

**INHIBITOR FAKTOR VIII PADA HEMOFILIA A :  
PROPORSI DAN FAKTOR YANG BERHUBUNGAN**

**RIKARNI**

Universitas Indonesia

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1.LATAR BELAKANG

Hemofilia A merupakan kelainan koagulasi herediter yang disebabkan oleh defisiensi atau disfungsi faktor pembekuan (F) VIII. Penyakit ini ditandai dengan perdarahan berulang, yang paling sering adalah hemartrosis yaitu perdarahan ke dalam rongga sendi, hematoma dan *delayed bleeding*.<sup>1</sup> Beratnya perdarahan pada hemofilia A berkorelasi dengan aktivitas F VIII. Pada hemofilia A berat dengan aktivitas F VIII <1% dapat terjadi perdarahan spontan ke dalam sendi, otot dan organ dalam. Pada hemofilia sedang dengan aktifitas F VIII 1-5%, dapat terjadi perdarahan jika ada trauma ringan, sedangkan pada hemofilia ringan dengan aktifitas F VIII >5-40%, perdarahan terjadi jika ada trauma berat atau tindakan bedah.<sup>2</sup>

Prinsip penatalaksanaan hemofilia A adalah mencegah terjadi perdarahan, penatalaksanaan perdarahan akut, penatalaksanaan kerusakan otot, sendi, akibat lain dari perdarahan, dan penataksanaan komplikasi terapi seperti pembentukan inhibitor.<sup>3</sup> Terapi pengganti dapat berupa kriopresipitat yaitu komponen darah yang banyak mengandung F VIII, atau terapi pengganti dengan konsentrat F VIII yang dapat berasal dari plasma atau berupa rekombinan F VIII. Dua hal yang menyulitkan terapi adalah munculnya inhibitor setelah diterapi F VIII pada beberapa pasien dan risiko infeksi akibat infus F VIII.<sup>4</sup> Saat ini, risiko kontaminasi produk F VIII dan infeksi karena infus telah berhasil diperkecil, sedangkan pembentukan inhibitor masih merupakan komplikasi paling penting yang dihadapi pasien hemofilia saat ini.<sup>5</sup>

Inhibitor terhadap F VIII dapat timbul pada 20-30% pasien hemofilia A.<sup>6</sup> Insiden lebih tinggi ditemukan pada penduduk Afrika, penduduk asli Amerika, dan Asia.<sup>7</sup> Insiden inhibitor pada hemofilia berat 25-50%, sedangkan pada hemofilia ringan dan sedang 3-13%.<sup>8, 9</sup> Inhibitor F VIII merupakan antibodi berupa imunoglobulin (Ig) G yang mempunyai afinitas tinggi terhadap F VIII sehingga secara fungsional

mempunyai kemampuan menghambat aktivitas F VIII.<sup>10</sup> Pasien diduga memiliki inhibitor F VIII bila tidak memberi respons setelah mendapat infus F VIII yang adekuat pada saat perdarahan atau jika kadar F VIII setelah infus lebih rendah dari yang diprediksi dan tidak ditemukan kenaikan F VIII setelah infus.<sup>11</sup> Untuk mengetahui adanya inhibitor F VIII dilakukan pemeriksaan inhibitor menurut Bethesda.<sup>11</sup> Pasien dengan inhibitor diklasifikasi berdasarkan definisi dari *International Society of Thrombosis and Haemostasis*. Pasien hemofilia A diklasifikasikan sebagai *high responder* dan *low responder*. *High responder* bila titer inhibitor >5 Bethesda Unit (BU) /mL dan terjadi reaksi anamnestik yaitu terdapat peningkatan titer inhibitor jika mendapat terapi pengganti F VIII. Pasien hemofilia A diklasifikasikan sebagai *low responder* bila titer inhibitor F VIII  $\leq 5$ BU /mL<sup>12</sup>

Adanya inhibitor pada pasien hemofilia A akan mengakibatkan penatalaksanaan perdarahan menjadi lebih sulit karena pasien menjadi resisten dengan terapi pengganti F VIII dan akan meningkatkan biaya perawatan.<sup>13,14, 15</sup> Terapi pengganti F VIII pada pasien hemofilia A memerlukan biaya tinggi dan untuk pasien hemofilia A dengan inhibitor memerlukan biaya lebih besar lagi.<sup>15, 16</sup>

Untuk mengurangi insiden inhibitor perlu diketahui faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor. Faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor dapat dibedakan atas faktor yang tidak bisa diubah seperti genotipe, etnis, riwayat keluarga positif inhibitor F VIII dan faktor yang bisa diubah seperti usia pertama diberi terapi faktor pembekuan, lama terapi dan jenis konsentrat FVIII.<sup>15</sup> Pengaruh usia terhadap risiko timbulnya inhibitor belum jelas diketahui, diduga berbanding terbalik dengan usia saat pertama diberi terapi pengganti.<sup>11</sup> Saat ini masih diperdebatkan apakah produk konsentrat Faktor VIII rekombinan mempunyai risiko lebih tinggi timbulnya inhibitor dibandingkan produk konsentrat F VIII berasal dari plasma.<sup>17</sup>

Pada beberapa tahun terakhir, mulai meningkat perhatian untuk mengidentifikasi faktor non genetik atau faktor yang bisa diubah, yang mempengaruhi kecenderungan berkembangnya inhibitor pada hemofilia A. Hal tersebut

menimbulkan keinginan melakukan penelitian ini untuk mengetahui faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor pada pasien hemofilia A.

## **1.2. RUMUSAN MASALAH**

1. Berapa proporsi inhibitor F VIII pada pasien hemofilia A di RSCM ?
2. Faktor apakah yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A ?

## **1.3. TUJUAN PENELITIAN**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Mengetahui proporsi inhibitor F VIII pada hemofilia A dan faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor.

### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Mendapatkan proporsi inhibitor F VIII pada hemofilia A
2. Mendapatkan proporsi inhibitor F VIII berdasarkan derajat hemofilia
3. Mendapatkan proporsi *high responder* dan *low responder* inhibitor F VIII
4. Mengetahui hubungan faktor usia pertama diberi terapi pengganti F VIII dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A.
5. Mengetahui hubungan lama *exposure day* dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A
6. Mengetahui hubungan antara jenis terapi pengganti F VIII dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A

## **1.4. MANFAAT PENELITIAN**

### **1.4.1. Manfaat dalam bidang akademik/ilmiah**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan data tentang inhibitor FVIII pada hemofilia A dan faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor pada pasien hemofilia A.

#### **1.4.2. Manfaat klinis**

Dengan mengetahui proporsi inhibitor F VIII dan faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor pada pasien hemofilia A maka dapat dibuat strategi untuk mengurangi timbulnya inhibitor.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

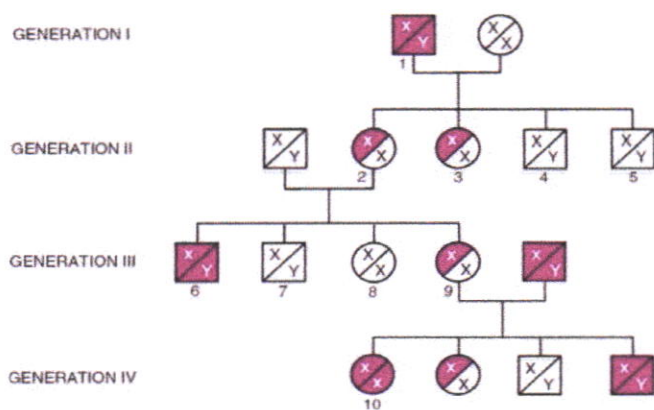
#### 2.1. HEMOFILIA A

##### 2.1.1. Definisi, epidemiologi, dan genetika

Hemofilia A adalah kelainan koagulasi yang disebabkan kegagalan produksi F VIII yang ditandai dengan perdarahan berulang ke dalam berbagai jaringan. Kelainan ini disebabkan mutasi gen F VIII yang menimbulkan defisiensi faktor VIII atau defek struktural sehingga menimbulkan gangguan fungsi F VIII.<sup>1, 16, 18</sup>

Hemofilia A ditemukan hampir di seluruh dunia. Insiden hemofilia A adalah 1 dalam 20.000 sampai 1 dalam 10.000 orang pertahun.<sup>1</sup> Insiden lebih tinggi ditemukan pada penduduk Afrika, penduduk asli Amerika, dan Asia.<sup>7</sup> Hemofilia A merupakan kelainan yang diturunkan melalui kromosom X, secara *X-linked recessive*.

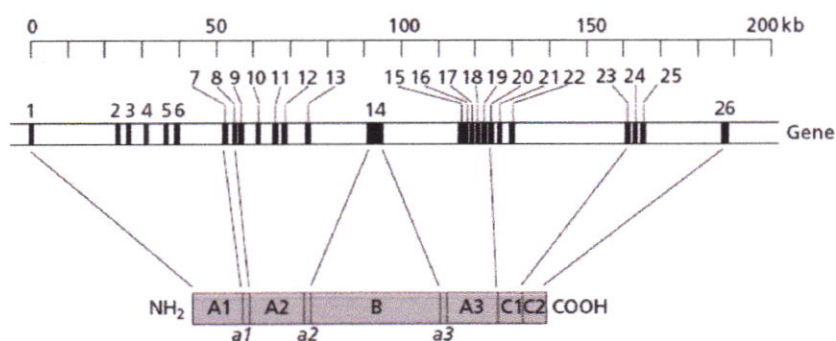
Defek gen pada lengan panjang kromosom X pada band q 2.8 . Defek gen pada lelaki akan bermanifestasi hemofilia klinis seperti diperlihatkan gambar 2.1. Generasi pertama lelaki hemofilia A menikah dengan perempuan sehat. Lelaki hemofilia A tersebut tidak dapat menurunkan kelainan pada anak lelakinya dan semua anak lelakinya sehat (generasi kedua nomor 4 dan 5). Sedangkan semua anak perempuan (generasi kedua nomor dua dan tiga) adalah karier karena mereka membawa kromosom X dari ayah yang mempunyai defek gen. Bila perempuan karier (generasi kedua) menikah dengan lelaki sehat maka perempuan karier tersebut akan menurunkan kelainan kemungkinan pada setengah anak lelakinya menjadi lelaki hemofilia (generasi ketiga nomor 6) dan karier kemungkinan pada setengah anak perempuannya (generasi ketiga nomor 9). Bila wanita karier generasi ketiga menikah dengan lelaki hemofilia A akan menurunkan kelainan pada anak perempuan (generasi 10).<sup>1</sup>



Gambar 2.1. *Pedigree* hemofilia A. Kotak menunjukkan lelaki. Lingkaran menunjukkan wanita. Penuh diwarnai menunjukkan anggota keluarga yang sakit, setengah lingkaran diwarnai menunjukkan wanita karier. X = kromosom X normal, x = kromosom X abnormal.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Struktur gen faktor VIII

Gen faktor VIII dipetakan pada lengan panjang kromosom X pada band q 2.8. Gen F VIII mempunyai berat molekul 300 kDa, panjang 186 kb dan mengandung 25 intron, 26 ekson, 2332 asam amino dengan struktur domain A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (gambar2.2).<sup>19</sup>



Gambar.2.2. Gen Faktor VIII terdiri dari 26 ekson dengan struktur domain A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2.<sup>19</sup>

Interaksi *Von Willebrand factor* (VWF) dengan F VIII pada domain a3, C1 dan C2 dan tempat ikatan yang utama adalah pada domain a3. Domain A2,A3 merupakan area untuk berkontak dengan faktor IXa. Domain C1, C2 berikatan dengan permukaan fosfolipid.<sup>19</sup>

### 2.1.3. Siklus hidup faktor VIII

Tiga fase dalam siklus hidup F VIII adalah transpor F VIII dari tempat sekresi ke tempat perdarahan, partisipasi F VIII dalam koagulasi dan klirens F VIII dari sirkulasi.<sup>13</sup>

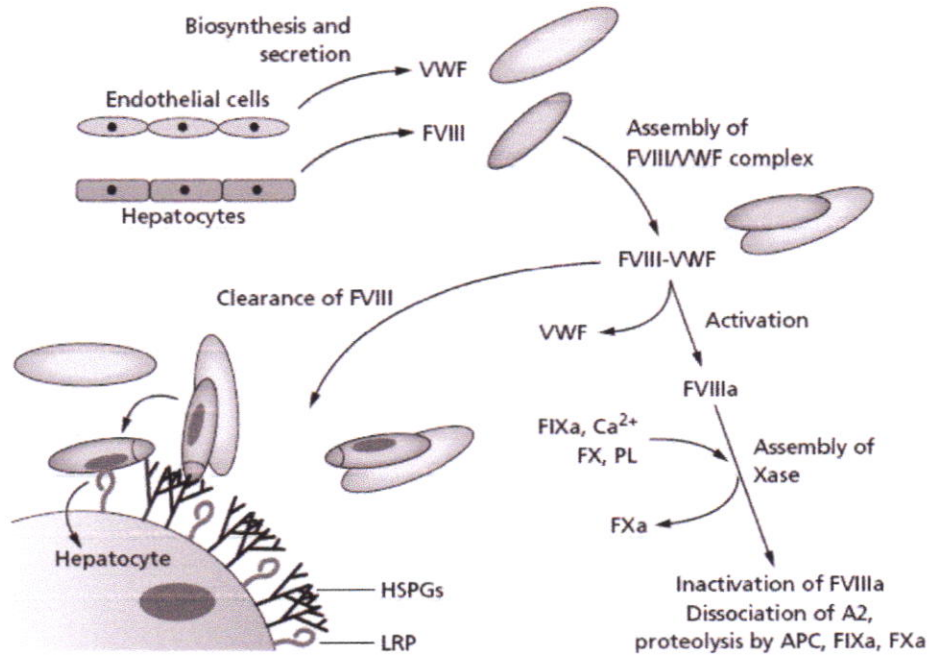
#### a. Transpor faktor VIII dari tempat sekresi ke tempat perdarahan.

Faktor VIII disintesis terutama di hepar oleh hepatosit dan tempat sintesis lain seperti limpa dan paru.<sup>2, 13</sup> Kadar faktor VIII di sirkulasi rerata 0,2 µg/ml (0,7 nmol/L).<sup>2</sup> Faktor VIII dilepaskan ke sirkulasi sebagai glikoprotein heterodimer. Di sirkulasi, F VIII membentuk kompleks dengan VWF yang disekresikan sel endotel vaskular (gambar 2.3).<sup>18</sup> *Von Willebrand Factor* adalah alat pengangkut F VIII dalam plasma. Ikatan F VIII dengan VWF bersifat nonkovalen yang melibatkan *light chain* domain a3, C1, C2 dari F VIII dan regio VWF.<sup>13</sup> Ratio F VIII dengan VWF cukup konstan dengan 1 molekul F VIII untuk 50-100 molekul VWF.<sup>2</sup> Sekitar 94% molekul F VIII berikatan ke VWF dan 6% dalam bentuk bebas. Ikatan F VIII dengan VWF memproteksi F VIII dari ikatan ke permukaan sel endotel dan trombosit teraktivasi dan proteolisis oleh beragam serin protease, termasuk *activated protein C* dan F Xa. Oleh karena VWF dapat berikatan dengan kolagen jika ada kerusakan endotel maka VWF mengarahkan F VIII menuju tempat perdarahan.<sup>13</sup>

#### b. Klirens faktor VIII dari sirkulasi.

Siklus hidup F VIII diakhiri dengan klirens F VIII dari sirkulasi. (gambar 2.3). Faktor VIII akan dibersihkan dari sirkulasi dengan perantara *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) suatu reseptor hepar multiligand. *Low density lipoprotein receptor-related protein* memperantarai klirens F VIII dari kompleks dengan VWF, difasilitasi oleh *cell-surface heparin sulfate proteoglycans* (HSPGs) yang merupakan komponen glikoprotein utama pada matriks ekstraseluler. Faktor VIII akan mengikat LRP dan mengalami internalisasi serta degradasi<sup>18</sup>



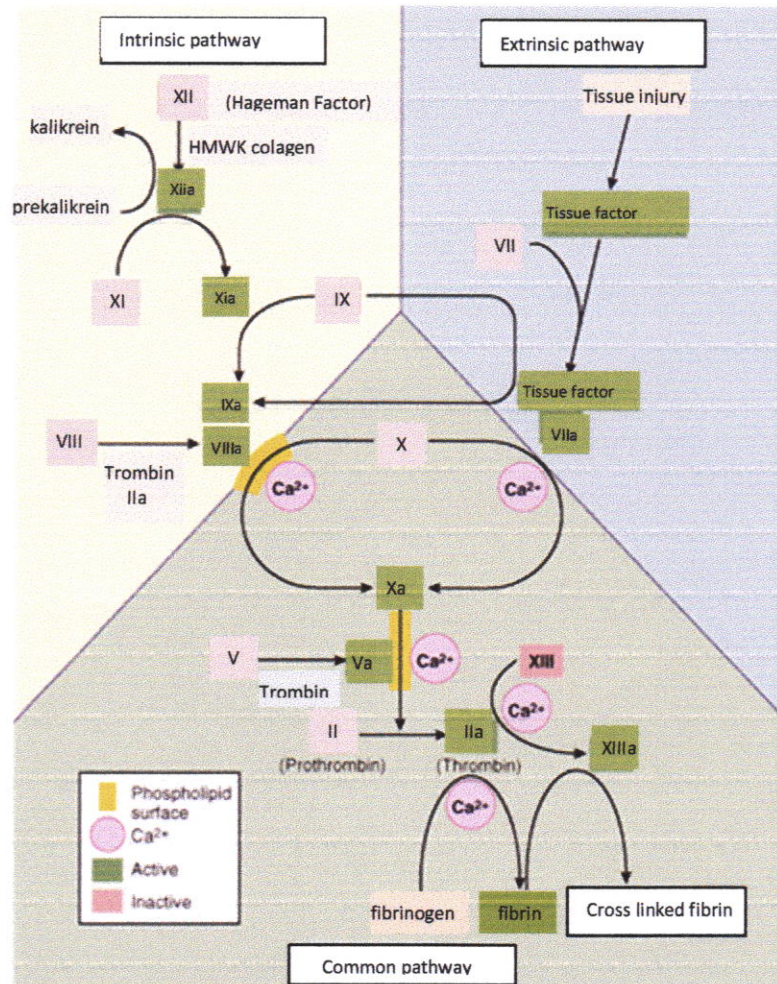


Gambar 2.3. Siklus hidup Faktor VIII. Faktor VIII disintesa oleh beberapa tipe sel terutama oleh hepatosit, dan disekresikan. Di sirkulasi, F VIII membentuk kompleks dengan VWF yang disekresikan sel endotel vaskular. F VIII memperoleh aktifitas kofaktor dengan aktivasi oleh trombin atau F Xa dan berperan dalam membentuk kompleks *tenase* yang mengaktifkan F X, yang mengubah protrombin menjadi trombin. F VIII secara cepat diinaktifasi oleh enzim proteolisis dan disosiasi subunit A2. Pembersihan F VIII dari sirkulasi terjadi melalui interaksi awal kompleks F VIII/VWF dengan HSPGs, yang mengkonsentratkan kompleks pada permukaan sel dan memberikan pada resptor klirens LRP yang akan memperantarai katabolisme F VIII.<sup>18</sup>

### c. Partisipasi faktor VIII dalam kaskade koagulasi.

Pada tempat perdarahan, F VIII yang terikat VWF akan diaktifkan oleh trombin. Trombin mengaktifkan F VIII dengan cara proteolisis pada *light chain* Arg 1689 dan *heavy chain* Arg 372 dan Arg 740. Faktor VIII juga diaktifkan oleh F Xa dengan proteolisis pada *light chain* Arg1689 menghasilkan perubahan susunan *light chain* yang mengubah afinitas ikatan F VIIIa ke VWF, sehingga dilepaskan F VIIIa dan berintegrasi menjadi kompleks *tenase*. Dengan bantuan F VIIIa maka F IXa akan mengubah F X menjadi F Xa, seperti diperlihatkan gambar 2.4. Bila tidak ada kofaktor F VIIIa maka F IXa memperlihatkan aktivitas katalitik sangat

rendah. Aktifitas maksimal F IXa dicapai dengan adanya kofaktor F VIIIa dan substrat F X. Selanjutnya F Xa dengan bantuan F Va akan mengubah protrombin menjadi trombin. Trombin merupakan enzim sentral dalam hemostasis dan salah satu aktivitasnya mengubah fibrinogen menjadi fibrin.<sup>18, 20</sup>

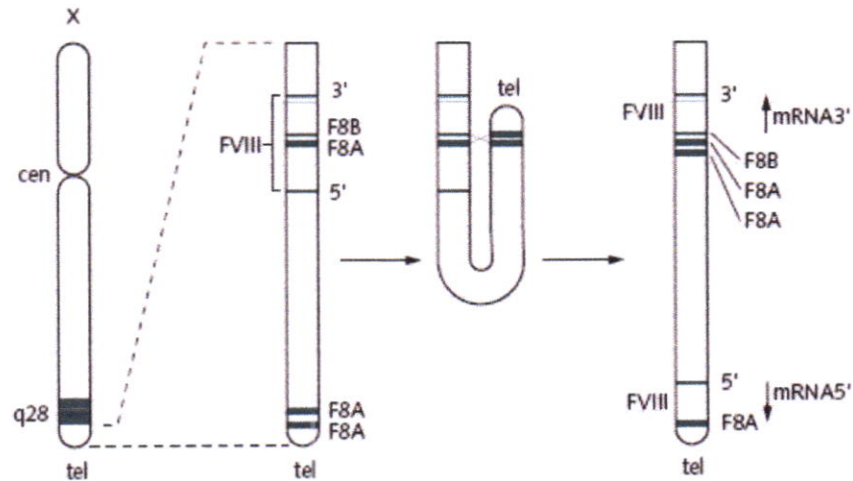


Gambar 2.4. Kaskade koagulasi.<sup>21</sup>

#### 2.1.4. Defek gen faktor VIII pada hemofilia A

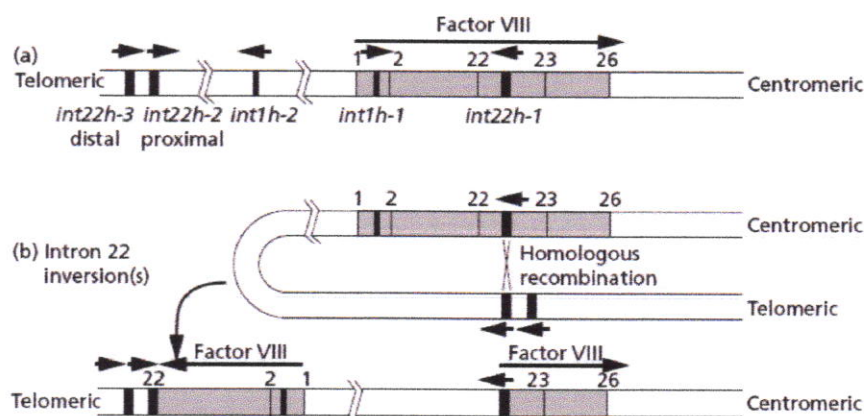
Defek gen F VIII yang berhubungan dengan hemofilia A dibagi dalam beberapa kategori yaitu : *gross gene rearrangements*, insersi atau delesi rangkaian genetik, substisusi DNA tunggal berupa *missense*, *nonsense*, *stop mutation*, dan defek *mRNA splicing*.<sup>19</sup> Defek gen yang penting untuk klinis adalah *gene*

*rearrangements* berupa inversi yang melibatkan F 8 intron 22 yang terjadi pada 50 % kasus hemofilia A berat. Pada hemofilia A, intron yang memisahkan exon 22 dan 23 mengandung 2 transkrips tambahan yang dinamai F8A dan F8B. F8B adalah transkrips 2,5 kb yang ditranskripsi pada arah yang sama dengan gen F VIII. F8A adalah transkrips dengan arah berlawanan dengan gen F VIII dan ditemukan 2 kopi F8A pada 300 kb dan 400 kb telomerik gen F VIII (gambar 2.5).<sup>22</sup>



Gambar 2.5. Inversi *flip tip* kromosom X pada Hemofilia A. Cross-over terjadi antara kopi F8A dalam gen F VIII dengan satu dari dua kopi telomerik. Cross-over dengan kopi distal lebih sering terjadi sekitar 80 % dari kasus inversi.<sup>22</sup>

Pada inversi F8 intron 22 terjadi rekombinasi homolog antara 9,5 kb rangkaian intron (*int22h-1*) dan salah satu dari dua rangkaian intron (*int22h-2* dan *int22h-3*). Rekombinasi terjadi selama pembelahan miosis dari spermatogenesis, menghasilkan inversi besar dan translokasi rangkaian gen ekson 1-22 dan ekson 23-26 (gambar 2.6).<sup>19</sup>



Gambar 2.6. Mekanisme inversi gen yang menimbulkan hemofilia A berat, melibatkan rangkaian intron 22 gen F VIII. Rekombinasi antara rangkaian homolog intron 22 dan telomerik 400 kb gen yang menimbulkan pemisahan ekson 1-22 dari ekson 23-26 dengan rangkaian tebal dan relokasi tempat rangkaian telomer.<sup>19</sup>

### 2.1.5. DIAGNOSIS KLINIS DAN LABORATORIUM HEMOFILIA A

Pada umumnya ditemukan riwayat perdarahan pada keluarga, tetapi pada sepertiga kasus tidak ditemukan riwayat keluarga menderita hemofilia A karena terjadi mutasi baru.<sup>3</sup> Pasien diduga menderita hemofilia A apabila mempunyai riwayat mudah memar pada masa anak, perdarahan spontan terutama pada sendi, jaringan lunak dan perdarahan yang berlebihan setelah trauma atau operasi. Pasien dengan hemofilia ringan tidak mengalami perdarahan berlebihan kecuali bila mengalami trauma berat atau operasi. Anak yang menderita hemofilia berat dapat tidak mengalami perdarahan sampai usia 1 tahun dan mulai mengalami gejala perdarahan saat mulai berjalan dan beraktivitas.<sup>3</sup> Hemofilia A lebih sering mengenai lelaki karena diturunkan secara *X-linked recessive*. Tiga puluh persen anak lelaki diketahui menderita hemofilia saat mengalami perdarahan waktu sirkumsisi.<sup>23</sup> Perdarahan pada hemofilia A yang paling sering adalah perdarahan sendi yang disebut hemartrosis (70-80%). Perdarahan dapat mengenai otot, jaringan lunak (10-20%) dan perdarahan tempat lain (5-10%). Sendi yang paling sering mengenai sendi lutut (45%), siku (30%), tumit (15%), bahu (3%),

pergelangan tangan (3%), pinggul (2%).<sup>3</sup> Perdarahan yang membahayakan dapat terjadi pada susunan saraf pusat (<5%), saluran nafas atas dan gastrointestinal.<sup>3, 23</sup>

Uji skrining akan memperlihatkan hasil pemanjangan *activated partial thromboplastin time* (aPTT) pada kasus sedang dan berat. Sedangkan kasus ringan dapat memberikan hasil aPTT memanjang atau normal. Diagnosis definitif dengan pemeriksaan aktivitas F VIII. Beratnya manifestasi perdarahan pada hemofilia A berkorelasi dengan aktivitas F VIII seperti diperlihatkan pada tabel 2.1.<sup>3</sup>

Tabel 2.1. Korelasi beratnya manifestasi perdarahan dengan aktivitas F VIII<sup>3</sup>

	aktivitas F VIII % (IU/ml)	episode perdarahan
Hemofilia berat	1% (<0,01)	perdarahan spontan, terutama pada sendi dan otot
Hemofilia sedang	1-5% (0,01-0,05)	kadang perdarahan spontan, perdarahan berat bila trauma, operasi
Hemofilia ringan	5-40% (0,05-0,40)	perdarahan berat bila trauma, operasi

Uji laboratorium yang sering dipakai untuk skrining pasien yang diduga kelainan perdarahan adalah: hitung trombosit, masa perdarahan, *prothrombin time* (PT), dan aPTT. Berdasarkan uji laboratorium tersebut, kategori kelainan perdarahan diidentifikasi seperti diperlihatkan pada tabel 2.2.<sup>3</sup>

Tabel 2.2. Uji skrining pasien dengan kelainan perdarahan<sup>3</sup>

Kondisi yang menungkingkan	PT	aPTT	masa perdarahan	hitung trombosit
Normal	normal	normal	normal	normal
Hemofilia A atau B	Normal	memanjang	normal	normal
VWD	Normal	normal atau memanjang	normal atau memanjang	normal atau menurun
Defek pada trombosit	normal	normal	normal atau memanjang	normal atau menurun

### 2.1.6. TERAPI PENGGANTI

Prinsip penatalaksanaan hemofilia A adalah mencegah terjadinya perdarahan, penatalaksanaan perdarahan akut, penatalaksanaan kerusakan otot, sendi, akibat lain dari perdarahan dan penatalaksanaan komplikasi terapi seperti pembentukan inhibitor dan infeksi.<sup>3</sup> Untuk terapi pengganti dapat diberikan kriopresipitat atau konsentrat F VIII berasal dari plasma atau konsentrat F VIII rekombinan.<sup>24</sup>

Kriopresipitat masih digunakan sebagai sumber F VIII jika konsentrat F VIII tidak tersedia di negara berkembang.<sup>24</sup> Kriopresipitat yaitu komponen darah yang banyak mengandung F VIII. Kriopresipitat berasal dari *whole blood* yang dibekukan pada suhu 4°C selama 24 jam membentuk *Fresh Frozen Plasma* kemudian dilakukan pencairan. Pada proses pencairan, ada bagian yang mengendap. Dilakukan pemisahan dengan sentrifugasi dan didapatkan kriopresipitat yang mengandung F VIII, F V, fibrinogen, F IX, F XIII, VWF, fibronektin.<sup>25, 26</sup> Setiap unit kriopresipitat mengandung  $\pm$  80-100 IU F VIII.<sup>24</sup> Problem dari kriopresipitat adalah sulit dilakukan inaktivasi virus.<sup>24, 26</sup>

Tahun 1960 berkembang metode untuk memisahkan F VIII dari plasma kumpulan untuk mendapatkan konsentrat F VIII *lyophilized*. Pertama, kriopresipitat dihasilkan dengan proses standar. Kemudian *antihemophilic factor* (AHF) diekstraksi dari kriopresipitat dengan melarutkan dalam bufer. Supernatan yang mengandung fibrinogen dikeluarkan dan F VIII dipresipitasi. Kemudian dilakukan purifikasi dengan tehnik kromatografi, selanjutnya dilakukan *freeze-dried* yang akan menghasilkan F VIII *lyophilized*. Langkah membunuh kuman dilakukan dengan pemanasan dan/ atau pemberian detergen/ pelarut.<sup>26</sup> Walaupun melalui beberapa prosedur inaktivasi kuman tetapi belum berhasil menghilangkan semua virus patogen.<sup>24</sup>

Tahun 1980 terjadi epidemi transmisi virus hepatitis dan HIV melalui transfusi . Hal ini memicu penelitian untuk mengklon gen F VIII. Tahun 1984 berhasil dilakukan kloning gen F VIII dan mulai diproduksi konsentrat F VIII rekombinan.<sup>27</sup> *Baby hamster kidney cell line* ditransfeksi dengan cDNA F VIII manusia dan akan mensekresikan *full-length rF VIII* dalam medium kultur. Kemudian dilakukan purifikasi beberapa kali seperti *ion exchange*, *size exclusion*, *immunoaffinity chromatography* memakai *murine monoclonal anti F VIII antibody*. Langkah purifikasi akan menginaktifkan virus sehingga kultur akan bebas virus.<sup>28</sup>

### 2.1.7. KOMPLIKASI KRONIK HEMOFILIA A

Hemofilia A dapat menimbulkan komplikasi kronik pada muskuloskeletal berupa artropati kronik, kontraktur, fraktur, dan pembentukan pseudotumor pada tulang, jaringan lunak. Komplikasi kronik lain yaitu infeksi yang berhubungan dengan infus seperti *human immunodeficiency virus* (HIV), hepatitis B virus, hepatitis C virus dan parvovirus B19. Komplikasi yang paling penting adalah munculnya antibodi yang akan menghambat F VIII eksogen.<sup>3</sup> Inhibitor terhadap F VIII dapat timbul sebagai alloantibodi pada pasien hemofilia A yang diinfus dengan F VIII eksogen. Inhibitor terhadap F VIII dapat juga timbul sebagai autoantibodi pada pasien bukan hemofilia.<sup>10</sup>

## 2.2. INHIBITOR TERHADAP FAKTOR VIII

### 2.2.1. Definisi dan epidemiologi

Inhibitor F VIII adalah antibodi poliklonal Ig G dengan afinitas tinggi terhadap F VIII yang mempunyai kemampuan secara fungsional menetralkan aktivitas F VIII. Inhibitor F VIII terutama dari kelas IgG1, IgG2, IgG4 dan jarang IgG3. Di laboratorium titer inhibitor paling sering ditentukan dengan titer Bethesda.<sup>11</sup> Jika F VIII ditambahkan pada plasma yang mengandung inhibitor dan campuran diinkubasi, maka F VIII akan secara progresif dinetralkan. Definisi 1 Bethesda Unit (BU) adalah jumlah inhibitor yang akan menetralkan 50% dari satu unit F VIII yang ditambahkan dalam 2 jam pada suhu 37°C.<sup>29</sup>

Inhibitor terhadap F VIII dapat timbul pada 20-30% pasien hemofilia A.<sup>6</sup> Insiden lebih tinggi ditemukan pada penduduk Afrika, penduduk asli Amerika, dan Asia.<sup>7</sup> Insiden inhibitor pada hemofilia berat 25-50%, sedangkan pada hemofilia ringan dan sedang 3-13%.<sup>8, 9</sup> Pada anak dengan hemofilia A berat atau sedang perkembangan inhibitor terutama pada median usia 2 tahun (1,7-3,3 tahun).<sup>11</sup> Pada hemofilia A berat dan sedang setelah terpajan F VIII dapat dilakukan skrining untuk inhibitor pada *exposure day* 5-20, kemudian diulangi bulan 3-6 dan selanjutnya setiap tahun. Pada hemofilia A ringan, skrining inhibitor dilakukan setelah terapi penggantian intensif.<sup>30</sup>

### 2.2.2. Faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor

Faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor meliputi faktor pasien dan faktor terapi. Faktor pasien termasuk tipe dan berat hemofilia, ras, genotipe hemofilia, umur waktu pertama mendapat terapi pengganti F VIII. Faktor yang berhubungan dengan terapi adalah jenis produk F VIII, *exposure day*, dan intensitas terapi. Faktor risiko yang berhubungan dengan pasien berperan dalam menentukan risiko timbulnya inhibitor. Derajat hemofilia mempengaruhi pembentukan inhibitor F VIII.<sup>11</sup> Individu dengan defisiensi F VIII berat (kadar < 0,01 U/ml) mempunyai risiko tinggi untuk perkembangan inhibitor. Inhibitor lebih sering timbul pada hemofilia berat dari hemofilia sedang dan ringan.<sup>11</sup>

Faktor genetik mempengaruhi timbulnya inhibitor. Peranan genotip hemofilia A pada host mendasari predisposisi terjadinya inhibitor. Risiko terbentuknya inhibitor dipengaruhi tipe mutasi gen F VIII.<sup>11</sup> Pasien dengan defek molekuler berat seperti delesi besar, *nonsense mutations* dan inversi intron 22 lebih berisiko 7-10 kali untuk timbulnya inhibitor dibandingkan dengan delesi kecil, *missense mutations*, dan *splice site mutation*.<sup>22</sup> Tipe mutasi juga dihubungkan dengan beratnya hemofilia.<sup>31</sup> Beberapa penelitian memperlihatkan pembentukan inhibitor lebih tinggi pada pasien hemofilia A yang mempunyai saudara kandung lelaki dengan inhibitor.<sup>11, 32</sup>

Pembentukan inhibitor dipengaruhi ras. Orang Amerika keturunan Afrika dengan hemofilia A cenderung lebih mudah berkembang inhibitor. Studi prevalensi di Amerika Utara menemukan prevalensi 21% orang Amerika keturunan Afrika dibandingkan dengan 14% pada kulit putih. Penelitian lain menemukan 50% pada Amerika keturunan Afrika dan 29% pada kulit putih.<sup>31</sup>

Pengaruh usia saat pertama diberi infus F VIII terhadap risiko timbulnya inhibitor masih diduga dan belum jelas diketahui. Hal ini diduga berdasarkan studi retrospektif oleh Lorenzo yang pertama kali melaporkan adanya hubungan usia saat pertama mendapat terapi pengganti dan timbulnya inhibitor.<sup>11</sup>

Faktor risiko timbulnya inhibitor berhubungan dengan terapi pengganti yang hangat diperdebatkan adalah tipe produk F VIII. Imunogenitas terhadap



kriopresipitat, konsentrat F VIII berasal dari plasma dan konsentrat F VIII rekombinan masih belum jelas diketahui.<sup>11</sup> Konsentrat F VIII terutama mengandung F VIII dan sejumlah kecil fibrinogen.<sup>33</sup> Konsentrat F VIII dari plasma diduga bersifat antigenik bila pasteurisasi dengan penambahan pelarut detergen pada proses inaktivasi virus.<sup>11</sup> F VIII rekombinan adalah molekul F VIII yang telah berhasil diklon sebagai protein rekombinan. Preparat ini lebih mahal dari konsentrat F VIII yang berasal dari plasma.<sup>33</sup> Faktor VIII dosis tinggi yang diberikan pada episode perdarahan berat seperti perdarahan intrakranial, perdarahan retroperitoneal, dapat berperan sebagai predisposisi perkembangan inhibitor.<sup>11</sup>

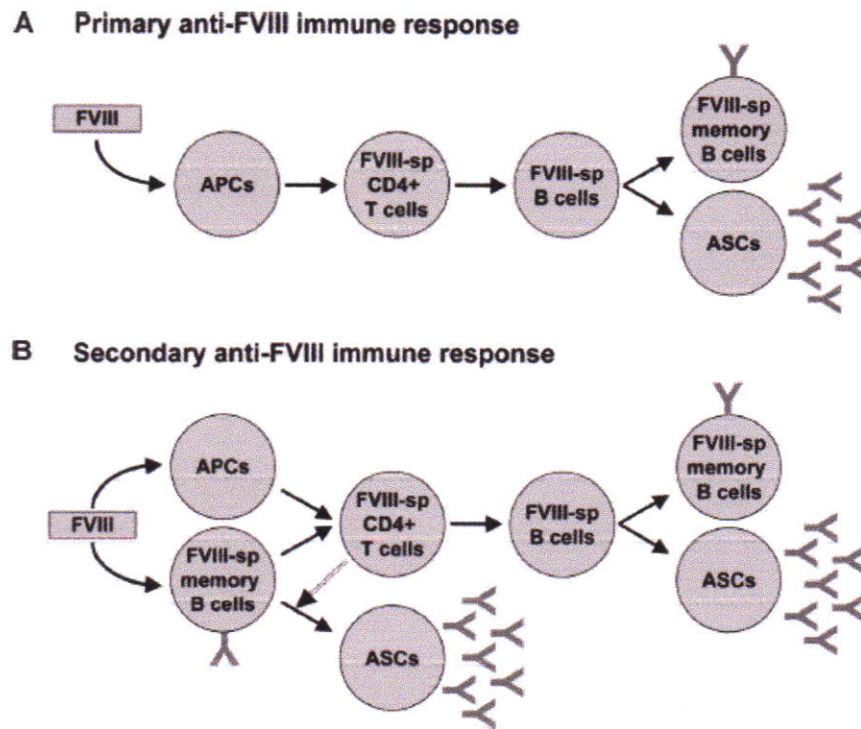
### 2.2.3. Pembentukan inhibitor faktor VIII

Respons imun terhadap F VIII memperlihatkan beberapa karakteristik. Antibodi terhadap F VIII dapat timbul pada individu sehat, pasien hemofilia A yang telah diterapi dan pasien beberapa penyakit autoimun. Pada individu sehat dan individu dengan penyakit autoimun, F VIII bersifat sebagai autoantigen. Sedangkan pada pasien hemofilia, F VIII eksogen yang diberikan sebagai terapi pengganti bersifat sebagai alloantigen.<sup>11</sup>

Apabila pasien hemofilia menerima infus F VIII maka sistem imun tubuh akan menganggap F VIII tersebut sebagai antigen yang dapat menimbulkan produksi antibodi yang bersifat inhibitor. Inhibitor akan berikatan dengan F VIII yang diinfuskan sehingga tidak tercapai kadar F VIII yang cukup untuk mengontrol perdarahan. Pasien hemofilia A diduga memiliki inhibitor bila tidak memberi respons yang adekuat terhadap terapi penggantian pada saat perdarahan.<sup>11</sup>

Beberapa penelitian memperlihatkan bahwa respons imun terhadap F VIII adalah *T-cell dependent*. Penelitian pada limfosit darah perifer dari pasien hemofilia A dengan inhibitor F VIII ditemukan hipermutasi gen yang mengkode beragam bagian antibodi anti F VIII. Penelitian ini memperlihatkan sel B menghasilkan antibodi anti F VIII melalui proses maturasi yang memerlukan bantuan sel T spesifik dan memperlihatkan peran sel T dalam perkembangan respons humoral F VIII.<sup>34</sup>

Respons sistem imun terhadap terapi pengganti F VIII berkembang sebagai respons imun klasik terhadap antigen eksternal. Pembentukan antibodi terhadap F VIII eksogen oleh sel T melibatkan *antigen-presenting cells* (APC), limfosit B dan T. Faktor VIII akan berikatan ke permukaan APC, mengalami internalisasi dan kemudian dipresentasikan ke sel T spesifik antigen. Sel T teraktivasi akan menghasilkan sinyal aktivasi ke limfosit B spesifik antigen dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresikan antibodi atau sel B memori yang mensekresikan antibodi. Respons imun terhadap F VIII pada pasien hemofilia A berupa respons imun primer dan respons imun sekunder seperti diperlihatkan gambar 2.7.<sup>13</sup> Respons imun primer diawali dengan internalisasi F VIII eksogen oleh APC dan mempresentasikan ke sel T *Cluster of Differentiation* (CD)<sup>4+</sup> spesifik F VIII. Sel T CD<sup>4+</sup> teraktivasi mengaktifkan sel B spesifik F VIII, yang berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresikan antibodi (*antibody-secreting cells* = ASC) dan sel B memori spesifik F VIII. Pada respons imun sekunder, sel B memori spesifik F VIII yang dihasilkan selama respons imun primer berperan sebagai APC dan mengaktifkan sel T CD<sup>4+</sup> spesifik F VIII. Dengan bantuan sel T CD<sup>4+</sup>, sel B spesifik F VIII selanjutnya berdiferensiasi menjadi ASC dan sel B memori spesifik F VIII. Pada keadaan paralel, F VIII yang berikatan dengan APC menghasilkan aktivasi sel T CD<sup>4+</sup> spesifik F VIII yang akan mengaktifkan sel B spesifik F VIII untuk menjadi ASC yang mensekresikan antibodi dan sel B memori spesifik F VIII.<sup>13</sup>

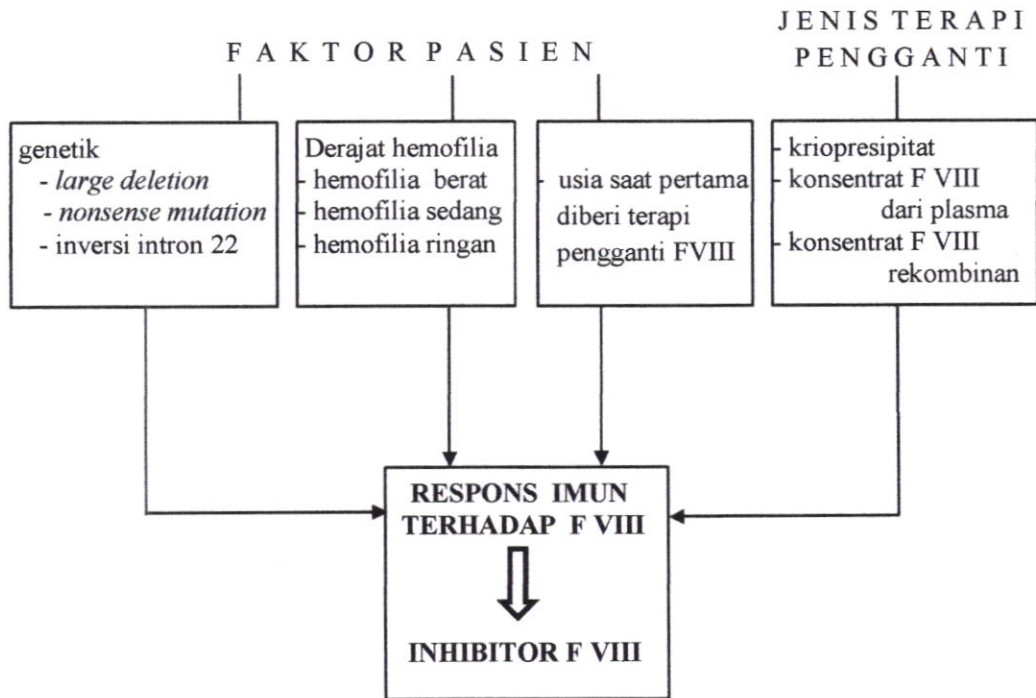


Gambar 2.7. Respons imun terhadap Faktor VIII pada pasien hemofilia A.<sup>13</sup>  
A. Respons imun primer B. Respons imun sekunder

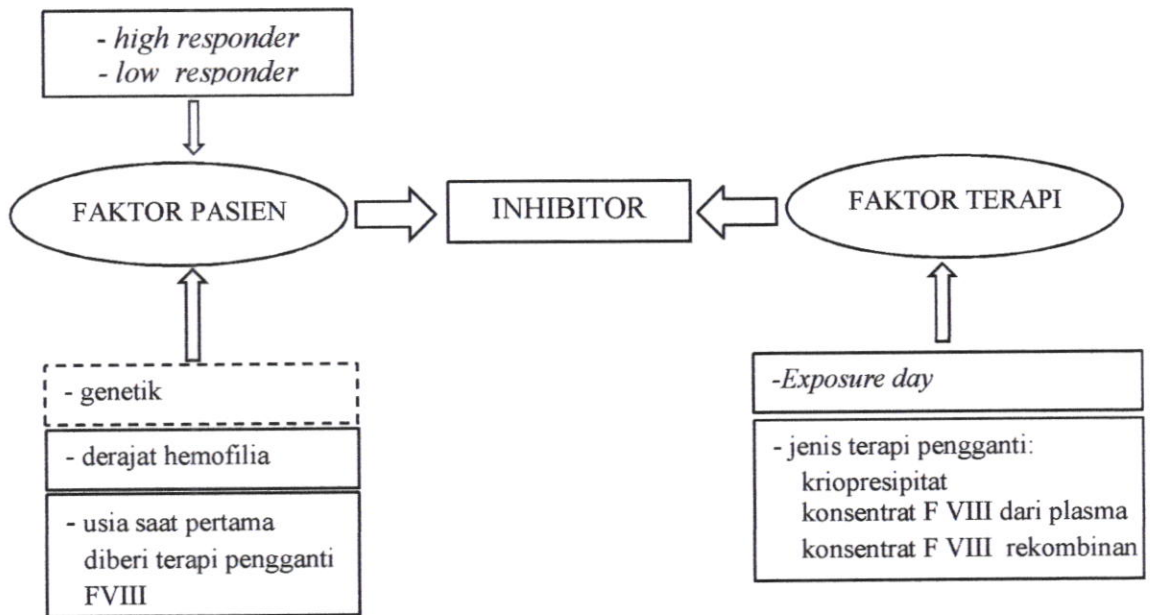
#### 2.2.4. Mekanisme inhibitor menimbulkan inaktivasi faktor VIII

Beberapa mekanisme inhibitor menimbulkan inaktivasi F VIII telah diketahui. Inhibitor mengenal epitop F VIII dan menetralkan F VIII dengan mencegah interaksi antara F VIII dengan VWF, trombin dan F Xa. Inhibitor akan menghambat interaksi F VIII dengan VWF sehingga F VIII tidak terproteksi dari proteolisis. Inhibitor menghambat interaksi F VIII dengan trombin dan F Xa sehingga tidak dapat mengaktifkan F VIII.<sup>35</sup> Mekanisme lain yaitu inhibitor merupakan antibodi katalitik yang menghidrolisis antigen. Inhibitor F VIII dapat menetralkan fungsi prokoagulan F VIII melalui proteolisis F VIII oleh alloantibodi anti F VIII.<sup>35</sup> Inhibitor F VIII mengikat regio antigenik molekul F VIII dan menghasilkan kompleks antigen antibodi yang segera dibersihkan dari sirkulasi.<sup>16</sup>

2.3. KERANGKA TEORI



2.4. KERANGKA KONSEP



Keterangan :  : variabel yang diteliti  
 : variabel yang tidak diteliti

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. DESAIN PENELITIAN

Desain penelitian adalah *cross sectional*

#### 3.2. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Departemen Patologi Klinik FKUI-RSCM dan Pusat Pelayanan Terpadu Hemofilia RSCM pada bulan April- Oktober 2012.

#### 3.3. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN

Populasi target penelitian ini adalah pasien hemofilia A. Populasi terjangkau adalah pasien hemofilia A yang berobat di Pusat Pelayanan Terpadu Hemofilia RSCM. Pasien diambil dengan metode *consecutive sampling*.

#### 3.4. KRITERIA PENERIMAAN SUBYEK

- pasien hemofilia A yang mendapat terapi pengganti
- bersedia ikut dalam penelitian

#### 3.5. KRITERIA TOLAKAN

- pasien HIV (dari data rekam medis)

#### 3.6. BESAR SAMPEL

Besar sampel untuk mengetahui proporsi inhibitor F VIII dihitung berdasarkan rumus besar sampel untuk penelitian deskriptif kategorik

$$n = \frac{Z\alpha^2PQ}{d^2}$$

didapatkan n = 100 orang

$Z\alpha = 1,96$  adalah konstanta untuk tingkat kemaknaan 5% (2 tailed)

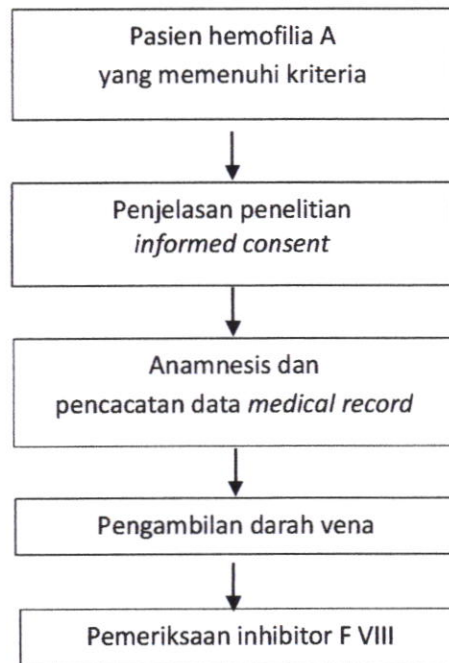
$P = 0,15$  adalah proporsi inhibitor hemofilia A

$Q = 1 - P = 0,85$

$d = 0,07$  adalah tingkat ketepatan absolut

n = jumlah sampel minimal

### 3.7. ALUR PENELITIAN



### 3.8. CARA PENELITIAN

#### 3.8.1. Pengumpulan sampel

Kepada pasien hemofilia A yang memenuhi kriteria seleksi diterangkan mengenai tujuan penelitian dan apabila bersedia ikut penelitian diminta untuk menandatangani *informed consent*. Pada subyek yang tidak mampu menandatangani *informed consent* ditandatangani keluarga terdekat. Setelah itu dilakukan pengambilan darah vena.

### 3.8.2. Pemeriksaan inhibitor faktor VIII

#### Prinsip pemeriksaan

Apabila plasma normal dicampur dengan plasma pasien yang mengandung inhibitor dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C maka inhibitor dalam plasma pasien akan menghambat F VIII yang terdapat dalam plasma normal. Aktivitas F VIII sisa dalam campuran tersebut ditentukan dengan membandingkannya dengan campuran plasma normal dengan F VIII defisiensi plasma. Untuk mengkonversi aktivitas F VIII sisa menjadi titer Bethesda dipakai kurva inhibitor dengan aksis adalah titer Bethesda dalam skala linier dan ordinat menunjukkan aktivitas F VIII sisa dalam skala log.

#### Bahan pemeriksaan

Bahan pemeriksaan adalah *platelet poor plasma* (PPP) yang diperoleh dengan cara 0,5 ml natrium sitrat 0,109 M ditambahkan 4,5 ml darah vena dan campur sampai homogen. Darah sitrat tersebut disentrifus dengan kecepatan 1500 g selama 15 menit sehingga didapatkan PPP. Pemeriksaan dilakukan sebelum 2 jam sejak darah ditampung.

#### Peralatan dan reagen:

1. Koagulometer, Sysmex Ca=50
2. *fixed volume pipettes* 100 µL dan *variable pipette* 200- 1000 µL
3. *disposable tip*
4. tabung reaksi plastik
5. reagen:
  - reagen F VIII defisiensi plasma  
(SIEMENS OTXW17 kat.no.546545)
  - reagen pathromtin SL  
(SIEMENS OQGS 184, kat no. 536652)
  - bufer veronal owren  
(SIEMENS QQTL 195E, kat.no547011)
  - Na CL 0,9 %

- CaCl<sub>2</sub> kadar 0,025 mol/L  
(SIEMENS ORHD 194, kat.no.539473)
- *control plasma normal* (CPN)  
(SIEMENS ORKE 41, kat. no.503166A)

**Cara pemeriksaan :**

1. Buat *owren buffer solution* (OBS) dengan cara:  
200 ml bufer veronal owren + 800 ml Na Cl 0,9%
2. Plasma pasien diencerkan dengan OBS  
 Tabung P1 (pengenceran 1:2):  
200 µl plasma pasien + 200 µl OBS  
 Tabung P2 (pengenceran 1:4):  
200 µl OBS + 200 µl dari tabung 1  
 Tabung P3 (pengenceran 1:8):  
200 µl OBS + 200 µl dari tabung 2  
 Tabung P4(pengenceran1:16):  
200 µl OBS + 200 µl dari tabung 3
3. Selanjutnya pada tabung yang berisi plasma pasien :  
 Tabung P1 : ditambahkan 200 µl CPN  
 Tabung P2 : ditambahkan 200 µl CPN  
 Tabung P3 : ditambahkan 200 µl CPN  
 Tabung P4 : dibuang 200 µl isi tabung P4, kemudian  
ditambahkan 200 µl CPN
4. Buat standar :  
 Tabung S : 200 µl CPN + 200 µl OBS
5. Tabung P1,P2,P3,P4, dan S diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C
6. Standar (nomor 4) dibuat pengenceran :  
 Tabung S1(pengenceran 1:5) :  
100 µl dari tabung standar + 400 µl OBS  
 Tabung S2 (pengenceran 1:10) :  
250 µl OBS + 250 µl dari tabung S1



Tabung S3 (pengenceran 1:20) :

250  $\mu$ L OBS + 250  $\mu$ L dari tabung S2

7. Lakukan pemeriksaan aktifitas F VIII pada tabung S1, S2, S3 dengan cara :
  - Diambil 100  $\mu$ L dari tabung S1 + 100  $\mu$ L reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu$ L reagen pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan CaCl<sub>2</sub>  
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
  - Diambil 100  $\mu$ L dari tabung S2 + 100  $\mu$ L reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu$ L reagen pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan CaCl<sub>2</sub>  
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
  - Diambil 100  $\mu$ L dari tabung S3 + 100  $\mu$ L reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu$ L reagen pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan CaCl<sub>2</sub>  
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
8. Hasil diplot pada kurva standar dengan menggunakan kertas grafik. Ditarik garis melalui ketiga titik tersebut yang harus dalam bentuk garis lurus.
9. Dilakukan pengenceran tabung P1,P2,P3,P4 (dari nomor 3) dengan cara :

Tabung Pa1 (pengenceran 1:5) :

100  $\mu$ L dari tabung P1 + 400  $\mu$ L larutan bufer veronal

Tabung Pa2 (pengenceran 1:5) :

100  $\mu$ L dari tabung P2 + 400  $\mu$ L larutan bufer veronal

Tabung Pa3 (pengenceran 1:5) :

100  $\mu$ L dari tabung P3 + 400  $\mu$ L larutan bufer veronal

Tabung Pa4 (pengenceran 1:5) :

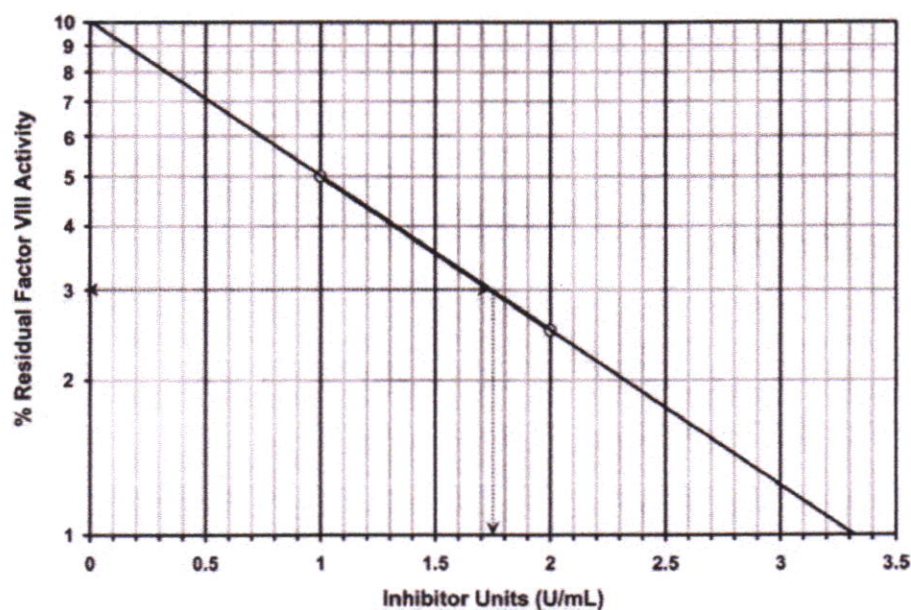
100  $\mu$ L dari tabung P4 + 400  $\mu$ L larutan bufer veronal

10. Dilakukan pemeriksaan aktifitas F VIII pada tabung Pa1, Pa2, Pa3, Pa4

dengan cara :

1. Diambil 100  $\mu$ L dari tabung Pa1 + 100  $\mu$ L reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu$ L reagen Pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan CaCl<sub>2</sub>  
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
2. Diambil 100  $\mu$ L dari tabung Pa2 + 100  $\mu$ L reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu$ L reagen Pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan CaCl<sub>2</sub>  
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.

3. Diambil 100  $\mu\text{L}$  dari tabung Pa3 + 100  $\mu\text{L}$  reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu\text{L}$  reagen Pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan  $\text{CaCl}_2$   
Dibaca lamanya .pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
  4. Diambil 100  $\mu\text{L}$  dari tabung Pa4 + 100  $\mu\text{L}$  reagen F VIII defisiensi plasma + 100  $\mu\text{L}$  reagen Pathromtin SL. Inkubasi 2 menit, tambahkan  $\text{CaCl}_2$   
Dibaca lamanya pembentukan bekuan dengan alat koagulometer.
11. Ditentukan aktivitas F VIII yang ada di Pa1, Pa2,Pa3,Pa4 dari kurva standar. Diantara keempat hasil tersebut dilihat yang aktifitas F VIII yang paling mendekati 50% dan dalam range 30-60%, dipilih satu untuk kalkulasi inhibitor. Kemudian dibaca dari kurva inhibitor, aktivitas tersebut sesuai dengan berapa Bethesda Unit. Hasilnya dikalikan faktor pengenceran awal dari tabung yang dipilih untuk kalkulasi inhibitor .



Gambar 2,8. Kurva kalibrasi pemeriksaan Bethesda. Misal aktivitas F VIII diukur setelah inkubasi plasma pasien dan kontrol selama 2 jam adalah 30 % ( ditandai x pada aksis Y). Interpolasi grafik menunjukkan antibody F VIII berada pada kadar 1,75 Bethesda Units. Jika sampel pasien diencerkan saat inkubasi, maka nilai 1,75 dikalikan faktor pengenceran untuk mendapatkan hasil.<sup>36</sup>

### 3.9. DEFINISI OPERASIONAL

Hemofilia A berat :

dari hasil laboratorium didapatkan aktivitas F VIII < 1%

Hemofilia A sedang :

dari hasil laboratorium didapatkan aktivitas F VIII 1-5%

Hemofilia A ringan :

dari hasil laboratorium didapatkan aktivitas F VIII > 5-40%

Inhibitor F VIII adalah :

antibodi poliklonal Ig G dengan afinitas tinggi terhadap F VIII, yang dinilai dengan Bethesda Unit (BU)/mL

1 Bethesda Unit adalah :

Jumlah inhibitor yang akan menetralkan 50% dari satu unit F VIII yang ditambahkan dalam 2 jam pada suhu 37 °C

Inhibitor positif :

Titer inhibitor yang dapat dibaca dengan pemeriksaan Bethesda > 0,5 BU

*High responder :*

Berdasarkan definisi dari *International Society of Thrombosis and Haemostasis*, bila titer inhibitor > 5 BU /mL dan terjadi reaksi anamnestik yaitu terdapat peningkatan titer inhibitor jika mendapat terapi pengganti F VIII.

*Low responder :*

Berdasarkan definisi dari *International Society of Thrombosis and Haemostasis* bila titer inhibitor ≤ 5BU /mL

*Exposure day :*

jumlah hari pemberian infus F VIII.

Pada penelitian ini dihitung *exposure day* dalam 1 tahun terakhir

Kriopresipitat :

Komponen darah yang berasal dari proses pencairan *fresh frozen plasma* dan diambil bagian yang mengendap (kriopresipitat). Kriopresipitat banyak mengandung FVIII, F V, fibrinogen, F IX, F XIII, VWF, fibronektin.

Konsentrat F VIII berasal dari plasma :

Konsentrat F VIII *lyophilized* yang berasal dari plasma banyak donor.

Konsentrat F VIII rekombinan :

Konsentrat F VIII rekombinan yang berasal dari kloning gen F VIII

### **3.10. PENGOLAHAN DAN ANALISA DATA**

Data yang diperoleh dicatat dan dimasukkan ketabel. Setelah itu dipastikan kelengkapannya, dilakukan analisa data. Untuk melihat karakteristik data dilakukan secara deskriptif. Untuk mengetahui hubungan dua variabel dilakukan Chi Square test. Untuk mengetahui hubungan beberapa variabel dilakukan uji regresi logistik.

### **3.11. ETIKA PENELITIAN**

Peneliti memberi penjelasan kepada subyek penelitian mengenai tujuan penelitian, manfaat penelitian, dan prosedur penelitian kemudian subyek diminta menandatangani persetujuan tertulis atas kesediaannya untuk ikut dalam penelitian. Subyek penelitian bebas untuk menyetujui atau menolak berpartisipasi dalam penelitian setelah mendapat penjelasan.

Penelitian telah mendapat izin dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Indonesia dengan nomor surat 130/PT02.FK/ETIK/2012.

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1. Uji ketelitian *within run*

Uji ketelitian *within run* dilakukan sebanyak 5 kali menggunakan sampel pasien. Pada uji ketelitian *within run* didapatkan *coefficient of variation* (CV) sebesar 4,37 %

**Tabel 4.1. Hasil uji ketelitian sampel**

Pemeriksaan	inhibitor F VIII (BU)
1	1,6
2	1,5
3	1,6
4	1,6
5	1,7
Mean	1,6
SD	0,07
CV (%)	4,37

#### 4.2. Karakteristik subyek penelitian

Karakteristik subyek penelitian seperti diperlihatkan pada tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Karakteristik subyek penelitian**

Variabel		deskripsi n (%)
Umur	rerata (tahun)	16,3±11,1
	< 5 tahun	12 (12)
	5-18 tahun	55 (55)
	>18 tahun	33 (33)
Jenis kelamin	Lelaki	99 (99)
	perempuan	1 (1)
Derajat penyakit	hemofilia berat	74 (74)
	hemofilia sedang	20 (20)
	hemofilia ringan	6 (6)

#### 4.3. Proporsi inhibitor faktor VIII pada hemofilia A.

Tabel 4.3 menyajikan proporsi inhibitor F VIII pada hemofilia A di RSCM didapatkan hasil 31%. Proporsi *high responder* adalah 16%, dan proporsi *low responder* adalah 84%

**Tabel 4.3. Proporsi inhibitor Faktor VIII pada hemofilia A**

Variabel	deskripsi n (%)
Inhibitor negatif	69 (69)
Inhibitor positif	31 (31)
<i>high responder</i>	5 (16)
<i>low reponder</i>	26 (84)

#### 4.4. Proporsi inhibitor faktor VIII berdasarkan derajat hemofilia A

Tabel 4.4. menyajikan proporsi inhibitor F VIII berdasarkan derajat hemofilia A. Proporsi inhibitor F VIII paling banyak terdapat pada hemofila berat sebanyak 35%.

**Tabel 4.4. Proporsi inhibitor F VIII berdasarkan derajat hemofilia A.**

Derajat hemofilia A	inhibitor positif n (%)
Hemofilia berat	26 (35)
Hemofilia sedang	5 (25)
Hemofilia ringan	0

#### 4.5. Proporsi *high responder* dan *low responder* inhibitor faktor VIII berdasarkan derajat hemofilia A

Tabel 4.5. menyajikan proporsi *high responder* dan *low responder* inhibitor F VIII berdasarkan derajat hemofilia A. Pada pasien hemofilia berat didapatkan proporsi *high responder* adalah 23% dan proporsi *low responder* adalah 77%. Pada pasien hemofilia sedang tidak ditemukan *high responder*. Pada pasien hemofilia ringan tidak ditemukan inhibitor.

**Tabel 4.5 Proporsi *high responder* dan *low responder* inhibitor F VIII berdasarkan derajat hemofilia A**

Derajat hemofilia A	<i>high reponsder</i> n (%)	<i>low responder</i> n (%)
Hemofilia berat	6 (23)	20 (77)
Hemofilia sedang	0	5 (100)
Hemofilia ringan	0	0

#### 4.6. Hubungan usia pertama diberi terapi pengganti faktor VIII dengan pembentukan inhibitor

Tabel 4.6 memperlihatkan bahwa pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia <12 bulan mempunyai OR 2,66 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia  $\geq 12$  bulan, dan terdapat perbedaan yang bermakna.

**Tabel 4.6. Hubungan usia pertama diberi terapi pengganti Faktor VIII dengan pembentukan inhibitor**

Usia pertama mendapat terapi pengganti F VIII	jumlah pasien n (%)	Inhibitor positif n (%)	nilai p	Odds Ratio	IK 95% min-maks
< 1 tahun	33 (33)	15 (47)	0,03	2,66	1,09-6,44
$\geq 1$ tahun	67 (67)	16 (25)		1	

#### 4.7. Hubungan *exposure day* dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A

Tabel 4.7 memperlihatkan bahwa pasien dengan *exposure day*  $\geq 20$  mempunyai OR 7,69 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien dengan *exposure day*  $< 10$ . Pada pasien dengan *exposure day* 10-20 mempunyai OR 1,14 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien dengan *exposure day*  $< 10$ .

**Tabel 4.7. Hubungan *exposure day* dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A**

<i>Exposure day</i>	jumlah pasien	Inhibitor positif	nilai p	Odds Ratio	IK 95%
	n (%)	n (%)			min-maks
$\geq 20$	51 (51)	25 (49)	0,06	7,69	0,90-66,05
10 - < 20	40 (40)	5 (12)	0,90	1,14	0,12-11,12
$< 10$	9 (9)	1 (11)		1	

#### 4.8. Hubungan jenis terapi dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A

Tabel 4.8. memperlihatkan bahwa pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma mempunyai OR 2,40 untuk membentuk inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan mempunyai OR 2,17 untuk membentuk inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Pasien yang mendapat terapi pengganti kombinasi mempunyai OR sama untuk membentuk inhibitor dibandingkan pasien dengan terapi pengganti kriopresipitat.



**Tabel 4.8. Hubungan jenis terapi dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A**

Jenis terapi pengganti	jumlah pasien	Inhibitor positif	nilai p	Odds ratio	IK 95%
	n (%)	n (%)			min-maks
Konsentrat F VIII berasal dari plasma <sup>£</sup>	16 (16)	6 (41)	0,47	2,40	0,22-26,82
Konsentrat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan <sup>§</sup>	54 (54)	19 (34)	0,49	2,17	0,23-20,84
Kombinasi (konsentrat FVIII dan kriopresipitat <sup>¶</sup>	25 (25)	5 (20)	1,00	1	
Kriopresipitat	5 (5)	1 (20)		1	

<sup>£</sup> koate

<sup>§</sup> kogenate, koate

<sup>¶</sup> (koate, kriopresipitat),(kogenate, koate, kriopresipitat)

## BAB 5 PEMBAHASAN

### 5.1. Karakteristik subyek penelitian

Penelitian ini dilakukan pada 100 subyek, terdiri atas 99 orang lelaki dan 1 orang perempuan. Pasien HIV dikeluarkan dari penelitian karena pada pasien HIV terjadi penurunan sel T CD4<sup>+</sup>. Pada pasien hemofilia A, sel T CD 4<sup>+</sup> berperan dalam pembentukan inhibitor F VIII sehingga adanya penyakit HIV pada pasien hemofilia A akan mengganggu pengukuran dan interpretasi. Hemofilia A lebih sering bermanifestasi pada lelaki karena hemofilia A merupakan kelainan yang diturunkan secara *X-linked recessive*. Hemofilia A juga bisa bermanifestasi pada perempuan. Pada penelitian ini terdapat 1 orang pasien hemofilia A perempuan. Manifestasi hemofilia A pada perempuan bisa karena *true hemophilia* yaitu anak perempuan dari seorang ayah hemofilia dengan ibu carrier, atau carrier hemofilia yang bermanifestasi. Pada carrier hemofilia, gen yang diekspresikan terjadi secara random. Jika yang diekspresikan adalah gen abnormal maka hemofilia bermanifestasi secara klinis, sebaliknya jika yang diekspresikan gen yang normal, maka tidak muncul gejala hemofilia. Fenomena ini disebut *lyonization* karena pertama kali ditemukan oleh Mary Lyon pada tahun 1962.<sup>37,38</sup>

Pada penelitian ini, 74 subyek adalah pasien hemofilia berat, karena pasien hemofilia berat lebih sering mengalami perdarahan dan perlu berobat ke Rumah Sakit untuk mendapat terapi pengganti faktor VIII.

### 5.2. Proporsi inhibitor Faktor VIII pada hemofilia A.

Pada penelitian ini ditemukan pasien hemofilia A dengan inhibitor F VIII sebanyak 31 orang (31%). Proporsi inhibitor pada pasien hemofilia A berat 35%, dan pada pasien hemofilia A sedang 25%, serta pada hemofilia A ringan tidak ditemukan inhibitor. Hal ini sesuai dengan kepustakaan bahwa inhibitor F VIII lebih sering dijumpai pada hemofilia A berat.<sup>11, 39</sup> Menurut Berntorp, 20-30% pasien dengan hemofilia A memiliki inhibitor.<sup>6</sup> Menurut Berg proporsi inhibitor

pada pasien hemofilia A berat berkisar antara 20–52%.<sup>39</sup> Penelitian Bray dkk mendapatkan hasil 31% dan Lusher dkk mendapatkan hasil 30%.<sup>11</sup> Penelitian Gouw dkk mendapatkan hasil 28%.<sup>40</sup>

Berdasarkan ISTH, pasien hemofilia A dengan inhibitor dapat dibedakan atas *high responder* dan *low responder*. *High responder* apabila titer inhibitor >5 BU dan terjadi reaksi anamnestik yaitu terdapat peningkatan titer inhibitor jika mendapat terapi pengganti F VIII. Pada pasien hemofilia A berat didapatkan proporsi *high responder* adalah 23% dan proporsi *low responder* adalah 77%. Pada pasien hemofilia A sedang ditemukan semuanya adalah *low responder*, sedangkan pada pasien hemofilia ringan tidak ditemukan inhibitor. Pasien dengan *high responder* memiliki risiko perdarahan yang mengancam jiwa dan memerlukan terapi yang kompleks.<sup>40</sup>

### **5.3. Hubungan usia pertama diberi terapi pengganti Faktor VIII dengan pembentukan inhibitor**

Pada penelitian ini pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia <1tahun mempunyai OR 2,66 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia ≥1tahun. Interpretasi hasil adalah pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia <1tahun mempunyai risiko 2,66 kali untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia ≥1tahun.

Jika penderita hemofilia A terpajan faktor VIII pada usia dini maka diduga akan menyebabkan pembentukan inhibitor. Hal ini disebabkan pemberian terapi pengganti F VIII pada usia dini akan menimbulkan interaksi awal F VIII dengan sel T CD4 yang mengaktifkan sistem imun dan berpotensi untuk memfasilitasi pembentukan inhibitor.<sup>32</sup> Pembentukan inhibitor dipengaruhi usia saat pertama kali diberi terapi pengganti F VIII. Lorenzo dkk pertama kali melaporkan pada penelitian terhadap 62 pasien hemofilia A. Pada penelitian tersebut didapatkan insiden inhibitor 41% jika usia pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII <6 bulan, 29% jika 6-<12 bulan, dan 12% jika ≥12 bulan (P = 0,03).<sup>11, 41</sup> Penelitian

Avest dkk menunjukkan pada pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia <1 bulan memiliki OR 2,8 dibandingkan usia  $\geq 12$  bulan. Pada usia <6 bulan memiliki OR 1,8 dibandingkan usia  $\geq 12$  bulan, dan pada usia 6-<12 bulan memiliki OR 1,3 dibandingkan usia  $\geq 12$  bulan, serta pada usia <12 bulan memiliki OR 1,59 dibandingkan usia  $\geq 12$  bulan.<sup>42</sup>

#### **5.4. Hubungan *exposure day* dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A**

Pada penelitian ini, pasien dengan *exposure day*  $\geq 20$  mempunyai OR 7,69 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien dengan *exposure day* <10. Pada pasien dengan *exposure day* 10-<20 mempunyai OR 1,14 untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien dengan *exposure day* <10. Interpretasi hasil adalah pasien dengan *exposure day*  $\geq 20$  mempunyai risiko 7,69 kali untuk terbentuknya inhibitor dibandingkan pasien dengan *exposure day* <10. Pasien dengan *exposure day* 10-<20 mempunyai risiko 1,14 kali untuk terbentuknya inhibitor dibandingkan pasien dengan *exposure day* <10

Penelitian Gouw dkk mendapatkan hasil bahwa makin lama *exposure day* maka risiko pembentukan inhibitor makin meningkat dan lebih pendek interval antara *exposure day* maka risiko pembentukan inhibitor makin meningkat.<sup>40</sup>

#### **5.5. Hubungan jenis terapi dengan pembentukan inhibitor pada hemofilia A**

Pada penelitian ini, pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma mempunyai OR 2,40 untuk membentuk inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan mempunyai OR 2,17 untuk membentuk inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Interpretasi hasil adalah pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma mempunyai risiko 2,40 kali untuk terbentuknya inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Pasien yang mendapat terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan mempunyai risiko 2,17 kali untuk terbentuknya inhibitor dibandingkan pasien yang mendapat kriopresipitat. Jenis terapi mempengaruhi

pembentukan inhibitor. Penelitian Perlinck dkk memperlihatkan bahwa insiden pembentukan inhibitor pada pasien hemofilia A yang diterapi dengan kriopresipitat adalah 6%. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pasien yang diberi F VIII konsentrat memperlihatkan insiden pembentukan inhibitor yang lebih tinggi dibandingkan pasien yang diberi kriopresipitat.<sup>43</sup>

Sampai saat ini masih diperdebatkan apakah pembentukan inhibitor lebih tinggi pada pasien yang menerima F VIII rekombinan atau yang berasal dari plasma. Penelitian Gouw.SC pada 376 pasien hemofilia A berat memberikan hasil bahwa pasien yang menerima produk faktor VIII berasal dari plasma tidak menurunkan risiko perkembangan inhibitor dibandingkan pasien yang menerima produk F VIII rekombinan. Pasien yang di *switching* diantara derivat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan tidaklah meningkatkan risiko.<sup>40</sup> Penelitian Goudemand J pada 148 pasien hemofilia A berat mendapatkan hasil pasien yang menerima F VIII rekombinan berisiko 2,5 sampai 3 kali untuk terbentuk inhibitor dibandingkan pasien yang menerima F VIII berasal dari plasma.<sup>44</sup> Penelitian Iorio dkk mendapatkan hasil tidak terdapat perbedaan risiko pembentukan inhibitor antara konsentrat F VIII berasal dari plasma dan rekombinan.<sup>45</sup>

#### **.5.6. Kekuatan dan keterbatasan penelitian**

Penelitian ini menyajikan proporsi inhibitor F VIII dan menganalisis faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor F VIII dengan jumlah sampel yang cukup sesuai perhitungan statistik. Pembentukan inhibitor masih merupakan komplikasi paling penting yang dihadapi pasien hemofilia saat ini dan masih belum jelas diketahui faktor - faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor F VIII. Data mengenai proporsi dan faktor yang berhubungan dengan pembentukan inhibitor F VIII masih jarang ditemukan di Indonesia.

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak meneliti faktor genetik. Disamping itu pada penelitian ini, tidak ditemukan pasien yang diterapi dengan rekombinan F VIII saja sehingga penelitian ini tidak dapat membandingkan risiko terbentuknya inhibitor F VIII antara pasien yang diterapi dengan konsentrat berasal dari plasma dan rekombinan.

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Telah dilakukan penelitian mengenai inhibitor F VIII pada hemofilia A. Penelitian ini menghasilkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Proporsi inhibitor F VIII pada pasien hemofilia A di RSCM adalah 31% dari pasien yang diteliti.
2. Proporsi inhibitor pada hemofilia A berat adalah 35% dari pasien hemofilia A berat yang diteliti, hemofilia sedang 25% dan pada hemofilia ringan tidak ditemukan inhibitor.
3. *High responder inhibitor* hanya ditemukan pada hemofilia berat dengan proporsi 23% dari pasien yang diteliti. Pada hemofilia sedang ditemukan semuanya adalah *low responder inhibitor* dan pada hemofilia ringan tidak ditemukan inhibitor.
4. Pembentukan inhibitor berhubungan dengan usia saat pertama kali diberi terapi pengganti F VIII. Pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia <1tahun mempunyai risiko 2,66 kali untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien yang pertama kali mendapat terapi pengganti F VIII pada usia  $\geq$ 1tahun.
5. Lamanya *exposure day* dalam 1 tahun mempengaruhi pembentukan inhibitor. Pasien dengan *exposure day*  $\geq$ 20 mempunyai risiko 7,69 kali untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan pasien dengan *exposure day* <10.
6. Jenis terapi mempengaruhi pembentukan inhibitor. Pasien yang diberi terapi pengganti konsentrat F VIII berasal dari plasma mempunyai risiko 2,40 kali untuk membentuk inhibitor F VIII dibandingkan dengan pasien yang diberi kriopresipitat.

## 6.2. Saran

Proporsi inhibitor F VIII pada pasien hemofilia A di RSCM yang tinggi maka disarankan untuk pemeriksaan inhibitor terutama pada hemofilia A berat dan sedang.

Pemberian terapi pengganti F VIII disarankan memperhatikan usia, *exposure day* dan jenis terapi untuk mengurangi timbulnya inhibitor. Pemberian terapi pengganti F VIII pada usia <1 tahun disarankan hanya diberikan pada keadaan pasien sangat membutuhkan.

Pada pasien hemofilia A yang memiliki inhibitor disarankan untuk dilakukan analisa genetik untuk mengetahui faktor genetik yang berperan dalam pembentukan inhibitor. Tipe mutasi gen F VIII akan berpengaruh terhadap risiko terbentuknya inhibitor dan tipe mutasi juga dihubungkan dengan beratnya hemofilia A.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Friedman KD, Rodgers GM. Inherited Coagulation Disorder. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Parakevas F, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12 th ed ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2009. p. 1380-424.
2. Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Everse NSJJ, Mann KG. Blood Coagulation and Fibrinolysis. In: Greer JP, Foerster J, Rodger GM, Paraskevas F, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 12 th ed ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2009. p. 529-605.
3. WFH. Guidelines for the management of hemophilia. Montreal World Federation of hemophilia 2005.
4. Powell JS. Recombinant factor VIII in the management of hemophilia A: current use and future promise *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2009;5:391-402.
5. Centers FDCP. Why we do research on hemophilia. *Haemophilia*. Atlanta: USA.gov; 2011. p. 1-2.
6. Berntorp E, Shapiro A, Astermark J, Blanchette VS, Collins PW, Dimichele D, et al. Inhibitor treatment in haemophilias A and B: summary statement for the 2006 international consensus conference. *Haemophilia* 2006;12(suppl 6):1-7.
7. Hay CR. The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia* 2006;12((Suppl 6)):23-9.
8. Lacroix-Desmazes S, Bayri J, Misra N, Horn MP, Villard S, Pashov A. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A. *N Engl J Med*. 2002;346(9):662-7.
9. Krudysz-Amblo J, Parhami-Seren B, Butenas S, Brummel-Ziedin KE, Gomperts ED, Rivard GE. Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood*. 2009;113(11):2587-94.
10. Kasper CK. Diagnosis and management of inhibitots to factors VIII and IX. *Treatment of hemophilia*. 2004;34:1-22.
11. DiMichele D. Inhibitors to factor VIII-epidemiology and treatment. In: A.Lee C, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of hemophilia*. Massachusett: Blackwell Publishing; 2005. p. 64-70.
12. Astermark J. Basic aspects of inhibitors to factors VIII and IX and the influence of non-genetic risk factors. *Haemophilia* 2006;12(suppl 6):8-14.
13. Lacroix-Desmazes S, Navarrete A-M, Bayry SAJ, V.Kaveri S, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood*. 2008;112(2):240-9.



14. A.Coppola, Santoro C, Tagliaferri A, Franchini M, Diminno G. Understanding inhibitor development in haemophilia A : towards clinical prediction and prevention strategies. *Haemophilia*. 2010;16(S1):13-9.
15. Chambost H. Assessing risk factors ; prevention of inhibitors in hemophilia. *Haemophilia*. 2010;16(s2):10-5.
16. Shima M, Yoshioka A. Haemophilia A and inhibitors. In: Tanaka KD, editor. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*. Tokyo: Springer; 2008. p. 389-405.
17. Ettingshausen CE, Kreuz W. Recombinant vs. plasma-derived products, especially those with intact VWF, regarding inhibitor development *Haemophilia*. 2006;12(suppl 6):94-102.
18. Saenko EL, Ananyeva NM. Hemophilia A: role of factor VIII in coagulation In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of Hemophilia*. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 27-33.
19. Kembal-Cook G, Tundenham E. Molecular Basis of Hemophilia A. In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of hemophilia*. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 19-26.
20. Kembal CG TE, Mc Vey JH. Normal haemostasis. In: Hoffbrand AV CD, Tuddenham EGD, editor. *Postgraduate haematology*. 5 ed. Malden Massachusetts: Blackwell publishing; 2005. p. 783-807.
21. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Hemostasis and thrombosis. . In: Stanley R, Cotran e, editors. *Basic Pathology 8 ed*: ed: Elsevier Saunders; 2007. p. 86-98.
22. Giangrande PL. The molecular basis of hemophilia. In: Provan D, Gribben J, editors. *Molecular Hematology*. 2 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 184-98.
23. Scott P, Montgomery RR. Hereditary Clotting Factor Deficiency; Factor VIII or Factor IX. In: Kleigman RM, Behrmen RE, Jenson HB, Stanton BF, editors. *Nelson Textbook of Pediatric*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
24. Maclean RM, Makris M. Hemophilia A and B. In: O'Shaughnessy D, Markis M, Lilicrap D, editors. *Practical Hemostasis and Thrombosis*. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 41-50.
25. service B. Cryoprecipitate. Australian Red Cross. 2011.
26. Giangrande PL. Products Used to Treat Hemophilia: Plasma-Derived Coagulation Factor Concentrates. In: A.Lee C, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of Hemophilia*. 1 ed. Massachusett: Blackwell Publishing; 2005. p. 142-46.
27. Lusherl JM. Hemophilia: From Plasma to Recombinant Factors. *Hematology library*, American Society of Hematology. 2011.
28. Yoshioka A. Products Used to Treat Hemophilia: Recombinat products. In: A.Lee C, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of Hemophilia*. 1 ed. Massachusett: Blackwell Publishing; 2005. p. 136-41.
29. Kitchen S, McGraw A. Diagnosis of Haemophilia and Other Bleeding Disorders. *A laboratory Manual*. Montreal: World Federation of Hemophilia; 2000. p. 72-7.
30. Hay CRM, Brown S, Collins P, Keeling D, Liesner R. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors; a guideline from United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization. *British Journal of Haematology*. 2006;133:591-605.
31. Viel KR, Ameri A, Thomas C, Abshire, Iyer RV, Watts RG, Lutch C. Inhibitors of Factor VIII in Black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009;360:1618-27.
32. Astermark J. Why do inhibitors develop ? Principles of factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia*. 2006;12(3):52-60.

33. Sacher RA, McPherson RA. Ilmu Kedokteran Transfusi In: Sacher RA, McPherson RA, editors. Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium. 11 ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG; 2002. p. 235-85.
34. Jacquemin M, Vantomme V, Buhot C, Lavendhomme R, Burny W, Demotte N. CD4 T-cell clones specific for wild-type factor VIII: a molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A. *Blood*. 2003;101:1351-8.
35. Marie J, Jacquemin MG. Inhibitor to factor VIII-immunology. In: Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK, editors. *Textbook of Hemophilia*. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2005. p. 53-8.
36. Rodgers GM. Testing for Inherited Bleeding Disorder. In: Bennet ST, Lehman CM, Rodgers GM, editors. *Laboratory Hemostasis*. Salt Lake City: Springer; 2007.
37. Haemophilia I. Bleeding disorder, haemophilia inheritance. New Street, Dublin 8: Irish Haemophilia Society.; 2012.
38. Barlow-Stewart K. X Chromosome Inactivation. In: Butler B, Jamieson R, Morgan G, Parasivam G, Turner MSA, editors. Centre for Genetics Education. Internet.; 2012.
39. Berg Mvd. Risk of inhibitor development in children with haemophilia A. *European Haematology Review*. 2007;1(1):8-10.
40. Gouw SC BJVd, Berg Marijke Van den Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007;109:4648-54.
41. Lorenzo JI, Lopez A, Altisent C, Aznar JA. Incidence of Factor VIII Inhibitors in Severe Hemophilia : The importance of patient age. *British Journal of Hematology*. 2001;113:600-3.
42. Avest Ter P, Mancuso ME, Santagostino E, Yuste VJ, Van Den Berg HM. Risk Stratification for inhibitor development at first treatment for severe hemophilia A : a tool for clinical practice. *J Thromb Haemost*. 2008;6:2048-54.
43. Peerlinck K RF, Vermeylen J. Incidence of Inhibitor Development in a Group of Young Hemophilia A Patients Treated Exclusively With Lyophilized Cryoprecipitate. *Blood*. 1993;81(12):3332-5.
44. Goudemand J RC, Demiquel V, Vinciquerratt C. Influence of type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 2006;107:46-51.
45. Iorio A HS, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E. Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J Thromb Haemost*. 2010;8(6):1256-65.