

IDENTIFIKASI TIPE HLA KELAS II DENGAN TEKNIK PCR

Ervi Salwati *

Abstract

HLA (Human Leukocyte Antigen) contains a set of genes located together on the short arm of chromosome 6. These genes control immune responses, graft acceptance or rejection and tumor surveillance. These abilities have close relationship with genetic variation (occur in "many forms" or alleles) that bind and present antigens to T lymphocytes.

Using advanced technology and molecular biology approaches (PCR technique) detection of genetic variation in the HLA region (or HLA typing) has been performed based on DNA. PCR is an in vitro technique to amplify the DNA sequence enzymatically. "Sequence Specific Primers" (SSP) are designed for this PCR to obtain amplification of specific alleles or groups of alleles. The PCR products are visualized through agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

The PCR technique requires small amount of whole blood (0.5 - 1 ml), gives rapid, accurate and complete result. This paper discuss identification of HLA class II typing using PCR-SSP technique and show the examples of the results.

Key words: *HLA (Human Leukocyte Antigen) class II, PCR (Polymerase Chain Reaction)*

Pendahuluan

HLA adalah singkatan dari Human Leukocyte Antigen atau disebut juga MHC (Major Histocompatibility Complex). MHC mengandung satu set gen (sekurang-kurangnya 200 gen) yang terletak bersama pada satu kromosom yaitu pada lengan pendek kromosom nomor 6. Gen MHC menyandi molekul MHC kelas I, kelas II, dan kelas III. MHC kelas I mengandung gen yang menyandi HLA-A, -B, -C, -E, H, G dan F, kelas II mengandung gen yang menyandi HLA-DRB1, -DRB3/4/5, DQA1, -DQB1, dan DPB1, dan MHC kelas III mengandung gen yang menyandi komplemen, TNF (Tumor Necrosis Factor) dan HSP (Heat Shock Protein)^{1,2}.

Molekul MHC kelas I dan II sebagian besar diekspresikan sebagai glikoprotein membran pada permukaan sel. MHC kelas I ditemukan pada permukaan sel somatik dan sel-sel berinti, MHC kelas II ditemukan terutama pada permukaan sel sistem imun seperti limfosit B, makrofag, dan monosit. MHC kelas III biasanya merupakan molekul yang dapat larut¹.

HLA/MHC memegang peranan penting dalam mengatur respon imun (seluler dan humoral) terhadap patogen yang masuk, reaksi penolakan / penerimaan terhadap organ yang ditransplantasikan dan surveilans tumor². HLA/MHC kelas II yang berperan sebagai gen respon imun terutama terlibat pada aktivasi sel T helper (CD4+). Kemampuan ini erat hubungannya dengan variasi gen (alel) yang terdapat pada

* Peneliti Puslitbang Pemberantasan Penyakit, Badan Litbangkes

HLA/MHC dalam mengikat dan mempresentasikan antigen terhadap sel limfosit T³.

HLA typing merupakan istilah untuk penentuan variasi genetik pada daerah HLA yang tujuannya antara lain adalah: untuk melakukan identifikasi gen atau molekul HLA spesifik yang berhubungan dengan (a) antigen pada jaringan transplantasi yaitu dalam menentukan kompatibilitas jaringan antara donor dan resipien (b) genetik antara grup etnik dalam suatu populasi^{4,5} (c) penyakit tertentu atau kerentanan seseorang terhadap suatu penyakit (d) ekspresi epitop peptida yang berguna untuk pengembangan vaksin (e) untuk uji paternitas dan (f) analisa forensik^{6,7,8,9}.

Identifikasi / penentuan tipe HLA (HLA typing) kelas II telah sejak lama dilakukan secara serologis. Cara ini mempunyai kelemahan karena pemeriksaan serologis dengan menggunakan antibodi (berarti mengidentifikasi produk gen HLA yang diekspresikan pada permukaan sel), sangat tergantung pada antibodi (anti-HLA) yang digunakan⁴. Di samping itu, pemrosesan sampel sampai didapatkan hasil membutuhkan waktu lama (sekurang-kurangnya 8 jam) dan darah yang digunakan banyak (lebih dari 20 ml) karena sel limfosit B harus dipisahkan lebih dahulu dari sel limfosit T¹⁰. Dengan pemeriksaan serologis hasil (typing) yang didapat tidak lengkap, karena beberapa molekul HLA untuk antisera spesifik tidak muncul^{4,5}.

Saat ini, dengan kemajuan teknologi dan perkembangan biologi molekuler, telah dikembangkan metoda alternatif untuk mengatasi keterbatasan seperti telah disebutkan di atas, antara lain dengan teknik yang didasarkan atas amplifikasi DNA menggunakan reaksi berantai polimerase (Polymerase Chain Reaction / PCR).

PCR merupakan suatu teknik *in vitro* untuk memperbanyak sikuen DNA yang sama secara enzimatis dengan waktu yang cepat. Dengan teknik ini darah yang diperlukan sedikit (0.5-1 ml). Penentuan tipe HLA kelas II menggunakan teknik PCR beserta contohnya akan dibahas dalam makalah ini.

Identifikasi Tipe HLA (HLA Typing) dengan Teknik PCR

Ada 4 tahap yang dilakukan:

Tahap I. Isolasi DNA

Tahap II. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Tahap III. Visualisasi produk PCR dengan elektroforesis

Tahap IV. Interpretasi data

Tahap I. Isolasi DNA

1. Sumber DNA. Sel limfosit B (baca inti) merupakan salah satu sumber DNA untuk HLA kelas II yang bisa diisolasi dari darah (*whole blood*), dan dari sel beku.
2. Reagen untuk isolasi DNA
 - a. Larutan A: larutan A disebut juga larutan pelisis karena larutan ini berguna untuk melisis sel darah merah. Jika materi awal adalah darah (*whole blood*) penambahan larutan ini sangat penting untuk membuang hemoglobin yang dilepaskan oleh sel darah merah karena adanya hemoglobin akan mempengaruhi reaksi amplifikasi gen⁵. EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) yang terdapat dalam larutan ini juga berfungsi sebagai protease inhibitor yang sangat penting untuk mengontrol proteolisis yang tidak diinginkan¹¹. Larutan A terdiri dari: 6.35 g NH₄CL, 1.33 g EDTA, 0.92 g Trizma / 500 ml ddH₂O PH 7.2. Ditambahkan ddH₂O sampai volume 1 liter.
 - b. Proteinase K: adalah suatu enzim yang menghancurkan protein⁵. Dengan penambahan ini DNA dibebaskan dari protein yang terikat. Konsentrasi DNA yang dipakai adalah 20 mg/ml
 - c. SDS (Sodium Duodecyl Sulfate): adalah suatu detergen yang dapat melisis dinding sel untuk melepaskan nukleus⁵. Konsentrasi SDS yang dipakai 10%.

- d. Guanidine Chlorida: adalah suatu zat yang diperlukan untuk memurnikan DNA. Konsentrasi Guanidine Chlorida yang dipakai $7.5 M^5$.
3. Cara mengisolasi DNA
(3.1) Dari darah (*whole blood*)
- sebanyak 0.5-1 ml darah diambil dan dimasukkan ke dalam tabung ACD-A/B (berisi antikoagulan ACD/Acid Citrate Dextrose) kemudian digoyang-goyang supaya homogen.
 - darah disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit.
 - lapisan putih (*buffy coat*) sebanyak 500 ul diambil dan ditambahkan 1 ml larutan pelisis (larutan A).
 - campuran ini disentrifugasi pada 5000 rpm, 1 menit, dan supernatan dibuang. Langkah ini diulangi sampai semua sel darah merah lisis (tidak lebih dari 3 kali).
 - terhadap pelet yang didapat (mengandung sel-sel limfosit) ditambahkan reagen-reagen di bawah ini sesuai dengan volume pelet tersebut.

Volume pelet	100-50 ul	50-25 ul	25-20 ul
DDH ₂ O	800 ul	400 ul	300 ul
Proteinase K (20 mg/ml)	40 ul	20 ul	12 ul
SDS 10%	300 ul	150 ul	105 ul
Guanidine-HCl, 7.5 M	3000 ul	150 ul	105 ul

- ke dalam pelet ditambahkan berturut-turut DDH₂O, proteinase K, SDS 10%, Guanidine HCL 7.5M (divorteks setiap selesai pencampuran zat).
- campuran diinkubasi pada suhu 68-70°C selama 15 menit (setelah 10 menit campuran digoyang supaya homogen).

- campuran disentrifugasi 10.000 rpm selama 4 menit. Supernatan ditransfer ke 1.7 ml tabung eppendorf. Jika supernatan masih keruh tahap (g-h) harus diulangi.
- supernatan yang mengandung DNA ini dipresipitasi yaitu dengan menambahkan etanol 100% dan menggoyang tabung bolak-balik menggunakan tangan. Kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifuga yang mempunyai kecepatan tinggi (Eppendorf, centrifuge 5415) 14.000 rpm, 2 menit, supernatan dibuang.
- diulangi dengan etanol 70%, disentrifugasi 14.000 rpm, 2 menit, supernatan dibuang.
- pelet DNA (ada di dasar tabung) dikeringkan dengan membalikkan tabung di atas kertas tisu selama 2 menit
- DNA disuspensi dengan 100 ul DDH₂O dan diinkubasi pada suhu 68-70°C selama 5-30 menit.
- konsentrasi dan kemurnian DNA ditentukan dengan mengukur rapat optiknya (*optical density*) menggunakan spektrofotometer (Beckman DU-6) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.
- DNA bisa disimpan pada refrigerator bila tes untuk identifikasi akan dilakukan dalam waktu tidak terlalu lama (di bawah 6 bulan) atau direvco (-70°C) untuk penyimpanan dalam jangka panjang (di atas 6 bulan) ⁽¹⁴⁾

(3.2) Dari sel beku

DNA dapat diisolasi dari sel limfosit yang telah dibekukan (-70°C).

- sel beku (pellet) dicuci dalam PBS sebanyak 500 ml yaitu dengan jalan mensentrifugasi pada 5000 rpm selama 1 menit dan supernatan dibuang.
- Terhadap sel pellet ditambahkan larutan A, vorteks dan didiamkan selama 2 menit.

- c. disentrifugasi pada 5000 rpm selama 1 menit dan supernatan dibuang.
- d. sel pellet selanjutnya diproses dengan penambahan DDH₂O, Proteinase K, SDS 10% dan seterusnya seperti di atas (14)

Tahap II. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Amplifikasi DNA secara enzimatis ini menggunakan enzim DNA polimerase dan 2 primer Oligonukleotida yang menghibridisasi DNA rantai tunggal dari arah yang berlawanan sehingga ke-2 primer tersebut mengapit sikuen DNA spesifik yang akan diamplifikasi (sikuen target) ⁷. Karena kebanyakan polimorfisme (banyak bentuk / alel) kelas II terdapat pada *exon* ke-2 maka primer biasanya dirancang mengapit bagian ini untuk diamplifikasi ⁴.

Amplifikasi ini, didasarkan pada pengulangan suatu siklus yang terdiri dari 3 tahap yang masing-masing berhubungan dengan kondisi temperatur yang terkontrol yaitu:

1. Tahap denaturasi DNA cetakan (*template denaturation*), adalah suatu tahap pemisahan DNA rantai ganda cetakan menjadi DNA tunggal melalui proses inkubasi pada temperatur 94-98°C.
2. Tahap penempelan primer (*primer annealing*), adalah tahap hibridisasi (penempelan) antara primer dan sikuen DNA spesifik. Hanya alel atau kelompok alel (gen) spesifik saja yang akan terhibridisasi. Tahap ini berlangsung pada suhu sekitar 45-60°C.
3. Tahap ekstensi (*extension*), adalah tahap perpanjangan hibridisasi (dari tahap 2) dengan adanya aktivitas DNA polimerase. Temperatur berkisar antara 72-75°.

Hasil amplifikasi DNA pada siklus pertama dapat berfungsi sebagai cetakan bagi siklus berikutnya dan seterusnya, sehingga jika dilakukan sebanyak 'n' siklus dalam suatu reaksi PCR maka akan didapat

penggandaan DNA (baca gen) sebanyak 2ⁿ amplifikasi ⁷. Prosedur teknik PCR telah diotomatisasi oleh suatu alat yang disebut *thermal cycler* (Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600).

Cara kerja

1. Membagi campuran amplifikasi menjadi volume kecil-kecil (aliquot)

Campuran amplifikasi (reaksi PCR) diperoleh dari UCLA (University California Los Angeles). Di dalam campuran tersebut sudah termasuk primer yang telah dirancang untuk mendapatkan amplifikasi alel atau kelompok alel spesifik (SSP / Sequence Specific Primers). Campuran reaksi PCR terdiri dari 24 tabung yang berisi campuran 1 sampai dengan 18 (MIX1 s/d MIX18) untuk HLA DRB (DRB1, DRB3, DRB4, dan DRB5) dan 6 tabung berisi campuran 19 sampai dengan 24 (MIX19 s/d MIX 24) untuk HLA DQB1. Reaksi PCR dialiquot (dibagi kecil-kecil) menjadi 5 ul ke setiap tabung PCR dan ditambahkan 10 ul mineral oil. Campuran yang sudah dialiquot ini disimpan pada -20°C atau -80 °C sampai digunakan.

2. Amplifikasi sampel DNA.
 - a. sampel DNA dibuat pada konsentrasi 40 ug/ml dengan pengencer DDH₂O.
 - b. diambil 130 ul dan sampel DNA ditambahkan 3 ul kontrol positif, *β-actin* (termasuk di dalam kit), ukuran pita DNA pada posisi 505 bp.
 - c. campuran sampel DNA ini diletakkan di atas *sand block* (Fisher Scientific) selama 5 menit pada suhu 94°C dan segera diletakkan di atas es.
 - d. ditambahkan 2 ul *Taq DNA Polymerase*.
 - e. campuran ini sebanyak 5 ul ditambahkan ke setiap campuran reaksi PCR yang telah dialiquot sebelumnya.

- f. divorteks dan ditempatkan pada *PCR thermal cyclers* selama 32 siklus dengan menggunakan parameter berikut:

denaturasi 95°C, 1 menit
annealing 57°C, 30 detik
extention 73°C, 30 detik

Tahap III. Visualisasi produk PCR dengan SDS-PAGE

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) melalui gel agarose merupakan metoda standar untuk memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA⁵. Fragmen DNA diidentifikasi melalui ukurannya (dalam satuan bp atau base pairs / pasangan basa) berdasarkan ukuran penanda (marker) DNA.

1. Penyediaan gel agarose 3%
 - a. dalam tabung erlenmeyer nusieve agarose sebanyak 3 g dilarutkan dalam 100 ml buffer TBE 1x dengan mikrowave selama 5 menit. Tabung digoyang-goyang supaya terlarut merata.
 - b. setelah agak dingin ditambahkan 10 ul ethidium bromide (10 mg/ml) dan dituangkan ke *gel-casting tray* yang telah diletakkan sisir yang mempunyai 26 sumur di atasnya. Gel dibiarkan dingin selama 1 jam.
 - c. sisir diangkat dan gel ditempatkan pada tank elektroforesis.
2. *Loading buffer*
 - a. ke dalam tabung yang berisi produk PCR ditambahkan 2 ul *loading buffer*.
 - b. dua sumur diisi dengan 10 ul penanda DNA (Phi-X 174 Hae fragment posisi 72 - 310 bp sedangkan sisa sumur (24 sumur) diisi dengan 10 ul sampel (produk PCR).
 - c. pada posisi bagian bawah tank ditambahkan 5 ul ethidium bromide DNA bergerak ke kutub positif

karena DNA itu sendiri bermuatan negatif. *Power supply* dinyalakan dan voltase diset pada 150 V selama 30 menit.

Tahap IV. Interpretasi Data

1. Fotodokumentasi

Gel yang telah selesai dijalankan dipindahkan dari *casting-tray* ke *transilluminator* lampu UV atau *gel doc SOP Molpar* (Biorad Gel doc 2000) secara komputersasi. DNA yang terikat dengan ethidium bromide dengan bantuan sinar UV akan terlihat. Kemudian diambil fotonya untuk dokumentasi.
2. Interpretasi hasil

Interpretasi data dibantu oleh lembaran isian data yang telah disediakan. Di lembaran tersebut sudah tercantum angka-angka (disebut nomor alel) pada setiap pita. Langkah-langkah yang harus dilakukan adalah sebagai berikut:

- a.. Pita-pita (DNA) yang terlihat difoto dapat diketahui ukurannya berdasarkan ukuran pada penanda DNA.
- b. Kemudian terhadap pita-pita tersebut diberi angka 1,2,4,6, dan 8 untuk menandai tingkat ketajaman dari masing-masing pita.
- c. Menentukan alel-alel yang terdapat pada HLA-DR dan HLA-DQ berdasarkan nomor yang terdapat pada masing-masing pita
- d. Menetapkan haplotip (separoh dari penampilan genetik) HLA-DR dan HLA-DQ seperti terlihat pada tabel.

3. Contoh hasil HLA typing dengan teknik PCR.

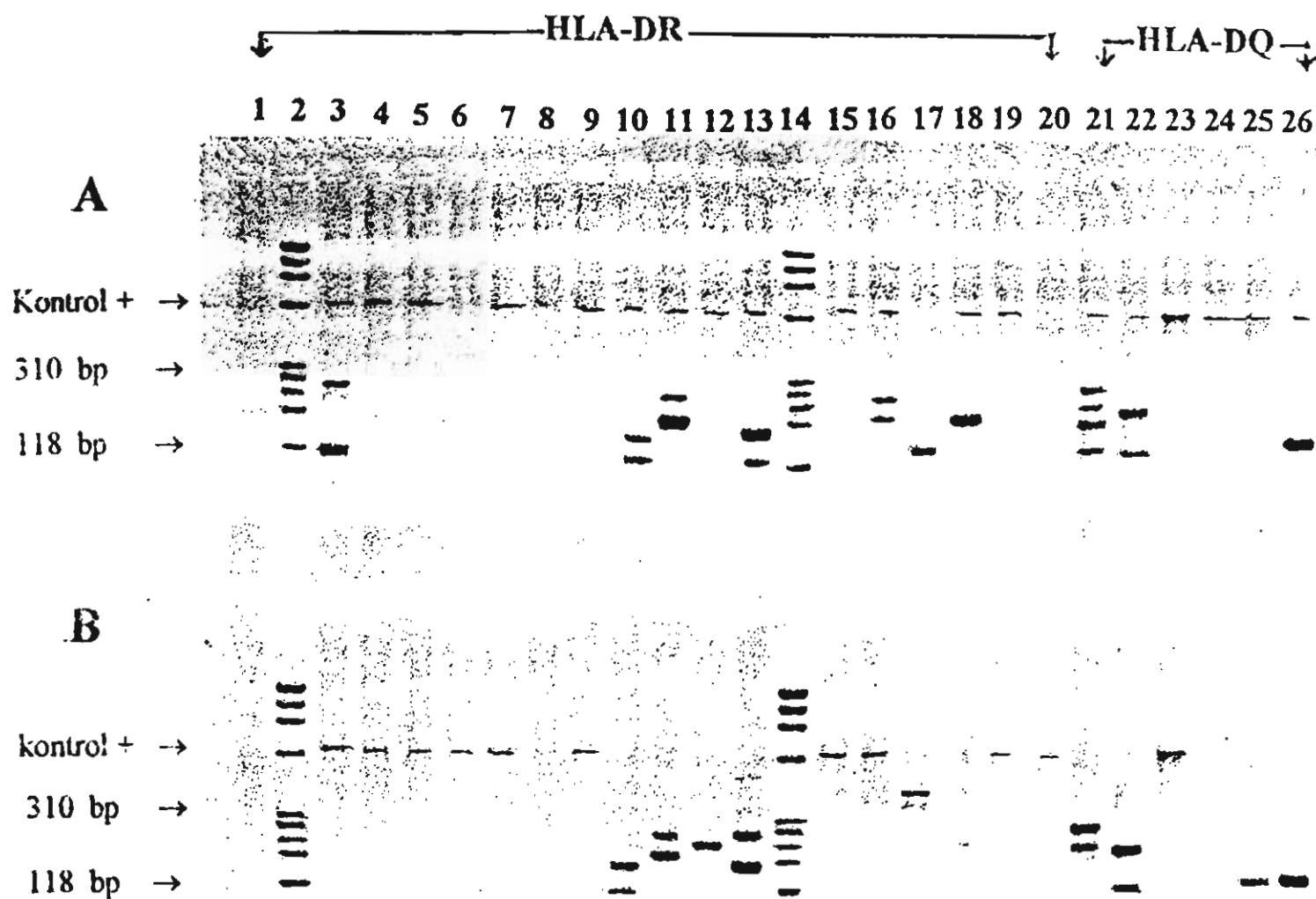
Di bawah ini adalah contoh dari 2 sampel (A dan B) yang telah dilakukan di Puslit Pemberantasan Penyakit, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan bekerja sama dengan Naval Medical Research Unit-2 (Namru-2), Jakarta dalam rangka penelitian ke arah pengembangan vaksin malaria.

Tabel . Beberapa contoh hubungan haplotip HLA-DR dan HLA-DQ

DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQB1
1201	0202			0301
1202	0101			0503
1202	0101			0301
1202	0301			0301
1302	0202			0604
1303	0101			0301
1401	0202			0502
1402	0202			0301
1403	0101			0301
0701		0101		0303
0701		0101		0201
0901		0101		0303
1501			0101	0602
1502			0102	0501
1502			0102	0601
1503			0101	0602
1503			0101	0501
1602			0202	0502
1602			0202	0301

(Sumber : UCLA Tissue Typing Laboratory, DNA Department, 1993)

Gambar. Contoh Hasil *HLA typing* Kelas II dengan Teknik PCR



Keterangan: Fotografi elektroforesis hasil PCR dari 2 sampel (A dan B) yang diwarnai dengan ethidium bromide pada nusieve agarose 3%. Dari kiri ke kanan: Sumur 2 dan 14 adalah penanda DNA, *PHI-X 174 Hae fragment*; sedangkan sisanya, sumur 1, 3 s/d 20) untuk HLA-DR dan sumur 21 s/d 26 untuk HLA-DQ

1. Contoh sampel A :

- a. Sumur 1, 4 s/d 9, 12, 15, 19, 20, 23 s/d 25 tidak ada pita yang muncul
- b. Pita yang muncul dan diyakini berhubungan satu sama lainnya adalah sebagai berikut:
 - Pita di sumur 3 pada ukuran 261 dan 111 bp
 - Pita di sumur 10 pada ukuran pada ukuran 171 dan 111 bp
 - Pita di sumur 11 pada ukuran 258 dan 192 bp
 - Pita di sumur 13 pada ukuran 177 dan 117 bp
 - Pita di sumur 16 pada ukuran 258 dan 210 bp
 - Pita di sumur 17 pada ukuran 142 bp
 - Pita di sumur 18 pada ukuran 204 bp
 - Pita di sumur 21 pada ukuran 276, 222, 177, dan 117 bp
 - Pita di sumur 22 pada ukuran 204 dan 117 bp
 - Pita di sumur 26 pada ukuran 133 bp
- c. Setelah dianalisis dan dicocokkan dengan angka-angka (nomor alel) yang tertera pada setiap pita pada lembaran isian data, maka dengan menggunakan tabel 1 dapat diketahui haplotip HLA-DR dan DQ untuk contoh sampel A sebagai berikut:
 - a. DRB1*1202 DRB3*0301 DQB1*0301
 - b. DRB1*1502 DRB5*0102 DQB1*0501

2. Contoh sampel B:

Dengan cara yang sama didapatkan haplotipe sebagai berikut:

- a. DRB1*1202 DRB3*0101 DQB1*0301
- b. DRB1*1202 DRB3*0101 DQB1*0503

Sampel pada foto A merupakan contoh haplotip yang heterozigot (mempunyai alel yang berbeda dalam sepasang kromosom) sedangkan pada foto B merupakan contoh yang homozigot untuk HLA-DR (mempunyai alel yang sama) dan heterozigot untuk HLA-DQ.

Pemberian nama (nomenklatur) terhadap HLA diatur oleh WHO. Misalnya, RB1*1202. DRB1 adalah nama lokus yang menyandi rantai β 1 HLA-DR kemudian

diikuti oleh tanda asterik (*) dan nomor alel. Molekul kelas II biasanya dinamai berdasarkan pada *serologic typing*. Dengan contoh yang sama DRB1*1202 maksudnya adalah alel yang menyandi molekul DR12⁵.

Pembahasan

Seperti telah disebutkan di atas, isolasi DNA untuk HLA kelas II dapat diperoleh dari darah (*whole blood*). Dalam keadaan di mana penentuan tipe HLA tidak mungkin atau tidak harus diproses langsung, ada alternatif lain untuk isolasi DNA yaitu dari sel beku. Isolasi DNA dari sel beku dapat diperoleh dari sel limfosit yang diproses dengan ficoll-hypaque atau dari sel limfosit B yang diperbanyak dengan virus (dalam kultur) yang dikenal dengan transformasi EBV (Epstein-Barr Virus)¹². Cara terakhir ini bahkan dapat ditumbuhkan lagi bila diperlukan.

Hasil (typing) yang terdeteksi dengan menggunakan teknik PCR lebih lengkap dibandingkan dengan pemeriksaan secara serologis. Karena teknik PCR untuk penentuan tipe HLA didasarkan atas adanya DNA (DNA-based typing) yang berarti mengidentifikasi genotip HLA yang menyandi molekul HLA. Sementara pemeriksaan serologis didasarkan atas adanya antibodi (anti-HLA) yaitu mengidentifikasi produk gen HLA yang diekspresikan pada permukaan sel⁴. Misalnya, secara serologis tipenya adalah HLA-DR4 berarti memiliki alel (baca produk gen) yang sama, yaitu molekul DR4. Dengan teknik PCR sekurang-kurangnya memiliki 11 alel yaitu DRB1*0401, DRB1*0402, DRB1*0403, DRB1*0404, DRB1*0405, DRB1*0406, DRB1*0407, DRB1*0408, DRB1*0409, DRB1*0410, dan DRB1*0411⁴.

Dalam makalah ini penentuan tipe HLA kelas II, HLA-DRB yang dideteksi adalah alel pada DRB1, DRB3, DRB4, dan DRB5 sedangkan DQB adalah DQB1 saja¹⁴. Alel DRB1 terdapat pada semua haplotip sedangkan DRB3, DRB4, dan DRB5 terdapat hanya pada beberapa haplotip¹⁵

Kesimpulan

Dengan kemajuan teknologi dan perkembangan Biologi Molekuler penggunaan teknik PCR untuk penentuan tipe HLA kelas II memberikan keuntungan karena dapat dilakukan dalam waktu cepat, jumlah darah yang dibutuhkan sedikit, hasil lebih akurat, dan lebih lengkap.

Ucapan Terima kasih

Saya mengucapkan terima kasih kepada dr. Liliana Kurniawan MSc., dr. Sumarijati Arjoso SKM., dr. Suriadi Gunawan, Prof. Dr. Aftab Ansari, Dr. Eduardo Gomez-Saladin, Dr. Allen L. Richards yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk ikut training teknik "HLA class II typing" di Emory University, Atlanta, USA.

Juga saya ucapkan terimakasih pada dr. Ingerani, SKM selaku Kepala Puslitbang Pemberantasan Penyakit, teman-teman di Kelompok Bioteknologi Terapan, terutama Drs. Syahrial Harun MS, Drh. Basundari Sri Utami MKes, yang telah membantu dan memberikan dorongan terhadap penulisan ini.

Daftar Pustaka

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia : W.B Saunders Co. , 1994. p. 96-114.
2. Andersson G, Andersson L, Larhammar D, Rask L, Sigurdardottir S. Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. *Immunology Today*, 1994; 15(2):58-61
3. Austyn JM, Wood KJ. Principles of Cellular and Molecular Immunology. Oxford University Press., New York, 1995. p. 65-112
4. Bender K.. HLA-system (2nd English ed.) *Biotest Bull.* 2: 62-116. Dalam Moeslichan, S. Mengenal antigen HLA. Bagian Ilmu Kesehatan Anak, FKUI-RSCM, 1984 .
5. Charron D. Molecular basis of human leukocyte antigen class II disease associations. *Advances in Immunology*, 1990 ; 48: 107-58.
6. Chicz RM, Urban RG. Analysis of MHC-presented peptides: applications in autoimmunity & vaccine development. *Immunology Today*, 1994; 15(4): 155-59.
7. Coligan JE. *Current Protocols in Immunology*. City University of New York Medical School , 1994. Vol. 1 p. 7.22.1-3.
8. Erlich HA, Bugawan TL. HLA DNA typing. In Innis MA et al, editors: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, San Diego, Academic Press, 1990. p. 261-71, 1.
9. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA et al Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 1991; 352: 595-9.
10. Hurley CK . DNA methods for HLA typing. *A Workbook for beginners*. C.W. Bill" Young Marrow Donor Recruitment and Research Program Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University School of Medicine, Washington, DC, 1993. p. 9-53
11. Marshak DR. Strategic for protein purification and characterization. *A Laboratory course manual*. Cold Spring Habor Laboratory Press, 1996. p.280
12. Moss D.J, Khanna R. Major histocompatibility complex: from genes to function. *Immunology Today*, 1999; 20 (4): 165-7.
13. Nepom G. HLA Typing. In Rich R R. *Clinical immunology principles & practise*. 1996 ; vol. II, p. 2210 - 9.
14. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practise including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 1992 ; 39: 225-35.
15. UCLA Tissue Typing Laboratory, DNA Department. *UCLA PCR-amplification mixtures with sequence-specific-primers*. Veteran Avenue Los Angles, CA, 1993.