

**MUTASI *BASAL CORE PROMOTER* (BCP) DAN *PRECORE*
VIRUS HEPATITIS B PADA PERJALANAN INFEKSI
HEPATITIS B KRONIS**



TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER BIOMEDIK (M.Biomed)**

**TURYADI
0806419642**

**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
DESEMBER 2010**

PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun
dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Turyadi

NPM : 0806419642

Tanda tangan :



METERAI
TEMPEL
11B06AAF342784552
6000 DJP

Tanggal : 20 Desember 2010

PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Turyadi
NPM : 0806419642
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Mutasi *basal core promoter* (BCP) dan *precore* virus hepatitis B pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI


Pembimbing I : dr. Alida R Harahap, SpPK(K), Ph.D

()

Pembimbing II : dr. David H Muljono, SpPD, Ph.D

()


Penguji I : dr. Fera Ibrahim, MSc., SpMK, Ph.D

()

Penguji II : Prof. Drs. Purnomo Soeharso, Ph.D

()

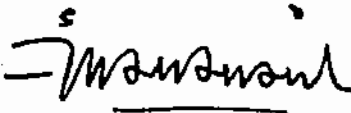
Penguji III : Dr. Drs. Heri Wibowo, MS

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 20 Desember 2010

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

()

(Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan karuniaNYA sehingga penulisan tesis ini dapat terselesaikan.

Tulisan yang merupakan hasil penelitian dan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister biomedik ini dapat saya selesaikan berkat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu, ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang tinggi saya haturkan kepada dr. David Handojo Muljono, SpPD., Ph.D dan dr. Alida R Harahap, SpPK, Ph.D atas bimbingan, arahan dan dukungan yang tidak ternilai selama ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Dr.rer.physiol. dr.Septelia Inawati Wanandi, Ketua Kekhususan Imunologi, Dr. Drs. Heri Wibowo, MS dan segenap jajaran pengajar di Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menimba ilmu di Universitas Indonesia.

Penghormatan dan ucapan terima kasih juga saya haturkan kepada Prof. dr. Sangkot Marzuki, AM, Ph.D, DSc, dan dr. Herawati A Sudoyo, MS., Ph.D sebagai pimpinan Lembaga Biologi Molekul Eijkman atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang yang lebih tinggi.

Terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Drs. Purnomo Soeharso, Ph.D dan dr. Fera Ibrahim, MSi, Sp.MK, Ph.D atas masukan dan arahan dalam diskusi-diskusi yang sangat berharga.

Ucapan terima kasih saya ucapkan kepada dr. Meta Dewi Theja, M.Biomed, Susan Irawati, B.Biomed.Sc., dan dr. MartonoRoni, SpPK di Laboratorium

Hepatitis Lembaga Eijkman yang telah banyak memberi masukan dan arahan selama penelitian hingga penulisan tesis ini.

Terima kasih juga kepada rekan-rekan di Laboratorium Hepatitis Lembaga Eijkman, Erick Sidarta, S.Si, drh. Ni Ketut Dyas Nursanti dan Agustiningsih, S.Si atas diskusi-diskusinya yang sangat berharga.

Terima kasih kepada Iskandar A Adnan S.Si, Windi Joanmawati, S.Si dan Eva Manulang, S.Si yang telah banyak membantu saya dalam proses sekuensing DNA sehingga penelitian saya dapat terselesaikan.

Terima kasih yang tidak terhingga kepada sahabat-sahabat saya di Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Dr. Puji Budi Setia Asih, S.Si, Leily Trianty, S.Si, MSi, Hannie HK, S.Si, Post Grad.Dipl., Debby DA, S.Si, dan masih banyak lagi yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan semangat dan dorongan dan masukan yang sangat berarti.

Tidak juga saya lupakan, ucapan terima kasih saya kepada teman-teman seangkatan khususnya dari Kekhususan Imunologi, dr. Armedy, Pratiwi, S.Si, dan dr. Dianne atas persahabatan dalam perjuangan selama ini.

Hormat dan bakti tulus ananda persembahkan kepada kedua orang tua tercinta Bapak Wiryo Utomo dan Ibu Sumini atas segala bimbingan, tauladan dan nasehat yang akan tetap ananda kenang. Tesis ini merupakan persembahan ananda sebagai wujud bakti meski belum tunai dibanding kasih sayang yang selama ini ananda terima.

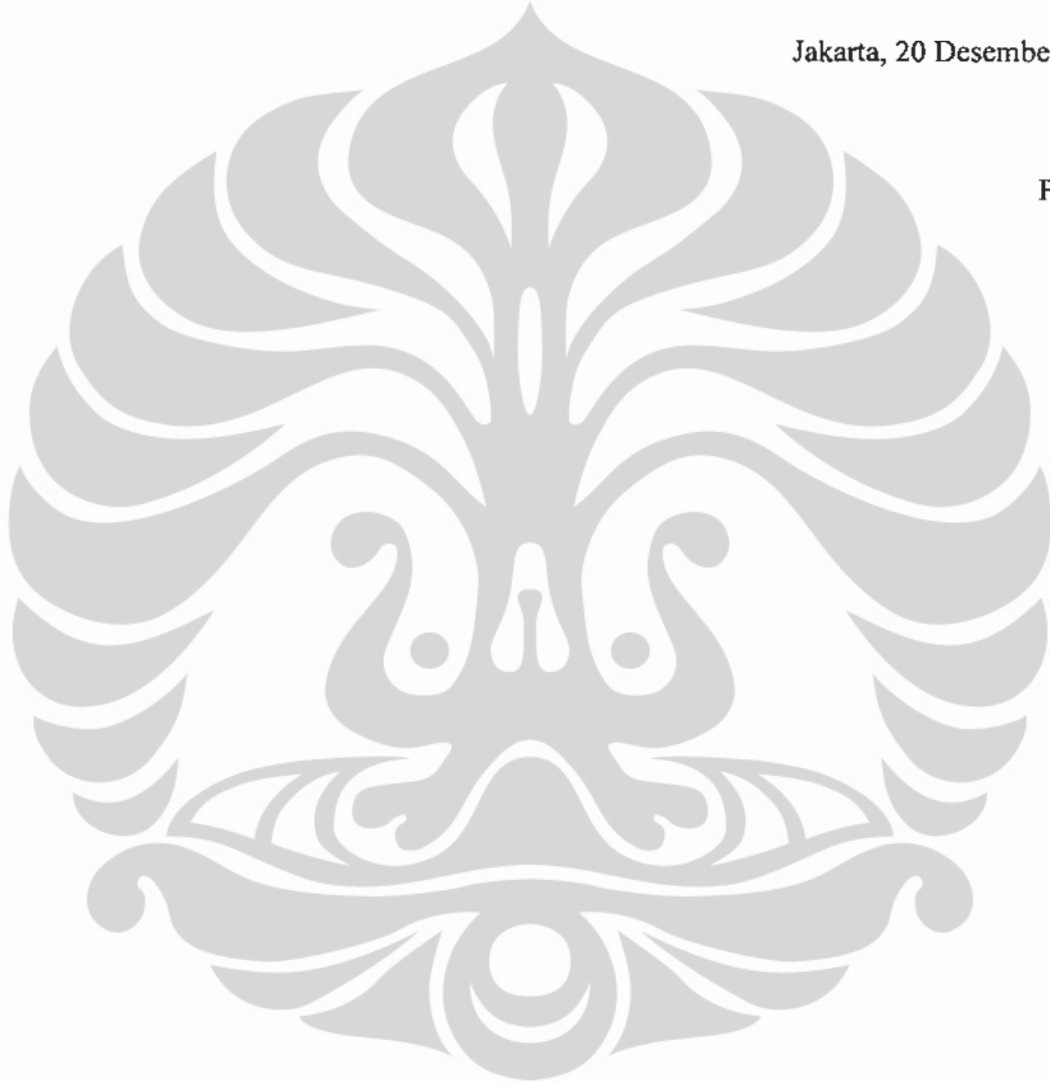
Rasa cinta, kasih dan sayang yang tidak pernah putus saya limpahkan kepada isteri tercinta Sri Handayani dan buah hati tersayang Zahrani Kusumaning

Tyas dan Naura Cahyaning Tyas. Semoga kecintaan, pengertian dan kesabaran kalian selama ini mendapat buah kasih dari Allah Subhanahu wa Ta'ala.

Akhir kata, semoga tesis ini dapat membawa manfaat bagi dunia pendidikan, dunia ilmu pengetahuan dan dunia kedokteran serta turut memberi andil bagi suksesnya penanggulangan penyakit hepatitis B di Indonesia.

Jakarta, 20 Desember 2010

Penulis



**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Turyadi
NPM : 0806419642
Program Studi : Ilmu Biomedik
Kekhususan : Immunologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Mutasi *basal core promoter* (BCP) dan *precore* virus hepatitis B pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya .

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 20 Desember 2010
Yang menyatakan



(Turyadi)

Abstrak

Nama : Turyadi
Program Studi : Ilmu Biomedik Kekhususan Imunologi
Judul : Mutasi *basal core promoter* (BCP) dan *precore* virus hepatitis B pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis

Latar Belakang. Mutasi A1762T/G1764A *basal core promoter* (BCP) dan G1896A *precore* pada genom virus hepatitis B (VHB) berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit hati, namun demikian peran mutasi-mutasi tersebut pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis masih belum jelas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi mutasi A1762T/G1764A dan G1896A serta hubungannya dengan fase-fase pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

Metodologi. Seratus empat puluh pasien hepatitis B kronis yang dilibatkan dalam penelitian ini, belum mendapatkan pengobatan, dan dikelompokkan ke dalam fase *immunotolerant* (IT), *immunoclearance* (IC), *non/low replicative* (LR) dan hepatitis "e"negatif (ENH). DNA VHB diperiksa dan diukur kadarnya dengan teknik *polymerase chain reaction*, kemudian disekuensing untuk dianalisis.

Hasil. Usia subjek lebih tua pada kelompok ENH dan LR dibandingkan dengan fase lain ($p < 0.05$). Kadar DNA paling tinggi pada fase IC dan paling rendah pada fase LR ($p < 0.001$), sementara pria mempunyai risiko lebih besar terjadi reaktivasi dengan HBeAg negatif ($p < 0.05$). Mutasi A1762T/G1764A tidak berbeda bermakna pada semua fase ($p = 0.56$) dan lebih tinggi pada genotipe C dan subtipe *adr* ($p < 0.05$). Mutasi G1896A paling tinggi pada fase LR ($p < 0.05$), dan tidak berbeda bermakna pada genotipe dan subtipe VHB. Tidak ada hubungan antara kadar DNA VHB dengan mutasi di *precore* dan BCP.

Kesimpulan. Prevalensi mutasi G1896A berbeda pada fase hepatitis B kronis di Indonesia, ditemukan lebih sering pada usia lebih tua dan fase lanjut. Mutasi A1762T/G1764A berkorelasi dengan genotipe dan subtipe VHB, sebaliknya tidak berhubungan dengan fase infeksi. Studi ini mengindikasikan bahwa mutasi BCP tidak berhubungan dengan serokonversi HBeAg pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

Kata kunci: hepatitis B kronis, perjalanan infeksi, *basal core promoter*, *precore*

Abstract

Name : Turyadi
Study Program : Biomedical Science, Majoring in Immunology
Title : Basal core promoter (BCP) and precore mutations during the natural history of chronic hepatitis B patients

Background: Precore G1896A and basal core promoter (BCP) A1762T/G1764A mutations of hepatitis B virus (HBV) genome have been correlated with severe liver diseases; however, their role in the pathogenesis of chronic hepatitis B (CHB) remains unclear. We assessed the prevalence and association of these mutations in different phases of CHB in Indonesian patients.

Methods: One-hundred and forty CHB patients, not undergoing antiviral therapy, were classified into immune-tolerance (IT), immune-clearance (IC), non/low-replicative (LR), and hepatitis B *e* antigen (HBeAg)-negative hepatitis (ENH) phases. HBV DNA was detected and quantified by polymerase chain reaction then analyzed by sequencing.

Results: ENH and LR patients were older than IC or IT patients ($p < 0.05$). HBV DNA levels were highest in IC patients and lowest in LR ($p < 0.0001$). The A1896 pre-core mutants were most prevalent in LR ($p < 0.001$) and higher in ENH ($p < 0.001$) than in IT and IC patients, while the A1762T/G1764A BCP mutants were comparable between all phases. The A1762T/G1764A BCP mutants were more frequently identified in genotype C than in genotype B ($p < 0.05$), and in subtype *adr* than in subtypes *adw* and *ayw* ($p < 0.05$). The T1858 mutants were detected in almost all HBV isolates regardless the genotypes (B and C). No associations were observed between HBV DNA levels and precore as well as BCP mutations.

Conclusions: The prevalence of precore A1896 mutation differed in phases of CHB in Indonesian patients with preponderance in older ages and later stages. BCP A1762T/G1764A mutations were associated with HBV genotypes and subtypes, irrespective of infection phases. These findings indicate that BCP mutations could be independent of HBeAg seroconversion in the natural history of chronic HBV infection.

Keywords : *chronic hepatitis B, natural history, basal core promoter, precore*

DAFTAR ISI

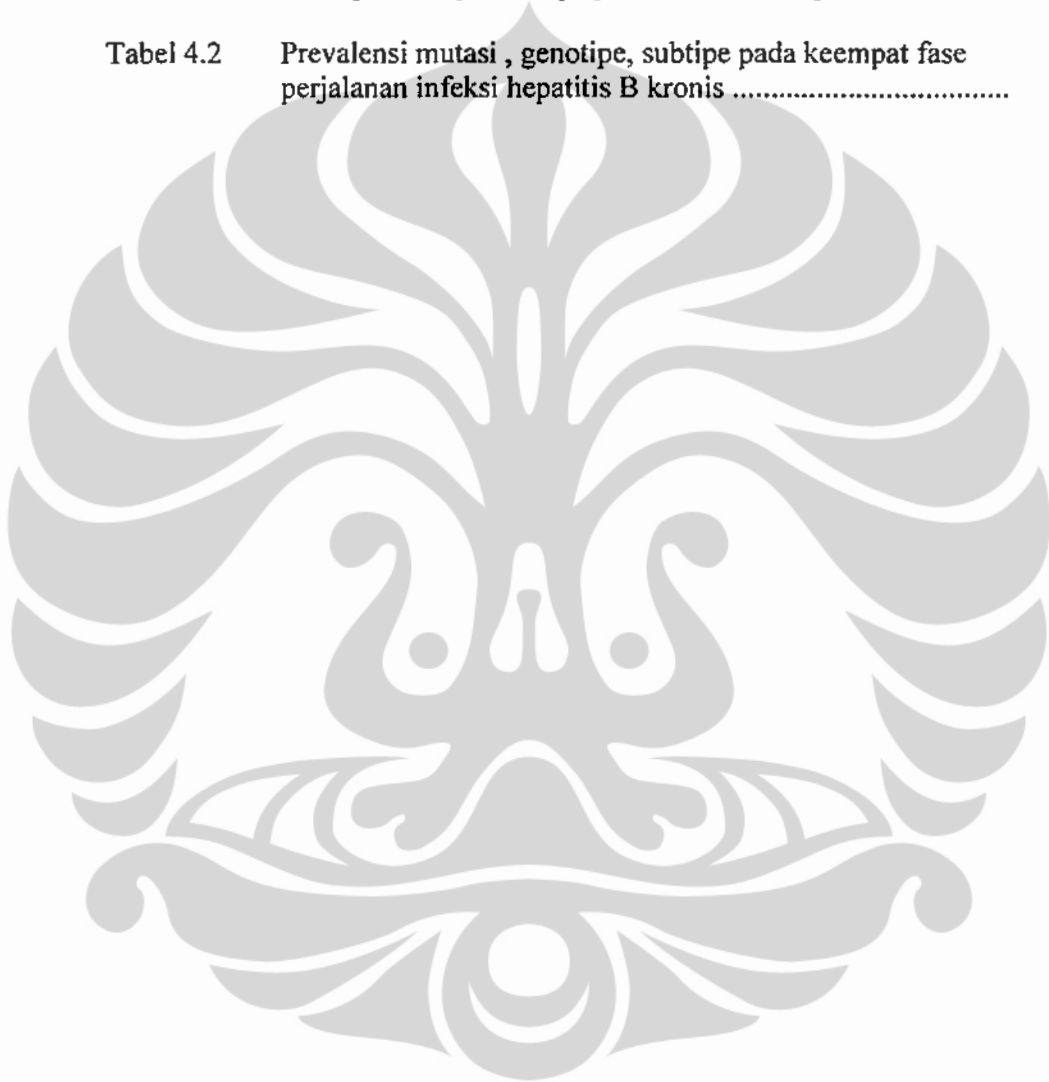
JUDUL	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
I. PENDAHULUAN	1
I.1 Latar belakang	1
I.2 Rumusan masalah	4
I.3 Tujuan penelitian.....	5
I.4 Manfaat penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
II.1 Epidemiologi	7
II.2 Sejarah dan klasifikasi virus hepatitis B.....	8
II.3 Organisasi genom virus hepatitis B	10
II.4 Siklus hidup virus hepatitis B	11
II.5 Respon imun terhadap infeksi virus hepatitis B	15
II.5.1. Respon imun pada infeksi virus hepatitis B akut	16
II.5.2. Respon imun pada infeksi virus hepatitis B kronis	16
II.6 Perjalanan infeksi hepatitis B kronis	18
II.7. Mutasi pada genom virus hepatitis B	19
II.7.1 Mutasi pada gen S	19

II.7.2	Mutasi pada gen P	19
II.7.3	Mutasi pada gen C	19
II.7.4	Mutasi pada gen X	20
II.8	Ekspresi HBeAg	20
III.	BAHAN DAN CARA KERJA	23
III.1	Desain penelitian	23
III.2	Tempat dan waktu penelitian	23
III.3	Bahan penelitian	23
III.4	Alur penelitian	24
III.5.	Pemeriksaan HBeAg dan anti-Hbe	25
III.6.	Pengelompokkan fase perjalanan infeksi virus hepatitis B kronis	26
III.7.	Isolasi DNA virus hepatitis B	27
III.8.	Amplifikasi DNA	27
III.9.	Elektroforesis gel agarosa	29
III.10.	Pemurnian fragmen DNA	29
III.11.	Sekuensing DNA	31
IV.	HASIL PENELITIAN	33
IV.1.	Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB	33
IV.2.	Prevalensi mutasi A1762T/G1764A, mutasi G1896A, genotipe dan sub tipe VHB	34
IV.3.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan jenis kelamin	35
IV.4.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan usia	36
IV.5.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan kadar ALT	36
IV.6.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan kadar DNA VHB	37

IV.7.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan genotipe dan subtype VHB	37
IV.8.	Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan status HBeAg	38
V	PEMBAHASAN	40
VI	KESIMPULAN DAN SARAN	46
VI.1	Kesimpulan	46
VI.2	Saran	46
	DAFTAR PUSTAKA	47
	LAMPIRAN	
	RIWAYAT HIDUP	
	DRAFT ARTIKEL	

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.	Primer untuk penentuan genotipe, subtipe dan deteksi mutasi BCP dan <i>precore</i>	28
Tabel 4.1.	Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB pada empat fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis ...	33
Tabel 4.2	Prevalensi mutasi , genotipe, subtipe pada keempat fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis	34



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peta penyebaran hepatitis B di dunia.....	7
Gambar 2.2.	Gen-gen pada virus hepatitis B yang saling tumpang tindih.....	10
Gambar 2.3.	Pada proses enkapsidasi, protein polimerase terikat pada epsilon.....	13
Gambar 2.4	Replikasi VHB dalam sel hepatosit	14
Gambar 2.5.	Mutasi G1896A menghentikan produksi HBeAg tanpa mengganggu produksi protein core.....	22
Gambar 3.1.	Alur penelitian.....	24
Gambar 3.2.	Pembagian fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis	26
Gambar 4.1.	Prevalensi mutasi BCP dan <i>precore</i> pada pria dan wanita ..	36
Gambar 4.2.	Hubungan antara mutasi BCP dan <i>precore</i> dengan usia inang	36
Gambar 4.3.	Hubungan antara mutasi BCP dan <i>precore</i> dengan kadar ALT	37
Gambar 4.4.	Hubungan antara mutasi BCP dan <i>precore</i> dengan kadar DNA VHB	37
Gambar 4.5.	Sebaran mutasi A1762T/G1764A dan A1896A pada genotipe VHB	38
Gambar 4.6.	Sebaran mutasi A1762T/G1764A dan G1896A pada sub tipe VHB	38
Gambar 4.7.	Hubungan antara mutasi BCP dan <i>precore</i> dengan status HBeAg	39
Gambar 5.1.	Nukleotida ke 1896 berpasangan dengan nukleotida ke 1858 pada struktur epsilon(ε)	44

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Surat persetujuan komisi etik
- Lampiran 2. Contoh surat persetujuan keikutsertaan (*inform consent*)
- Lampiran 3. Daftar subjek penelitian
- Lampiran 4. Gambar elektroforesis gel agarosa
- Lampiran 5. Elektroforegram hasil proses sekuensing DNA regio BCP
- Lampiran 6. Elektroforegram hasil proses sekuensing DNA regio *precore*
- Lampiran 7. Gambar elektroforegram hasil sekuensing fragmen DNA regio BCP dan *precore*
- Lampiran 8. Gambar elektroforegram hasil sekuensing fragment gen S
- Lampiran 9. Perhitungan Statistik
- Lampiran 10. Publikasi Abstrak pada APASL 2011 Bangkok

DAFTAR SINGKATAN

A	<i>Adenine</i>
ALT	<i>Alanine amino transferase</i>
AST	<i>Aspartate amino transferase</i>
BCP	<i>Basal core promoter</i>
C	<i>Core</i>
C	<i>Cytosine</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CHB	<i>Chronic hepatitis B</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
DMSO	<i>dymethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DR	<i>direct repeat</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENH	<i>"e" negative hepatitis B</i>
G	<i>Guanine</i>
GSHV	<i>ground squirrel hepatitis virus</i>
HBAg	<i>Hepatitis B antigen</i>
HBcAg	<i>Hepatitis B core antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IC	<i>Immunoclearance</i>
IFN	<i>interferon</i>
IL	<i>interleukin</i>
IT	<i>Immun tolerant</i>
IU	<i>International unit</i>
Kb	<i>Kilobasa</i>
L	<i>Liter</i>
LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
LR	<i>Low replicative</i>
mg	<i>Miligram</i>
MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
mL	<i>Mililiter</i>
mM	<i>Milimolar</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
N	<i>Normal</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>natural killer T</i>
nM	<i>Nanomolar</i>
NRE	<i>negative regulatory element</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
P	<i>polymerase</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>power of hydrogen</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
rcDNA	<i>relaxed circular deoxyribonucleic acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolution per minute</i>
S	<i>surface</i>
SHBs	<i>small hepatitis B surface protein</i>
T	<i>Tymine</i>
TMB	<i>tetramethylbenzidine</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UV	<i>Ultra violet</i>
V	<i>Volt</i>
VHA	<i>Virus Hepatitis A</i>
VHB	<i>Virus hepatitis B</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHV	<i>woodchuck hepatitis virus</i>
WMHV	<i>wooly monkey hepatitis virus</i>
µg	<i>Mikrogram</i>
µL	<i>Mikroliter</i>
µM	<i>Mikromolar</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Hepatitis B adalah penyakit hati akibat infeksi virus hepatitis B (VHB), yang merupakan masalah global di bidang kesehatan. Sekitar 2 milyar penduduk dunia terinfeksi VHB dan 360 juta di antaranya menjadi pengidap VHB kronis dengan risiko terjadinya sirosis dan kanker hati, sekaligus sebagai pembawa VHB. Selama tahun 2000 diperkirakan sekitar 620.000 penderita hepatitis B yang meninggal dunia, 580.000 (94%) di antaranya karena sirosis dan kanker hati yang disebabkan infeksi hepatitis B kronis, sementara 40.000 (6%) sisanya karena hepatitis B akut.¹

Indonesia merupakan wilayah dengan prevalensi pengidap hepatitis B mulai dari sedang hingga tinggi, dan secara umum dimasukkan pada daerah dengan prevalensi tinggi.²

Infeksi VHB dikelompokkan ke dalam infeksi akut dan infeksi kronis. Sekitar 95% pengidap hepatitis B kronis terinfeksi pada saat lahir atau masa kanak-kanak, sedangkan 5% lainnya terinfeksi pada usia dewasa.^{3,4}

Hepatitis B kronis (*chronic hepatitis B* = CHB) didefinisikan apabila pada penderita ditemukan adanya *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) dalam serum lebih dari 6 bulan. Hepatitis B kronis mempunyai spektrum yang luas, mulai dari tanpa gejala, hepatitis kronis aktif, sirosis hati sampai terjadinya kanker hati.^{5,6} Berdasarkan status *hepatitis B e antigen* (HBeAg), kadar DNA VHB, dan kadar *alanine transaminase* (ALT), Fattovich et al membagi perjalanan infeksi hepatitis B kronis ke dalam empat fase, meliputi: (1) fase imunotoleran (*immunotolerant* = IT) yang merupakan awal dari infeksi yang ditandai dengan HBeAg positif, kenaikan kadar DNA VHB, kadar ALT normal, (2) fase imunoreaktif (*immunoclearance* = IC) yang merupakan fase lanjutan dari fase IT dengan ciri-ciri HBeAg positif, kadar virus mulai menurun atau fluktuatif, serta kadar ALT cenderung meningkat atau fluktuatif, (3) replikasi rendah atau tanpa replikasi (*low replicative* = LR) adalah fase inaktif ditandai HBeAg negatif dengan kadar DNA VHB yang rendah atau tidak terdeteksi,

kadar ALT normal, dan (4) fase hepatitis B dengan HBeAg negatif ("*e*" *negative hepatitis* = ENH) sering disebut juga dengan fase reaktivasi dan ditandai dengan HBeAg negatif, kenaikan kadar DNA VHB, serta kenaikan kadar ALT.⁷

Pada fase LR risiko terjadinya sirosis dan kanker hati sangat rendah dan telah mengalami serokonversi HBeAg dari HBeAg positif dan anti-HBe negatif menjadi HBeAg negatif dan anti-HBe positif.⁸ Serokonversi HBeAg pada fase LR dianggap sebagai penanda penurunan replikasi virus, sehingga serokonversi HBeAg dijadikan target jangka pendek pada terapi hepatitis B. Ternyata sebagian penderita hepatitis B dengan HBeAg negatif dapat mengalami reaktivasi menuju fase ENH, di mana replikasi terjadi kembali, baik diikuti HBeAg positif maupun tetap dengan HBeAg negatif. Pada tahap ini infeksi berkembang menjadi hepatitis B kronis aktif, di mana kemungkinan terjadinya sirosis hati adalah 2–4%.⁹ Terjadinya sirosis hati pada penderita hepatitis B kronis dengan HBeAg negatif dua kali lebih besar dibanding pada penderita dengan HBeAg positif.⁷ Fase ini biasanya terjadi pada pasien yang lebih tua dengan kerusakan hati yang berkelanjutan karena merupakan fase lanjut dari infeksi hepatitis B kronis.¹⁰

Protein prekursor HBeAg yang disandi oleh gen *core* (C), setelah mengalami proses modifikasi pasca translasi menjadi HBeAg diekspresikan ke luar hepatosit dan akhirnya masuk ke dalam aliran darah. Gen C dalam transkripsinya menghasilkan dua macam *messenger RNA* (mRNA) yaitu: (1) mRNA *precore* yang menyandi HBeAg dan (2) mRNA *pregenom* yang menyandi protein C, yang merupakan komponen kapsid. Selain itu gen C juga mengalami transkripsi balik menghasilkan DNA genom pada proses replikasi VHB.¹¹

Proses transkripsi balik pada replikasi VHB tidak mempunyai kemampuan koreksi (*proof reading*) jika terjadi salah baca. Hal ini menyebabkan laju mutasi pada genom VHB lebih cepat dibanding virus DNA yang lain. Mutasi tersebut dapat terjadi pada semua gen dan dapat mempengaruhi protein yang disandinya termasuk mempengaruhi ekspresi HBeAg jika mutasi tersebut terjadi pada regio *precore* yang merupakan bagian dari gen C atau terjadi pada regio promoter yang mengatur transkripsinya.¹²

Dalam hubungannya dengan ekspresi HBeAg selama replikasi virus, terdapat dua kelompok mutasi yang mempengaruhi ekspresi HBeAg. Yang pertama mutasi G1896A pada regio *precore* yang terletak pada basa ke-1896 guanin (G) menjadi adenin (A) menyebabkan kodon ke 28 yang menyandi triptofan berubah menjadi kodon stop. Mutasi ini menyebabkan kegagalan ekspresi HBeAg karena protein prekursor gagal dibentuk. Pada RNA pregenom, nukleotida 1896 terletak pada daerah lengkung sinyal enkapsidasi (disebut $\epsilon = \textit{epsilon}$) yang sangat penting pada proses replikasi VHB, dan berpasangan dengan nukleotida 1858 (kodon ke 15). Karena perlu adanya kestabilan struktur ϵ , maka mutasi G1896A pada *loop* tersebut dipengaruhi pasangannya yaitu basa ke 1858. Mutasi C1858T pada regio *precore* yang merubah sitosin (*cytosine* = C) menjadi timin (T) meningkatkan kestabilan mutasi G1896A, atau dengan kata lain mutasi C1858T merupakan faktor disposisi terjadinya mutasi G1896A.¹³ Kelompok mutasi kedua yang mempengaruhi ekspresi HBeAg adalah yang terjadi pada regio *basal core promoter* (BCP) yang merupakan mutasi ganda A1762T/G1764A yang merubah A menjadi T pada basa ke 1762 dan G menjadi A pada basa ke 1764. Mutasi ini menyebabkan penurunan laju transkripsi mRNA *precore* sehingga ekspresi HBeAg juga menurun.¹⁴

Kedua mutasi tersebut telah dilaporkan berhubungan dengan keparahan penyakit. Mutasi *precore* dilaporkan berasosiasi erat dengan terjadinya hepatitis akut fulminan, khususnya di daerah mediterrania.^{3,15} Sedangkan mutasi BCP berasosiasi dengan manifestasi penyakit yang lebih parah, seperti sirosis yang progresif dan kanker hati.¹⁶ Namun demikian peranan kedua kelompok mutasi tersebut dalam hubungannya dengan perjalanan infeksi hepatitis B kronis masih belum banyak diketahui.

Selain hubungannya dengan perubahan status HBeAg akibat mutasi tersebut, keparahan penyakit hati juga dihubungkan dengan karakteristik genetik virus, yaitu genotipe VHB yang ditentukan berdasarkan variasi susunan genom VHB, dan serotipe VHB yang ditentukan berdasarkan perbedaan reaksi serologi. Terdapat delapan genotipe VHB, yaitu A-H, serta empat subtipe utama VHB, yaitu *adw*, *adr*, *ayw* dan *ayr*.^{17,18}

1.2. Rumusan masalah

Indonesia merupakan wilayah dengan prevalensi hepatitis B kronis yang tinggi dengan risiko terjadinya sirosis dan kanker hati. Faktor yang memegang peranan utama pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis meliputi: kadar DNA VHB, HBeAg, genotipe VHB, dan mutasi pada BCP dan *precore*.¹⁹ Faktor-faktor tersebut dapat berperan sendiri-sendiri maupun kombinasi, namun demikian mekanismenya belum banyak diketahui sehingga diperlukan studi mengenai masing-masing faktor dan hubungannya satu sama lain.

Hingga saat ini data mengenai mutasi A1762T/G1764A pada regio BCP dan G1896A regio *precore* dari subjek Indonesia masih sangat terbatas. Sedangkan data mutasi-mutasi tersebut pada berbagai fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis di Indonesia sampai saat ini belum pernah dilaporkan.

HBeAg negatif masih digunakan sebagai target pada terapi hepatitis B oleh sebagian kalangan. Mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan atau G1896A regio *precore* dapat mempengaruhi produksi HBeAg,²⁰ sehingga pada keadaan tersebut kadar HBeAg dalam darah kemungkinan tidak lagi dapat dikaitkan dengan laju replikasi yang terjadi dalam sel hati. Apakah HBeAg masih relevan untuk dijadikan indikator replikasi virus, dan selanjutnya dijadikan target terapi, hal ini masih perlu dikaji lebih lanjut.

Tong juga menyebutkan bahwa sebagian besar dari pasien hepatitis B kronis aktif dengan HBeAg negatif membawa varian-varian VHB dengan mutasi pada regio *precore* dan regio BCP.²⁰ Apakah mutasi A1762T/G1764A dan G1896A tersebut hanya ditemukan pada subjek dengan HBeAg negatif, informasi ini masih sangat terbatas.

Mutasi yang sering terjadi pada regio BCP dan dikaitkan dengan status HBeAg, menurut Tong menyebabkan penurunan ekspresi HBeAg hingga 80% tetapi justru meningkatkan replikasi genom VHB hingga 8 kali lipat,²⁰ yang artinya bahwa subjek yang membawa mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A *precore* mempunyai kadar DNA VHB lebih tinggi dibandingkan yang normal. Apakah ini juga berlaku di populasi Indonesia, sampai sekarang belum ada laporan mengenai hal

itu. Selain itu, data mengenai pola mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dari subjek CHB dalam hubungannya dengan genotipe dan sub tipe yang beredar di Indonesia juga masih sangat terbatas.

I.3. Tujuan penelitian

I.3.1. Tujuan umum

Mengetahui prevalensi mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dan mempelajari hubungannya dengan fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis pada populasi pasien di Indonesia

I.3.2. Tujuan khusus

1. Mengetahui prevalensi mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* pada berbagai fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis.
2. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan jenis kelamin.
3. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan usia subjek.
4. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan peradangan hati.
5. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan kadar DNA VHB.
6. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan genotipe VHB.
7. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan sub tipe VHB.
8. Mengetahui hubungan antara mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dengan status HBeAg.

I.4. Manfaat penelitian

I.4.1. Manfaat klinis

Data mengenai mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* serta hubungannya dengan fase, status HBeAg dan kadar DNA VHB dapat menjadi bahan pertimbangan pada tata laksana pengobatan pasien hepatitis B kronis terutama dengan HBeAg negatif.

I.4.2. Manfaat ilmiah

Data mengenai mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* pada berbagai fase hepatitis B kronis, serta kaitannya dengan genotipe dan sub tipe yang beredar di Indonesia, diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam memahami peranan mutasi-mutasi tersebut pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

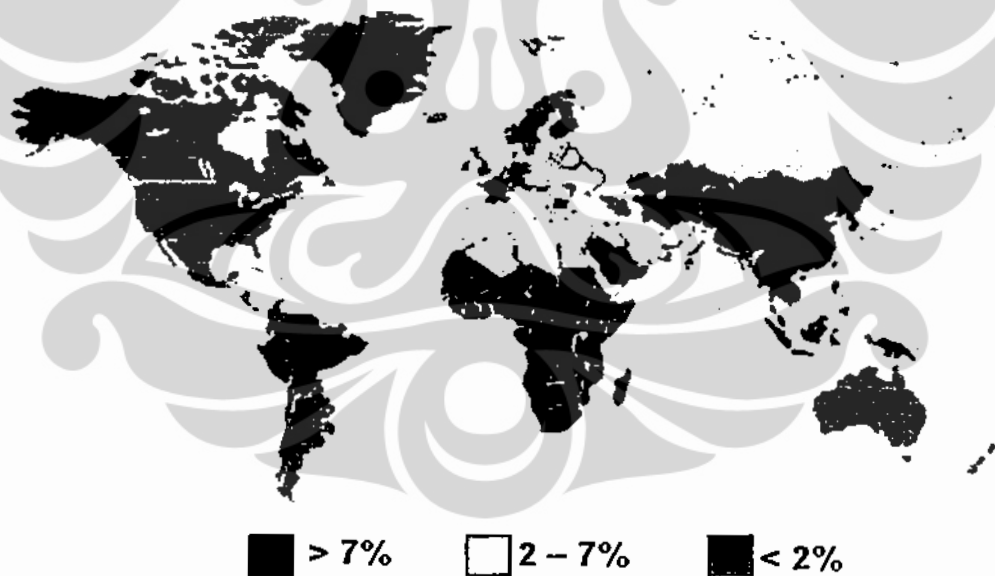
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Epidemiologi

Penyakit hepatitis B yang disebabkan oleh virus hepatitis B (VHB) mempunyai penyebaran yang sangat luas di belahan dunia. Diperkirakan lebih dari 2 miliar penduduk dunia pernah terinfeksi VHB. Dari angka tersebut, kira-kira 360 juta di antaranya merupakan pengidap infeksi kronis dengan gejala yang bervariasi mulai tanpa gejala, gejala ringan hingga berat. Penyakit hepatitis B kronis ini mempunyai risiko untuk terjadinya sirosis hati dan kanker hati. Berdasarkan data tahun 2000, diperkirakan sekitar 600 ribu pasien hepatitis B kronis meninggal dunia setiap tahunnya karena VHB.¹

Menurut WHO Indonesia termasuk daerah dengan prevalensi hepatitis B sedang hingga tinggi, tetapi secara rata-rata termasuk sebagai prevalensi tinggi.² Peta penyebaran hepatitis B terlihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Peta penyebaran hepatitis B di dunia.²¹

II.2. Sejarah dan klasifikasi virus hepatitis B

Seperti yang dituliskan oleh Reuben, sejarah hepatitis B diawali oleh penemuan Baruch Blumberg seorang ahli genetik yang sedang mengerjakan risetnya mengenai polimorfisme protein plasma. Dia menemukan suatu protein yang unik pada saat melakukan imunodifusi ganda sederhana menggunakan gel agar dari serum seorang *Aborigine* Australia dan dari seorang penderita hemofilia yang sering mendapat transfusi darah sebagai sumber antibodi. Protein unik tersebut kemudian disebut sebagai *Australian antigen (Au antigen)*. Prince kemudian menemukan bahwa antigen tersebut mempunyai kesamaan dengan protein (antigen) yang ada dalam serum dengan positif hepatitis. Dengan menggunakan mikroskop elektron tahun 1970 Dane et al berhasil mendeskripsikan antigen tersebut sebagai partikel virus dengan ukuran 42 nm, sehingga sampai sekarang VHB disebut juga sebagai partikel "Dane". Selanjutnya Krugman et al melakukan penelitian yang sangat kontroversial dengan menginokulasi dan memberi asupan makanan yang bersifat infeksius kepada anak-anak penderita retardasi mental. Dari perlakuan tersebut didapatkan dua tipe virus hepatitis yang berbeda secara imunologi dan disebut sebagai virus hepatitis A (VHA) dan virus hepatitis B (VHB).²² Pada tahun 1973 WHO menamakan antigen Australia sebagai *hepatitis B antigen (HBsAg)*, dan selanjutnya disebut sebagai HBsAg (*hepatitis B surface antigen*).²² Penemuan antigen Australia yang kemudian disebut sebagai HBsAg merupakan tonggak bagi perkembangan penelitian hepatitis, untuk itu pada tahun 1976 Blumberg dianugerahi hadiah Nobel bidang Fisiologi dan Kedokteran.^{22,23}

Virus hepatitis B merupakan virus dengan genom DNA ukuran sangat kecil yaitu sekitar 3,3 kilobasa (kb) di mana strategi replikasinya melibatkan transkripsi balik. Berdasarkan pada kriteria genom, organisasi genom dan strategi dalam proses replikasi tersebut, virus hepatitis B termasuk dalam famili Hepadnaviridae. Famili Hepadnaviridae mempunyai 2 genus yaitu *orthohepadnavirus* yang menginfeksi mamalia dan *avihepadnavirus* yang menginfeksi unggas. VHB termasuk dalam genus *orthohepadnavirus* bersama dengan *woodchuck hepatitis virus (WHV)*, *ground squirrel hepatitis virus (GSHV)* dan *wooly monkey hepatitis virus (WMHV)*.²⁴

Berdasarkan pada tingkat perbedaan urutan nukleotida dalam genom virus, sampai saat ini VHB dikelompokkan ke dalam 8 genotipe (A–H). Genotipe ditentukan oleh adanya perbedaan urutan nukleotida lebih dari 8% dari seluruh genom VHB, atau tingkat perbedaan lebih dari 4% jika diukur pada gen yang menyandi protein S.²⁵

Antigen permukaan VHB (HBsAg) mempunyai tiga daerah antigen utama, meliputi:

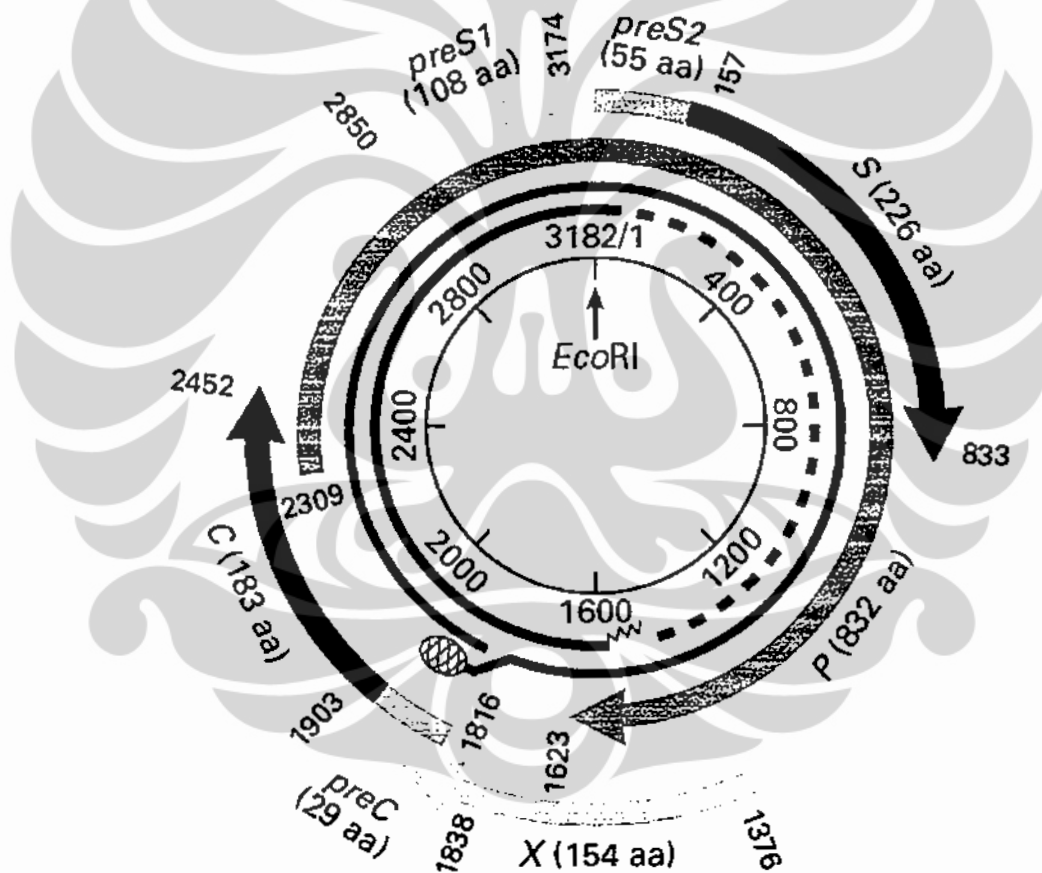
- antigen “a” yang spesifik untuk semua kelompok VHB,
- antigen “d” atau “y” yang spesifik untuk sub tipe, dan
- antigen “r” atau “w” yang spesifik untuk sub tipe.

Dengan demikian VHB dapat diklasifikasikan ke dalam empat sub tipe utama, *adr*, *adw*, *ayr* dan *ayw*.²⁶ Penentuan sub tipe utama dilakukan dengan melihat jenis asam amino pada posisi 122 dan posisi 160 dari protein S. Sub tipe *adr* atau *adw* mempunyai asam amino lisin (K) pada asam amino ke 122, sementara pada sub tipe *ayw* atau *ayr* pada tempat tersebut adalah asam amino arginin (R). Sub tipe *adw* atau *ayw* mempunyai asam amino K pada asam amino ke 160, sementara pada sub tipe *adr* atau *ayr* pada tempat tersebut adalah R.¹⁸

Dengan ditemukannya spesifisitas tambahan dalam sub tipe yang ada, klasifikasi tersebut diperluas lagi menjadi sembilan sub tipe, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* dan *adrq-*. Asam amino ke 127 menentukan klasifikasi lebih lanjut untuk sub tipe utama *adw* dan *ayw*. Pada posisi tersebut dapat berupa asam amino prolin (P), threonin (T) atau leusin (L), maka menjadi w1/w2, w3 atau w4, sesuai urutannya. Lima asam amino yang terletak pada posisi 134, 143, 159, 161 dan 168 membedakan antara *ayw1* dan *ayw2*. Pada *ayw1*, asam amino tersebut adalah fenilalanin (F), T, alanin (A), tirosin (Y) dan valin (V), dan pada *ayw2* adalah Y, serin (S), glisin (G), F dan A. Sub tipe *adw2* mempunyai kesamaan asam amino dengan *ayw1* pada kelima posisi tersebut. Sub tipe *adrq+* dan *adrq-* dibedakan atas jenis asam amino pada posisi 159 dan 177, di mana A dan V untuk *adrq+* serta V dan A untuk *adrq-*.²⁷

II.3. Organisasi genom virus hepatitis B

Virus hepatitis B berbentuk ikosahedral yang diselubungi oleh selubung virus yang mempunyai protein permukaan HBsAg. Bagian virus yang membentuk ikosahedral tersebut terdiri dari protein *core* yang melindungi genom virus berupa DNA sirkuler tidak penuh yang berada di dalamnya.¹⁸ Genom VHB tersebut berukuran sekitar 3,2 kb mempunyai empat *open reading frame* (ORF) yang saling tumpang tindih (Gambar 2.2) yaitu: *surface* (S) yang menyandi protein selubung, *core* (C) yang menyandi protein *core*, *polymerase* (P) yang menyandi protein polimerase dan X yang menyandi protein X.²⁸



Gambar 2.2. Gen-gen pada virus hepatitis B yang saling tumpang tindih.²⁸

Gen S, terdiri dari preS1, preS2 dan S, di mana preS2 terletak di bagian hulu dari S dan preS1 terletak dibagian hulu dari preS2. Translasi protein dimulai dari masing-masing preS1, preS2 dan S dan berhenti pada titik yang sama sehingga dihasilkan protein S dengan tiga ukuran yang berbeda. Translasi yang dimulai dari preS1 menghasilkan protein S besar (LHBs = *large hepatitis B surface protein*), yang dimulai dari preS2 menyandi protein S sedang (MHBs = *middle hepatitis B surface protein*) dan yang dimulai dari S menghasilkan protein S kecil (SHBs = *small hepatitis B surface protein*).¹⁸

Gen C menyandi dua jenis ukuran mRNA yaitu mRNA *precore* dan mRNA *pregenom* dengan panjang sekitar 3,5 kb. mRNA *precore* mempunyai ukuran lebih panjang di ujung 5' sekitar 30 basa dan pada daerah 30 basa tersebut terdapat sekuens *start codon* dengan kerangka baca yang sama. Meskipun sebagian besar sekuens kedua mRNA sama, tetapi protein yang dihasilkan berbeda. mRNA *precore* ditranslasikan menghasilkan protein dengan ukuran 25 kDa yang kemudian mengalami modifikasi pasca translasi menjadi protein dengan ukuran 17 kDa dan diekspresi ke luar sel hati sebagai HBeAg. Sementara itu, mRNA *pregenom* yang bersifat bi-sistronik selain ditranslasi menghasilkan protein *core* (ORF C) dengan ukuran 183 asam amino, dari kerangka baca dan *start codon* yang berbeda menghasilkan protein polimerase (ORF P). Selain itu, mRNA *pregenom* juga menjadi cetakan dalam proses transkripsi balik menghasilkan DNA genom yang nantinya akan mengalami enkapsidasi dalam pembentukan virion baru.¹¹

Gen X menyandi mRNA X dengan ukuran 0,7 kb yang ditranslasi menghasilkan protein X yang fungsinya masih belum banyak diketahui.

Selain gen yang menyandi protein struktural dan enzim tersebut, terdapat juga elemen-elemen regulator yang terdiri dari *enhancer*, *promoter*, *glucocorticoid responsive element* serta NRE (*negative regulatory element*) dan elemen CCAAT.¹⁸

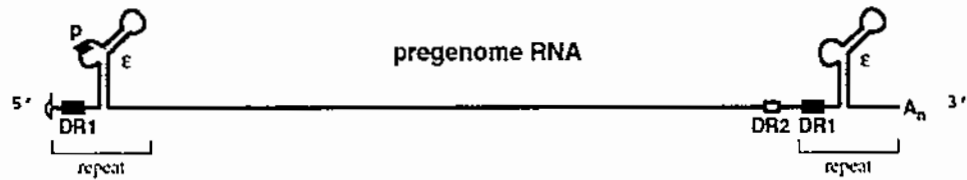
II.4. Siklus hidup virus hepatitis B

Virus hepatitis B yang bersifat hepatotropik menginfeksi dan berkembang dalam sel hati (hepatosit). Hepatosit merupakan target infeksi VHB, meskipun

penelitian telah membuktikan bahwa VHB dapat menginfeksi sel limfosit, sel ginjal, dan pankreas, serta dilaporkan bahwa VHB pernah ditemukan di organ lain seperti testis, lambung, usus, ginjal, sumsum tulang, tetapi pada jaringan-jaringan tersebut tidak menyebabkan gejala penyakit. Virus hepatitis B masuk ke dalam aliran darah dan menuju organ hati. Dalam sel hati VHB dapat masuk ke dalam sel diduga melalui suatu reseptor yang hingga kini belum diketahui secara pasti.^{29,31}

Dalam sel hati VHB melepaskan selubung virus dan melepaskan genomnya ke dalam inti sel. Selanjutnya dengan menggunakan enzim yang ada dalam sel, genom yang semula berbentuk sirkuler tidak penuh berubah menjadi sirkuler penuh yang disebut dengan *covalently closed circular DNA* (cccDNA).³⁰ Dengan memanfaatkan perangkat yang ada dalam inti sel, cccDNA mengalami transkripsi menghasilkan 4 kelompok mRNA, meliputi mRNA *precore*/pregenom berukuran sekitar 3,5 kb, mRNA *preS1* dengan ukuran 2,4 kb, mRNA *preS2/S* dengan ukuran 2,1 kb dan mRNA X dengan ukuran 0,7 kb. Semua mRNA tersebut mengalami proses *capping* pada ujung 5' serta poliadenilasi pada ujung 3' sebelum dibawa keluar inti menuju ke *endoplasmic reticulum* di dalam sitoplasma, untuk selanjutnya ditranslasi menghasilkan protein-protein yang dibutuhkan dalam pembentukan virus baru.^{30,31}

mRNA *precore* menyandi protein *precore*, yang setelah mengalami proses modifikasi pasca translasi, diekspresi keluar sel sebagai HBeAg. Sementara itu mRNA *pregenom* yang bersifat bi-sistronik menyandi protein *core* dan protein polimerase. mRNA ini juga mengalami proses enkapsidasi oleh protein *core*. Protein *core* pasca translasi yang berukuran 183 atau 185 asam amino (tergantung dari genotipe virus) mengalami dimerisasi dan selanjutnya bergabung dengan sesamanya secara spontan, dan selanjutnya berikatan dengan RNA *pregenom* dalam proses enkapsidasi.²⁹

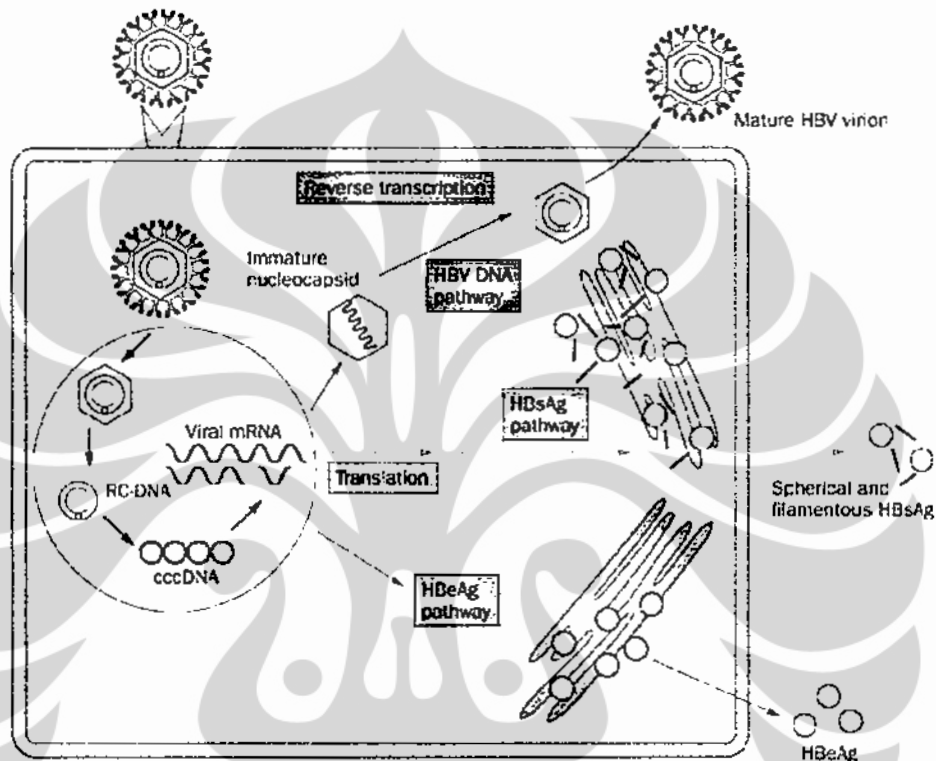


Gambar 2.3 . Pada proses enkapsidasi, protein polimerase terikat pada epsilon.²¹
DR=*direct repeat*, P=polimerase

RNA pregenom mempunyai bagian dengan urutan nukleotida yang spesifik disebut sebagai *direct repeat* 1 (DR1), DR2 dan DR1*. Selain itu juga terdapat bagian yang dapat membentuk lengkungan (*loop*) yang disebut sebagai sinyal enkapsidasi (ϵ) berada dekat ujung 5' dan dekat ujung 3'. Enkapsidasi dimulai dari penempelan protein polimerase virus pada bagian gembung pertama dari struktur epsilon membentuk kompleks RNA–Pol (Gambar 2.3). Kompleks tersebut kemudian di-enkapsidasi oleh protein *core* dimer membentuk suatu nukleokapsid yang belum matang. Begitu terjadi enkapsidasi atau segera sesudahnya, protein polimerase melakukan transkripsi balik pada RNA pregenom yang diikatnya menghasilkan genom DNA untai negatif. Sejalan dengan proses transkripsi balik, untai RNA yang telah ditranskrip didegradasi oleh RNase H yang merupakan aktivitas protein polimerase. Seluruh RNA pregenom didegradasi kecuali bagian ujung yang telah mengalami *capping* sebelumnya yang berisi 18 basa termasuk DR1. Karena sekuens DR1 dan DR2 bersifat saling komplementer, DR1 menempel dengan DR2 pada ujung lainnya dan membentuk lingkaran, sementara itu sisa RNA yang tidak didegradasi oleh RNase H siap untuk menjadi primer pada sintesis DNA oleh DNA polimerase membentuk genom virus dalam bentuk untai ganda tidak lengkap dan disebut sebagai *relaxed circular* DNA (rcDNA). Pada rcDNA ujung 5' untai negatif protein polimerase tetap terikat secara kovalen.^{14,29}

Nukleokapsid yang berisi rcDNA dalam retikulum endoplasma mengalami pembungkusan (selubung) oleh membran retikulum endoplasma di mana pada membran tersebut banyak terdapat protein S, baik yang kecil, sedang maupun yang besar dan membentuk virion baru. Virion tersebut dibawa oleh kompartemen pre-

golgi keluar dari sel hepatosit sebagai virus baru.^{29,31} Apabila pada membran retikulum endoplasma belum cukup adanya protein S, maka nukleokapsid akan kembali menuju inti sel dan mengalami proses yang sama seperti infeksi baru. Hal ini akan memperbanyak populasi cccDNA yang ada dalam inti sel hepatosit.³²



Gambar 2.4. Replikasi VHB dalam sel hepatosit.³³

Selain virus baru, pada proses replikasi VHB juga dihasilkan subvirus dan protein terlarut HBeAg yang dikeluarkan dari sel hepatosit (Gambar 2.4). Subvirus merupakan selubung HBsAg yang tidak membawa nukleokapsid termasuk genom virus di dalamnya.^{33,34} HBeAg bukan merupakan komponen dari virus, tetapi secara normal dihasilkan pada saat terjadi replikasi virus.³⁰ Sebagai akibatnya keberadaan HBeAg kadang dikaitkan dengan replikasi VHB yang sedang berlangsung dalam sel hepatosit.

II.5. Respon imun terhadap infeksi virus hepatitis B

Respon imun dari inang terhadap infeksi VHB merupakan interaksi yang kompleks dari beberapa sel. Di dalam organ hati, virus yang masuk dikenali oleh sel Kupffer sebagai antigen asing sehingga virus tersebut ditelan dan dicerna. Sel Kupffer sebagai sel *antigen presenting cell* (APC) mempresentasikan antigen dari virus melalui *major histocompatibility complex II* (MHC II) pada membran sel hati, yang kemudian akan dikenali dan mengaktifkan sel T CD4+ (T helper). Melalui sitokin yang diproduksinya, T helper teraktivasi akan mengaktifkan sel T CD8+ (T sitotoksik) dan sel B.^{35,36}

Virus yang berhasil masuk ke dalam sel hepatosit mengalami proses replikasi menghasilkan virus-virus baru dan protein-protein virus. Antigen dari komponen virus dipresentasikan melalui MHC I yang akan dikenali sel T sitotoksik dan mengaktifkannya. Sel T sitotoksik yang teraktivasi dan dibantu oleh sel T helper akan mengenali sel hepatosit terinfeksi VHB melalui antigen spesifik yang dipresentasikan melalui MHC II. Sel T sitotoksik tersebut kemudian menghambat replikasi virus dengan dua cara: (1) tanpa melisis sel hepatosit terinfeksi, tetapi melalui sitokin-sitokin yang diproduksinya dan (2) yang lebih sering adalah dengan cara melisis sel hepatosit yang terinfeksi.³⁵

Aktivitas sel T sitotoksik dalam eliminasi virus dengan cara melisis sel terinfeksi menyebabkan peradangan hati. Indikator peradangan hati biasanya dapat diketahui dari kenaikan kadar ALT. ALT merupakan enzim yang ada dalam sel hepatosit. Kerusakan pada sel hepatosit menyebabkan kebocoran sehingga enzim ALT dilepaskan ke dalam aliran darah, sebagai akibatnya konsentrasi ALT di aliran darah meningkat.³²

Perjalanan infeksi VHB ditentukan oleh factor usia, status imun dan rute dari infeksi tersebut. Infeksi yang terjadi secara vertikal dari ibu kepada anaknya atau terjadi pada masa kanak-kanak di mana status imun masih lemah (imunotoleran) sebagian besar akan berlanjut menjadi infeksi kronis. Sebaliknya jika infeksi terjadi pada usia dewasa dengan status imun telah berkembang dengan baik, sebagian besar (95% kasus) VHB dapat dilawan oleh sistem imun dan dapat sembuh total.³⁷

Secara umum imunitas bawaan akan segera memainkan peran begitu terjadi infeksi virus untuk membatasi penyebaran mikroba patogen termasuk virus serta segera membantu pembentukan respon imun adaptif.³⁷ Sel-sel yang berperan pada imunitas bawaan antara lain adalah makrofag, sel *natural killer* (NK), dan sel-sel yang mengekspresi mediator inflamasi. Sedangkan molekul yang terlibat di antaranya protein komplemen dan sitokin pro-inflamasi.³⁹

Pada infeksi VHB, genom virus yang tersembunyi di dalam protein kapsid tidak dikenali oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) sehingga tidak terdeteksi oleh sistem imun bawaan.⁴⁰

II.5.1. Respon imun pada infeksi virus hepatitis B akut

Mekanisme eliminasi virus pada infeksi akut telah banyak diteliti, baik penelitian klinis maupun eksperimental. Ratnam et al menyebutkan beberapa komponen yang terlibat pada eliminasi virus pada infeksi akut sebagai respon imun meliputi: (a) respon sitotoksik oleh sel T sitotoksik terhadap sel yang terinfeksi VHB. Sel terinfeksi dapat dikenali oleh sel T sitotoksik karena sel terinfeksi tersebut mengekspresikan antigen virus pada permukaannya, (b) sel Th1 memproduksi sitokin proinflamasi, seperti interferon (IFN), *tumor necrosis factor* (TNF) dan interleukin 12 (IL-12) yang mempunyai aktivitas antivirus dan dapat menekan reproduksi virus dalam sel hati, (c) sel-sel terinfeksi VHB dihancurkan oleh komponen imunitas bawaan, misalnya sel NK dan *natural killer T* (NKT), (d) produksi anti-HBs yang mampu menetralkan virus dapat mencegah terjadinya infeksi baru pada sel hati, dan (e) adanya lisis dan apoptosis sel hati yang terinfeksi, memicu terjadinya proliferasi sel hati yang normal.³⁹

II.5.2. Respon imun pada infeksi virus hepatitis B kronis

Pada infeksi hepatitis B kronis, respon sel T sitotoksik (*cytotoxic T lymphocyte* = CTL) digambarkan lemah dibandingkan respon yang terjadi pada infeksi akut, dan biasanya bersifat mono spesifik atau oligospesifik. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan VHB bersifat persisten: sel T, HBeAg, integrasi genom,

genetik inang, mutasi pada *precore* dan defisiensi IFN.⁴¹ Selain itu pada hepatitis B, laju replikasi virus pada awal infeksi sangat lambat dibandingkan virus lain seperti HIV dan CMV. Hal ini menimbulkan respon imun inang juga terlambat untuk terpicu terutama respon imun adaptif, sehingga virus dapat bertahan lebih lama di dalam sel hepatosit.⁴¹

HBeAg memegang peranan penting pada terjadinya infeksi hepatitis B kronis. Hampir semua bayi yang terlahir dari ibu dengan HBeAg positif akan terinfeksi VHB dan 90% diantaranya berkembang menjadi hepatitis B kronis.⁴¹ Mutasi pada *precore* dapat menyebabkan kegagalan produksi HBeAg. Perlu diingat bahwa meskipun serokonversi HBeAg biasanya dikaitkan dengan replikasi yang terkendali, adanya mutasi pada *precore* dapat menyebabkan replikasi menjadi lebih agresif.³⁸

Meskipun semua komponen respon imun penting dalam proses eliminasi VHB, tetapi CTL merupakan komponen utama pada eliminasi VHB. Lemahnya respon imun CTL mengakibatkan infeksi berkembang menjadi kronis. Kelemahan respon CTL tersebut dapat diakibatkan oleh virus misalnya ketidakcocokan epitop pada HBcAg virus dan HLA pada inang.⁴¹

Integrasi genom VHB ke dalam genom inang dapat terjadi pada infeksi kronis dan dapat menyebabkan ekspresi HBsAg tanpa replikasi virus. Integrasi ini lama-kelamaan dapat menyebabkan perubahan pada sel hepatosit. Sel yang membawa integrasi genom VHB biasanya lolos dari respon imun karena tidak mengekspresi HBcAg dan HBeAg.⁴¹

Infeksi kronis dapat dipicu karena adanya defisiensi IFN. IFN yang bersifat imunomodulator memegang peranan pada eliminasi virus pada respon imun bawaan. Tidak adanya IFN menyebabkan VHB dapat lolos dari respon imun.⁴¹

Selain itu, usia inang saat terjadi infeksi juga menentukan apakah infeksi akan bersifat akut atau berkembang menjadi infeksi kronis. Sekitar 90% infeksi yang terjadi pada bayi baru lahir akan berkembang menjadi infeksi kronis. Sementara itu hanya sekitar 5% dari infeksi yang terjadi pada usia dewasa yang berkembang menjadi infeksi kronis.⁴²

II.6. Perjalanan infeksi virus hepatitis B kronis

Replikasi VHB dalam sel hepatosit tidak bersifat sitolitik, sehingga keberadaan VHB dan proses replikasi VHB dalam sel hepatosit tidak menimbulkan manifestasi. Manifestasi dari infeksi VHB berasal dari respon imun inang yang berusaha mengeliminasi sel VHB dengan cara merusak sel hepatosit yang terinfeksi. Proses inilah yang menyebabkan terjadinya inflamasi dan menimbulkan peradangan pada hati.³⁹

Perjalanan infeksi hepatitis B kronis yang dipengaruhi oleh faktor virus dan respon imun dari inang, dapat dikelompokkan ke dalam empat fase, yang meliputi; (1) fase *immunotolerant* = IT, pada fase ini infeksi terjadi tanpa adanya respon imun yang berarti dari inang, ditandai dengan kadar DNA VHB tinggi, kadar ALT normal dan HBeAg positif, (2) fase *immunoclearance* = IC, infeksi VHB mulai mendapat respon dari inang dan terjadi lisis sel hepatosit yang terinfeksi akibat respon imun tersebut. Radang hati akibat lisis sel ditandai dengan kadar ALT yang tinggi, (3) fase *low/non replicative* = LR, akibat eliminasi VHB oleh respon imun, kadar VHB mengalami penurunan hingga kadar yang rendah atau tidak terdeteksi. Penurunan ini diikuti oleh penurunan respon imun yang ditandai dengan kadar ALT normal. Pada fase ini telah terjadi serokonversi HBeAg yang merupakan proses yang penting pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis. Setelah tidak terdeteksi kadarnya, VHB dapat mengalami reaktivasi kembali.³² VHB yang mengalami reaktivasi dapat merupakan virus tipe normal (*wildtype*), atau yang sering terjadi adalah tipe mutan yang dapat membawa mutasi yang mempengaruhi HBeAg. Reaktivasi tipe normal mengakibatkan HBeAg kembali terdeteksi dan kembali menuju fase IC. Tetapi yang sering terjadi adalah reaktivasi virus tipe mutan, di mana replikasi virus terjadi tanpa memproduksi HBeAg dan memasuki (4) fase *HBeAg negative Hepatitis B chronic* (ENH). Fase ini ditandai kadar DNA kembali tinggi, HBeAg negatif dan kadar ALT tinggi.⁷

II.7. Mutasi pada genom virus hepatitis B

Seperti diketahui bahwa pada perkembang-biakannya, VHB melewati fase RNA, di-mana DNA genom disintesis dengan transkripsi balik dengan cetakan RNA pregenom. Enzim yang digunakan pada proses transkripsi balik adalah *reverse transcriptase* dari virus yang tidak mempunyai kemampuan koreksi (*proof reading*) jika terdapat kesalahan baca. Hal ini menyebabkan tingkat mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan virus DNA yang lain.¹²

Kemungkinan mutasi dapat terjadi pada semua daerah dari genom virus. Karena gen dari VHB saling tumpang tindih, berarti mutasi pada satu gen juga dapat mempengaruhi gen yang lain, maka tidak semua virus yang mengalami mutasi dapat bertahan hidup.

II.7.1. Mutasi pada gen S

Gen S merupakan gen yang menyandi protein luar dari struktur VHB. Jika terjadi mutasi pada gen S dan mutasi tersebut mempengaruhi konformasi dari protein yang disandinya. Hal ini dapat menyebabkan virus tidak lagi dikenali oleh antibodi yang sudah ada sebelumnya. Dalam diagnostis serologi protein S merupakan target pemeriksaan, maka perubahan pada protein S dapat menyebabkan terjadinya hasil negatif palsu karena protein target sudah tidak lagi dikenali.¹⁸

II.7.2. Mutasi pada gen P

Karena gen S tumpang tindih dengan gen P (*polymerase*), mutasi pada gen S juga mempengaruhi gen P. Adanya perubahan konformasi protein P dapat mempengaruhi fungsi protein P dalam replikasi virus. Di sisi lain perubahan ini dapat menyebabkan protein P tidak dikenali oleh obat-obat yang ditargetkan pada protein P, sehingga menyebabkan virus resistan terhadap obat tersebut.⁴³

II.7.3. Mutasi pada gen C

Gen C (*core*) menyandi dua macam mRNA dengan ukuran yang berbeda yaitu RNA pregenom yang sedikit lebih pendek dan RNA *precore* yang lebih besar.

mRNA pregenom selain akan menjadi cetakan dalam pembentukan DNA genom, juga menyandi protein P dan protein C. Mutasi yang terjadi pada gen C dapat mempengaruhi gen P dan juga mempengaruhi mRNA *precore* yang menyandi protein precursor HBeAg.²⁰

Mutasi yang terjadi pada gen C juga dapat mengakibatkan perubahan epitop HBeAg sebagai target pengenalan CTL dalam eliminasi VHB. Maka dari itu mutasi pada gen C dapat mengganggu respon imun terhadap VHB.⁴⁴

II.7.4. Mutasi pada gen X.

Gen X tumpang tindih dengan *enhancer* II dan BCP yang merupakan elemen pengatur transkripsi RNA *precore* dan RNA pregenom. Mutasi yang terjadi pada BCP juga terjadi pada gen X. Mutasi A1762T/G1764A merubah kodon ke 130 lisin menjadi metionin dan dari valin menjadi isoleusin pada kodon ke 131.⁴⁵

II.8. Ekspresi HBeAg

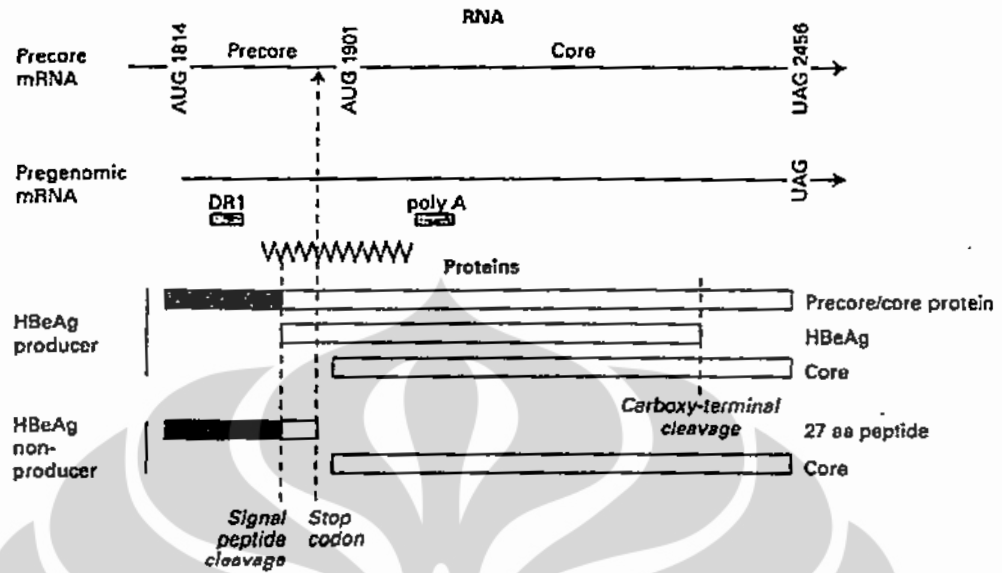
mRNA *precore* mempunyai ukuran sekitar 3,5 kb. Dibandingkan dengan mRNA pregenom, mRNA *precore* berukuran lebih panjang di mana terdapat kelebihan sekitar 30 nukleotida pada ujung 5' sementara ujung 3' tidak berbeda. Pada 30 nukleotida tersebut, terdapat *start codon* yang jaraknya 87 nukleotida lebih awal dibandingkan *start codon* pada mRNA pregenom. Dengan demikian protein *precore* berukuran lebih besar dibandingkan protein *core* yang disandi oleh mRNA pregenom.²⁰

Translasi mRNA *precore* dalam sitosol sel hati menghasilkan protein *precore* 25 kDa dengan panjang 212 asam amino. Sembilan belas asam amino pertama merupakan sekuens sinyal yang mengarahkan protein *precore* menuju retikulum endoplasma, di mana dalam retikulum endoplasma tersebut 19 asam amino pertama dipotong oleh peptidase. Protein *precore* dengan ukuran 193 asam amino selanjutnya mengalami pemotongan pada daerah kaya akan arginin pada ujung 3' dan menghasilkan protein yang ukurannya tinggal 159 asam amino dengan ukuran berat 17 kDa. Dari proses modifikasi pasca translasi tersebut, protein *precore* mempunyai

sekuens yang 10 asam amino lebih panjang pada ujung 5' tetapi lebih pendek 34 asam amino pada ujung 3'. Adanya ikatan disulfida pada konformasi sekunder menjadikan HBeAg yang dilepaskan keluar sel semakin berbeda dengan protein *core*.²⁰

HBeAg bukan merupakan bagian dari struktur virus atau pun terlibat pada replikasi virus. Namun demikian protein tersebut diproduksi pada saat terjadi replikasi virus, sehingga kadar HBeAg dalam darah dikaitkan dengan laju replikasi virus yang terjadi dalam sel hati.³⁰ Di sisi lain, ada dan tidaknya HBeAg dalam darah juga dikaitkan dengan kerusakan organ hati yang berkelanjutan.⁴⁶ Terdapat dua mutasi yang dapat mempengaruhi ekspresi HBeAg, yaitu mutasi yang terjadi pada BCP dan mutasi yang terjadi pada *precore*. Mutasi pada regio BCP yang paling penting adalah mutasi ganda A1762T/G1764A yang dapat menurunkan laju ekspresi HBeAg.⁴⁴ Sementara itu mutasi yang terjadi pada *precore* adalah G1896A pada kodon ke 28 yang merubah kodon triptofan (W) menjadi kodon stop yang menyebabkan sintesis protein prekursor HBeAg berhenti pada kodon ke-28 sehingga HBeAg gagal diekspresi.²⁰

Gambar 2.5. menerangkan bagaimana mutasi pada *precore* yang menyebabkan produksi HBeAg terganggu tanpa mempengaruhi produksi protein *core*. Letak kodon ke 28 tempat terjadinya mutasi G1896A berada sebelum *start codon* gen yang menyandi protein *core*. Sebagai akibatnya meskipun menghentikan proses translasi protein prekursor HBeAg, mutasi G1896A tidak mempengaruhi translasi protein *core*. Peristiwa inilah yang menyebabkan status HBeAg negatif meskipun replikasi VHB tetap berlangsung pada isolat yang membawa mutasi G1896A.³



Gambar 2.5. Mutasi G1896A menghentikan produksi HBeAg tanpa mengganggu produksi protein core.³

BAB III BAHAN DAN CARA KERJA

III.1. Desain penelitian

Desain penelitian adalah *cross sectional* analitik observasional. Pada penelitian ini akan dihitung prevalensi mutasi pada BCP dan *precore* pada masing-masing fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis. Selanjutnya mutasi pada BCP dan *precore* dikorelasikan dengan jenis kelamin, usia, kadar ALT, kadar DNA VHB, genotipe VHB, subtipe VHB dan status HBeAg.

III.2. Tempat dan waktu penelitian

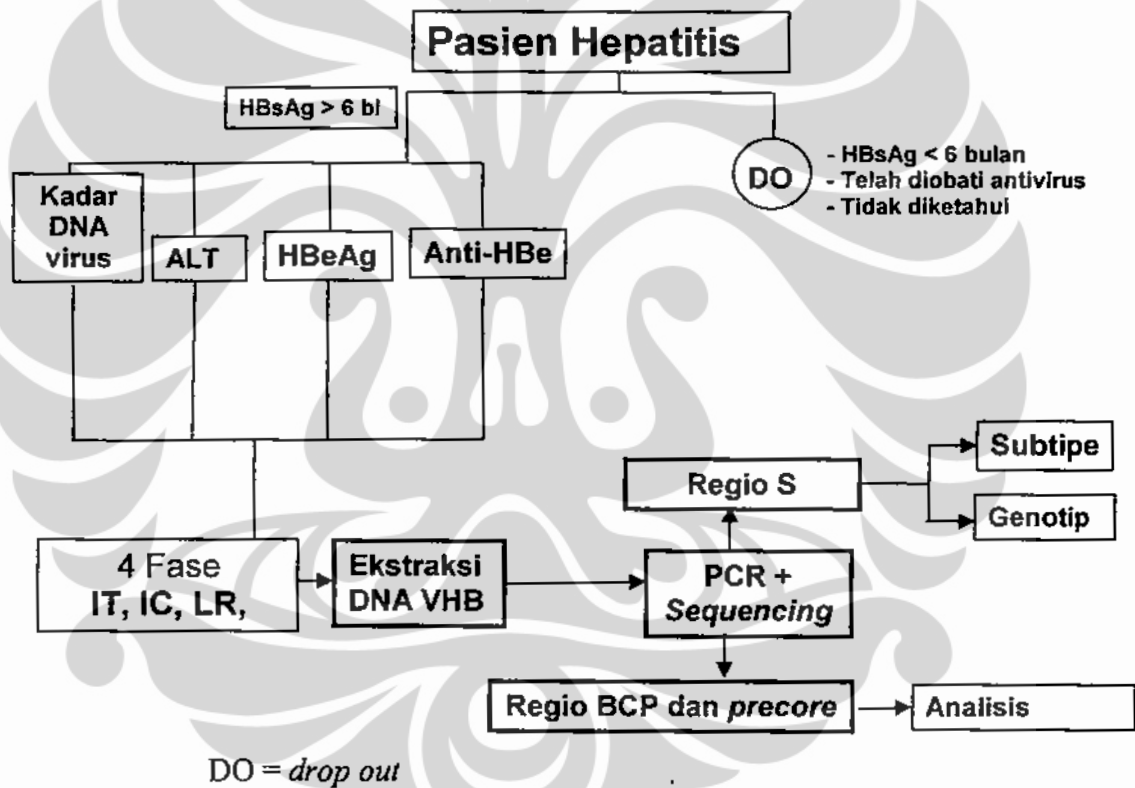
Penelitian dilakukan di Laboratorium Hepatitis di Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Jakarta, mulai Januari 2009 hingga Oktober 2010.

III.3. Bahan penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini merupakan pasien yang datang dirujuk untuk pemeriksaan DNA VHB, belum pernah mendapatkan pengobatan antivirus dan mempunyai catatan mengenai status HBsAg positif lebih dari 6 bulan, mempunyai data kadar ALT dan kadar DNA VHB. Subjek telah mendapat penjelasan mengenai hepatitis B dan keikutsertaannya pada penelitian ini serta telah menyatakan setuju untuk terlibat dengan menandatangani surat persetujuan atau *inform consent* (terlampir). Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dilakukan di Lembaga Biologi Molekul Eijkman dengan judul: " *Molecular diversity of Hepatitis B Virus (HBV) in Indonesia*" dan telah mendapatkan persetujuan etik dari *Eijkman Institute Research Ethic Commission* (EIREC) yang tertuang dalam surat keputusan tertanggal 16 Juli 2007 (Lampiran 1).

III.4. Alur penelitian

Alur penelitian ini ditampilkan pada gambar 3.1. Subjek yang memenuhi syarat adalah jika subjek mempunyai status HBsAg positif lebih dari 6 bulan, dan belum pernah diobati. Data mengenai status HBsAg, kadar virus, kadar AST dan ALT subjek diperoleh dari rekam medik pasien. Status HBeAg dan anti-HBe diperiksa dari serum atau plasma. Berdasarkan status HBeAg, anti-HBe, kadar DNA virus, kadar AST dan kadar ALT subjek dikelompokkan ke dalam fase-fase hepatitis B kronis. Genotipe, subtype dan mutasi diperiksa dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dilanjutkan dengan *direct sequencing*.



Gambar 3.1. Alur penelitian

III.5. Pemeriksaan HBeAg dan anti-HBe

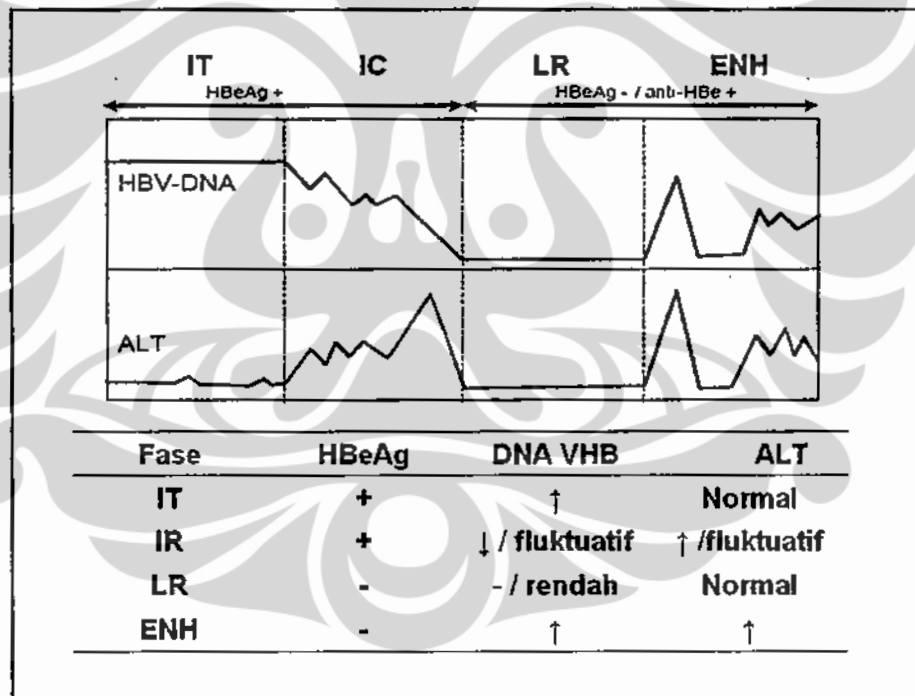
HBeAg diperiksa dengan teknik *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA) menggunakan kit Monolisa™ HBe Ag-Ab Plus (Biorad, USA) dengan mengikuti petunjuk yang disertakan dalam kit. Sebanyak 100 µL sampel serum dimasukkan ke dalam sumur *multiplate* yang telah dilapisi dengan antibodi terhadap HBe. Selain sampel serum, juga dimasukkan kontrol negatif dan kontrol positif. Setelah serum dimasukkan, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam. Serum, cairan kontrol negatif dan positif dibuang, sumur dicuci sebanyak empat kali dengan larutan dapar pencuci (*washing solution*) yang mengandung Tris dan NaCl dengan pH 7,4. Ke dalam sumur dimasukkan 100 µL larutan konjugat yang merupakan antibodi monoklonal anti-HBe yang dilabel dengan peroksidase, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Larutan konjugat dibuang, sumur dicuci dengan larutan *washing solution* sebanyak lima kali. Ke dalam sumur dimasukkan 80 µL larutan pewarna dan diinkubasi pada suhu ruang dalam tempat yang gelap selama 30 menit. Larutan pewarna merupakan campuran antara substrat H₂O₂ 0,015% dalam asam sitrat, sodium asetat dan DMSO 4%, pH 4,0 dengan larutan kromogen *tetramethyl benzidine* (TMB). Setelah 30 menit reaksi dihentikan dengan penambahan H₂SO₄ 1N sebanyak 100 µL. Intensitas warna diukur menggunakan alat pembaca ELISA Infinite F200 [Tecan, Austria] pada panjang gelombang 490 nm.

Prosedur pemeriksaan anti-HBe menggunakan kit yang sama dan langkah yang hampir sama kecuali sampel serum atau plasma dimasukkan ke dalam sumur dengan menambahkan larutan penetral yang mengandung HBeAg. Dengan teknik ELISA kompetitif, sampel serum atau plasma diinkubasi pada sumur yang telah dilapisi dengan anti-HBe, sekaligus ditambahkan larutan penetral. Dalam proses ini HBeAg dari larutan penetral akan menjembatani ikatan antibodi terfiksasi dengan antibodi sampel serum atau plasma. Semakin tinggi konsentrasi antibodi sampel, semakin sedikit HBeAg yang terbuka untuk diikat oleh antibodi dari konjugat yang diberikan pada tahap selanjutnya. Sebagai akibatnya, intensitas warna yang terukur berbanding terbalik dengan kadar anti-HBe dalam sampel.

III.6. Pengelompokkan fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis

Subjek yang digunakan dalam pemeriksaan telah mempunyai data ALT (*alanine transaminase*) dan kadar virus. Berdasarkan data tersebut dan status HBeAg, subjek dibedakan menjadi empat fase seperti pada gambar 3.2, sebagai berikut:

- Immunotolerance* (IT) jika subjek dengan HBeAg positif mempunyai kadar DNA di atas 10^5 / mL, ALT di bawah 90 IU/L.
- Immunoclearance* (IC) jika subjek dengan HBeAg positif mempunyai kadar ALT di atas 90 IU/L.
- Low/Non replicative* (LR) jika subjek dengan HBeAg negatif, anti-HBe positif mempunyai kadar DNA kurang dari 10^5 /mL, kadar ALT di bawah 90 IU/L.
- "e" *negative hepatitis B* (ENH) jika subjek dengan HBeAg negatif, anti-HBe positif, kadar DNA lebih dari 10^5 /mL atau atau ALT di atas 90 IU/L.



Gambar 3.2. Pembagian fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis.⁷
(telah diolah kembali))

III.7. Isolasi DNA virus hepatitis B

Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit QIAamp viral minikits [QIAGEN, USA] dengan mengikuti prosedur yang disertakan dalam kit. Sebanyak 140 μL serum dicampurkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL yang berisi 560 μL larutan pelisis AVL kemudian di-*vortex* selama sekitar 1 menit. Campuran sampel dan larutan pelisis AVL diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah disentrifugasi beberapa saat untuk menurunkan cairan yang mungkin menempel pada tutup tabung, ke dalam tabung ditambahkan 560 μL etanol absolut dan di-*vortex* selama sekitar 1 menit. Sebanyak 630 μL campuran dimasukkan ke dalam *column* kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8.000 *revolution per minute* (rpm) selama 1 menit, sehingga larutan keluar dari *column* dan masuk ke dalam tabung penampung kemudian dibuang, sementara DNA tetap tertahan di dalam *column*. Sisa larutan sebanyak 630 μL kembali dimasukkan ke dalam *column* dan disentrifugasi seperti sebelumnya. *Column* dicuci dengan larutan pencuci yang mengandung etanol yaitu AW1 dan AW2 secara berturut-turut dengan cara menambahkan sebanyak 500 μL dan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Untuk membuang sisa larutan pencuci yang mungkin masih tertinggal dalam *column*, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit dan mengganti tabung penampung dengan tabung steril. Untuk mendapatkan DNA yang terperangkap dalam *column*, ke dalam *column* dimasukkan 60 μL larutan elusi AVE dan diinkubasi pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 menit. Dengan melakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit, cairan yang mengandung DNA tertampung dalam tabung steril.

III.8. Amplifikasi DNA

Amplifikasi atau penggandaan fragmen DNA dilakukan pada dua target fragmen DNA yaitu sebagian regio gen S yang digunakan untuk penentuan genotipe dan sub tipe virus, serta regio BCP dan *precore* yang digunakan untuk pemeriksaan adanya mutasi pada regio BCP dan regio *precore*. Amplifikasi dilakukan dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik yang hanya dapat mengenali DNA VHB

tepatnya regio yang diinginkan. Sekuens dari primer tersebut dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Primer untuk penentuan genotipe, subtipe dan deteksi mutasi BCP dan *precore*.

Nama primer	Sekuens (5'-----3')	Arah	Regio target	Ukuran produk
S-88	TGTTGCCCGTTTGTCTCTA	<i>sense</i>	S	226 pb
S2-2	GGCACTAGTAAACTGAGCCA	<i>antisense</i>		
T-715	CTGTGCCTTCTCATCTGCCG	<i>sense</i>	BCP	419 pb
PC2	AAAGAAGTCAGAAGGCAAAAAGA	<i>antisense</i>	dan <i>precore</i>	

Amplifikasi fragmen DNA yang mencakup sebagian region gen S menggunakan pasangan primer S-88 yang spesifik mengenali DNA VHB pada posisi 462–481 ke arah hilir dan primer S2-2 yang spesifik mengenali DNA VHB pada posisi 668–687 ke arah hulu. Amplifikasi DNA fragmen yang mencakup regio BCP dan regio *precore* dilakukan menggunakan pasangan primer T-715 yang spesifik mengenali DNA VHB pada posisi 1554–1573 ke arah hilir dan primer PC2 yang spesifik mengenali DNA VHB pada posisi 1949–1972 ke arah hulu.

Proses PCR menggunakan mesin PCR *Thermal Cycler* ABI 9700 [ABI System, USA], dengan volume 25 μ L yang mengandung Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl 1,5 mM, dNTP 200 μ M, primer *sense* dan *antisense* masing-masing 400 nM, 1 unit *Taq platinum polymerase* DNA [Invitrogen, USA] dan hasil ekstraksi DNA sebanyak 2,5 μ L. Reaksi dijalankan pada suhu denaturasi 94⁰C selama 30 detik, suhu *annealing* 50⁰C selama 30 detik dan suhu elongasi 72⁰C selama 1 menit sebanyak 35 siklus. Pada awal reaksi dilakukan pre-denaturasi pada suhu 94⁰C selama 5 menit dan pada akhir reaksi dilakukan elongasi akhir pada suhu 72⁰C selama 5 menit.

III.9. Elektroforesis gel agarosa

Untuk mengetahui hasil amplifikasi dengan teknik PCR, dilakukan proses elektroforesis terhadap produk PCR pada gel agarosa. Sebanyak 0,75 gram bubuk agarosa dicampurkan ke dalam 50 mL larutan TAE (tiap liter TAE mengandung 4,84 g *Tris Base*, 1,14 mL asam asetat glasial dan 1 mM EDTA) kemudian dimasak menggunakan *microwave* sampai larut dengan sempurna. Sebanyak 5 μ L larutan *ethidium bromide* (10mg/mL) ditambahkan ke dalam gel agarosa yang masih cair dan dicampurkan hingga merata, kemudian gel agarosa dituang ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir pembentuk sumur gel. Setelah sekitar 30 menit dan gel sudah membeku, sisir diangkat sehingga terbentuk sumur-sumur gel bekas sisir. Gel agarosa bersama cetakannya diangkat dan dipasang ke dalam perangkat elektroforesis [Biorad, USA] dan ke dalamnya dimasukkan larutan TAE sampai permukaan atas gel. Ke dalam masing-masing sumur, dimasukkan 5 μ L produk PCR setelah dicampur dengan 2 μ L larutan *loading dye* (40% sukrosa, 0,25% *bromophenolblue*). Pada salah satu sumur dimasukkan 5 μ L (0,5 μ g) penanda DNA *Molecular weight marker XIV* [Roche, Germany] sebagai standar ukuran DNA. Perangkat elektroforesis dijalankan dengan memberi aliran listrik pada tegangan 80 Volt (V) selama 30 menit.

Setelah proses elektroforesis gel agarosa selesai, gel dimasukkan ke dalam perangkat GelDoc [Biorad, USA], dengan melepaskan gel dari cetakannya dan dilewatkan sinar ultraviolet (UV). Gambar gel yang terbentuk dibawah sinar UV didokumentasikan. Hasil positif ditunjukkan apabila ada pita pada lajur sesuai sumur dengan jarak dari sumur sesuai dengan ukuran yang diharapkan, dengan merujuk pada pita yang muncul pada lajur penanda DNA.

III.10. Permurnian fragmen DNA

Pemurnian fragmen DNA hasil dari reaksi PCR dilakukan menggunakan kit QIAQuick [Qiagen,USA]. Hasil PCR campurkan dengan larutan PB sebanyak 5 X volumenya, di-*vortex* beberapa detik sebelum dimasukkan ke dalam *column* yang sudah dipasang pada tabung penampung. *Column* disentrifugasi pada kecepatan 8.000

rpm selama 1 menit. Cairan yang tertampung dibuang kemudian tabung penampung dipasang kembali. *Column* yang membawa DNA di dalamnya dicuci dengan menambahkan 700 μL larutan PE yang mengandung etanol dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Larutan yang tertampung kembali dibuang dan tabung penampung dipasang kembali. *Column* disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit untuk membuang sisa-sisa larutan PE dari dalam *column*. *Column* dilepaskan dari tabung penampung dan dipasang pada tabung mikro ukuran 1,5 mL yang baru. Ke dalam bagian tengah *column* diteteskan 30 μL larutan *elution buffer* (EB) untuk melarutkan fragmen DNA yang terperangkap dalam *column*. *Column* didiamkan pada suhu ruang selama 3 menit sebelum disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit sehingga DNA yang larut dalam larutan EB turun ke dalam tabung mikro. Untuk mengetahui bahwa hasil pemurnian berhasil baik, 3–5 μL dari hasil pemurnian dilakukan elektroforesis gel agarosa seperti pada butir III.9 di atas.

Untuk hasil PCR yang mengandung pita nonspesifik, pemurnian dilakukan dengan cara *gel cut purification*. Dibuat gel agarosa seperti cara di atas dengan konsentrasi 1% menggunakan sisir ukuran besar supaya sumur yang terbentuk dapat menampung volume yang lebih banyak. Semua produk PCR dari masing-masing produk dicampur dengan 5–10 *loading dye* dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dijalankan pada voltase 80 V selama 30 menit. Selanjutnya, dibawah sinar UV, dengan membandingkan dengan penanda DNA, ukuran pita yang sesuai dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL yang sudah ditimbang sebelumnya. Tabung yang sudah berisi potongan gel ditimbang untuk mengetahui berat gel hasil potongan. Ke dalam tabung, untuk setiap 100 mg gel ditambahkan 300 μL larutan QG dan diinkubasi pada suhu 50 $^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit dengan setiap 2–3 menit dibolak-balik beberapa kali untuk menghomogenkan dan mempercepat gel larut dalam larutan QG. Ditambahkan 100 μL isopropanol untuk setiap 100 mg gel dan dicampur dengan membolak-balik tabung. Larutan dimasukkan ke dalam *column* yang telah dipasang pada tabung penampung dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Setelah dibuang cairan yang tertampung

dalam tabung penampung, ditambahkan 700 μL larutan pencuci PE ke dalam *column* dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit dan kembali dibuang cairan yang tertampung. Untuk langkah selanjutnya mengikuti cara seperti pemurnian fragmen DNA di atas.

III.11. Sekuensing DNA

Proses sekuensing diawali dengan siklus sekuensing pada 15 μL 1 X larutan penyangga yang mengandung 1 unit BigDye® terminator v3.1 [Applied Biosystems, USA], primer untuk sekuensing 0,2 μM serta fragmen DNA hasil PCR yang telah dimurnikan sebanyak 2–5 μL tergantung pada ketebalan pita DNA hasil pemurnian. Reaksi siklus sekuensing dijalankan pada suhu denaturasi 96⁰C selama 10 detik, suhu *annealing* 50⁰C selama 5 detik dan suhu elongasi 60⁰C selama 4 menit sebanyak 25 siklus. Pada awal reaksi dilakukan pre-denaturasi pada suhu 96⁰C selama 3 menit.

Hasil siklus sekuensing dipresipitasi dengan menambahkan 40,5 μL etanol yang mengandung 4% EDTA 125 mM dan 4% sodium asetat 3 M pH 5,2. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan pipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 mL kemudian diinkubasi dalam es selama minimal 10 menit. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dihisap menggunakan pipet dengan menghindari kontak langsung ujung tips pipet dengan endapan yang mungkin tidak terlihat secara kasat mata. Ke dalam tabung ditambahkan 250 μL etanol 70% dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 selama 10 menit. Supernatan dihisap sebanyak mungkin dengan menggunakan pipet tanpa mengganggu endapan. Untuk menghilangkan sisa etanol, tabung dikeringkan dengan vakum pengering [SpeedVac, USA] pada kecepatan sedang selama 5 menit. Tabung disimpan pada suhu -20⁰C dan dibungkus dengan kertas perak untuk menghindari pengaruh cahaya langsung.

Sebelum memulai sekuensing DNA menggunakan *DNA sequencer* ABI 3130xl [ABI, USA] yang berbasis kapiler, mesin tersebut dicek kondisi larutan pencuci, larutan pelarut, polimer dan kemungkinan adanya gelembung dalam larutan polimer yang dapat mengganggu jalannya proses sekuensing.

Sampel yang telah dikeringkan dilarutkan dengan menambahkan 11 μ L larutan HiDi, kemudian dimasukkan ke dalam *multiplate* 96 sumur. Larutan dipanaskan pada suhu 95 °C selama 3 menit dan langsung dipindahkan ke atas es selama minimal 3 menit. *Multiplate* dipasang dalam mesin sekuensing untuk dijalankan. Hasil sekuensing dalam bentuk elektroforegram diunduh untuk dilakukan *editing* dan analisis. *Editing* dilakukan menggunakan perangkat lunak BioEdit versi 7.0.5 dan FinchTV versi 1.4.0.

Untuk mengetahui apakah subjek membawa mutasi pada regio BCP dan *precore*, sekuens DNA regio BCP dan *precore* disejajarkan dengan sekuens DNA dari VHB normal yang diunduh dari *GenBank* [Acc.no. M54923.1] sebagai referensi.

Untuk menentukan genotipe VHB, sekuens VHB regio S disejajarkan dengan 70 sekuens lain yang sudah diketahui genotipenya terdiri dari genotipe A-H. Selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak *molecular evolutionary genetic analysis* (MEGA) versi 4.0 untuk mendapatkan kekerabatan dari masing-masing VHB berdasarkan kedekatan sekuens DNA. Sekuens yang masuk ke dalam satu kelompok genotipe tertentu dianggap mempunyai genotipe yang sama dalam kelompoknya.

Untuk menentukan subtipe VHB, sekuens DNA regio S diterjemahkan ke dalam bahasa protein yang berupa urutan asam amino. Penentuan subtipe dilakukan berdasarkan jenis asam amino ke 122 dan 160 protein S, seperti telah disebutkan sebelumnya.

BAB IV HASIL PENELITIAN

IV.1. Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB

Jumlah subjek yang dipakai dalam penelitian ini ditentukan secara *arbitrary*; semua subjek yang terkumpul dan memenuhi syarat inklusi digunakan dalam penelitian ini.

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 140 dengan status HBsAg positif lebih dari enam bulan dan belum pernah mendapatkan pengobatan antiviral. Didapatkan subjek dengan jenis kelamin laki-laki sebanyak 84 dan 56 subjek lainnya berjenis kelamin perempuan. Dari 140 subjek, 139 berhasil dilakukan pemeriksaan status HBeAg, kadar DNA virus dan kadar ALT. Berdasarkan status HBeAg, titer DNA virus, dan kadar ALT, subjek tersebut dikelompokkan menjadi 37 subjek fase IT 23 subjek fase IC, 29 subjek fase LR dan 50 subjek fase ENH, sementara satu subjek tidak dapat ditentukan. Perhitungan statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0.

Tabel 4.1. Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB pada keempat fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

	Fase				p
	IT	IC	LR	ENH	
n	37	23	29	50	
Usia(median,min;max) tahun	39 (21;80)	37 (14;69)	47 (25;69)	47,5 (26;74)	0,019*
Pria:Wanita	19:18	14:9	18:11	40:10	0,04
ALT(median,min;max) U/L)	31 (13;59)	155 (72;1320)	33 (19;55)	87,5 (31;1365)	<0,001*
Kadar DNA VHB (median, IU/mL)	2,91±1,9	5,14±2,2	1,81±1,1	4,72±1,4	<0,001*

*) Avona satu arah, dilanjutkan dengan uji Dunnett.

IV.2. Prevalensi mutasi A1762T/G1764A, mutasi G1896A, genotipe dan subtipe

Dari 139 subjek yang dapat dikelompokkan ke dalam fase infeksi hepatitis B kronis, hanya 92 subjek berhasil diperiksa mutasi baik pada *precore* dan BCP. Sembilan puluh lima subjek berhasil ditentukan genotipe-nya dan hanya 89 subjek yang berhasil ditentukan subtipe-nya.

Tabel 4.2. Prevalensi mutasi, genotipe dan subtipe pada keempat fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis

	Fase				p
	IT	IC	LR	ENH	
Mutan*					
1762T/1764A	2/15 (13,3)	5/14 (35,7)	6/20 (30)	12/43 (16,6)	0,56
1896A	0/16 (0)	2/15 (13,3)	10/20 (50)	15/41 (36,6)	0,003
Genotipe*					
B	20/26 (76,9)	11/20 (55)	18/21 (85,7)	23/28 (82,1)	0,091
C	6/26 (23,1)	45% (n=20)	3/21 (14,3)	5/28 (17,9)	
Subtipe*					
<i>adw</i>	20/26 (76,9)	10/18 (55,5)	15/18 (83,3)	22/27 (81,5)	0,231
<i>ayw</i>	1/26 (3,8)	0/18 (0)	1/18 (5,5)	1/27 (3,7)	
<i>adr</i>	5/26 (19,2)	8/18 (44,4)	2/18 (11,1)	4/27 (14,8)	

* jumlah positif per jumlah diperiksa (persen)

Rentang usia subjek pada penelitian ini adalah 14 hingga 80 tahun dengan usia rata-rata 43,41 tahun. Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB disajikan pada tabel 4.1, sementara prevalensi mutasi BCP dan *precore*, genotipe dan subtipe VHB dapat dilihat pada tabel 4.2.

Jenis kelamin subjek yang dapat dikelompokkan dalam fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis pada penelitian ini terdiri dari 84 pria dan 55 wanita. Perbandingan

jenis kelamin pada masing-masing fase menunjukkan adanya dominasi pria paling tinggi pada fase ENH dan paling rendah pada fase IT ($p=0,04$). Data perbandingan antara pria dan wanita pada masing-masing fase ditampilkan pada tabel 4.1.

Mutasi A1762T/G1764A dapat ditemukan pada semua fase infeksi hepatitis B kronis, dan tidak ada perbedaan signifikan prevalensi mutasi tersebut pada masing-masing fase, sementara mutasi G1896A paling banyak ditemukan pada kelompok subjek fase LR (50%, $p=0,003$) diikuti fase ENH. Prevalensi mutasi G1896A pada fase IC dan ENH masing-masing adalah 13,3% dan 36,6%, sementara pada fase IT tidak ditemukan adanya mutasi tersebut.

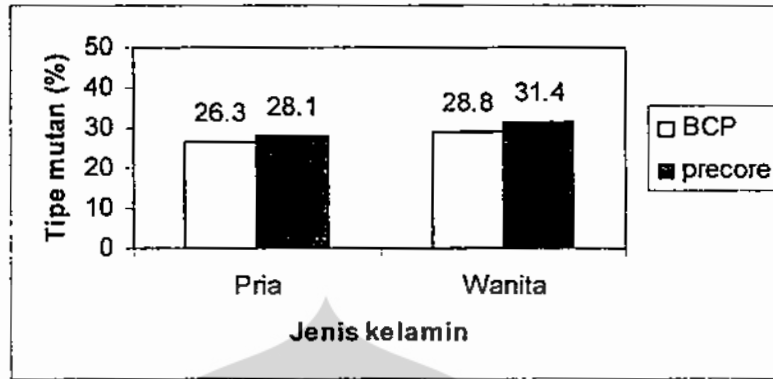
Pada penelitian ini hanya genotipe B dan C yang ditemukan, dengan genotipe B sebanyak 72 subjek dan genotipe C sebanyak 23 subjek. Tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna sebaran genotipe VHB pada masing-masing fase hepatitis B kronis ($p=0,091$).

Perbandingan genotipe B dan C pada fase hepatitis B kronis adalah 20:6, 11:9, 18:3 dan 23:5, masing-masing untuk fase IT, IC, LR dan ENH. Sementara itu, genotipe B pada HBeAg positif adalah 32,6% dan pada HBeAg negatif hanya 16,3%, yang artinya bahwa dari 23 subjek genotipe C yang ditemukan pada penelitian ini, 65,2% mempunyai status HBeAg positif dan sisanya 34,8% mempunyai status HBeAg negatif.

Pada penelitian ini, median kadar virus ditemukan paling tinggi pada fase IC ($5,14 \log_{10}$ IU/mL), sementara paling rendah ditemukan pada fase LR ($1,81 \log_{10}$ IU/mL) ($p<0,001$).

IV.3. Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan jenis kelamin

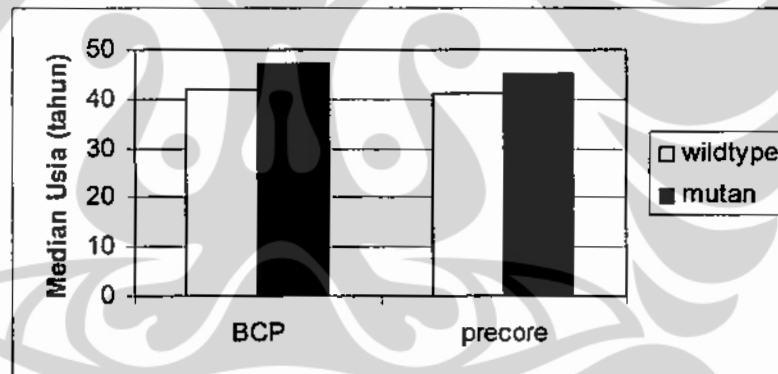
Dalam hubungannya dengan jenis kelamin, tidak ada korelasi mutasi A1762T/G1764A ($p=0,499$) dan G1896A (0,454) dengan jenis kelamin. Prevalensi tipe mutan pada pria dan wanita ditampilkan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Prevalensi mutasi BCP dan *precore* pada pria dan wanita

IV.4 Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan usia

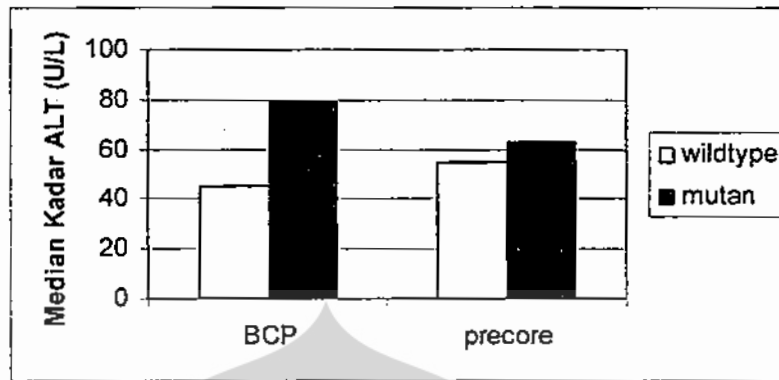
Dalam hubungannya dengan usia, tidak ada korelasi mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan usia ($p=0,164$ dan $p=0,757$). Sebaran median usia ditampilkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Hubungan antara mutasi BCP dan *precore* dengan usia inang.

IV.5. Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan kadar ALT

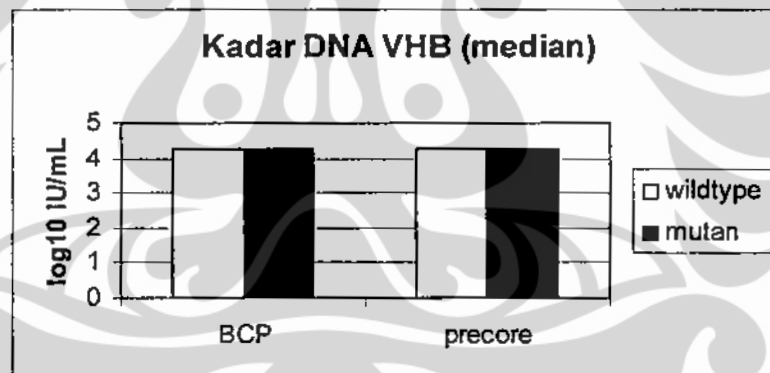
Tidak ada korelasi antara mutasi A1762T/G1764A dengan kadar ALT ($p=0,692$), sementara kadar ALT lebih tinggi pada subjek yang membawa VHB dengan mutan 1896A pada regio *precore* ($p=0,023$). Sebaran median kadar ALT dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Hubungan antara mutasi BCP dan precore dengan kadar ALT

IV.6. Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan kadar DNA VHB

Pada penelitian ini ditemukan bahwa mutasi A1762T/G1764A dan G1896A tidak berkorelasi dengan kadar DNA VHB ($p=0.922$ dan $p=0,846$). Sebaran median kadar DNA ditampilkan pada gambar 4.4.



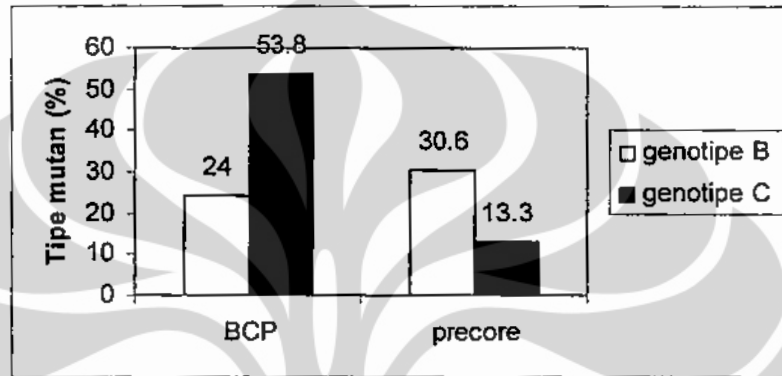
Gambar 4.4. Hubungan antara mutasi BCP dan precore dengan kadar DNA VHB

IV.7. Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan genotipe dan subtipe VHB

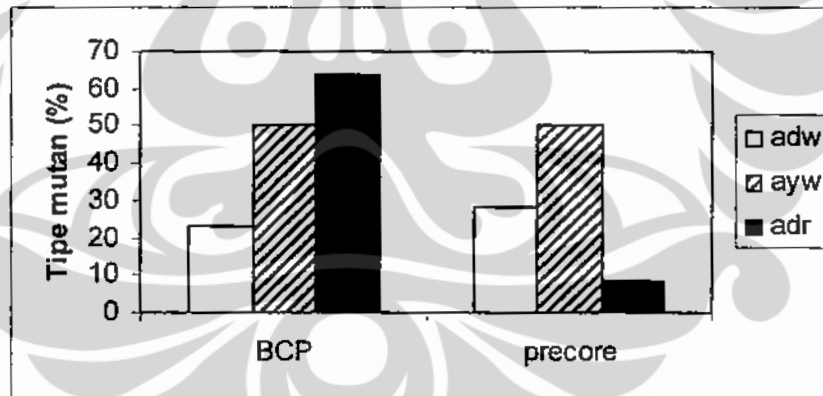
Mutasi ganda A1762AT/G1764A lebih banyak ditemukan pada subjek dengan genotipe C dibandingkan dengan genotip B ($p=0,043$). Sejalan bahwa subtipe *adr* biasanya masuk ke dalam genotipe C, mutasi ganda pada BCP tersebut lebih dominan

pada sub tipe *adr* dibandingkan pada sub tipe *adw* atau *ayw* yang ditemukan pada penelitian ini ($p=0,030$).

Tidak ada perbedaan bermakna mutasi G1896A regio *precore* baik itu pada genotipe ($p=0,185$) maupun pada sub tipe ($p=0,161$). Sebaran mutasi BCP dan *precore* pada genotipe dan sub tipe VHB terlihat pada gambar 4.5 dan 4.6.



Gambar 4.5. Sebaran mutasi A1762T/G1764A dan G1896A pada genotipe VHB.

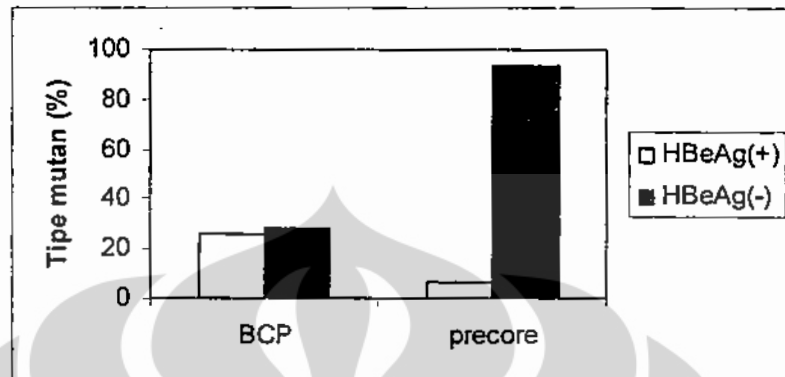


Gambar 4.6. Sebaran mutasi A1762T/G1764A dan G1896A pada sub tipe VHB.

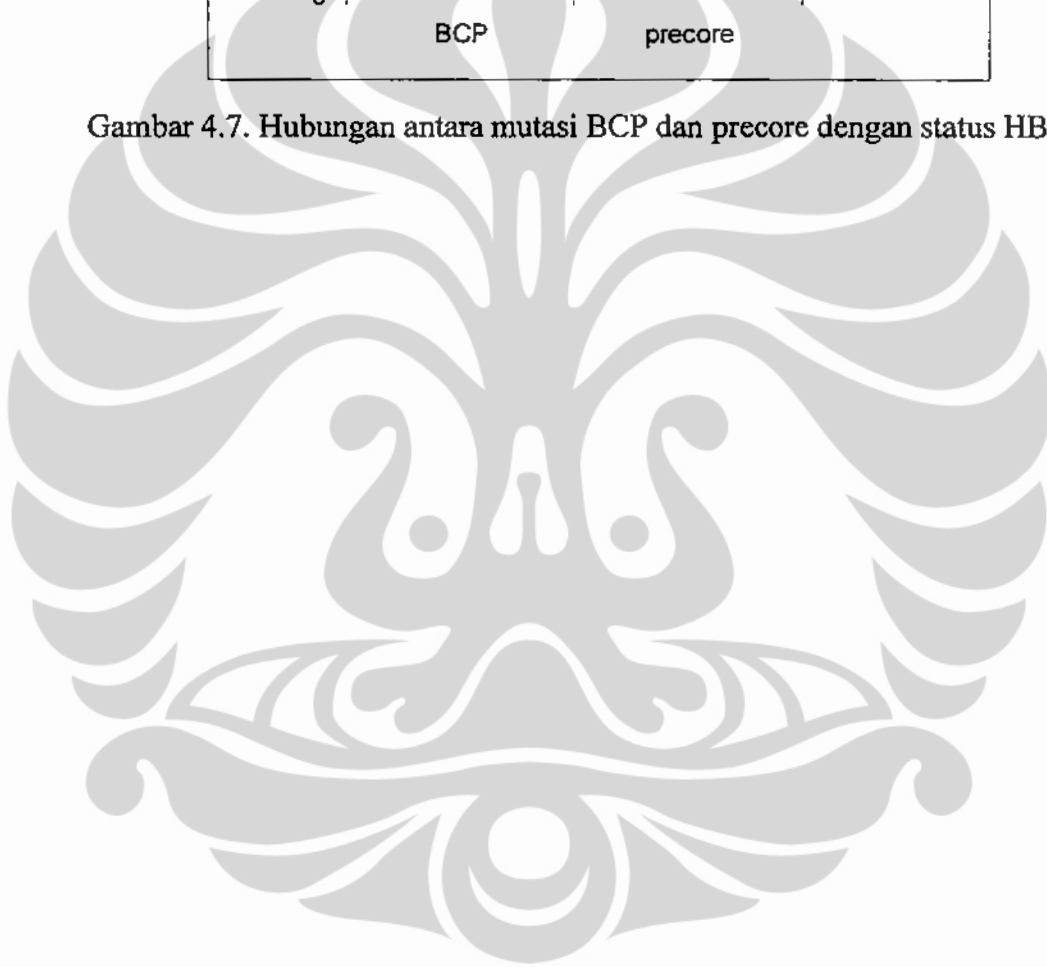
IV.8. Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1896A dengan status HBeAg

Secara statistik tidak ada perbedaan prevalensi mutasi A1762T/G1764A pada HBeAg positif dan negatif ($p=0,520$). Mutasi G1896A lebih sering ditemukan pada

isolat dengan status HBeAg negatif ($p=0,001$). Prevalensi mutasi BCP dan precore pada isolat dengan HBeAg positif dan negatif ditampilkan pada gambar 4.7.



Gambar 4.7. Hubungan antara mutasi BCP dan precore dengan status HBeAg.



BAB V

PEMBAHASAN

Indonesia dengan prevalensi hepatitis B tinggi, penularan virus lebih banyak terjadi pada usia kurang dari 2 tahun, dengan risiko berkembang menjadi hepatitis B kronis.

Perkembangan infeksi VHB bergantung pada interaksi virus dan inang. Pada infeksi yang terjadi pada masa bayi di mana imunitas belum berkembang dengan baik, sistem imun inang masih bersifat toleran terhadap antigen virus yang masuk dan disebut sebagai fase IT dengan HBeAg positif. Dalam replikasinya VHB tidak bersifat sitotoksik, tanpa adanya respon imun dari inang maka infeksi VHB tidak menampilkan gejala. Fase IT dapat berlangsung hingga 30 tahun tergantung usia saat infeksi VHB pertama terjadi. Fase ini berkembang menjadi fase IC sejalan dengan timbulnya respon imun terhadap sel hepatosit yang terinfeksi VHB. Proses eliminasi VHB dari sel hepatosit menyebabkan terjadinya kerusakan organ hati yang ditandai dengan kenaikan kadar ALT.⁷

Infeksi VHB yang terjadi pada usia dewasa biasanya segera memasuki fase IC dengan kadar ALT tinggi, kadar DNA VHB hingga 20.000 IU/mL dan HBeAg positif. Hasil yang penting dari fase IC adalah serokonversi dari HBeAg positif menjadi anti-HBe positif, yang biasanya diikuti dengan penurunan kadar DNA VHB. Ini merupakan masa transisi menuju fase LR yang ditandai dengan HBeAg negatif, kadar DNA VHB rendah atau tidak terdeteksi dan diikuti kadar ALT normal.⁷

Sebagaimana disebutkan pada bab sebelumnya bahwa cccDNA sebagai cetakan pada pembentukan virus baru tetap berada dalam inti sel hepatosit, reaktivasi replikasi VHB dapat terjadi secara spontan. Reaktivasi ini dapat merupakan reaktivasi virus yang *wildtype* (tipe liar) yang mengakibatkan HBeAg kembali positif. Tetapi yang sering terjadi adalah bahwa yang mengalami reaktivasi merupakan varian VHB pembawa mutasi yang menyebabkan ekspresi HBeAg terhenti. Varian ini memiliki kompetensi replikasi lebih baik dibandingkan varian normal.⁷

Pada penelitian ini ditemukan bahwa usia subjek pada kelompok fase LR dan ENH lebih tua dibandingkan pada kelompok fase IT dan IC. Hasil ini mendukung laporan Tong bahwa sebaran usia paling muda pada fase IT, sedangkan paling tua pada kelompok HBeAg negatif, pada penelitian ini fase LR dan ENH.⁴⁷ Perbedaan usia tersebut menggambarkan perjalanan infeksi hepatitis B kronis dari HBeAg positif menuju HBeAg negatif. Selain itu, dapat diindikasikan juga bahwa semakin bertambahnya usia, maka perjalanan infeksi hepatitis B kronis semakin menuju fase lanjut. Namun demikian karena adanya perbedaan tingkat imun inang dan adanya varian VHB, waktu yang ditempuh oleh fase-fase pada hepatitis B kronis pada masing-masing individu tidak sama. Dan juga tidak semua individu mengalami semua fase tersebut. Hal ini terlihat pada tabel 4.1 di mana ditemukan subjek dengan usia muda dan usia tua pada semua fase.

Pada penelitian ini jenis kelamin pria lebih dominan pada fase ENH, yaitu mencapai 80% ($p=0,04$). Apakah dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa infeksi hepatitis B kronis pada pria mempunyai risiko lebih besar untuk berkembang menuju fase ENH dengan risiko terjadinya sirosis dan kanker hati, tentu masih memerlukan pembuktian lebih lanjut. Meskipun pada laporan sebelumnya yang menyatakan bahwa jenis kelamin pria mempunyai risiko lebih besar untuk terjadinya sirosis.^{7,47}

Kadar DNA VHB ditemukan paling tinggi pada fase IC diikuti fase ENH, fase IT dan fase LR. Hasil ini tidak sesuai dengan laporan Tong yang mengatakan bahwa kadar DNA VHB paling tinggi ditemukan pada fase IT, meskipun dalam laporannya tersebut menyatakan bahwa fase IC masih ditandai dengan kadar DNA VHB yang masih tinggi.⁴⁷ Perbedaan tersebut kemungkinan karena dalam pengelompokan fase dalam penelitian ini salah satunya berdasarkan pada kadar ALT sebagai indikator peradangan hati. Karena kadar ALT bersifat fluktuatif, jadi kemungkinan pada saat terjadi kenaikan kadar ALT, kadar VHB masih tinggi. Pengelompokan fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis berdasarkan kadar ALT sebagai indikator peradangan hati akan kurang kuat jika hanya sekali dilakukan pemeriksaan kadar ALT. Hasil ini akan lebih baik jika dilakukan beberapa kali karena kadar ALT ini bersifat fluktuatif atau didukung dengan hasil biopsi.

Mutasi yang mempengaruhi ekspresi HBeAg adalah mutasi ganda A1762T/G1764A pada regio BCP yang menurunkan laju ekspresi dan mutasi G1896A pada kodon 28 regio *precore* yang menghentikan ekspresi protein prekursor HBeAg. Pada penelitian ini tidak ada perbedaan yang bermakna mutasi ganda A1762T/G1764A pada masing-masing fase, menunjukkan bahwa mutasi A1762T/G1764A pada patogenesis hepatitis B kronis bersifat *independent* dan tidak tergantung pada perjalanan infeksi. Mutasi G1896A lebih banyak terjadi pada fase LR dan ENH yang mempunyai status HBeAg negatif. Hasil ini mengindikasikan bahwa terjadinya serokonversi HBeAg dipengaruhi oleh mutasi G1896A dan tidak dipengaruhi oleh mutasi ganda A1762T/G1764A, sama seperti dugaan pada laporan sebelumnya.⁴⁷

Dua subjek pada penelitian ini dengan status HBeAg positif membawa mutasi G1896A yang mestinya mutasi tersebut menghentikan produksi HBeAg. Kemungkinan pada subjek tersebut terdapat lebih dari satu varian VHB (*quasispecies*), di mana virus didominasi oleh varian yang membawa mutasi G1896A tetapi ada sebagian kecil VHB yang normal dan memproduksi HBeAg dalam replikasinya. Kelemahan dari teknik sekuensing yang digunakan pada penelitian ini adalah bila ada variasi nukleotida yang dibawa oleh sebagian kecil populasi, akan tersamar oleh variasi yang mendominasi pada populasi tersebut. Mutasi G1896A pada subjek dengan HBeAg positif juga pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya yang menggunakan teknik sekuensing⁷ dan teknik hibridisasi.⁴⁸ Kemungkinan lain adalah pada subjek tersebut sesudah terjadinya mutasi, HBeAg yang merupakan hasil dari replikasi sebelumnya masih beredar dalam aliran darah sehingga masih terdeteksi meskipun produksinya sudah terhenti.

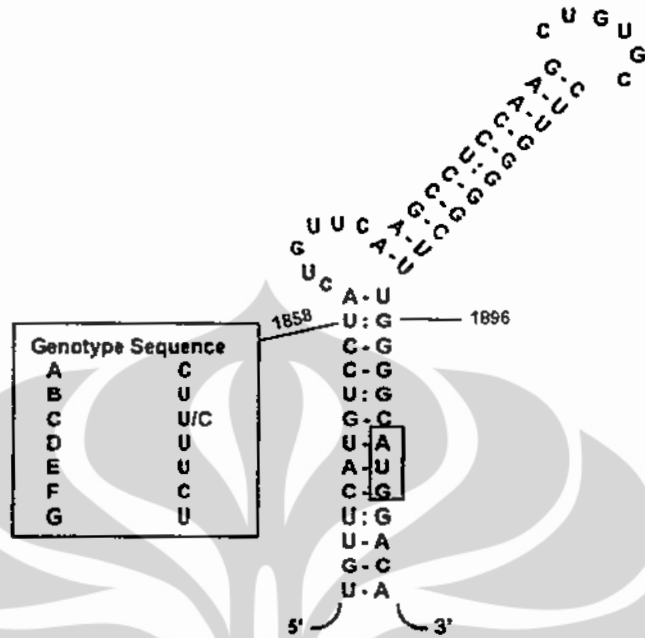
Mutasi ganda A1762T/G1764A lebih banyak ditemukan pada subjek dengan genotipe C dibandingkan dengan genotip B. Dari hasil ini kemungkinan pada genotipe C lebih besar risiko terjadinya mutasi A1762T/G1764A pada regio BCP dibandingkan pada genotipe B. Dalam hubungannya dengan subtipe VHB, mutasi A1762T/G1764A ditemukan lebih banyak pada subtipe *adr* dibandingkan *adw* dan *ayw*. Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa subtipe *adr* biasanya masuk ke dalam

genotipe C, sehingga mutasi yang berkorelasi positif dengan genotipe C juga berkorelasi positif dengan sub tipe *adr*.

Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa mutasi ganda A1762T/G1764A dan genotipe C mempunyai risiko lebih besar untuk terjadinya kerusakan hati lebih lanjut.¹¹ Belum diketahui secara pasti apakah mutasi ganda A1762T/G1764A dan genotipe C merupakan faktor yang berkaitan atau tidak dalam hubungannya dengan risiko tersebut. Chen et al melakukan penelitian di Taiwan dan melaporkan bahwa frekuensi mutasi ganda A1762T/G1764A meningkat pada pasien dengan penyakit hati lanjut baik pada genotip B maupun genotipe C.⁴⁹

Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar DNA virus pada subjek yang membawa mutasi ganda A1762T/G1764A maupun yang membawa mutasi G1896A dengan yang *wildtype*. Hasil ini mengindikasikan bahwa mutasi tersebut tidak mempengaruhi laju transkripsi mRNA pregenom yang akhirnya juga tidak mempengaruhi laju replikasi virus. Meskipun mutasi ganda A1762T/G1764A bersama mutasi lain meningkatkan laju replikasi VHB, Jammeh at al membuktikan bahwa secara *in vitro* mutasi ganda A1762T/G1764A dan mutasi G1896A tidak mempengaruhi laju replikasi virus.⁵⁰

Pada laporan sebelumnya disebutkan bahwa genotipe VHB mempengaruhi serokonversi HBeAg. Genotipe C memerlukan waktu lebih lama untuk mencapai serokonversi HBeAg dibandingkan dengan genotipe B.¹⁰ Pada penelitian ini genotipe C lebih banyak ditemukan pada subjek kelompok HBeAg positif (65,2%) dibandingkan pada kelompok HBeAg negatif (34,8%), sedangkan genotipe B lebih banyak ditemukan pada subjek kelompok HBeAg negatif (56,9%) dibandingkan pada kelompok HBeAg positif (43,1%). Ini berarti pada penelitian ini subjek yang telah mengalami serokonversi HBeAg lebih banyak genotipe B dibandingkan genotipe C. Meskipun tidak mencapai batas kemaknaan ($p=0,053$), hasil ini mendukung bahwa genotipe C memerlukan waktu lebih lama untuk mencapai serokonversi HBeAg.

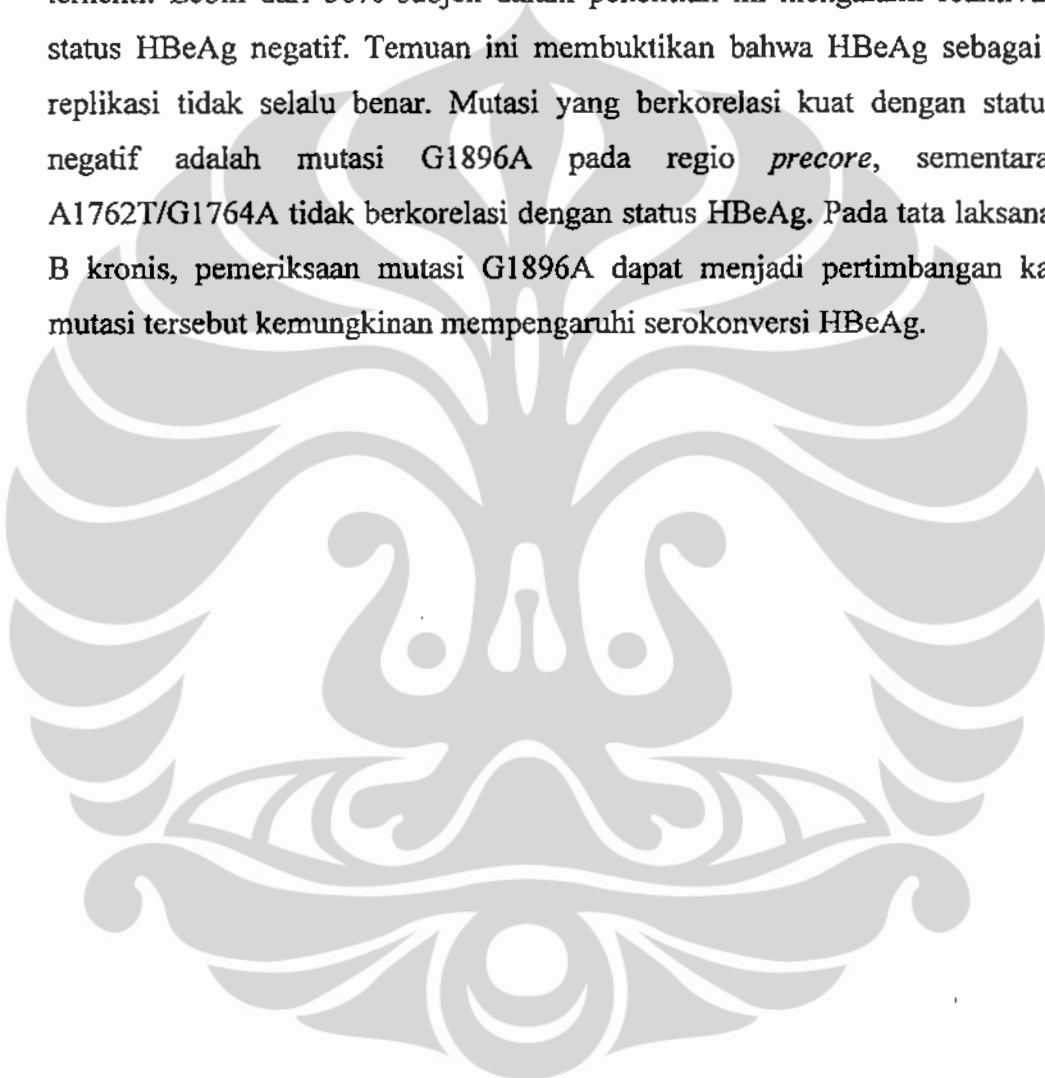


Gambar 5.1. Nukleotida ke 1896 berpasangan dengan nukleotida ke 1858 pada struktur epsilon (ϵ).⁵¹ “telah diolah kembali”

Pada genom VHB genotipe B dan C, titik 1858 didominasi oleh nukleotida T yang merupakan tipe mutan. Seperti disebutkan sebelumnya pada struktur sekunder mRNA pregenom pada regio epsilon (ϵ) titik 1896 berpasangan dengan titik 1858 (Gambar 5.1). Oleh karena itu, kestabilan mutasi yang terjadi pada titik 1896 sangat dipengaruhi jenis nukleotida pada titik 1858. Itu artinya mutasi G1896A menjadi lebih stabil manakala titik 1858 ditempati oleh nukleotida T. Peranan nukleotida 1858 pada mutasi G1896A dibuktikan oleh Wintermeyer et al yang melaporkan bahwa mutasi tersebut terjadi pada kelompok genotipe D yang membawa nukleotida T pada titik 1858 dan tidak terjadi pada kelompok genotipe A yang membawa nukleotida C.⁵² Data mengenai mutasi C1858T yang kami dapat dari penelitian lain di laboratorium di mana penelitian ini dilakukan dan dengan menggunakan subjek yang sama membuktikan bahwa dengan nukleotida T pada titik 1858, prevalensi mutasi G1896A jauh lebih tinggi (26,6%) dibandingkan dengan pada genotipe A yang hanya 0% pada pasien kaukasia⁵¹ dan 3% genotipe A dari pasien Amerika.⁵³ Isolat dengan

mutasi pada regio *precore* 1896A pada penelitian ini ternyata hampir semuanya membawa nukleotida T pada posisi 1858. Hasil ini mengindikasikan bahwa mutasi G1896A berkorelasi kuat dengan jenis nukleotida pada posisi 1858.

Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa setelah terjadinya serokonversi HBeAg, tidak selalu berarti bahwa replikasi VHB telah menurun atau terhenti. Lebih dari 50% subjek dalam penelitian ini mengalami reaktivasi dengan status HBeAg negatif. Temuan ini membuktikan bahwa HBeAg sebagai indikator replikasi tidak selalu benar. Mutasi yang berkorelasi kuat dengan status HBeAg negatif adalah mutasi G1896A pada regio *precore*, sementara mutasi A1762T/G1764A tidak berkorelasi dengan status HBeAg. Pada tata laksana hepatitis B kronis, pemeriksaan mutasi G1896A dapat menjadi pertimbangan karena tipe mutasi tersebut kemungkinan mempengaruhi serokonversi HBeAg.



BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN

IV.1. Kesimpulan

1. Tidak ada perbedaan bermakna mutasi A1762T/G1764A pada masing-masing fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis.
2. Mutasi G1896A berbeda bermakna antara fase IT dengan fase IC, LR dan ENH.
3. Mutasi A1762T/G1764A tidak berkorelasi dengan jenis kelamin, usia, peradangan hati, kadar DNA VHB dan status HBeAg.
4. Mutasi A1762T/G1764A berkorelasi positif dengan genotipe C dan sub tipe *adr*.
5. Mutasi G1896A tidak berkorelasi dengan jenis kelamin, usia, genotipe VHB, sub tipe VHB dan kadar DNA VHB.
6. Mutasi G1896A berkorelasi positif dengan peradangan hati.
7. Mutasi G1896A berkorelasi positif dengan HBeAg negatif.

IV.2. Saran

1. Penggunaan kadar ALT sebagai indikator kerusakan hati perlu dilakukan beberapa kali. Karena kadar ALT mudah berubah, maka pengambilan beberapa kali akan lebih mewakili.
2. Jika memungkinkan, indikator kerusakan hati ditambah dengan data biopsi.
3. Pada reaktivasi hepatitis B kronis sebaiknya diperiksa adanya mutasi G1896A yang berkaitan dengan HBeAg negatif.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2009;40(84): 405 – 420.
2. Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M, et al. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. Arch.Virol. 2009;154(7):1047 – 59.
3. Karayiannis P, Carman WF, Thomas HC. Molecular variations in the core promoter, *precore* and core regions of hepatitis B virus, and their clinical significance. In: Thomas HC, Lemon SM, Zuckerman AJ, editors. Viral Hepatitis 3rd Edition. United Kingdom:Blackwell Publishing Ltd, 2005;p. 242 – 261.
4. Lai CL, Yuen MF. The natural history and treatment of chronic hepatitis B: a critical evaluation of standard treatment criteria and end points. Ann.Intern.Med.2007;147:58 – 61.
5. De Castro L, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and *precore* regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. BMC 2001 ;1:10
6. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. Hepat. 2007;45(2):507 – 39.
7. Fattovich G, Bortolotti F, Donato, F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. J.Hepat. 2008;48:335 – 52.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B. J.Hepat. 2009;50:227 – 42.
9. Liaw YF. HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. Hepatol.Int. 2009;3:425 – 433.
10. Yim HJ, Lok ASF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. Hepat.2006;43 : S173 – 81.

11. Miyakawa Y, Okamoto H, Mayumi M. The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative infections. *J.Vir.Hepat.* 1997;4: 1 – 8.
12. Sharma S, Sharma B, Singla B, ChawlaYK, Chakraborti, Saini, et.al. Clinical significance of genotypes and *precore*/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in north India. *Dig.Dis.Sci.* 2010;55:794 – 802.
13. Lim CK, Tan JTM, Khoo JBS, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, et al. Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HBeAg expression and HBeAg/anti-HBe status in HBV carriers. *Int.J.Med.Sci.* 2006;3(1):14 – 20.
14. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminar in Liver Disease*, 2004 [24] Suppl.1. 3 – 10.
15. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl. J Med*, 1991;324(24):1705 – 9.
16. Tong MJ, Lawrence MB, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and precore A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver.Int.* 2007; 27(10): 1356 – 63.
17. Nuraeny N, Muljono DH, Sudoyo H, Marzuki S. Genetic study of hepatitis B in Indonesia reveals a new subgenotype B in east Nusa Tenggara. *Arch.Virol.*2008 ; 153: 1057 – 65.
18. Kann M. Structural and molecular virology. In: Lai CL, Locarnini S. *Hepatitis B virus*. London. International Medical Press. 2002 : 9 – 22.
19. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. *Precore*/basal core promoter mutant and hepatitis B viral DNA level as predictor for liver death and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006;12(41):6620 – 26.
20. Tong T, Kim KH, Chante C, Wands J, Li J. Hepatiti B virus e antigen variants. *Int.J.Med Sci.* 2005;2(1): 2 – 7
21. Carter JB, Saunders VA. *Virology Principles and Applications*. West Sussex: John Wiley and Sons; 2007

22. Reuben A. The thin red line. Landmarks in hepatology. *Hepat.*2002;36(3): 770 – 73
23. Lai CL. Discovery and classification. In:Lai CL, Locarnini S. *Hepatitis B virus*. London. International Medical Press.. 2002 : 1 – 8.
24. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2007 ; 13(1): 14 – 21
25. Alfaresi M, Elkoush A, Alshehhi H, Alzaabi A, Islam A. Hepatitis B virus genotypes and *precore* and core mutant in UAE patients. *Viol.J.*2010;7(160):1 – 8.
26. Ben-Porath E, Wands JR, Marciniak RA, Wong MA, Hornstein L, Ryder R , et al. Structural analysis of hepatitis B surface antigen by monoclonal antibodies. *J.Clin.Invest.* 1985 ;10: 1338 – 47.
27. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis virus serotype variations within the four major subtypes. *J.Gen.Virol.* 1992;72:3141 – 45
28. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N.Engl J Med.*1997;337(24): 1733 – 45.
29. Jilbert AR, Burrell CJ, Triatni M, Kann M. Hepatitis B virus replication. In: Lai CL, Locarnini S, Editors. *Hepatitis B virus.International*. London. Medical Press. 2002 : 43 – 53.
30. Moola N, Kew M, Arbuthnot P. Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *J.Vir.Hepat.* 2002; 9: 323 – 331.
31. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin.Liver Dis.* 2007;11(4): 685 – 706.
32. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. dalam Knipe DM, Howley PM.*Fields virology* 5th Ed.Lippincott Williams and Wilkins. 2007 : 2978 – 3014.
33. Nguyen T, Locarnini S. Monitoring drug therapy for hepatitis B – a global chalange? *Nat.Rev.Gastroenterol. Hepatol.* 2009;6:565 – 7.
34. Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor. Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J virol.* 2008;82(16):7812 – 17.
35. Huang C, Lin SL, Ho Y, Chen F, Yang C. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell.Mol.Immunol.*2006;3(2): 97 – 106.

36. Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis.* 2001;2: 43 – 50.
37. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus Infection-Natural history and clinical consequences. *NEJM.* 2004;350(11): 1118 – 29.
38. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J.Gen.Virol.* 2006 ; 87: 1439 – 49.
39. Ratnam D, Visvanathan K. New concepts in the immunopathogenesis of chronic hepatitis B: the importance of the immune response. *Hepatology Int.* 2008;2:S12 – 18.
40. Heydtmann M. Minireview. Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J.Virol.* 2009;83(7):2796 – 802.
41. Thursz MR, Thomas HC. Pathogenesis of chronic hepatitis B. In: Thomas H, Lemon S, Zuckerman A, Editors. *Viral hepatitis 3rd Ed.* 2005. USA. Blackwell Publishing Ltd :308 – 322.
42. Shi YH, Shi CH. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2009 ;15(25): 3099 – 105.
43. Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology.* 2009;49: S174 – 84.
44. Kim HJ, Lee DH, Gwak GY, Choi MS, Lee JH. Analysis of the core gene of hepatitis B virus in Korean patients. *Liver Int.* 2007; 27(5):633 – 8.
45. Kidd-Ljunggren K, Oberg M, Kidd AH. Hepatitis B virus X gene 1751 to 1764 mutations: implications for HBeAg status and disease. *J.Gen.Virol.* 1997; 78:1469 – 78.
46. Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L et al. Long-term follow-up of HBeAg-positif patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N.Engl.J. Med.* 1996;334:1422 – 7
47. Tong MJ, Hsu L, Hsien C, Kao JH, Durazo FA, Saab S, et al. A comparison of hepatitis B viral markers of patients in different clinical stages of chronic infection. *Hepatology Int.* 2010;4:516 – 22.

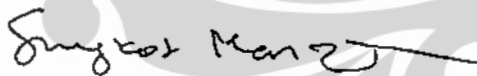
48. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SAA, Rizvi SAH. Genetic variability in the *precore* and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. BMC Gastroenterol. 2006;6(20): 1 – 6.
49. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and *precore* and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. J.Clin. Microbiol. 2005; 43(12):6000 – 6.
50. Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. J.Gen.Virol. 2008;89:901 – 9.
51. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. Hepatol.2003;38(5): 1075 – 86.
52. Wintermeyer P, Gerner P, Gehring S, Karimi A, Wirth S. Prevalence of hepatitis B virus *precore* stop codon mutations in chronically infected children. World J Gastroenterol.2006;12(14):2235 – 38.
53. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al. Prevalence of HBV *precore*/core promoter variants in the united states. Hepatol. 2003; 86(3): 619 – 28.

EIJKMAN INSTITUTE RESEARCH ETHICS COMMISSION

ETHICAL APPROVAL

The Eijkman Institute Research Ethics Commission has convened a meeting on July 2, 2007 to review the research protocol entitled "Molecular diversity of Hepatitis B virus (HBV) in Indonesia" with David Handoyo Mulyono, MD, PhD, as the principal investigator. After deliberations the Commission has decided to grant ethical approval.

Jakarta, July 16, 2007



Prof. Sangkot Marzuki, MD, MSc, PhD, DSc
Director, Eijkman Institute for Molecular Biology



Prof. A.A. Loedin MD.PhD.
Chairman

SURAT PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : _____

Alamat : _____

menyatakan bahwa :

1. Saya telah diberi penjelasan mengenai penyakit Hepatitis B: penyebab, gejala klinis dan pengobatan serta tindakan pencegahan yang dapat dilakukan untuk mencegah penularan yang mungkin terjadi
2. Berdasarkan penjelasan yang diberikan, saya menyadari bahwa masih sangat diperlukan penelitian baik penelitian dasar maupun klinis untuk mengatasi dan melakukan terobosan baik dari segi pencegahan maupun pengobatan penyakit hepatitis B.
3. Berdasarkan hal tersebut di atas (no. 2), saya bersedia untuk turut serta dalam penelitian dan bersedia menyumbangkan darah saya sebanyak kurang lebih 5 ml untuk penelitian yang berkaitan dengan penyakit hepatitis B dan ilmu kedokteran
4. Saya menyetujui bahwa semua data yang berkaitan dengan identitas saya akan dipperlakukan secara rahasia oleh peneliti.

Mengetahui:

Yang menyetujui:

(_____)

(_____)

(_____)

Daftar subjek penelitian

No	CODE	Sex	Age (year)	Viral Load (log ₁₀ IU/mL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Phase
1	EIHM026	M	44	4.24	19	25	ENH
2	EIJKH-B021	M	33	7.63	187	177	IC
3	EIJKH-B415	M	55	8.04	255	312	ENH
4	EIJKH-B017	F	41	3.42	32	41	IT
5	EIJKH-B293	M	54	5.91	132	115	ENH
6	EIJKH-B421	M	59	3.51	34	59	IT
7	EIJKH-B018	M	33	8.04	167	199	IC
8	EIJKH-B048	M	27	1.40	32	36	IT
9	EIJKH-B048	M	74	4.54	98	95	ENH
10	EIJKH-B122	F	34	2.64	233	301	IC
11	EIJKH-B114	M	25	0.78	21	31	IT
12	EIHM025	F	35	4.83	39	45	ENH
13	EIJKH-B020	M	62	2.24	172	155	ENH
14	EIJKH-B152	M	22	4.08	29	36	IT
15	EIJKH-B205	F	60	0.78	31	33	LR
16	EIHM024	M	50	4.24	11	17	ENH
17	EIJKH-B109	M	39	2.29	230	132	LR
18	EIJKH-B435	M	48	8.14	52	55	ENH
19	EIJKH-B288	F	32	3.78	31	36	IT
20	EIJKH-B154	F	55	0.78	67	55	LR
21	EIJKH-B075	F	49	6.94	66	97	ENH
22	EIJKH-B003	M	46	4.58	23	25	ENH
23	EIJKH-B296	M	47	7.15	89	94	ENH
24	EIJKH-B107	M	41	1.57	17	24	LR
25	EIJKH-B025	F	33	0.78	19	24	IT
26	EIJKH-B201	M	42	4.99	21	36	IT
27	EIHM021	M	33	4.24	76	87	ENH
28	EIHM022	F	34	5.86	133	105	ENH
29	EIHM020	M	52	4.24	71	82	ENH
30	EIJKH-B039	M	64	4.86	79	31	ENH
31	EIJKH-B101A	F	55	3.32	42	55	LR
32	EIJKH-B280	F	37	0.91	23	27	IT
33	EIJKH-B202	M	56	4.87	67	99	ENH
34	EIJKH-B204	M	36	5.34	255	312	IC
35	EIJKH-B091	M	21	6.87	35	50	IT
36	EIHM019	M	30	4.24	16	19	ENH
37	EIJKH-B377	F	54	1.65	27	33	LR
38	EIHM018	M	27	2.66	16	19	LR
39	EIJKH-B166	M	57	0.78	25	27	IT
40	EIJKH-B189	M	65	4.71	132	98	IC
41	EIJKH-B142	M	25	3.37	27	29	IT
42	EIJKH-B164	M	47	0.78	21	23	LR
43	EIJKH-B163	M	54	4.24	12	19	ENH
44	EIJKH-B273	M	26	2.59	27	29	LR
45	EIJKH-B470	M	36	6.60	477	527	ENH

Subjek penelitian							(lanjutan)
No	CODE	Sex	Age (year)	Viral load (log ₁₀ IU/mL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Phase
46	EIJKH-B037	M	39	1.44	21	24	IT
47	EIJKH-B423	M	49	0.87	34	40	IT
48	EIJKH-B124	F	39	4.08	42	72	IC
49	EIJKH-B044	M	50	7.80	977	1320	IC
50	EIJKH-B066	F	32	0.78	12	34	IT
51	EIJKH-B145	M	37	4.65	677	956	IC
52	EIJKH-B196	F	80	2.18	28	33	IT
53	EIJKH-B118	M	50	0.78	29	30	IT
54	EIJKH-B168	M	21	4.34	27	31	IT
55	EIJKH-B047	M	51	0.78	89	78	IC
56	EIHM017	F	32	4.24	21	23	ENH
57	EIJKH-B011	M	28	5.34	83	102	ENH
58	EIJKH-B402	F	56	0.78	78	91	LR
59	EIJKH-B302	F	39	0.78	21	23	IT
60	EIJKH-B266	M	23	0.78	11	13	IT
61	EIJKH-B140	M	69	0.78	29	16	IT
62	EIJKH-B274	F	26	5.86	23	31	IT
63	EIJKH-B207	F	46	3.64	19	25	IT
64	EIJKH-B241	F	36	5.14	144	124	IC
65	EIJKH-B169	F	25				
66	EIJKH-B447	F	50	4.24	121	144	ENH
67	EIJKH-B085	F	34	0.78	19	23	IT
68	EIJKH-B084	F	55	0.78	24	25	IT
69	EIJKH-B401	F	51	0.78	27	27	LR
70	EIJKH-B186	M	51	0.78	35	33	LR
71	EIJKH-B133	M	48	4.12	33	37	IT
72	EIJKH-B269	F	27	5.71	18	25	IT
73	EIJKH-B031	F	44	3.87	27	32	LR
74	EIJKH-B050	F	25	4.01	344	401	IC
75	EIJKH-B151	F	69	0.78	42	45	IC
76	EIJKH-B170	F	28	4.87	32	44	IT
77	EIJKH-B040	F	27	6.60	24	27	IT
78	EIJKH-B256	M	66	0.78	21	27	LR
79	EIJKH-B149	M	43	2.52	26	28	LR
80	EIJKH-B378	M	36	1.72	17	29	LR
81	EIJKH-B379	M	39	7.63	133	97	IC
82	EIJKH-B026	M	44	3.17	144	87	ENH
83	EIJKH-B393	F	57	2.63	66	79	LR
84	EIJKH-B380	F	19	8.04	126	155	IC
85	EIJKH-B293	M	54	1.65	28	33	LR
86	EIJKH-B422	M	30	2.16	26	33	LR
87	EIHM014	M	54	6.32	36	40	ENH
88	EIJKH-B083	M	51	0.78	19	23	LR
89	EIJKH-B139	M	40	4.24	24	26	IT
90	EIHM013	M	61	4.24	35	32	ENH

Subjek penelitian

(lanjutan)

No	CODE	Sex	Age (year)	Viral load (log ₁₀ IU/mL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Phase
91	EIJKH-B087	M	47	4.35	27	31	LR
92	EIJKH-B180	M	50	2.92	29	31	IT
93	EIJKH-B209	F	69	0.78	23	37	LR
94	EIJKH-B407	M	37	4.55	17	26	IT
95	EIJKH-B370	F	56	6.97	55	49	ENH
96	EIHM012	F	46	6.37	43	63	ENH
97	EIJKH-B400	F	50	7.45	233	178	ENH
98	EIJKH-B184	M	47	4.74	81	88	ENH
99	EIJKH-B175	M	46	3.54	27	34	LR
100	EIJKH-B262	M	66	1.82	433	312	LR
101	EIHM011	M	26	4.24	79	104	ENH
102	EIJKH-B163	M	53	4.71	79	98	ENH
103	EIJKH-B424	M	41	7.54	39	151	ENH
104	EIJKH-B043	M	57	3.97	46	77	IC
105	EIHM010	M	56	4.24	52	59	ENH
106	EIHM009	F	42	4.24	71	87	ENH
107	EIJKH-B038	M	32	5.07	227	256	ENH
108	EIJKH-B167	M	68	4.83	32	35	ENH
109	EIJKH-B286	F	41	6.70	127	161	IC
110	EIHM008	M	44	4.24	47	55	ENH
111	EIJKH-B373	F	63	2.74	22	31	LR
112	EIJKH-B436	M	36	3.82	46	77	IC
113	EIJKH-B282	F	32	8.04	123	199	IC
114	EIJKH-B158	M	21	6.86	134	122	IC
115	EIJKH-B108	F	58	0.78	31	33	IT
116	1005120236	F	52	2.61	36	44	IT
117	EIJKH-B210	M	45	0.78	19	22	LR
118	EIHM004	M	34	4.24	62	77	ENH
119	EIJKH-B176	M	52	6.79	79	81	IC
120	EIJKH-B126	M	53	5.11	89	94	IC
121	EIJKH-B022	F	54	3.73	56	99	ENH
122	EIJKH-B283	M	51	8.04	900	1365	ENH
123	EIJKH-B150	F	40	2.60	23	27	LR
124	EIJKH-B291	M	61	1.95	143	79	ENH
125	EIJKH-B392	M	40	3.72	287	200	IC
126	EIHM003	M	33	4.24	88	122	ENH
127	EIJKH-B071	M	29	4.62	32	36	ENH
128	EIJKH-B466	M	30	8.04	52	77	ENH
129	EIJKH-B131	F	21	2.82	19	44	IT
130	EIJKH-B374	F	14	8.04	241	311	IC
131	EIJKH-B408	M	25	3.09	39	33	LR
132	EIJKH-B123	M	42	4.84	41	47	IT
133	0903150139	M	36	5.54	120	312	ENH
134	EIHM002	M	26	4.63	30	34	ENH
135	EIHM001	M	48	5.32	56	61	ENH

Subjek penelitian

(lanjutan)

No	CODE	Sex	Age (year)	Viral load (log ₁₀ IU/mL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Phase
136	EIJKH-B045	F	48	3.15	32	35	IT
137	EIJKH-B203	M	43	6.54	98	120	ENH
138	EIJKH-B278	M	34	3.63	30	55	LR
139	EIJK-FF018	M	48	5.54	89	78	ENH
140	EIJK-FF40	M	55	4.71	79	114	ENH



A



B

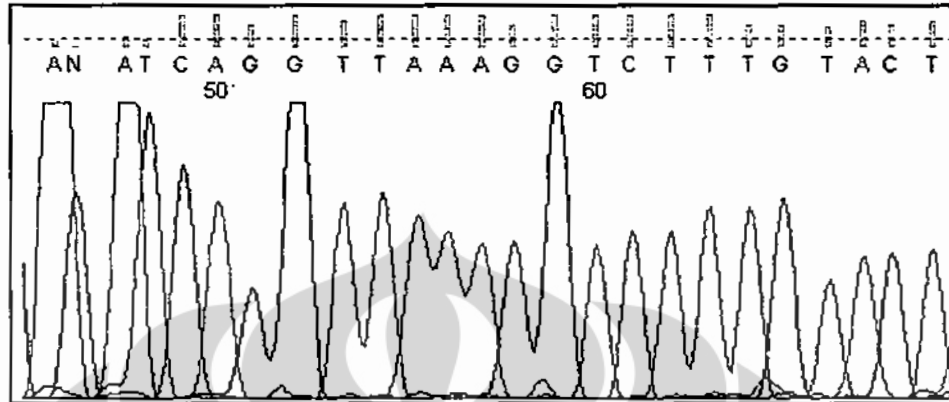


Gambar eletroforesis gel agarosa

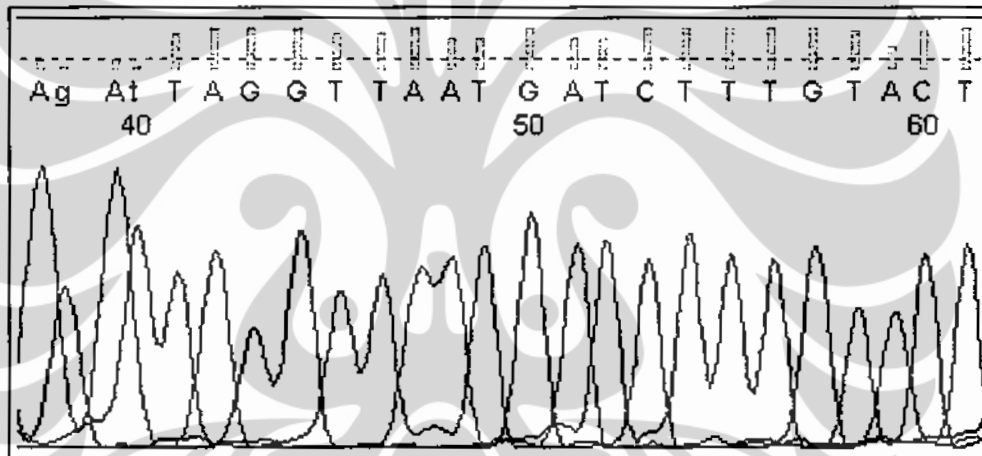
A. Hasil PCR fragmen DNA gen S

B. Hasil PCR fragmen DNA regio BCP dan precore

A



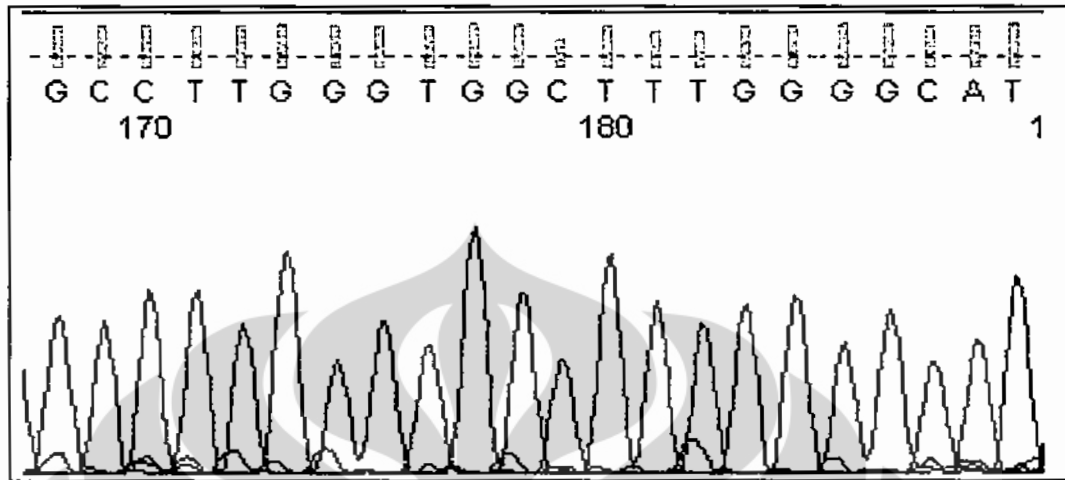
B



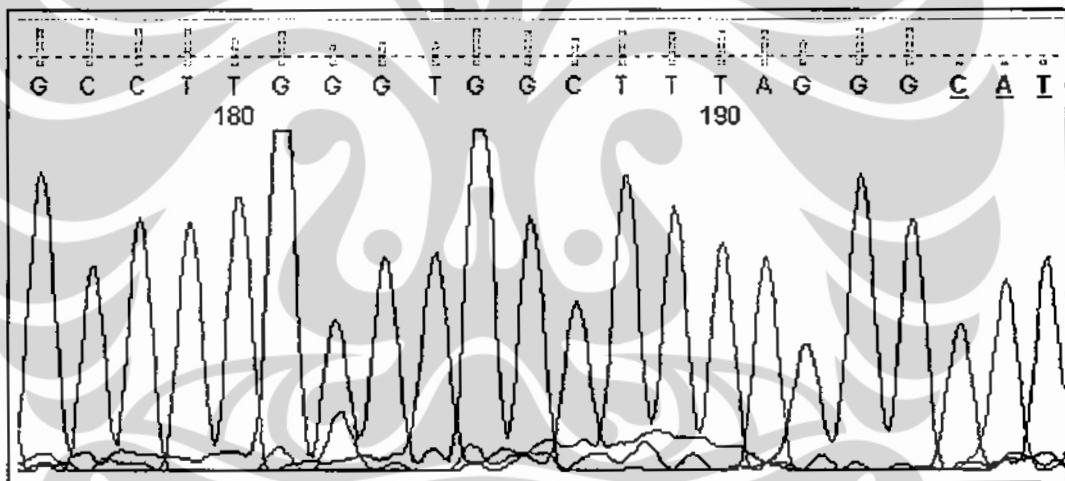
Elektroforegram hasil proses sekuensing DNA

- A. Regio BCP normal 1762A/1764G pada gambar posisi 1762 dan 1764 pada titik 57 dan 59
- B. Regio BCP mutan 1762T/1764A pada gambar posisi 1762 dan 1764 pada titik 49 dan 51

A



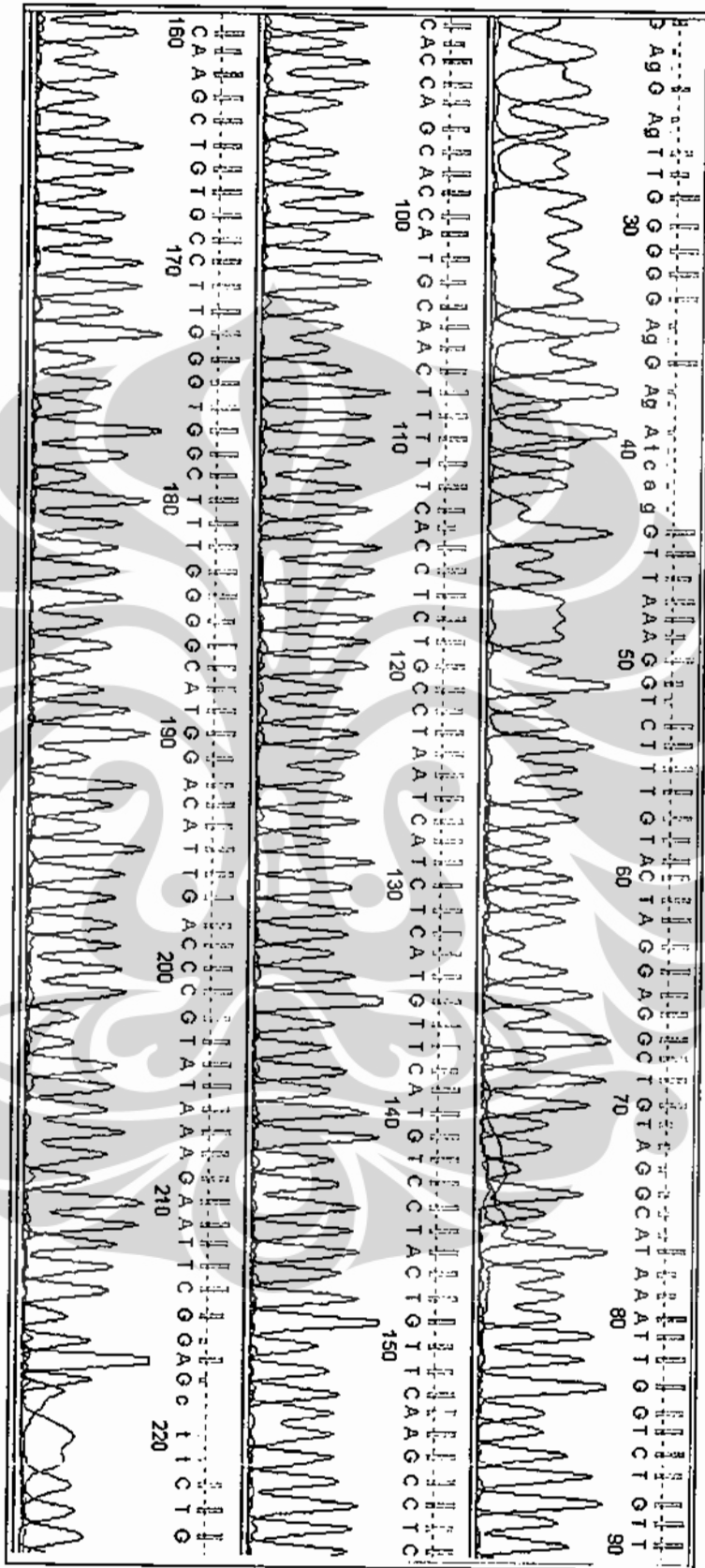
B



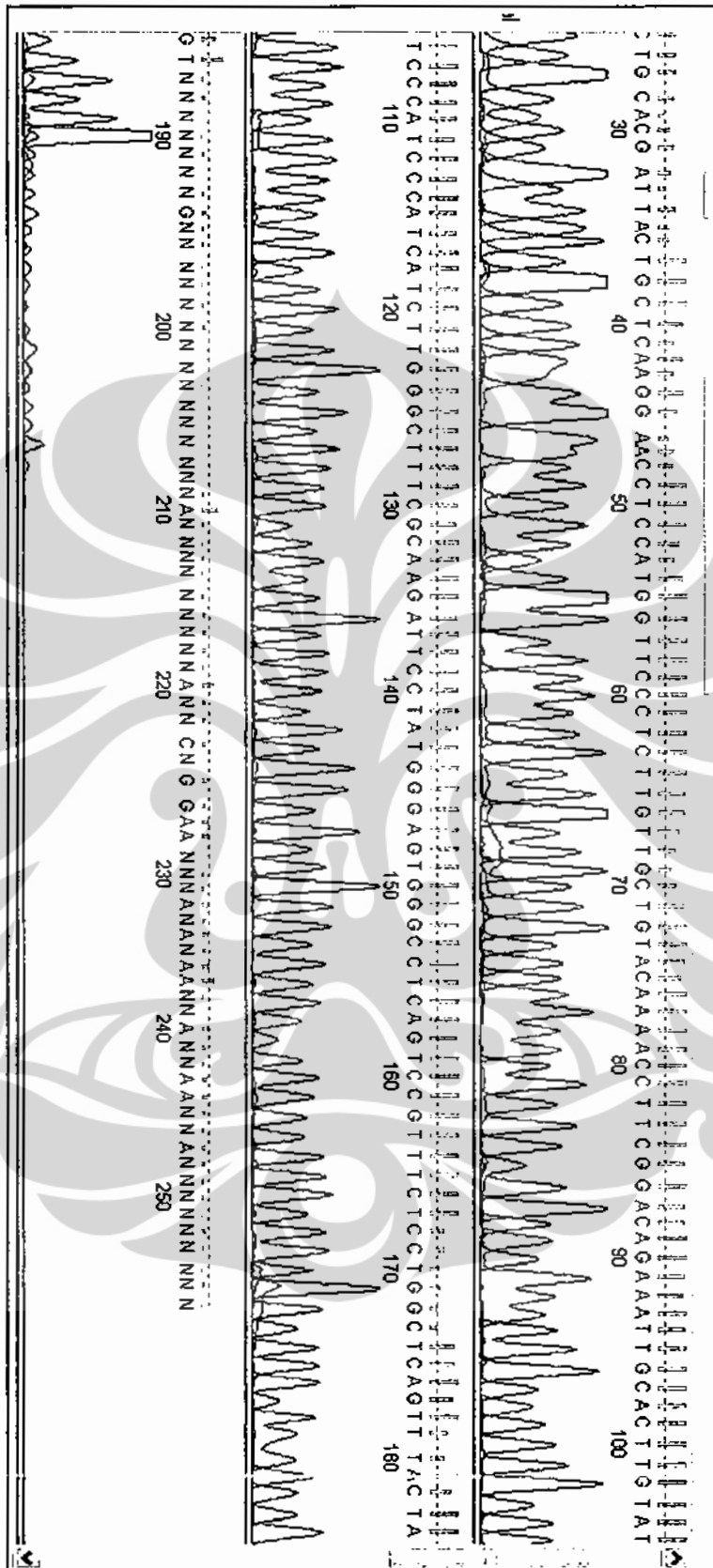
Elektroforegram hasil proses sekuensing DNA

A. Regio BCP normal 1896G. Pada gambar posisi 1896 berada pada titik 183

B. Regio BCP mutan 1896A. Pada gambar posisi 1896 berada pada titik 191



Gambar elektroforegram hasil sekuenjing fragmen DNA regio BCP dan *precore*. Pada gambar posisi 1762, 1764 dan 1896 masing-masing terletak pada titik 49, 51 dan 183.



Gambar elektroforegram hasil sekuensing fragmen gen S

PERHITUNGAN STATISTIK

Sebaran usia, kadar DNA VHB, kadar AST dan kadar ALT

Phase		Age	ViralLoad	AST	ALT
IT	Mean	39.5135	2.8549	26.0000	32.4054
	N	37	37	37	37
	Std. Deviation	14.39063	1.91617	6.89605	9.38515
	Median	39.0000	2.9151	27.0000	31.0000
	Minimum	21.00	.78	11.00	13.00
	Maximum	80.00	6.87	41.00	59.00
	Range	59.00	6.09	30.00	46.00
IC	Mean	39.6522	5.3193	205.2174	245.9565
	N	23	23	23	23
	Std. Deviation	13.89444	2.28496	217.00146	301.56599
	Median	37.0000	5.1424	133.0000	155.0000
	Minimum	14.00	.78	42.00	45.00
	Maximum	69.00	8.04	977.00	1320.00
	Range	55.00	7.26	935.00	1275.00
LR	Mean	47.5172	2.0414	51.4138	48.9655
	N	29	29	29	29
	Std. Deviation	12.19081	1.17131	83.56371	56.05194
	Median	47.0000	1.8175	27.0000	33.0000
	Minimum	25.00	.78	16.00	19.00
	Maximum	69.00	4.35	433.00	312.00
	Range	44.00	3.57	417.00	293.00
ENH	Mean	46.0200	5.1855	108.9000	128.3600
	N	50	50	50	50
	Std. Deviation	11.53785	1.45100	139.83332	199.77710
	Median	47.5000	4.7277	73.5000	87.5000
	Minimum	26.00	1.95	11.00	17.00

	Maximum	74.00	8.14	900.00	1365.00
	Range	48.00	6.19	889.00	1348.00
Total	Mean	43.5468	3.9313	90.7770	105.7122
	N	139	139	139	139
	Std. Deviation	13.21518	2.18365	140.11259	186.84529
	Median	44.0000	4.2366	39.0000	47.0000
	Minimum	14.00	.78	11.00	13.00
	Maximum	80.00	8.14	977.00	1365.00
	Range	66.00	7.35	966.00	1352.00

		Phase				
		IT	IC	LR	ENH	Total
Sex	M	19	14	18	40	91
	F	18	9	11	10	48
	Total	37	23	29	50	139

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Sex	Between Groups	1.875	3	.625	2.856	.040
	Within Groups	29.549	135	.219		
	Total	31.424	138			
Age	Between Groups	1713.764	3	571.255	3.445	.019
	Within Groups	22386.682	135	165.827		
	Total	24100.446	138			

Prevalensi mutasi BCP dan precore pada fase infeksi hepatitis B kronis

		Phase				
		IT	IC	LR	ENH	Total
BCP	normal	13	9	14	31	67
	mutant	2	5	6	12	25
	Total	15	14	20	43	92

Chi-Square Tests	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.060 ^a	3	.560
Likelihood Ratio	2.254	3	.521
Linear-by-Linear Association	.457	1	.499
N of Valid Cases	92		

a. 2 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.80.

		Phase				
		IT	IC	LR	ENH	Total
Precore	normal	16	13	10	26	65
	mutant	0	2	10	15	27
	Total	16	15	20	41	92

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	13.651 ^a	3	.003
Likelihood Ratio	18.007	3	.000
Linear-by-Linear Association	8.690	1	.003
N of Valid Cases	92		

a. 2 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.40.

Sebaran genotipe VHB pada fase infeksi hepatitis B kronis.

		Phase				
		IT	IC	LR	ENH	Total
Genotype	B	20	11	18	23	72
	C	6	9	3	5	23
	Total	26	20	21	28	95

Chi-Square Tests	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.472 ^a	3	.091
Likelihood Ratio	6.047	3	.109
Linear-by-Linear Association	1.172	1	.279
N of Valid Cases	95		

a. 1 cells (12.5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.84.

		Subtype			
		adw	ayw	adr	Total
Phase	IT	20	1	5	26
	IC	10	0	8	18
	LR	15	1	2	18
	ENH	22	1	4	27
	Total	67	3	19	89

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8.096 ^a	6	.231
Likelihood Ratio	7.922	6	.244
Linear-by-Linear Association	.964	1	.326
N of Valid Cases	89		

a. 6 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .61.

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan jenis kelamin.

			Sex		
			M	F	Total
BCP	normal	Count	42	25	67
		% within BCP	62.7%	37.3%	100.0%
		% of Total	45.7%	27.2%	72.8%
	mutant	Count	15	10	25
		% within BCP	60.0%	40.0%	100.0%
		% of Total	16.3%	10.9%	27.2%
Total		Count	57	35	92
		% within BCP	62.0%	38.0%	100.0%
		% of Total	62.0%	38.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.056 ^a	1	.813		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.056	1	.814		
Fisher's Exact Test				.814	.499
Linear-by-Linear Association	.055	1	.814		
N of Valid Cases	92				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.51.

b. Computed only for a 2x2 table

			Sex		
			M	F	Total
Precore	normal	Count	41	24	65
		% within PreC	63.1%	36.9%	100.0%
		% of Total	44.6%	26.1%	70.7%
	mutant	Count	16	11	27
		% within PreC	59.3%	40.7%	100.0%
		% of Total	17.4%	12.0%	29.3%
Total	Count	57	35	92	
	% within PreC	62.0%	38.0%	100.0%	
	% of Total	62.0%	38.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.118 ^a	1	.731		
Continuity Correction ^b	.012	1	.914		
Likelihood Ratio	.117	1	.732		
Fisher's Exact Test				.815	.454
Linear-by-Linear Association	.117	1	.733		
N of Valid Cases	92				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10.27.

b. Computed only for a 2x2 table

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan usia.

Age

BCP	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
normal	41.5075	67	12.56905	42.0000	14.00	68.00
mutant	45.6800	25	12.96058	47.0000	25.00	80.00
Total	42.6413	92	12.74223	44.0000	14.00	80.00

ANOVA Table^a

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Age * BCP	Between Groups	(Combined)	316.977	1	316.977	1.973	.164
	Within Groups	Within Groups	14458.186	90	160.647		
	Total		14775.163	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for Age * BCP cannot be computed.

Age

PreC	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum
normal	42.3077	65	13.64268	41.0000	14.00	80.00
mutant	43.2222	27	10.76080	46.0000	25.00	63.00
Total	42.5761	92	12.81245	43.0000	14.00	80.00

ANOVA Table^a

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Age * PreC	Between Groups	(Combined)	15.955	1	15.955	.096	.757
	Within Groups	Within Groups	14922.513	90	165.806		
	Total		14938.467	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for Age * PreC cannot be computed.

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan kadar ALT.

Report

ALT

BCP	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	Range
normal	119.9701	67	211.51610	45.0000	17.00	1365.00	1348.00
mutant	140.8000	25	253.55374	79.0000	24.00	1320.00	1296.00
Total	125.6304	92	222.46436	55.0000	17.00	1365.00	1348.00

ANOVA Table^a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALT * BCP Between (Combined) Groups	7899.494	1	7899.494	.158	.692
Within Groups	4495725.940	90	49952.510		
Total	4503625.435	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for ALT * BCP cannot be computed.

ALT

Precore	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	Range
normal	85.3538	65	78.92390	55.0000	19.00	312.00	293.00
mutant	180.7037	27	311.93981	63.0000	17.00	1365.00	1348.00
Total	113.3370	92	184.63074	55.0000	17.00	1365.00	1348.00

ANOVA Table^a

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALT * Precore Between (Combined) Groups	173432.063	1	173432.063	5.330	.023
Within Groups	2928622.491	90	32540.250		
Total	3102054.554	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for ALT * Precore cannot be computed.

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan kadar DNA VHB.

ViralLoad

BCP	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	Range
normal	4.4999	67	2.02139	4.2366	.78	8.04	7.26
mutant	4.4530	25	2.10806	4.2366	.78	8.14	7.35
Total	4.4872	92	2.03370	4.2366	.78	8.14	7.35

ANOVA Table^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ViralLoad * BCP	Between Groups	.040	1	.040	.010	.922
	Within Groups	376.331	90	4.181		
	Total	376.371	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for ViralLoad * BCP cannot be computed.

ViralLoad

Precore	Mean	N	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	Range
normal	4.4875	65	1.96962	4.2366	.78	8.14	7.35
mutant	4.3972	27	2.17273	4.2366	.78	8.04	7.26
Total	4.4610	92	2.01962	4.2366	.78	8.14	7.35

ANOVA Table^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ViralLoad * Precore	Between Groups	.155	1	.155	.038	.846
	Within Groups	371.022	90	4.122		
	Total	371.177	91			

a. With fewer than three groups, linearity measures for ViralLoad * Precore cannot be computed.

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan genotipe VHB.

		Genotype		
		B	C	Total
BCP	normal	38	6	44
	mutant	12	7	19
	Total	50	13	63

Chi-Square Tests		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square		4.363 ^a	1	.037	.048	.043
Continuity Correction ^b		3.061	1	.080		
Likelihood Ratio		4.085	1	.043		
Fisher's Exact Test						
Linear-by-Linear Association		4.294	1	.038		
N of Valid Cases		63				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.92.

b. Computed only for a 2x2 table

		Genotype		
		B	C	Total
Precore	normal	34	13	47
	mutant	15	2	17
	Total	49	15	64

Chi-Square Tests		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square		1.758 ^a	1	.185	.317	.161
Continuity Correction ^b		.984	1	.321		
Likelihood Ratio		1.949	1	.163		
Fisher's Exact Test						
Linear-by-Linear Association		1.730	1	.188		
N of Valid Cases		64				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.98.

b. Computed only for a 2x2 table

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan subtype VHB.

		Subtype			
		adw	ayw	adr	Total
BCP	normal	36	1	4	41
	mutant	11	1	7	19
	Total	47	2	11	60

Chi-Square Tests	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.989 ^a	2	.030
Likelihood Ratio	6.580	2	.037
Linear-by-Linear Association	6.836	1	.009
N of Valid Cases	60		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .63.

		Subtype			
		adw	ayw	adr	Total
Precore	normal	33	1	11	45
	mutant	13	1	1	15
	Total	46	2	12	60

Chi-Square Tests	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.705 ^a	2	.259
Likelihood Ratio	3.047	2	.218
Linear-by-Linear Association	1.659	1	.198
N of Valid Cases	60		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is .50.

Hubungan antara mutasi A1762T/G1764A dan G1806A dengan status HBeAg.

		HBeAg		
		neg	pos	Total
BCP	normal	44	23	67
	mutant	17	8	25
	Total	61	31	92

Chi-Square Tests		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square		.044 ^a	1	.834		
Continuity Correction ^b		.000	1	1.000		
Likelihood Ratio		.044	1	.833		
Fisher's Exact Test					1.000	.520
Linear-by-Linear Association		.044	1	.834		
N of Valid Cases		92				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.42.

b. Computed only for a 2x2 table

		HBeAg		
		neg	pos	Total
Precore	normal	35	30	65
	mutant	24	3	27
	Total	59	33	92

Chi-Square Tests		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square		10.183 ^a	1	.001		
Continuity Correction ^b		8.717	1	.003		
Likelihood Ratio		11.529	1	.001		
Fisher's Exact Test					.002	.001
Linear-by-Linear Association		10.073	1	.002		
N of Valid Cases		92				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.68.

b. Computed only for a 2x2 table

Dipresentasikan pada Konferensi APASL ke 21 di Bangkok, Thailand 17-20 Februari 2011

Pre-core and basal core promoter mutations during the natural history of chronic hepatitis B patients in Indonesia

Turyadi¹, Martono Roni¹, Meta Dewi Thedja¹, Susan Irawati Ie¹, Erick Sidarta¹, Alida R. Harahap^{1,2}, David H. Muljono¹

¹Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta

²Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

Background: Pre-core A1896 and basal core promoter (BCP) T1762/A1764 mutations of hepatitis B virus (HBV) genome have been correlated with severe liver diseases; however, their role in the pathogenesis of chronic hepatitis B (CHB) remains unclear. We assessed the prevalence and association of these mutations in different phases of CHB in Indonesian patients.

Methods: One-hundred and forty CHB patients, not undergoing antiviral therapy, were classified into immune-tolerance (IT), immune-clearance (IC), non/low-replicative (LR), and hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative hepatitis (ENH) phases. HBV DNA was detected and quantified by polymerase chain reaction then analyzed by sequencing.

Results: ENH and LR patients were older than IC or IT patients ($p < 0.05$). HBV DNA levels were highest in IC patients (median $5.34 \log_{10}$ IU/mL) and lowest in LR (median $1.65 \log_{10}$ IU/mL; $p < 0.0001$). The A1896 pre-core mutants were most prevalent in LR (53%, $p < 0.001$) and higher in ENH (32%, $p < 0.001$) than in IT and IC patients, while the T1762/A1764 BCP mutants were comparable between all phases. The T1762/A1764 BCP mutants were more frequently identified in genotype C than in genotype B ($p < 0.05$), and in subtype *adr* than in subtypes *adw* and *ayw* ($p < 0.05$). The T1858 mutants were detected in almost all HBV isolates regardless the genotypes (B and C). No associations were observed between HBV DNA levels and pre-core as well as BCP mutations.

Conclusions: The prevalence of pre-core A1896 mutation differed in phases of CHB in Indonesian patients with preponderance in older ages and later stages. BCP T1762/A1764 mutations were associated with HBV genotypes and subtypes, irrespective of infection phases. These findings indicate that BCP mutations could be independent of HBeAg seroconversion in the natural history of chronic HBV infection.

Keywords : chronic hepatitis B, precore, basal core promoter

RIWAYAT HIDUP

1. Nama lengkap : Turyadi, S.Si
2. NPM : 0806419642
3. Jenis Kelamin : Laki-laki
4. Agama : Islam
5. Tempat dan tgl.Lahir : Kebumen, 5 Pebruari 1974
6. Status : Menikah, mempunyai 2 anak
7. Alamat : Kebayoran lama utara, Jakarta
8. Pekerjaan : Asisten Peneliti
9. Alamat Instansi : Lembaga Biologi Molekul Eijkman
10. Riwayat Pendidikan :



SD Negeri Singosari tahun: 1981 – 1987

SLTP Negeri 1 Ambal tahun: 1987 – 1990

SMU Negeri 1 Kutowinangun tahun: 1990 – 1993

S1 Universitas Nasional tahun: 2002 – 2006

Jakarta, 20 Desember 2010

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Turyadi'.

(Turyadi, S.Si.)

MUTASI *BASAL CORE PROMOTER* (BCP) DAN *PRECORE VIRUS* HEPATITIS B PADA PERJALANAN INFeksi HEPATITIS B KRONIS

Turyadi¹, Harahap AR^{1,2}, Muljono DH¹

1.Lembaga Biologi Molekul Eijkman , Jakarta , Indonesia

2. Departemen Patologi Klinik, Falkultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

Email: yadi@eijkman.go.id

Abstrak

Latar Belakang. Mutasi A1762T/G1764A *basal core promoter* (BCP) dan G1896A *precore* pada genom virus hepatitis B (VHB) berhubungan dengan tingkat keparahan penyakit hati, namun demikian peran mutasi-mutasi tersebut pada patogenesis hepatitis B kronik masih belum jelas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi mutasi A1762T/G1764A dan G1896A serta hubungannya dengan fase-fase pada perjalanan hepatitis B kronik.

Metodologi. Seratus empat puluh pasien hepatitis B kronik yang dilibatkan dalam penelitian ini, belum mendapatkan pengobatan, dan dikelompokkan ke dalam fase *immunotolerant* (IT), *immunoclearance* (IC), *Non/low replicative* (LR) dan hepatitis "e"negatif (ENH). DNA VHB diperiksa dan diukur kadarnya dengan teknik *polymerase chain reaction*, kemudian disekuensing untuk dianalisis.

Hasil. Usia subjek lebih tua pada kelompok ENH dan LR dibandingkan dengan fase lain ($p<0.05$). Kadar DNA paling tinggi pada fase IC dan paling rendah pada fase LR ($p<0.001$), sementara pria mempunyai risiko lebih besar terjadi reaktivasi dengan HBeAg negatif ($p<0.05$). Mutasi A1762T/G1764A tidak berbeda bermakna pada semua fase ($p=0.56$) dan lebih tinggi pada genotipe C dan sub tipe *adr* ($p<0.05$). Mutasi G1896A paling tinggi pada fase LR ($p<0.05$), dan tidak berbeda bermakna pada genotipe dan sub tipe VHB. Tidak ada hubungan antara kadar DNA VHB dengan mutasi di *precore* dan BCP.

Kesimpulan. Prevalensi mutasi G1896A berbeda pada fase hepatitis B kronik di Indonesia, ditemukan lebih sering pada usia lebih tua dan fase lanjut. Mutasi A1762T/G1764A berkorelasi dengan genotipe dan sub tipe VHB, sebaliknya tidak berhubungan dengan fase infeksi. Studi ini mengindikasikan bahwa mutasi BCP tidak berhubungan dengan serokonversi HBeAg pada perjalanan hepatitis B kronik.

Kata kunci: hepatitis B kronik, perjalanan infeksi, precore, basal core promoter

Abstract

Background: *Precore* G1896A and *basal core promoter* (BCP) A1762T/G1764A mutations of hepatitis B virus (HBV) genome have been correlated with severe liver diseases; however, their role in the pathogenesis of chronic hepatitis B (CHB) remains unclear. We assessed the prevalence and association of these mutations in different phases of CHB in Indonesian patients.

Methods: One-hundred and forty CHB patients, not undergoing antiviral therapy, were classified into immune-tolerance (IT), immune-clearance (IC), non/low-replicative (LR), and hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative hepatitis (ENH) phases. HBV DNA was detected and quantified by polymerase chain reaction then analyzed by sequencing.

Results: ENH and LR patients were older than IC or IT patients ($p < 0.05$). HBV DNA levels were highest in IC patients and lowest in LR ($p < 0.0001$). The A1896 pre-core mutants were most prevalent in LR ($p < 0.001$) and higher in ENH ($p < 0.001$) than in IT and IC patients, while the A1762T/G1764A BCP mutants were comparable between all phases. The A1762T/G1764A BCP mutants were more frequently identified in genotype C than in genotype B ($p < 0.05$), and in subtype *adr* than in subtypes *adw* and *ayw* ($p < 0.05$). The T1858 mutants were detected in almost all HBV isolates regardless the genotypes (B and C). No associations were observed between HBV DNA levels and precore as well as BCP mutations.

Conclusions: The prevalence of precore A1896 mutation differed in phases of CHB in Indonesian patients with preponderance in older ages and later stages. BCP A1762T/G1764A mutations were associated with HBV genotypes and subtypes, irrespective of infection phases. These findings indicate that BCP mutations could be independent of HBeAg seroconversion in the natural history of chronic HBV infection.

Keywords : chronic hepatitis B, natural course, precore, basal core promoter

Latar Belakang

Hepatitis B adalah penyakit hati akibat infeksi virus hepatitis B (VHB), yang merupakan masalah global di bidang kesehatan. Sekitar 2 milyar penduduk dunia terinfeksi VHB dan 360 juta di antaranya menjadi pengidap VHB kronis dengan risiko terjadinya sirosis dan kanker hati, sekaligus sebagai pembawa VHB. Selama tahun 2000 diperkirakan sekitar 620.000 penderita hepatitis B yang meninggal dunia 580.000 (94%) di antaranya karena sirosis dan kanker hati yang disebabkan infeksi hepatitis B kronis, sementara 40.000 (6%) sisanya karena hepatitis B akut.¹

Indonesia merupakan wilayah dengan prevalensi pengidap hepatitis B mulai dari sedang hingga tinggi, dan secara umum dimasukkan pada daerah dengan prevalensi tinggi (gambar 1).²

Infeksi VHB dikelompokkan ke dalam infeksi akut dan infeksi kronis. Sekitar 95% pengidap hepatitis B kronis terinfeksi

pada saat lahir atau masa kanak-kanak, sedangkan 5% lainnya terinfeksi pada usia dewasa.^{3,4}

Hepatitis B kronis (*chronic hepatitis B = CHB*) didefinisikan apabila pada penderita ditemukan adanya *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) dalam serum lebih dari 6 bulan. Hepatitis B kronis mempunyai spektrum yang luas, mulai dari tanpa gejala, hepatitis kronis aktif, sirosis hati sampai terjadinya kanker hati.^{5,6} Berdasarkan status *hepatitis B e antigen* (HBeAg), kadar DNA VHB, dan kadar *alanine transaminase* (ALT), Fattovich et al membagi perjalanan infeksi hepatitis B kronis ke dalam empat fase, meliputi: (1) fase imunitoleran (*immunotolerant = IT*) yang merupakan awal dari infeksi yang ditandai dengan HBeAg positif, kenaikan kadar DNA VHB, kadar ALT normal, (2) fase imunoreaktif (*immunoclearance = IC*) yang merupakan fase lanjutan dari fase IT dengan ciri-ciri HBeAg positif, kadar virus mulai menurun atau fluktuatif, serta kadar ALT

cenderung meningkat atau fluktuatif, (3) replikasi rendah atau tanpa replikasi (*low replicative* = LR) adalah fase inaktif ditandai HBeAg negatif dengan kadar DNA VHB yang rendah atau tidak terdeteksi, kadar ALT normal, dan (4) fase hepatitis B dengan HBeAg negatif ("*e*" *negative hepatitis* = ENH) sering disebut juga dengan fase reaktivasi dan ditandai dengan HBeAg negatif, kenaikan kadar DNA VHB, serta kenaikan kadar ALT.⁷

Pada fase LR risiko terjadinya sirosis dan kanker hati sangat rendah dan telah mengalami serokonversi HBeAg dari HBeAg positif dan anti-HBe negatif menjadi HBeAg negatif dan anti-HBe positif.⁸ Serokonversi HBeAg pada fase LR dianggap sebagai penanda penurunan replikasi virus, sehingga serokonversi HBeAg dijadikan target jangka pendek pada terapi hepatitis B. Ternyata sebagian penderita hepatitis B dengan HBeAg negatif dapat mengalami reaktivasi menuju fase ENH, di mana replikasi terjadi kembali baik itu diikuti HBeAg positif maupun tetap dengan HBeAg negatif. Pada tahap ini infeksi berkembang menjadi hepatitis B kronis aktif, di mana kemungkinan terjadinya sirosis hati adalah 2 – 4 %.⁹ Terjadinya sirosis hati pada penderita hepatitis B kronis dengan HBeAg negatif dua kali lebih besar dibanding pada penderita dengan HBeAg positif.⁷ Fase ini biasanya terjadi pada pasien yang lebih tua dengan kerusakan hati yang berkelanjutan karena merupakan fase lanjut dari infeksi hepatitis B kronis.¹⁰

Protein prekursor HBeAg yang disandi oleh gen *core* (C), setelah mengalami proses modifikasi pasca translasi menjadi HBeAg diekspresikan ke luar hepatosit dan akhirnya masuk ke dalam aliran darah. Gen C dalam transkripsinya menghasilkan dua macam *messenger RNA* (mRNA) yaitu: (1) mRNA *precore* yang menyandi HBeAg dan (2) mRNA pregenom yang menyandi protein C, yang merupakan komponen kapsid. Selain itu gen C juga mengalami transkripsi balik menghasilkan DNA genom pada proses replikasi VHB.¹¹

Proses transkripsi balik pada replikasi VHB tidak mempunyai kemampuan koreksi (*proof reading*) jika terjadi salah baca. Hal ini menyebabkan laju mutasi pada genom VHB lebih cepat dibanding virus DNA yang lain. Mutasi tersebut dapat terjadi pada semua gen dan dapat mempengaruhi protein yang disandinya termasuk mempengaruhi ekspresi HBeAg jika mutasi tersebut terjadi pada regio *precore* yang merupakan bagian dari gen C atau terjadi pada regio promoter yang mengatur transkripsinya.¹²

Dalam hubungannya dengan ekspresi HBeAg selama replikasi virus, terdapat dua kelompok mutasi yang mempengaruhi ekspresi HBeAg. Yang pertama mutasi G1896A pada regio *precore* yang terletak pada basa ke-1896 guanin (G) menjadi adenin (A) menyebabkan kodon ke 28 yang menyandi triptofan berubah menjadi kodon stop. Mutasi ini menyebabkan kegagalan ekspresi HBeAg karena protein prekursor gagal dibentuk. Pada RNA pregenom, nukleotida 1896 terletak pada

daerah lengkung sinyal enkapsidasi (disebut ϵ = *epsilon*) yang sangat penting pada proses replikasi VHB, dan berpasangan dengan nukleotida 1858 (kodon ke 15). Karena perlu adanya kestabilan struktur ϵ , maka mutasi G1896A pada *loop* tersebut dipengaruhi pasangannya yaitu basa ke 1858. Mutasi C1858T pada regio *precore* yang merubah sitosin (*cytosine* = C) menjadi timin (T) meningkatkan kestabilan mutasi G1896A, atau dengan kata lain mutasi C1858T merupakan faktor disposisi terjadinya mutasi G1896A.¹³ Kelompok mutasi kedua yang mempengaruhi ekspresi HBeAg adalah yang terjadi pada regio *basal core promoter* (BCP) yang merupakan mutasi ganda A1762T/G1764A yang merubah A menjadi T pada basa ke 1762 dan G menjadi A pada basa ke 1764. Mutasi ini menyebabkan penurunan laju transkripsi mRNA *precore* sehingga ekspresi HBeAg juga menurun.¹⁴

Kedua mutasi tersebut telah dilaporkan berhubungan dengan keparahan penyakit. Mutasi *precore* dilaporkan berasosiasi erat dengan terjadinya hepatitis akut fulminan akut, khususnya di daerah mediterrania.^{3,15} Sedangkan mutasi BCP berasosiasi dengan manifestasi penyakit yang lebih parah, seperti sirosis yang progresif dan kanker hati.¹⁶

Namun demikian peranan kedua kelompok mutasi tersebut dalam hubungannya dengan perjalanan infeksi hepatitis B kronis masih belum banyak diketahui.

Selain hubungannya dengan perubahan status HBeAg akibat mutasi

tersebut, keparahan penyakit hati juga dihubungkan dengan karakteristik genetik virus, yaitu genotipe VHB, yang ditentukan berdasarkan variasi susunan genom VHB, dan serotipe VHB yang ditentukan berdasarkan perbedaan reaksi serologi. Terdapat delapan genotipe VHB, yaitu A-H, serta empat subtipe utama VHB, yaitu adw, adr, ayw dan ayr.^{17,18}

Faktor yang memegang peranan utama pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis meliputi: kadar DNA VHB, HBeAg, genotipe VHB, dan mutasi pada BCP dan *precore*.¹⁹ Faktor-faktor tersebut dapat berperan sendiri-sendiri maupun kombinasi, namun demikian mekanismenya belum banyak diketahui sehingga diperlukan studi mengenai masing-masing faktor dan hubungannya satu sama lain.

Hingga saat ini data mengenai mutasi A1762T/G1764A pada regio BCP dan G1896A regio *precore* dari subjek Indonesia masih sangat terbatas. Sedangkan data mutasi-mutasi tersebut pada berbagai fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis di Indonesia sampai saat ini belum pernah dilaporkan.

HBeAg negatif masih digunakan sebagai target pada terapi hepatitis B oleh sebagian kalangan. Mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan atau G1896A regio *precore* dapat mempengaruhi produksi HBeAg,²⁰ sehingga pada keadaan tersebut kadar HBeAg dalam darah kemungkinan tidak lagi dapat dikaitkan dengan laju replikasi yang terjadi dalam sel hati. Apakah HBeAg masih relevan untuk dijadikan indikator replikasi virus, dan

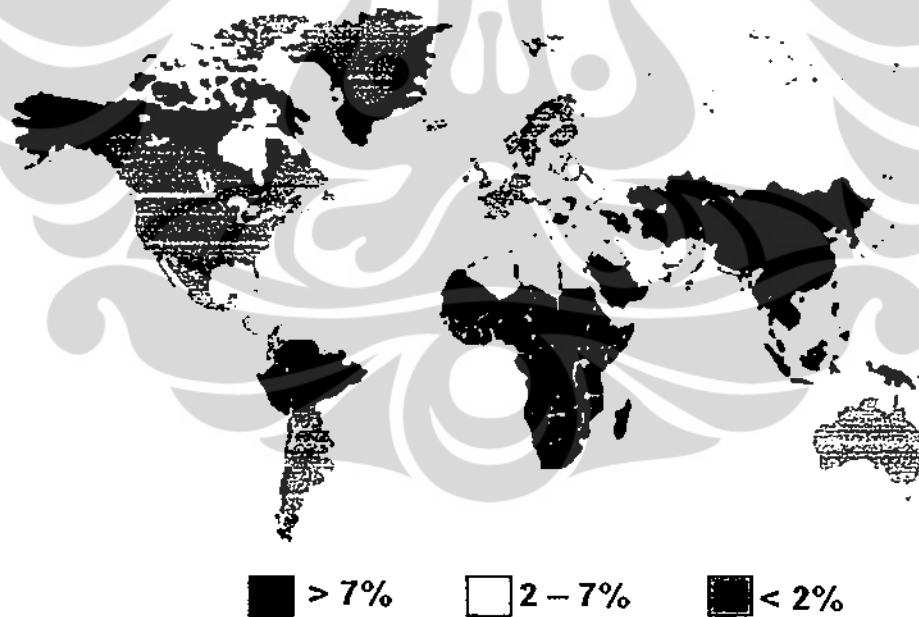
selanjutnya dijadikan target terapi, hal ini masih perlu dikaji lebih lanjut.

Tong juga menyebutkan bahwa sebagian besar dari pasien hepatitis B kronis aktif dengan HBeAg negatif membawa varian-varian VHB dengan mutasi pada regio *precore* dan regio BCP.²⁰ Apakah mutasi A1762T/G1764A dan G1896A tersebut hanya ditemukan pada subjek dengan HBeAg negatif, informasi ini masih sangat terbatas.

Mutasi yang sering terjadi pada regio BCP dan dikaitkan dengan status HBeAg, menurut Tong dikatakan menyebabkan penurunan ekspresi HBeAg hingga 80% tetapi justru meningkatkan replikasi genom VHB hingga 8 kali lipat,²⁰ yang artinya bahwa subjek yang membawa mutasi

A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A *precore* mempunyai kadar DNA VHB lebih tinggi dibandingkan yang normal. Apakah ini juga berlaku di populasi Indonesia, sampai sekarang belum ada laporan mengenai hal itu.

Selain itu, data mengenai pola mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dari subjek CHB dalam hubungannya dengan genotipe dan sub tipe yang beredar di Indonesia juga masih sangat terbatas. Studi ini bertujuan untuk mengetahui prevalensi mutasi A1762T/G1764A regio BCP dan G1896A regio *precore* dan mempelajari hubungannya dengan fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis, faktor inang dan faktor virus pada populasi pasien di Indonesia.



Gambar 1. Peta penyebaran hepatitis B di dunia.²¹

Metodologi

Desain penelitian adalah *cross sectional* analitik observasional. Pada penelitian ini akan prevalensi mutasi pada BCP dan *precore* pada masing-masing fase perjalanan infeksi hepatitis B kronis. Selanjutnya mutasi pada BCP dan *precore* dikorelasikan dengan jenis kelamin, usia, kadar ALT, kadar DNA VHB, genotipe VHB, sub tipe VHB dan status HBeAg.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hepatitis di Lembaga Biologi Molekul Eijkman, Jakarta dengan subjek yang merupakan pasien yang datang dirujuk untuk pemeriksaan DNA VHB, belum mendapatkan pengobatan antivirus dan mempunyai catatan mengenai status HBsAg positif lebih dari 6 bulan, mempunyai data kadar ALT serta kadar DNA VHB. Subjek telah mendapat penjelasan mengenai hepatitis B dan keikutsertaannya pada penelitian ini serta telah menyatakan setuju untuk terlibat dengan menandatangani surat persetujuan atau *inform consent*. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dilakukan di Lembaga Biologi Molekul Eijkman dengan judul: "*Molecular diversity of Hepatitis B Virus (HBV) in Indonesia*" dan telah mendapatkan persetujuan etik dari *Eijkman Institute Research Ethic Commission* (EIREC).

HBeAg diperiksa dengan teknik *enzyme linked immunosorbant assay* (ELISA) menggunakan kit Monolisa™ HBe Ag-Ab Plus (Biorad, USA) dengan mengikuti petunjuk yang disertakan dalam kit. Intensitas warna diukur menggunakan alat pembaca

ELISA Infinite F200 [Tecan, Austria] pada panjang gelombang 490 nm.

diberikan pada tahap selanjutnya. Sebagai akibatnya, intensitas warna yang terukur berbanding terbalik dengan kadar anti-HBe dalam sampel.

Subjek yang digunakan dalam pemeriksaan telah mempunyai data ALT (*alanine transaminase*) dan kadar virus. Berdasarkan data tersebut dan status HBeAg, subjek dibedakan menjadi empat fase yaitu fase IT, IC, LR dan ENH. Isolasi DNA dilakukan menggunakan kit QIAamp viral minikits [QIAGEN, USA] dengan mengikuti prosedur yang disertakan dalam kit. Amplifikasi atau penggandaan fragmen DNA dilakukan pada dua target fragmen DNA yaitu sebagian regio gen S yang digunakan untuk penentuan genotipe dan sub tipe virus, serta regio BCP dan *precore* yang digunakan untuk pemeriksaan adanya mutasi pada regio BCP dan regio *precore*. Amplifikasi dilakukan dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer S-88 (5' TGT TGC CCG TTT GTC CTC TA 3') dan S2-2 (5' GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA 3') untuk regio gen S dan pasangan primer T-715 (5' CTG TGC CTT CTC ATC TGC CG 3') dan PC2 (5' AAA GAA GTC AGA AGG CAA AAA AGA 3') untuk regio BCP dan *precore*.

Proses PCR menggunakan mesin PCR *Thermal Cycler* ABI 9700 [ABI System, USA], dengan volume 25 µL yang mengandung Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl 1,5 mM, dNTP 200 µM, primer

sense dan *antisense* masing-masing 400 nM, 1 unit *Taq platinum polymerase* DNA [Invitrogen, USA] dan hasil ekstraksi DNA sebanyak 2,5 µL. Reaksi dijalankan pada suhu denaturasi 94°C selama 30 detik, suhu *annealing* 50°C selama 30 detik dan suhu elongasi 72°C selama 1 menit sebanyak 35 siklus. Pada awal reaksi dilakukan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit dan pada akhir reaksi dilakukan elongasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.

Untuk mengetahui hasil amplifikasi dengan teknik PCR, dilakukan proses elektroforesis terhadap produk PCR pada gel agarosa dengan pewarnaan ethidium bromide dan dilihat di bawah sinar ultraviolet. Produk PCR dimurnikan untuk selanjutnya dilakukan proses sekuensing menggunakan BigDye® terminator v3.1 [Applied Biosystems, USA] dan dijalankan pada *DNA sequencer* ABI 3130xl [ABI, USA] yang berbasis kapiler. *Editing* dilakukan menggunakan perangkat lunak BioEdit versi 7.0.5 dan FinchTV versi 1.4.0.

Untuk mengetahui apakah subjek membawa mutasi pada regio BCP dan *precore*, sekuens DNA regio BCP dan *precore* disejajarkan dengan sekuens DNA dari VHB normal yang diunduh dari *GenBank* [Acc.no. M54923.1] sebagai referensi.

Untuk menentukan genotipe VHB, sekuens VHB regio S disejajarkan dengan 70 sekuens lain yang sudah diketahui genotipenya terdiri dari genotipe A-H. Selanjutnya dilakukan konstruksi pohon filogenetik

menggunakan perangkat lunak *molecular evolutionary genetic analysis* (MEGA) versi 4.0 untuk mendapatkan kekerabatan dari masing-masing VHB berdasarkan kedekatan sekuens DNA.

Untuk menentukan sub tipe VHB, sekuens DNA regio S diterjemahkan ke dalam bahasa protein yang berupa urutan asam amino. Penentuan sub tipe dilakukan berdasarkan jenis asam amino ke 122 dan 160 protein S.

Hasil Penelitian

Jumlah subjek yang dipakai dalam penelitian ini ditentukan secara *arbitrary*, di mana semua subjek yang terkumpul dan memenuhi syarat inklusi digunakan dalam penelitian ini.

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 140 subjek dengan status HBsAg positif lebih dari enam bulan dan belum mendapatkan pengobatan antiviral. Subjek dengan jenis kelamin laki-laki sebanyak 84 subjek dan 56 subjek lainnya berjenis kelamin perempuan. Dari 140 subjek, 139 subjek berhasil dilakukan pemeriksaan status HBeAg, kadar DNA virus, dan kadar ALT. Berdasarkan status HBeAg, titer DNA virus dan kadar ALT, subjek tersebut dikelompokkan menjadi 37 subjek fase IT, 23 subjek fase IC, 29 subjek fase LR dan 50 subjek fase ENH, sementara satu subjek tidak dapat ditentukan. Perhitungan statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS versi 16.0.

Tabel 1. Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB pada keempat fase infeksi hepatitis B kronis.

	Fase				p
	IT	IC	LR	ENH	
n	37	23	29	50	
Usia(median,min;max) tahun	39 (21;80)	37 (14;69)	47 (25;69)	47,5 (26;74)	0,019
Pria:Wanita	19:18	14:9	18:11	40:10	0,04
ALT(median,min;max) U/L)	31 (13;59)	155 (72;1320)	33 (19;55)	87,5 (31;1365)	<0,001
Kadar DNA VHB (median, IU/mL)	2,91±1,9	5,14±2,2	1,81±1,1	4,72±1,4	<0,001

Tabel 2. Prevalensi mutasi, genotipe dan subtipe pada keempat fase infeksi hepatitis B kronis

	Fase				p
	IT (n=37)	IC (n=23)	LR (n=29)	ENH (n=50)	
Mutan 1762T/1764A	13,3 % (n=15)	35,7% (n=14)	30% (n=20)	27,9% (n=43)	0,56
Mutan 1896A	0% (n=16)	13,3% (n=15)	50% (n=20)	36,6% (n=41)	0,003
Genotipe					
B	76,9% (n=26)	55% (n=20)	85,7% (n=21)	82,1% (n=28)	0,091
C	23,1% (n=26)	45% (n=20)	14,3% (n=21)	17,9% (n=28)	
Subtipe					
<i>adv</i>	76,9% (n=26)	55,5% (n=18)	83,3% (n=18)	81,5% (n=27)	0,231
<i>ayw</i>	3,8% (n=26)	0% (n=18)	5,5% (n=18)	3,7% (n=27)	
<i>adr</i>	19,2% (n=26)	44,4% (n=18)	11,1% (n=18)	14,8% (n=27)	

Dari 139 subjek yang dapat dikelompokkan ke dalam fase infeksi hepatitis

B kronis, hanya 92 subjek berhasil diperiksa mutasi baik pada *precore* dan BCP. Sembilan

puluh lima subjek berhasil ditentukan genotipe-nya dan hanya 89 subjek yang berhasil ditentukan subtipe-nya.

Rentang usia subjek pada penelitian ini adalah 14 hingga 80 tahun dengan usia rata-rata 43,41 tahun. Distribusi usia, jenis kelamin, kadar ALT dan kadar DNA VHB disajikan pada tabel 1, sementara prevalensi mutasi BCP dan *precore*, genotipe dan subtipe VHB dapat dilihat pada tabel 2.

Jenis kelamin subjek yang dapat dikelompokkan fase infeksi hepatitis B kronis pada penelitian ini terdiri dari 84 pria dan 55. wanita. Perbandingan jenis kelamin pada masing-masing fase, dominasi pria paling tinggi pada fase ENH dan paling rendah pada fase IT ($p=0,04$).

Mutasi A1762T/G1764A dapat ditemukan pada semua fase infeksi hepatitis B kronis, dan tidak ada perbedaan signifikan prevalensi mutasi tersebut pada masing-masing fase, sementara mutasi G1896A paling banyak ditemukan pada kelompok subjek fase LR (50%, $p=0,003$) diikuti fase ENH. Prevalensi mutasi G1896A pada fase IC dan ENH masing-masing adalah 13,3 % dan 36,6 %, sementara pada fase IT tidak ditemukan adanya mutasi tersebut.

Pada penelitian ini hanya genotipe B dan C yang ditemukan, dengan genotipe B sebanyak 72 subjek dan genotipe C sebanyak 23 subjek. Tidak ditemukan adanya perbedaan bermakna sebaran genotipe VHB pada masing-masing fase hepatitis B kronis ($p=0,091$).

Perbandingan genotipe B dan C pada fase hepatitis B kronis adalah 20:6, 11:9, 18:3 dan 23:5 masing-masing untuk fase IT, IC, LR dan ENH. Sementara itu, genotipe B pada HBeAg positif adalah 32,6 % dan pada HBeAg negatif hanya 16,3%, yang artinya bahwa dari 23 subjek genotipe C yang ditemukan pada penelitian ini, 65,2 % mempunyai status HBeAg positif dan sisanya 34,8 % mempunyai status HBeAg negatif.

Pada penelitian ini, median kadar virus ditemukan paling tinggi pada fase IC ($5.14 \log_{10}$ IU/mL), sementara paling rendah ditemukan pada fase LR ($1,81 \log_{10}$ IU/mL) ($p<0,001$). Tidak ada korelasi mutasi A1762T/G1764A dengan jenis kelamin ($p=0,499$ dan $p=0,454$), dengan usia ($p=0,164$ dan $p=0,757$) dan kadar DNA VHB ($p=0,922$ dan $p=0,846$).

Tidak ada korelasi antara mutasi A1762T/G1764A dengan kadar ALT ($p=0,692$), sementara kadar ALT lebih tinggi pada subjek yang membawa VHB dengan mutan 1896A pada regio *precore* ($p=0,023$).

Mutasi ganda 1762 A>T/1764 G>A lebih banyak ditemukan pada subjek dengan genotipe C dibandingkan dengan genotip B ($p=0,043$) dan lebih banyak pada subtipe *adr* ($p=0,03$).

Tidak ada korelasi mutasi G1896A pada regio *precore* dengan genotipe maupun ($p=0,161$) maupun dengan subtipe ($p=0,259$).

Tidak ada perbedaan prevalensi mutasi A1762T/G1764A pada HBeAg positif dan negatif ($p=0,520$). Mutasi G1896A lebih

sering ditemukan pada isolat dengan status HBeAg negatif ($p=0,001$).

Diskusi

Indonesia dengan prevalensi hepatitis B tinggi, penularan virus lebih banyak terjadi pada usia kurang dari 2 tahun, dengan risiko berkembang menjadi hepatitis B kronis.

Perkembangan infeksi VHB bergantung pada interaksi virus dan inang. Infeksi yang terjadi pada masa bayi di mana imunitas belum berkembang dengan baik, sistem imun inang masih bersifat toleran terhadap antigen virus yang masuk dan disebut sebagai fase IT dengan HBeAg positif. Dalam replikasinya VHB tidak bersifat sitotoksik, tanpa adanya respon imun dari inang maka infeksi VHB tidak menampilkan gejala. Fase IT dapat berlangsung hingga 30 tahun tergantung usia saat infeksi VHB pertama terjadi. Fase ini berkembang menjadi fase IC sejalan dengan timbulnya respon imun terhadap sel hepatosit yang terinfeksi VHB. Proses eliminasi VHB dari sel hepatosit menyebabkan terjadinya kerusakan organ hati yang ditandai dengan kenaikan kadar ALT.⁷

Infeksi VHB yang terjadi pada usia dewasa biasanya segera memasuki fase IC dengan kadar ALT tinggi, kadar DNA VHB hingga 20.000 IU/mL dan HBeAg positif. Hasil yang penting dari fase IC adalah serokonversi dari HBeAg positif menjadi anti-HBe positif, yang biasanya diikuti dengan penurunan kadar DNA VHB. Ini merupakan masa transisi menuju fase LR yang ditandai dengan HBeAg negatif, kadar DNA VHB

rendah atau tidak terdeteksi dan diikuti kadar ALT normal.⁷

Sebagaimana disebutkan pada bab sebelumnya bahwa cccDNA sebagai cetakan pada pembentukan virus baru tetap berada dalam inti sel hepatosit, reaktivasi replikasi VHB dapat terjadi secara spontan. Reaktivasi ini dapat merupakan reaktivasi virus yang *wildtype* (tipe liar) yang mengakibatkan HBeAg kembali positif. Tetapi yang sering terjadi adalah bahwa yang mengalami reaktivasi merupakan varian VHB pembawa mutasi yang menyebabkan ekspresi HBeAg terhenti. Varian ini memiliki kompetensi replikasi lebih baik dibandingkan varian normal.⁷

Pada penelitian ini ditemukan bahwa usia subjek pada kelompok fase LR dan ENH lebih tua dibandingkan pada kelompok fase IT dan IC. Hasil ini mendukung laporan Tong bahwa sebaran usia paling muda pada fase IT, sedangkan paling tua pada kelompok HBeAg negatif, pada penelitian ini fase LR dan ENH.²² Perbedaan usia tersebut menggambarkan perjalanan infeksi hepatitis B kronis dari HBeAg positif menuju HBeAg negatif. Selain itu, dapat diindikasikan juga bahwa semakin bertambahnya usia, maka perjalanan infeksi hepatitis B kronis semakin menuju fase lanjut. Namun demikian adanya perbedaan tingkat imun inang dan adanya varian VHB, waktu yang ditempuh oleh fase-fase pada hepatitis B kronis pada masing-masing individu tidak sama. Dan juga tidak semua individu mengalami semua fase tersebut. Hal ini terlihat pada tabel I di mana

ditemukan subjek dengan usia muda dan dan usia tua pada semua fase.

Pada penelitian ini jenis kelamin pria lebih dominan pada fase ENH, yaitu mencapai (80%, $p=0,04$). Apakah dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa infeksi hepatitis B kronis pada pria mempunyai risiko lebih besar untuk berkembang menuju fase ENH dengan risiko terjadinya sirosis dan kanker hati, tentu masih memerlukan pembuktian lebih lanjut. Meskipun pada laporan sebelumnya menyatakan bahwa jenis kelamin pria mempunyai risiko lebih besar terjadinya sirosis.^{7,22}

Kadar DNA VHB ditemukan paling tinggi pada fase IC diikuti fase ENH, fase IT dan fase LR. Hasil ini tidak sesuai dengan laporan Tong yang mengatakan bahwa kadar DNA VHB paling tinggi ditemukan pada fase IT, meskipun dalam laporannya tersebut menyatakan bahwa fase IC masih ditandai dengan kadar DNA VHB yang masih tinggi.²² Perbedaan tersebut kemungkinan karena dalam pengelompokan fase dalam penelitian ini salah satunya berdasarkan pada kadar ALT sebagai indikator peradangan hati. Karena kadar ALT bersifat fluktuatif, jadi kemungkinan pada saat terjadi kenaikan kadar ALT, kadar VHB masih tinggi.

Mutasi yang mempengaruhi ekspresi HBeAg adalah mutasi ganda A1762T/G1764A pada regio BCP yang menurunkan laju ekspresi dan mutasi G1896A pada kodon 28 regio *precore* yang menghentikan ekspresi protein prekursor HBeAg. Pada penelitian ini tidak ada perbedaan yang bermakna mutasi

ganda A1762T/G1764A pada masing-masing fase. Hasil ini mengindikasikan bahwa mutasi A1762T/G1764A pada patogenesis hepatitis B kronis bersifat *independent* dan tidak tergantung pada perjalanan infeksi. Mutasi G1896A lebih banyak terjadi pada fase LR dan ENH yang mempunyai status HBeAg negatif. Hasil ini mengindikasikan bahwa terjadinya serokonversi HBeAg dipengaruhi oleh mutasi G1896A dan tidak dipengaruhi oleh mutasi ganda A1762T/G1764A sama seperti dugaan pada laporan sebelumnya.²²

Dua subjek pada penelitian ini dengan status HBeAg positif membawa mutasi G1896A yang mestinya mutasi tersebut menghentikan produksi HBeAg. Kemungkinan pada subjek tersebut terdapat lebih dari satu varian VHB (*quasispecies*), di mana virus didominasi oleh varian yang membawa mutasi G1896A tetapi ada sebagian kecil VHB yang normal dan memproduksi HBeAg dalam replikasinya. Kelemahan dari teknik sekuensing yang digunakan pada penelitian ini adalah bila ada variasi nukleotida yang dibawa oleh sebagian kecil populasi, akan tersamar oleh variasi yang mendominasi pada populasi tersebut. Mutasi G1896A pada subjek dengan HBeAg positif juga pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya yang menggunakan teknik sekuensing,⁷ dan teknik hibridisasi.²³ Kemungkinan lain adalah pada subjek tersebut sesudah terjadinya mutasi, HBeAg yang merupakan hasil dari replikasi sebelumnya masih beredar dalam aliran darah sehingga

masih terdeteksi meskipun produksinya sudah terhenti.

Mutasi ganda A1762T/G1764A lebih banyak ditemukan pada subjek dengan genotipe C dibandingkan dengan genotip B. Dari hasil ini kemungkinan pada genotipe C lebih besar risiko terjadinya mutasi A1762T/G1764A pada regio BCP dibandingkan pada genotipe B. Dalam hubungannya dengan subtipe VHB, mutasi A1762T/G1764A ditemukan lebih banyak pada subtipe *adr* dibandingkan *adw* dan *ayw*. Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa subtipe *adr* biasanya masuk ke dalam genotipe C, sehingga mutasi yang berkorelasi positif dengan genotipe C juga berkorelasi positif dengan subtipe *adr*.

Pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa mutasi ganda A1762T/G1764A dan genotipe C mempunyai risiko lebih besar untuk terjadinya kerusakan hati lebih lanjut.¹¹ Belum diketahui secara pasti apakah mutasi ganda A1762T/G1764A dan genotipe C merupakan faktor yang berkaitan atau tidak dalam hubungannya dengan risiko tersebut. Chen et al melakukan penelitian di Taiwan dan melaporkan bahwa frekuensi mutasi ganda A1762T/G1764A meningkat pada pasien dengan penyakit hati lanjut baik pada genotip B maupun genotipe C.²⁴

Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar DNA virus pada subjek yang membawa mutasi ganda A1762T/G1764A maupun yang membawa mutasi G1896A dengan yang *wildtype*. Hasil ini mengindikasikan bahwa

mutasi tersebut tidak laju transkripsi mRNA pregenom yang akhirnya juga tidak mempengaruhi laju replikasi virus. Meskipun mutasi ganda A1762T/G1764A bersama mutasi lain meningkatkan laju replikasi VHB, Jammeh et al membuktikan bahwa secara *in vitro* mutasi ganda A1762T/G1764A dan mutasi G1896A tidak mempengaruhi laju replikasi virus.²⁵

Pada laporan sebelumnya disebutkan bahwa genotipe VHB mempengaruhi serokonversi HBeAg. Genotipe C memerlukan waktu lebih lama untuk mencapai serokonversi HBeAg dibandingkan dengan genotipe B.¹⁰ Pada penelitian ini genotipe C lebih banyak ditemukan pada subjek kelompok HBeAg positif (65,2%) dibandingkan pada kelompok HBeAg negatif (34,8%), sedangkan genotipe B lebih banyak ditemukan pada subjek kelompok HBeAg negatif (56,9%) dibandingkan pada kelompok HBeAg positif (43,1%). Ini berarti pada penelitian ini subjek yang telah mengalami serokonversi HBeAg lebih banyak genotipe B dibandingkan genotipe C. Meskipun tidak mencapai batas kemaknaan ($p=0,053$), hasil ini mendukung bahwa genotipe C memerlukan waktu lebih lama untuk mencapai serokonversi HBeAg.

Pada genom VHB genotipe B dan C, titik 1858 didominasi oleh nukleotida T yang merupakan tipe mutan. Seperti disebutkan sebelumnya pada struktur sekunder mRNA pregenom pada regio epsilon (ϵ) titik 1896 berpasangan dengan titik 1858. Oleh karena itu, kestabilan mutasi yang terjadi pada titik 1896 sangat dipengaruhi jenis nukleotida pada

titik 1858. Itu artinya mutasi G1896A menjadi lebih stabil manakala titik 1858 ditempati oleh nukleotida T. Peranan nukleotida 1858 pada mutasi G1896A dibuktikan oleh Wintermeyer et al yang melaporkan bahwa mutasi tersebut terjadi pada kelompok genotipe D yang membawa nukleotida T pada titik 1858 dan tidak terjadi pada kelompok genotipe A yang membawa nukleotida C.²⁷ Data mengenai mutasi C1858T yang kami dapat dari penelitian lain di group kami membuktikan bahwa dengan nukleotida T pada titik 1858, prevalensi mutasi G1896A jauh lebih tinggi (26,6%) dibandingkan dengan pada genotipe A yang hanya 0% pada pasien kaukasia²⁶ dan 3% genotipe A dari pasien Amerika.²⁸ Isolat yang dengan mutasi pada regio *precore* 1896A pada penelitian ini ternyata hampir semua membawa nukleotida T pada posisi 1858. Hasil ini mengindikasikan bahwa mutasi G1896A berkorelasi kuat dengan jenis nukleotida pada posisi 1858.

Dari hasil penelitian ini, dapat diketahui bahwa setelah terjadinya serokonversi HBeAg, tidak selalu berarti bahwa replikasi VHB telah menurun atau terhenti. Lebih dari 50% dari subjek yang dipakai dalam penelitian ini mengalami reaktivasi dengan status HBeAg negatif. Temuan ini membuktikan bahwa HBeAg sebagai indikator replikasi tidak selalu benar.

Mutasi yang berkorelasi kuat dengan status HBeAg negatif adalah mutasi G1896A pada regio *precore*, sementara mutasi A1762T/G1764A tidak berkorelasi dengan status HBeAg. Pada tata laksana hepatitis B

kronis, pemeriksaan mutasi G1896A dapat menambah pertimbangan karena pada tipe mutasi tersebut kemungkinan mempengaruhi serokonversi HBeAg.

Pengelompokan fase perjalanan infeksi kronis hepatitis berdasarkan kadar ALT sebagai indikator peradangan hati akan kurang kuat jika hanya sekali dilakukan pemeriksaan kadar ALT. Hasil ini akan lebih baik jika dilakukan beberapa kali karena kadar ALT ini bersifat fluktuatif atau didukung dengan hasil biopsi.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2009;40(84): 405 – 420.
2. Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M, et al. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. Arch.Virol. 2009;154(7):1047 – 59.
3. Karayiannis P, Carman WF, Thomas HC. Molecular variations in the core promoter, *precore* and core regions of hepatitis B virus, and their clinical significance. In: Thomas HC, Lemon SM, Zuckerman AJ, editors. Viral Hepatitis 3rd Edition. United Kingdom:Blackwell Publishing Ltd, 2005;p. 242 – 261.
4. Lai CL, Yuen MF. The natural history and treatment of chronic hepatitis B: a critical evaluation of standard treatment criteria

- and end points. *Ann.Intern.Med.*2007;147:58 – 61.
5. De Castro L, Niel C, Gomes SA. Low frequency of mutations in the core promoter and *precore* regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. *BMC* 2001 ;1:10
 6. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. AASLD practice guidelines. *Hepat.* 2007;45(2):507 – 39.
 7. Fattovich G, Bortolotti F, Donato, F. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J.Hepat.* 2008;48:335 – 52.
 8. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B. *J.Hepat.* 2009;50:227 – 42.
 9. Liaw YF. HBeAg seroconversion as an important end point in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol.Int.* 2009;3:425 – 433.
 10. Yim HJ, Lok ASF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepat.*2006;43 : S173 – 81.
 11. Miyakawa Y, Okamoto H, Mayumi M. The molecular basis of hepatitis B e antigen (HBeAg)-negative infections. *J.Vir.Hepat.* 1997;4: 1 – 8.
 12. Sharma S, Sharma B, Singla B, ChawlaYK, Chakraborti, Saini, et.al. Clinical significance of genotypes and *precore*/basal core promoter mutations in HBV related chronic liver disease patients in north India. *Dig.Dis.Sci.* 2010;55:794 – 802.
 13. Lim CK, Tan JTM, Khoo JBS, Ravichandran A, Low HM, Chan YC, et al. Correlations of HBV genotypes, mutations affecting HBeAg expression and HBeAg/anti-HBe status in HBV carriers. *Int.J.Med.Sci.* 2006;3(1):14 – 20.
 14. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminar in Liver Disease*, 2004 [24] Suppl.1. 3 – 10.
 15. Liang TJ, Hasegawa K, Rimon N, Wands JR, Ben-Porath E. A hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *N Engl. J Med*, 1991;324(24):1705 – 9.
 16. Tong MJ, Lawrence MB, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. Basal core promoter T1762/A1764 and *precore* A1896 gene mutations in hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma: a comparison with chronic carriers. *Liver.Int.* 2007; 27(10): 1356 – 63.
 17. Nuraeny N, Muljono DH, Sudoyo H, Marzuki S. Genetic study of hepatitis B in Indonesia reveals a new subgenotype B in east Nusa Tenggara. *Arch.Virol.*2008 ; 153: 1057 – 65.
 18. Kann M. Structural and molecular virology. In: Lai CL, Locarnini S. *Hepatitis B virus*. London. International Medical Press. 2002 : 9 – 22.
 19. Tong MJ, Blatt LM, Kao JH, Cheng JT, Corey WG. *Precore*/basal core promoter mutant and hepatitis B viral DNA level as predictor for liver death and hepatocellular

- carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006;12(41):6620 – 26.
20. Tong T, Kim KH, Chante C, Wands J, Li J. Hepatitis B virus e antigen variants. *Int.J.Med Sci.* 2005;2(1): 2 – 7
21. Carter JB, Saunders VA. *Virology Principles and Applications.* West Sussex: John Wiley and Sons; 2007
22. Tong MJ, Hsu L, Hsien C, Kao JH, Durazo FA, Saab S, et al. A comparison of hepatitis B viral markers of patients in different clinical stages of chronic infection. *Hepato. Int.* 2010;4:516 – 22.
23. Abbas Z, Muzaffar R, Siddiqui A, Naqvi SAA, Rizvi SAH. Genetic variability in the *precore* and core promoter regions of hepatitis B virus strains in Karachi. *BMC Gastroenterol.* 2006;6(20): 1 – 6.
24. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, et al. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and *precore* and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J.Clin. Microbiol.* 2005; 43(12):6000 – 6.
25. Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J.Gen.Virol.* 2008;89:901 – 9.
26. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepato.*2003;38(5): 1075 – 86.
27. Wintermeyer P, Gerner P, Gehring S, Karimi A, Wirth S. Prevalence of hepatitis B virus *precore* stop codon mutations in chronically infected children. *World J Gastroenterol.*2006;12(14):2235 – 38.
28. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al. Prevalence of HBV *precore*/core promoter variants in the united states. *Hepato.* 2003; 86(3): 619 – 28.