan dengan *informed consent*.

Perkiraan besar sampel minimal untuk penelitian ini dihitung dengan rumus:

$$N = 2 \left( \frac{z_{\alpha} + z_{\beta}}{\mu_1 - \mu_2} \right)^2 \delta^2$$

Dari rumus tersebut diperoleh jumlah sampel minimal yang harus dipenuhi sebesar 58 sampel. Cara pemilihan sampel dilakukan secara konsekutif, di mana semua subyek yang datang dan memenuhi kriteria pemilihan dimasukkan dalam penelitian sampai jumlah sampel yang diperlukan terpenuhi. Data yang diperoleh dari penelitian dianalisa dengan uji nonparametrik menggunakan komputer.

Darah kontrol dan pasien sebanyak 2 ml ditampung dalam tabung dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan serum. Serum disimpan pada suhu -20°C sebelum dipergunakan.

*Standard Diluent Buffer* sebanyak 50  $\mu$ l dimasukkan ke dalam masing-masing *well*, kecuali *well* untuk *blanko* dibiarkan kosong. Selanjutnya dimasukkan 50  $\mu$ l standar (0; 31,2; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pg/mL), serum kontrol dan serum pasien ke *well* yang sesuai dan ditambahkan 50  $\mu$ l *biotinylated anti IL-8*. *Plate* ditutup dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1,5 jam. Cairan di dalam *well* dibuang dan dicuci sebanyak 4 kali menggunakan *washing buffer*. *Streptavidin-HRP working solution* sebanyak 100  $\mu$ l dimasukkan ke dalam masing-masing *well* kecuali *well* untuk *blanko*. *Plate* ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Cairan dibuang dan *well* dicuci sebanyak 4

kali menggunakan *washing buffer*. Selanjutnya ke dalam semua *well* ditambahkan 100  $\mu$ l *stabilized chromogen* dan diinkubasi pada suhu kamar dan tempat gelap selama 30 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan *stop solution* sebanyak 100  $\mu$ l ke dalam semua *well* dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm. Pengukuran kadar IL-8 dilakukan dengan cara membuat kurva standar kadar IL-8 terlebih dahulu.

## HASIL

Pasien sejumlah 58 orang yang didiagnosa menderita infeksi dengue berdasarkan diagnosa kerja menurut WHO (1997) dan ditunjang hasil serologi dengue positif dijadikan sampel dalam penelitian ini. Sampel tersebut terdiri dari 38 pasien derajat ringan (DBD *grade* I) dan 20 orang pasien derajat berat (13 pasien DBD *grade* II, 6 pasien *grade* III dan 1 pasien *grade* IV). Orang sehat yang dipergunakan sebagai kontrol negatif sebanyak 30 orang. Darah kontrol dan sampel diambil serumnya dan diukur kadar IL-8 menggunakan metode ELISA.

Pada penelitian ini digunakan metode ELISA untuk mengetahui kadar IL-8 dalam serum (kontrol negatif maupun sampel). *Plate* yang telah *dicoated* dengan anti IL-8 akan berikatan dengan IL-8 dalam serum dan direaksikan dengan anti IL-8 berlabel biotin yang akan berikatan dengan streptavidin-peroksidase dan selanjutnya ditambahkan kromogen sehingga menghasilkan warna dengan intensitas yang berbeda. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan *microplate reader* dan dibuat kurva standar sehingga kadar IL-8 pada kontrol maupun sampel dapat dihitung.

Kadar IL-8 pada serum kontrol negatif berkisar antara 0,01 – 0,14 ng/mL dengan rata-rata 0,02 ng/mL. Pada sampel derajat ringan (DBD *grade* I), kadar IL-8 berkisar antara 0,03 – 2,79 ng/mL dengan rata-rata 0,74 ng/mL. Kadar IL-8 pada derajat berat (DBD *grade* II, III dan IV) berkisar antara 0,02 – 3,47 ng/mL dan rata-

rata 2,24 ng/mL (tabel 1). Rata-rata kadar IL-8 pada sampel (derajat ringan dan berat) menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan rata-rata kadar IL-8 pada kontrol negatif dan rata-rata kadar IL-8 pada sampel derajat berat lebih tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata kadar IL-8 pada sampel derajat ringan.

Kadar IL-8 dari kontrol, pasien derajat ringan dan berat selanjutnya dianalisa dengan uji non parametrik menggunakan program SPSS 11,5. Kadar IL-8 kontrol negatif, derajat ringan dan berat menunjukkan perbedaan nilai yang signifikan ( $P < 0,05$ ). Perbedaan yang signifikan juga ditunjukkan antara derajat ringan dan berat. Hal ini menggambarkan bahwa peningkatan kadar IL-8 berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit infeksi dengue.

Tabel 1. Kadar IL-8 pada kontrol negatif dan sampel

Kelompok	IL-8		
	Jumlah	Kisaran (ng/mL)	Rerata (ng/mL)
Kontrol negatif	30	0,01- 0,14	0,02
Derajat ringan	38	0,03-2,79	0,74
Derajat berat	20	0,02-3,47	2,24

## PEMBAHASAN

Infeksi virus dengue yang berat dapat menyebabkan DBD atau DSS, suatu sindrom *plasma leakage* yang potensial berakibat fatal. Salah satu kejadian selama inflamasi adalah terjadinya *vascular leakage* yang berhubungan dengan mediator-mediator yang disekresikan oleh sel dalam sirkulasi. Respon imun terhadap inflamasi menyebabkan perkembangan penyakit ke arah berat. Limfosit, monosit dan makrofag, sel *mast*, sel endotel, sel hepar dan sel dendritik merupakan target virus dengue dan sel-sel tersebut dapat

menghasilkan sitokin setelah terjadinya infeksi virus dengue. Interleukin-8, suatu sitokin dengan efek *proinflammatory*, memiliki aktivitas *chemoattractant*, disekresikan oleh berbagai macam tipe sel dan berperan dalam inflamasi, penyembuhan luka, angiogenesis, metastasis dan *lymphoid trafficking*. Peningkatan kadar IL-8 ditemukan pada pasien dengan infeksi virus dengue yang berat.<sup>10,11</sup>

Patogenesis infeksi dengue dapat dibagi ke dalam dua kategori yaitu: (1) virus dengue memiliki sifat tertentu, hal ini berkaitan dengan virulensi virus dan serotipe virus dengue, dan (2) manusia yang terinfeksi mengalami suatu proses imunologi yang berakibat kebocoran plasma, perdarahan dan berbagai manifestasi klinik. Pada berbagai penyakit infeksi termasuk infeksi dengue ditemukan peningkatan kadar IL-8. Peningkatan kadar IL-8 dalam serum dan RNA IL-8 dalam monosit berkaitan dengan peningkatan keparahan infeksi dengue. Hal ini menunjukkan bahwa IL-8 kemungkinan memegang peranan penting dalam peningkatan derajat keparahan dan bahkan kematian. Koagulopati intravaskuler yang ditemukan pada demam berdarah dengue kemungkinan juga merupakan efek dari IL-8. Kadar IL-8 lokal yang tinggi juga berkaitan dengan efusi pleura.<sup>9</sup>

Biffi *et al.*<sup>12</sup> melaporkan bahwa *plasma leakage* pada kasus DBD berkaitan dengan peningkatan kadar berbagai sitokin dalam plasma. Interleukin-8 meningkatkan permeabilitas sel endotel. Pasien dengan infeksi dengue akut menunjukkan peningkatan kadar khemokin dalam darah atau cairan pleura dan ekspresi gen khemokin dalam *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Hal ini diduga memberikan kontribusi terhadap inflamasi dan patogenesis penyakit, meskipun mekanisme induksi khemokin oleh virus dengue tersebut belum dapat dijelaskan.<sup>11</sup>

## KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat perbedaan kadar IL-8 antara serum kontrol negatif, sampel derajat ringan dan berat yaitu rata-rata kadar IL-8 pada kontrol negatif sebesar 0,02 ng/mL, pada sampel derajat ringan 0,74 ng/mL dan pada derajat berat 2,24 ng/mL. Kadar IL-8 pada kontrol negatif lebih rendah dibandingkan sampel dan pada derajat ringan lebih rendah dibandingkan derajat berat. Perbedaan nilai ini signifikan secara statistik ( $P < 0,05$ ), menunjukkan bahwa peningkatan kadar IL-8 berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit infeksi dengue.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Wuryadi S. Isolasi virus dengue dari penderita demam berdarah dengue pada waktu wabah di Jakarta tahun 1988. *Cermin Dunia Kedokteran* 1990;60:27-30.
2. Soedarmo SP. Demam berdarah dengue. *Medika* 1995;10(XXI):798-808.
3. Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot CF, Rocha MC, Vazeille-Falcoz MW, Wien FA, et al. Determination in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 2000;274:292-308.
4. Rothman AL. Dengue, defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004;113:946-51.
5. Biran SI, Saraswati R, Parwati T, Kerti D. Dengue fever/dengue hemorrhagic fever at Sanglah Hospital January 1997 – April 2002, correlation with rainfall. Dalam Buku Abstrak Kongres Nasional Petri VIII, Perpari V, PKWI V; 19-21 Juli 2002, Malang.
6. Mahendra IB, Parwati T, Biran SI. The epidemiologic study of dengue haemorrhagic

fever in adult patient at Sanglah General Hospital. Dalam Buku Abstrak Kongres Nasional Petri VIII, Perpari V, PKWI V; 19-21 Juli 2002, Malang.

7. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol* 2002;76:9877-87.
8. Medin LC, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol* 2005;11053-61.
9. Chaturvedi UC, R Agarwal EA, Elbishbishi AS, Mustafa. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis.

*FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2000;28:183-8.

10. Juffrie M, Van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJP, Thijs LG. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infection and Immunity* 2000;68(2):702-7.
11. Bosch I, Khaja K, Estevez L, Raines G, Melichar H, Warke RV, et al. Increased production of interleukin-8 in primary human monocytes and in human epithelial and endothelial cell lines after dengue virus challenge. *J Virol* 2002;76(11):5588-97.
12. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Franciose RJ, Banerjee A. Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. *J Trauma* 1995;39(1):98-103.

---

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*

*J Peny Dalam, Volume 10 Nomor 1 Januari 2009*