

**Mutasi Gen Pre-S/S Virus Hepatitis B dalam Sintesis
HBsAg pada Hepatitis B Tersamar:
Kajian Serologi dan Molekuler**

*Pre-S/S Gene Mutation of Hepatitis B Virus in the Synthesis
of HBsAg in Occult Hepatitis B:
Serological and Molecular Analysis*



Teguh Wijayadi

Nomor Pokok: P0200313027



**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN, MAKASSAR**

2018

DISERTASI

**MUTASI GEN PRE-S/S VIRUS HEPATITIS B DALAM
SINTESIS HBsAg PADA HEEPATITIS B TERSAMAR:
KAJIAN SEROLOGI DAN MOLEKULER**

Disusun dan diajukan oleh

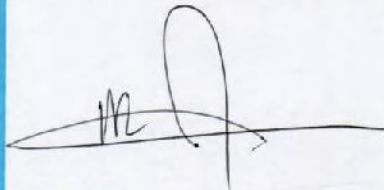
TEGUH WIJAYADI
Nomor Pokok P0200313027

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 10 Desember 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

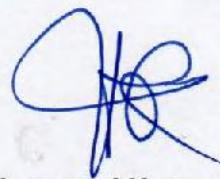


Prof. dr. David Handojo Muljono, Ph.D, Sp.PD, FINASIM, FAASLD
Promotor



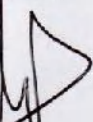
Prof. dr. Irawan Yusuf, Ph.D
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,



Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi Ph.D
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



khari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK (K) Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed



DAFTAR TIM PENGUJI

- Promotor : Prof. dr. David Handojo Muljono, PhD, SpPD,
FINASIM, FAASLD
- Ko Promotor : Prof. dr. Irawan Yusuf, PhD
- Ko. Promotor : Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD. SpMK.
- Penguji Eksternal : Prof. Dr. dr. Murdani Abdullah, SpPD, KGEH,
FACG, FINASIM.
- Penguji : Prof. Dr. dr. Suryani Asaad, SpGK(K)
- Penguji : Dr. dr. Gatot S. Lawrence, MSc, SpPA(K), DFM,
SpF, FESC
- Penguji : Dr. dr. Ilham Djaja Patelonggi. MSc
- Penguji : Dr. dr. Fardakh Akil, SpPD, K-GEH. FINASIM
- Penguji : dr. Rizalinda Sjahril, MSc, PhD, SpMK (K)



PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Teguh Wijayadi
Nomor Pokok : P 0200313027
Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran Program Pasca Sarjana
Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 8 Desember 2018

Yang menyatakan,

Teguh Wijayadi



PRAKATA

Salam sejahtera,

Dengan puji syukur saya kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa dan pemurah, karena limpahan rahmat dan berkatNya yang telah diberikan kepada saya, sehingga mampu menyelesaikan disertasi ini, yang merupakan syarat pendidikan saya.

Keberhasilan penyusunan disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, sehingga pada kesempatan yang berbahagia ini perkenankan saya menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya sebagai wujud penghargaan dan penghormatan yang tulus kepada:

- **Prof. Dr. Dwia Aries Tina NK. MA** selaku rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. dr. Idrus A. Patturusi SpOT** selaku rektor Universitas Hasanuddin periode sebelumnya, **Prof. Dr. Mursalim, M.Sc** selaku direktur Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin, **Prof. dr. Budu, PhD, SpM (K)** selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. dr. Andi As'adul Islam SpBS(K) dan Prof. dr. Irawan Yusuf, PhD** selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya.
- **dr. Agussalim Bukhari, PhD, SpGK(K)** selaku koordinator pendidikan Fakultas Kedokteran UNHAS, **Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, SpGK (K) dan Prof. DR. dr. Suryani As'ad, SpGK(K) MSc** selaku



koordinator pendidikan S3 Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya.

- sebelumnya, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- **Prof. dr. David Handojo Muljono PhD, SpPD, FINASIM, FAASLD** selaku promotor yang telah bersedia mengorbankan; waktu, tenaga dan pikiran, serta kesibukan beliau di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta untuk membimbing, memotivasi dan memberi dorongan dari awal hingga disertasi ini selesai.
- **Prof. dr. Irawan Yusuf PhD**, sebagai ko-promotor yang meluangkan waktu tenaga dan pemikiran dan mengarahkan pada penulisan disertasi ini, di tengah kesibukan beliau.
- **Prof. dr. Muh. Nasrum Massi PhD, Sp.MK (K)** selaku ko-promotor yang juga telah meluangkan waktu, tenaga dan di sela-sela kesibukannya yang padat untuk memberikan pengarahan dalam penulisan disertasi ini.
- **Prof. Dr. dr. Murdhani Abdullah. SpPD. KGEH. FAC.** Kepala divisi Gastroenterologi, Bagian Ilmu Penyakit Dalam RSCM/ FKUI selaku penguji dan sebagai pemberi dukungan dan menyelesaikan disertasi ini.



- **Dr. dr. Fardah Akil, SpPD, K-GEH**, sebagai kepala di Divisi Gastroentero-Hepatologi, Bagian Penyakit Dalam RS Wahidin Sudiro Husodo dan penguji disertasi ini.
- **dr. Rizalinda Syahrir, MSc, PhD** sebagai penguji, dan guru saya selalu memberi dorongan, bantuan dalam mengumpulkan sampel dan bimbingan, kepada saya dalam menyelesaikan disertasi ini.
- **Dr. dr, Ilham Jaya Patellongi, MS**, sebagai guru yang telah memberikan waktu dan pemikiran untuk saran bidang statistik penulisan disertasi ini.
- **Dr. dr. Gatot S Lawrence, MSc, SpPA (K), DFM, SpF, FESC**, sebagai guru yang dengan sabar membimbing dan memberi saran.
- **Pimpinan dan Staf Lembaga Biologi Molekular Eijkman Jakarta, khususnya Lab Hepatitis**; dr. Meta Dewi Thedja, M.Biomed., Ph.D, Turyadi M.Biomed., Susan Irawati Ie, M.Biomed.Sc, Rahmi Safitri, S.Si., Magfira M.Biomed, Rita Margyaningsih S.Si., dan Dhita Prabasari Wibowo S.Si., yang membantu membimbing dan memfasilitasi pemeriksaan molekuler mulai ekstraksi DNA virus sampai analisa mutasi virus hepatitis B dan teman teman dari Laboratorium Universitas Hasanuddn.
- **Direktur Utama RS GADING PLUIT Dr.dr Barlian Sutedja SpB** yang telah mendukung dan memberi izin untuk kami meneliti. dan staf sekretariat Jenny, Fitri, Yunus, Aria dan atas fasilitas yang diberikan untuk pengolahan dan pengumpulan sampel penelitian.



- **Kepada Dr. dr. Lyana Setiawan, SpPK dan staf** yang telah membantu dalam pemeriksaan kadar HBsAg dan kadar DNA HBV sampel penelitian kami.
 - **Kepala Lab RS GADING PLUIT dr. Koewodjo Sadimin, SpPK, dan staf** yang telah banyak membantu pemeriksaan analisis darah dari subyek penelitian kami.
 - **Prof. Dr. dr. Daldiyono, SpPD-KGEH, Prof. dr. Aziz Rani, SpPD-KGEH, dan Prof dr. Abdul Muthalib, SpPD-KHOM** Bagian Penyakit Dalam FKUI/ RS Cipto Mangunkusumo sebagai guru saya selama PPDS yang memberi dukungan untuk mengikuti pendidikan dan menyelesaikan disertasi.
 - Kepada Bapak Murdaya Poo yang telah saya anggap sebagai keluarga dekat yang sangat besar memberikan semangat dan dukungan kepada saya untuk melanjutkan studi S3 saya mengucapkan banyak terima kasih.
 - Saya sampaikan terima kasih kepada staf administrasi Pascasarjana S3 Kedokteran Universitas Hasanudin, Makasar. Pihak lainnya yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.
 - Kepada guru saya mulai dari SD, SMP dan SMA yang telah memberikan ajaran moral, etika dan ilmu dasar, saya menyampaikan terima kasih yang tak terhingga, semoga Tuhan yang Pemurah
- meny balas kebaikan beliau semua.



- Terima kasih saya haturkan kepada kedua orang tua saya tercinta, ayahanda (Alm Teguh Widjaja) dan Ibunda (Alm) tercinta yang telah mengasuh dan mendididik. Mendoakan saya, semua kebaikan dan pengorbanan keduanya tidak dapat saya balas dengan apapun.
- Kepada ibu dan ayah mertua dr. Sugiarto Wibowo (Alm) yang semasa hidup senantiasa mendukung dan memotivasi saya mengikuti Pendidikan S3,
- Kepada isteri saya tercinta, **Dr. dr. Linda J.W., SpKK, FINSDV**, yang dengan tulus dan sabar mendampingi dan mendukung seluruh kegiatan pendidikan saya; anak saya **Christian Wiraja, Ph.D, B.Eng.** dan **Fernando Dharmaraja**, sebagai motivator dan sumber energi saya dalam menjalani pendidikan ini.
- Sekali lagi saya menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang membantu saya dan semoga Tuhan senantiasa melimpahkan rahmat dan berkatnya kepada kita semua. Saya berharap disertasi ini dapat bermanfaat dan berkontribusi dalam perkembangan penelitian selanjutnya di bidang hepatitis B, dapat menjadi salah satu acuan dalam upaya pencegahan, deteksi dini, penatalaksanaan hepatitis B, pencegahan progresivitas penyakit dan komplikasi hepatitis B kronik sirosis atau hepatoma di Indonesia, dan berguna bagi dunia kesehatan. Disertasi ini mengawali dan menjembatani riset

ekuler dan klinis bidang kedokteran. Harapan saya, hasil penelitian dapat menjadi bagian ilmu, dipersembahkan kepada almamater



Universitas Airlangga, Universitas Indonesia, dan Universitas Hasanuddin di Indonesia tercinta.

Makassar, 10 Desember 2018

Teguh Wijayadi



ABSTRAK

Mutasi Gen Pre-S/S Virus Hepatitis B Dalam Sintesis HBsAg pada Hepatitis B Tersamar dengan anti-HBc reaktif: Kajian Serologi dan Molekuler

(Dibimbing oleh Prof. dr. David Handojo Muljono. PhD, SpPD, FINASIM, FAASLD, Prof. dr. Irawan Yusuf, PhD dan Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD, SpMK)

Latar Belakang: Diagnosis hepatitis B tergantung HBsAg serum, pada HBsAg tidak terdeteksi, disertai adanya VHB DNA disebut *Occult Hepatitis B infection (OBI)* / Hepatitis B tersamar.

Tujuan: menganalisa mutasi gen Pre-S/S virus hepatitis B, infeksi tersamar hepatitis B kronik, kajian aspek serologi dan molekuler.

Metode: Penelitian Potong-Lintang, subyek sukarelawan asimtomatis tenaga kesehatan (Nakes) pada empat RSU Kabupaten Provinsi Sulawesi Selatan dan subjek nakes di RS Swasta Jakarta. Pemeriksaan serologi di laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin, Makasar. dan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta untuk nested PCR, sekuensing dan analisa antigenitas. Sebanyak 1251 subjek dilakukan pemeriksaan serologi marker anti-HBc total, Pemeriksaan HBV-DNA dikerjakan pada subject dengan anti-HBc positif, sampel dengan HBV-DNA positif, dilanjutkan HBsAg dan anti-HBs, genotipe VHB dan analisa mutasi regio determinan 'a' gen s dan whole S genom VHB. Mutasi gen s dikaitkan titer HBsAg dan VHB-DNA kuantitatif. Pemeriksaan antigenisitas

Hasil-hasil: Dari total 1251 subjek berhasil diperiksa didapatkan subjek laki-laki/ perempuan 439/812, rentang usia 16-71 tahun. Hasil serologi menunjukkan 303 (24,2%) anti-HBc positif dan 54 (4,3%) HBsAg positif, serta 822 (65,7%) anti-HBs positif. Pemeriksaan Nested PCR (1st PCR dan 2nd PCR) dilakukan pada 98 sampel yang dapat diperiksa, untuk penentuan mutasi, subtype, genotipe VHB. Didapatkan genotipe B (59,1 %), genotipe C (40,9 %). Pada 73 sampel sekuensing, didapatkan mutasi di determinan 'a' regio S pada 69 sampel dan 4 pada gen S lengkap.

Kesimpulan: Didapatkan korelasi positif, antara spesifik mutasi pada gen Pre-S/S hepatitis B Virus dengan perubahan antigenitas HBsAg, yang menyebabkan gagal deteksi HBsAg.

Kata kunci: Mutasi gen pre-S/S virus hepatitis B, Gagal deteksi HBsAg, Gangguan antigenitas, infeksi hepatitis B tersamar



ABSTRACT

B Virus Pre-S/S Gene Mutations in the HBsAg Synthesis in Occult Hepatitis Hepatitis B with reactive anti-HBc: Serological and Molecular Analysis

(Supervised by Prof dr. David Handojo Muljono, PhD, SpPD, FINASIM, FAASLD, Prof. dr. Irawan Yusuf, PhD dan Prof. dr. M. Nasrum Massi, PhD, SpMK)

Background: Hepatitis B diagnosis relies on the detection of hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg). However, HBV may prevail without detectable HBsAg despite the presence of HBV DNA in the serum and/or liver, i.e. occult HBV infection (OBI).

Aim: To assess the role of HBV Pre-S/S gene mutation with regards to HBsAg detection failure.

Method: A total of 1251 subjects (aged 16-71, median 33 years; male/female 441/812) were assayed for HBV core-antigen antibody (Anti-HBc). HBV DNA was tested and isolated among anti-HBc-positive samples, then analyzed and assayed for HBsAg.

Result: Among 294 anti-HBc-positive subjects, HBV DNA was detected in 98 (33.3%), comprising 29 (9.9%) HBsAg-positive and 69 (23.5%) HBsAg-negative (OBI) samples. From OBI group, 48 sequences encompassing HBsAg-encoding gene and four whole - length S gene sequences were generated. Thirty-six (75%) of the former and all of the latter had mutations which resulted in amino acid substitutions, stop codon, and new glycosylation site, causing antigenicity alteration. HBsAg titer was unquantifiable in OBI samples. No correlation was found between the mutations and HBV DNA titer in OBI and non-OBI samples.

Conclusion: Mutations in HBV pre-S/S gene associated with antigenicity alteration were detected in OBI, which could be the background of HBsAg detection failure.

Keywords: hepatitis B virus, pre-S/S gene mutation, antigenicity alteration, hepatitis B detection failure, occult hepatitis B infection



DAFTAR ISI

DAFTAR TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR TABEL	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
DAFTAR SINGKATAN	xxiii
DAFTAR ALIH BAHASA	xxiv
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang Masalah.....	1
I.2. Rumusan Masalah	5
I.3. Pertanyaan Penelitian	5
I.4. Tujuan Penelitian.....	6
I.4.1. Tujuan Umum.....	6
I.4.2. Tujuan khusus	6
I.5. Manfaat Penelitian.....	8



BAB II	9
TINJAUAN PUSTAKA.....	9
II.1. Epidemiologi Virus Hepatitis B	9
II.2. Organisasi Virus Hepatitis B.....	11
II.2.1. Gen S	13
II.2.2. Gen P	16
II.2.3. Gen C	17
II.2.4. Gen X	18
II.3. Infeksi Hepatitis B Tersamar (<i>Occult Hepatitis B Infection</i> / OBI).....	18
BAB III	23
KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	23
III.1. Kerangka Teori.....	23
III.2. Kerangka Konsep.....	25
BAB IV	26
METODE PENELITIAN	26
IV.1. Rancangan Penelitian.....	26
IV.2. Populasi dan Subyek Penelitian.....	26
IV.3. Tempat dan Waktu Penelitian	27
IV.4. Metode Pengambilan Sampel	27
IV.5. Metode Pengumpulan Data	28
IV.6. Prosedur Kerja	31
IV.6.1. Cara Pengambilan Spesimen	31



IV.6.2. Pemeriksaan serologi hepatitis B, hepatitis C, dan infeksi HIV	31
IV.6.2.1. Pemeriksaan dan pengukuran kadar HBsAg	31
IV.6.2.2. Pemeriksaan anti-HBc	33
IV.6.2.3. Pemeriksaan dan pengukuran kadar anti-HBs.....	33
IV.6.2.4. Pemeriksaan anti-HCV.....	34
IV.6.2.5. Pemeriksaan anti-HIV	35
IV.6.3. Isolasi, deteksi dan pengukuran kadar DNA Virus Hepatitis B.....	35
IV.6.3.1. Isolasi DNA Virus Hepatitis B.....	35
IV.6.3.2. Amplifikasi DNA Virus Hepatitis B dengan Nested PCR	37
IV.6.3.2.a. Amplifikasi DNA VHB yang menyandi HBsAg.....	37
IV.6.3.2.b. Amplifikasi DNA VHB yang menyandi protein selubung VHB dengan <i>Nested</i> PCR	40
IV.6.3.3. Deteksi fragmen DNA Virus Hepatitis B dengan elektroforesis.....	42
IV.6.3.4. Pengukuran kadar DNA VHB.....	43
IV.6.4. Sekuensing DNA Virus Hepatitis B	44
IV.6.4.1. Purifikasi produk PCR.....	44
IV.6.4.2. Reaksi sekuensing untuk PCR.....	45
IV.6.4.3. Elektroforesis DNA untuk <i>sequencing</i>	46
IV.6.5. Analisis karakteristik genetik Virus Hepatitis B.....	46
IV.6.5.1. Pembuatan pohon filogenetik untuk penentuan genotipe Virus Hepatitis B	46
IV.6.5.2. Penentuan sub tipe Virus Hepatitis B.....	47



IV.6.6. Studi prediksi perubahan antigenisitas.....	48
IV.7. Etik penelitian.....	49
IV.8. Persetujuan ikut serta dalam penelitian	49
IV.9. Batasan Operasional	50
IV.10. Kriteria obyektif parameter penelitian.....	54
IV.11. Analisis statistik.....	56
BAB V	57
HASIL PENELITIAN	57
V.1. Status infeksi VHB pada subyek penelitian.....	57
V.2. Keberadaan DNA VHB pada subyek terpajan VHB	60
V.3. Hepatitis B tersamar pada subyek terpajan VHB	60
V.4. Faktor virologi pada hepatitis B tersamar.....	63
V.4.1. Analisis bagian Gen S yang menyandi determinan 'a' HBsAg	63
V.4.2. Genotipe dan sub tipe virus hepatitis B.....	64
V.4.3. Pola mutasi Gen S yang menyandi determinan 'a' HbsAg	67
V.4.3.1. Pola mutasi HBsAg	67
V.4.4. Frekuensi mutasi asam amino pada HBsAg	70
V.4.4.1. Topografi mutasi asam amino pada HBsAg.....	72
V.4.4.2. Hubungan antara genotipe dan sub tipe virus hepatitis B dengan mutasi HBsAg.....	73
V.4.5. Analisis Gen S dan Pola Mutasi Protein Selubung (<i>Large Protein</i>) VHB	74



V.4.5.1. Genotipe virus hepatitis B	74
V.4.5.2. Pola Mutasi Protein Selubung (<i>Large Protein</i>) VHB.....	76
V.5. Hubungan mutasi HBsAg dengan Kadar HBsAg dan DNA VHB pada OBI	78
V.5.1. Kadar DNA VHB pada OBI	78
V.5.2. Hubungan Mutasi HBsAg dengan Kadar HBsAg dan DNA VHB pada OBI.....	79
V.6. Faktor Inang pada hepatitis B tersamar: Keberadaan anti-HBs pada OBI	80
V.7. Faktor eksternal pada hepatitis B tersamar: koinfeksi VHB dengan virus hepatitis C (VHC) dan HIV	82
V.8. Pengaruh mutasi Gen S terhadap perubahan antigenisitas dan sintesis HBsAg pada OBI	83
V.8.1. Analisis antigenisitas HBsAg pada OBI.....	83
V.8.2. Analisis antigenisitas protein selubung (<i>Large Protein</i>) VHB pada OBI	86
BAB VI.....	88
DISKUSI	88
VI.1. Karakteristik Subjek Penelitian.....	88
VI.2. Status serologi Infeksi VHB pada subjek penelitian	89
VI.3. Hepatitis B tersamar pada subyek terpajan VHB	92
VI.4. Faktor virologi pada hepatitis B tersamar.....	94
VI.4.1. Genotipe dan subtype virus hepatitis B.....	94
VI.4.2. Mutasi pada bagian Gen S yang menyandi determinan 'a' HBsAg	95



VI.4.3. Mutasi pada Gen S yang memengaruhi sintesis HBsAg	98
VI.4.4. Hubungan mutasi pada Genotipe dan sub tipe VHB dengan mutasi HBsAg.....	99
VI.4.5. Hubungan mutasi HBsAg dengan kadar HBsAg dan DNA VHB pada OBI.....	100
VI.5. Faktor inang pada hepatitis B tersamar: Keberadaan anti-HBs pada OBI	101
VI.6. Faktor eksternal pada hepatitis B tersamar: Koinfeksi VHB dengan virus hepatitis C dan <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ada OBI	103
VI.7. Pengaruh mutasi DNA VHB terhadap perubahan antigenitas HBsAg	104
BAB VII.....	107
RINGKASAN	107
VII.1. Ringkasan Penelitian	107
VII.2. Kekuatan Penelitian	111
VII.3. Keterbatasan Penelitian.....	112
BAB VIII.....	113
KESIMPULAN DAN SARAN.....	113
VIII.1. Kesimpulan	113
VIII.2. Saran	113
DAFTAR PUSTAKA.....	114
LAMPIRAN	122



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Genome VHB dan produk protein	12
Gambar 2. Proses replikasi virus hepatitis B.....	13
Gambar 3. Gen S dan Produk Protein	14
Gambar 4. Perjalanan alamiah infeksi VHB.....	20
Gambar 5. Kerangka Teori hubungan ekspresi HBsAg dan hepatitis B infeksi.....	23
Gambar 6. Kerangka Konsep.....	25
Gambar 7. Alur penelitian	30
Gambar 8. Skema dua tahap nested PCR untuk amplifikasi bagian gen S DNA VHB yang menyandi HBsAg	38
Gambar 9. Skema dua tahap nested PCR untuk amplifikasi seluruh gen S DNA VHB	41
Gambar 10. Prevalensi anti-HBc menurut kelompok umur	60
Gambar 11. Hasil seleksi mendapatkan subyek dengan OBI	62
Gambar 12. Pohon filogenetik gen S DNA VHB yang menyandi determinan 'a' HBsAg 73 dari sampel beserta referensi genotipe	65
Gambar 13. Sekuens asam amino 'a' determinan pada kelompok OBI dan HBsAg positif	69
Gambar 14. Frekuensi mutasi determinan 'a' HBsAg	71
Gambar 15. Posisi dan frekuensi mutasi pada determinan 'a' HBsAg.....	72
Gambar 16. Analisis filogenetik gen S lengkap sampel OBI	75
Gambar 17. Sekuens Protein S lengkap.....	77
Gambar 18: Hepatitis B tersamar pada 826 subyek dengan pemeriksaan VHB lengkap	81



Gambar 19. Perubahan antigenitas pada HBsAg gagal deteksi 85

Gambar 20. Analisis pada sekuens S gen lengkap dari 4 isolat OBI 87

Gambar 21. Glikolisasi akibat delesi asam amino yang disintesis gen Pre-S1 pada gen S2 87



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Primer untuk nested PCR dan sekuensing gen S DNA VHB	42
Tabel 2. Hasil pemeriksaan HBsAg dan anti-HBc menurut karakteristik subjek penelitian	59
Tabel 3. Hasil pemeriksaan HBsAg dan anti-HBc.....	59
Tabel 4. Genotipe, subtipe, dan mutasi pada determinan 'a' HBsAg pada 73 sampel DNA VHB positif, OBI, dan Non-OBI	67
Tabel 5. Hubungan antara genotipe virus hepatitis B dengan mutasi HBsAg.....	73
Tabel 6. Hubungan antara subtipe virus hepatitis B dengan mutasi HBsAg	73
Tabel 7. Hubungan kadar DNA VHB dengan status OBI	78
Tabel 8. Hubungan antara mutasi HBsAg dengan kadar HBsAg dan DNA VHB dan kaitannya dengan status OBI.....	79
Tabel 9. Hubungan OBI dengan status anti-HBs pada subyek DNA VHB positif	82
Tabel 10. Hubungan OBI dengan koinfeksi VHB dengan VHC dan HIV ..	83
Tabel 11. Distribusi varian HBsAg yang ditemukan pada OBI menurut kelompok makna.....	97



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Prevalensi HBsAg, anti-HBc dan anti-HBs pada subyek penelitian	122
Lampiran 2. Hasil pemeriksaan anti-HCV, anti-HBV atau anti-HIV, anti-HCV dan anti-HIV	123
Lampiran 3. Sekuens Gen S Regio determinan 'a' HBsAg dari 73 sampel OBI	124
Lampiran 4. Sekuens Gen S Lengkap dari 4 Sampel OBI	127
Lampiran 5. Karakteristik Demografi, <i>Accession Number</i> GenBank, Status OBI, Mutasi HBsAg, Genotipe dan Subtipe Virus Hepatitis B pada 7 Subyek dengan OBI.....	129
Lampiran 6. Index Antigenisitas Determinan 'a' HBsAg pada 7 Subyek OBI	131
Lampiran 7. Index Antigenisitas Pretein Selubung Virus Hepatitis B pada 4 Subyek OBI.....	134



DAFTAR SINGKATAN

Anti-HBc	: antibody Hepatitis B core
Anti-HBs	: antibody Hepatitis B surface
APASL	: Asian Pacific Association for the Study of the Liver
cccDNA	: covalently closed circular DNA
CHB	: Chronic Hepatitis B virus
DNA	: Deoxyribonucleid Acid
GHSS	: Global Health Sector Strategy
Gen Pre-S/S	: gen pre-S1/pre-S2/ S
HBcAg	: Hepatitis B core antigen
HBsAg	: Hepatitis B surface antigen
HBV-DNA	: Hepatitis B Virus - deoxyribonucleic acid
mRNA	: messenger RNA
NAT	: Nucleic Acid Testing
OBI	: Occult Hepatitis B Infection
ORF	: Open Reading Frame
pg-RNA	: pregenomic-RNA
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
VHB	: Virus Hepatitis B
WHO	: World Health Organization
RT	: reverse transcriptase



DAFTAR ALIH BAHASA (BAHASA INGGRIS KE BAHASA INDONESIA)

Amino acid	: asam amino
Chronic Hepatitis B	: hepatitis B Kronik
HBV-DNA	: DNA - Virus Hepatitis B (DNA - VHB)
Open Reading Frame	: daerah Penyandi
Trancription	: trankripsi
Translation	: translasi
Gene	: gen
Occult Hepatitis B infection	: hepatitis B tersamar



BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang Masalah

Infeksi virus hepatitis B (VHB) masih merupakan masalah kesehatan global, dengan lebih dari 2 miliar orang di seluruh dunia terinfeksi dan 257 juta diantaranya menderita infeksi kronik dengan risiko menjadi sirosis hati (SH) dan karsinoma hepatoseluler (KHS), menyebabkan sekitar 887.000 kematian setiap tahun (Franco et al., 2012, WHO, 2018). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melakukan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2013 yang menunjukkan prevalensi HBsAg sebesar 7,1%, berarti sekitar 18 juta penduduk mengidap hepatitis B. Sedangkan prevalensi anti-HBc adalah 32,8%, berarti hampir sepertiga dari populasi pernah terinfeksi VHB, yang mengakibatkan sebagian tidak sakit dan sebagian terinfeksi kronik, dengan risiko berkembang menjadi SH dan KHS (Menteri Kesehatan RI - Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013). Progresivitas hepatitis B kronik adalah penyebab sepertiga dari seluruh kasus sirosis hepatis dan lebih dari 75% kasus kanker hati diseluruh dunia (Perz et al., 2006).

Deteksi VHB baik pada individu maupun screening pada populasi, positifnya berbeda berdasarkan endemisitas daerah tertentu. Pada deteksi infeksi hepatitis B adalah berdasarkan HBsAg dalam serum rekomendasi WHO, terutama pada masyarakat dengan tingkat



ekonomi rendah-sedang (WHO, 2017, WHO, 2018). Sedangkan pada negara dengan tingkat ekonomi yang lebih baik, selain pemeriksaan berdasarkan HBsAg dan anti-HBs, juga dilakukan pemeriksaan anti-HBc yang merupakan bukti seseorang terpajan oleh VHB. Sebagai strategi pemeriksaan serologi untuk mengatasi keterbatasan dalam deteksi HBsAg maka menggunakan pemeriksaan yang telah dikembangkan yaitu anti-HBc, ELISA, HBV NAT (*nucleic acid testing*). (Bréchet et al., 1985). Pada berbagai jenis varian, *genotype, subtype* yang berbeda di populasi dengan geografi yang berbeda pula (Croagh et al., 2015) ditemukan tingkat sensitivitas berbeda. Pada fase *window period* dimana HBsAg sudah turun, sedangkan anti-HBs belum terbentuk maka pemeriksaan anti-HBc berguna.

Pemeriksaan menggunakan HBsAg dan anti-HBc pada negara berpenghasilan sedang - tinggi merupakan metode kombinasi yang dapat mengatasi kelemahan pemeriksaan HBsAg saja, namun hal ini hanya dikerjakan pada daerah tingkat endemis rendah (kurang dari 2%), dan tidak dikerjakan pada daerah endemis. Di daerah endemis sedang-tinggi banyak individu/populasi yang telah terpajan (terinfeksi) hasil pemeriksaan menggunakan anti-HBc saja dapat melebihi 50%. Sebagian dari subyek dengan anti-HBc positif mengalami kesembuhan dengan munculnya anti-HBs dan hilangnya HBsAg. Dengan demikian, pada negara endemis hepatitis B, pemeriksaan anti-HBc tidak dapat mencerminkan prevalensi

HB yang sebenarnya. Berdasarkan keadaan ini maka WHO dan
Forum Peneliti Hati di Asia Pasific (APASL) tetap mengajukan



HBsAg sebagai petanda infeksi VHB (Sarin et al., 2016, WHO, 2017). Pada dekade ini penggunaan HBsAg semakin populer, setelah dikembangkan kuantitasi HBsAg, terdapat korelasi dengan DNA VHB, maka titer HBsAg serum digunakan sebagai monitor hasil pengobatan (Chan et al., 2010),

Deteksi infeksi VHB menjadi topik yang penting kembali, setelah dilaporkannya infeksi VHB pada penderita hepatitis B yang menunjukkan hasil HBsAg negatif, yang dikenal dengan istilah ‘Hepatitis B tersamar’ atau *Occult hepatitis B* (OHB) atau Occult hepatitis B infection (OBI) (Bréchet et al., 1985, Kwak and Kim, 2014, Hollinger and Sood, 2010).

Sejak dilaporkannya sekitar tahun 1980, OBI telah secara seroepidemiologi maupun klinis, tetapi penelitian ini sebagian besar dikerjakan di negara non-endemik (Raimondo et al., 2008). Berbagai laporan menyebutkan bahwa angka kejadian OBI lebih tinggi pada negara endemis hepatitis B, dibanding negara non-endemis hepatitis B (Raimondo et al., 2010, Kwak and Kim, 2014). Laporan dan penelitian tentang OBI di negara endemis sangat jarang dikerjakan, khususnya Indonesia (Darmawan et al., 2015, Ie et al., 2015). OBI telah mendapat perhatian khusus di kalangan perhimpunan ahli di Asia Pasifik (Sarin et al., 2016), dan dimasukkan sebagai klasifikasi suatu bentuk hepatitis kronis oleh Perhimpunan Ahli Hepatitis di Eropa (European Association for the Study of the Liver, 2017).



Seingat pentingnya masalah ini dan merespon HBsAg serum andalan diagnostik dan skrining hepatitis B di masyarakat, maka

diperlukan studi khusus tentang VHB serta faktor-faktor yang menjadi latar belakang (Mortensen et al., 2016). Untuk mengatasi masalah global ini, WHO telah mencanangkan program GHSS (*Global Health Sector Strategy on viral Hepatitis 2016-2021*) yang bertujuan menurunkan jumlah penderita infeksi VHB dengan target bahwa hepatitis B sudah tidak menjadi masalah dunia pada tahun 2030 (WHO, 2016). Indonesia telah memberikan respon yang serius, dengan dikeluarkannya Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 53 tahun 2015 yang memaksimalkan pencegahan dan deteksi dini (Menteri Kesehatan RI, 2015).

Beberapa hal diketahui menjadi penyebab OBI, yaitu: (i) faktor yang berasal dari virus (mutasi gen S yang menyandi HBsAg atau gen Pre-S yang mempengaruhi sintesis HBsAg); (ii) faktor yang berasal dari inang (kelainan imunologi, adanya anti-HBs yang tidak dapat menetralsir VHB, faktor epigenetik, dan fase *window period* – yaitu di saat HBsAg sudah tidak terdeteksi namun anti-HBs belum terbentuk); (iii) faktor eksternal (misalnya koinfeksi dengan HCV atau HIV, sensitivitas alat, penggunaan obat antivirus yang menyebabkan mutasi gen gen P dengan dampak perubahan gen S (Raimondo et al., 2013, Ponde, 2015, Samal et al., 2012).

Mengamati hal tersebut diatas, maka peneliti memilih topik. Mutasi gen Pre-S/S dalam sintesis HBsAg kajian klinis dan molekuler, dengan penekanan pada aspek virologi. Penelitian dilakukan pada individu yang

cara fisik dan tidak menunjukkan tanda infeksi/penyakit hati. Dalam penelitian ini dilakukan pendekatan dengan memeriksa subyek penelitian



petanda infeksi VHB menggunakan anti-HBc, diikuti VHB DNA. Kemudian dilakukan analisis lebih lanjut untuk mempelajari virus yang lolos dari deteksi HBsAg, serta pengaruhnya terhadap perubahan antigenisitas virus tersebut.

I.2. Rumusan Masalah

1. Terbatasnya informasi tentang besaran masalah dan penyebab terjadinya infeksi VHB tersamar (OBI) di Indonesia, yang dalam studi ini dibatasi dalam aspek virologi pada subjek yang terpajan VHB.
2. Saat ini belum diketahui secara mendalam karakteristik molekuler VHB penyebab OBI di Indonesia
3. Saat ini belum diketahui karakteristik HBsAg (yang merupakan target diagnostik serologi hepatitis B), sebagai akibat perubahan karakteristik
4. Molekuler VHB pada OBI

I.3. Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana besaran masalah hepatitis B tersamar serta penyebab terjadinya berkaitan dengan faktor virologi, faktor inang, dan faktor eksternal pada populasi target yang diteliti?

Bagaimana karakteristik molekuler DNA VHB, dalam hal ini karakteristik molekuler gen pre-S/S yang menyandi HBsAg, pada



subjek dengan OBI, serta hubungannya terhadap kadar DNA VHB dan kadar HBsAg?

3. Bagaimana karakteristik HBsAg yang terjadi akibat mutasi gen pre-S/S DNA VHB dalam hal perubahan antigenitas HBsAg

I.4. Tujuan Penelitian

I.4.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik serologi dan molekuler dan pola mutasi gen Pre-S/S VHB pada hepatitis B tersamar serta pengaruhnya pada deteksi dan kadar HBsAg serta deteksi dan kadar DNA VHB.

I.4.2. Tujuan khusus

1. Mengetahui status infeksi VHB subyek penelitian berdasarkan pola serologi hepatitis B
2. Mengetahui keberadaan DNA VHB pada subyek yang terpajan VHB
3. Mengetahui infeksi VHB tersamar (*occult hepatitis B/OBI*) pada subyek yang terpajan VHB
4. Mengetahui faktor virologi pada hepatitis B tersamar:
 - a. Mengetahui karakteristik bagian Gen S DNA VHB yang menyandi determinan 'a' HBsAg (S pendek/*small S*) dalam

kaitan dengan:

- Genotipe dan sub tipe VHB



- Pola mutasi bagian gen DNA VHB (S pendek/*small S*) yang menyandi HBsAg
 - Pola mutasi HBsAg
 - Hubungan antara genotipe dan subtipe VHB dengan mutasi HBsAg
- b. Mengetahui karakteristik seluruh Gen S DNA VHB (S lengkap/*whole S*) yang berpengaruh terhadap sintesis HBsAg dalam kaitan dengan:
- Genotipe VHB
 - Pola mutasi gen S lengkap (*whole S*) DNA VHB
 - Pola mutasi Protein Selubung VHB
- c. Mengetahui hubungan mutasi DNA VHB dengan kadar DNA VHB dan kadar HBsAg
5. Mengetahui faktor inang pada hepatitis B tersamar: keberadaan anti-HBs pada OBI
6. Mengetahui faktor eksternal pada hepatitis B tersamar: koinfeksi VHB dengan virus hepatitis C dan *human immunodeficiency virus* pada OBI
7. Mengetahui pengaruh mutasi DNA VHB terhadap perubahan antigenisitas HBsAg.



I.5. Manfaat Penelitian

1. **Manfaat ilmu:** Penelitian ini diharapkan akan dapat memberi informasi tentang pola mutasi virus hepatitis B pada gen Pre-S/S dan kaitan yang dapat menerangkan, titer HBsAg dan HBV-DNA serum. Mengetahui salah satu faktor kegagalan deteksi HBsAg.
2. **Manfaat aplikasi:** Mengetahui varian gen pre-S/S yang ada di Indonesia/daerah penelitian, sebagai bahan penyempurnaan sistem diagnostik dini dan pencegahan. Adanya varian gen tertentu dapat sebagai dasar ilmiah pembuatan formula vaksin hepatitis B khas Indonesia.
3. **Manfaat Kesehatan Masyarakat:** Memperbaiki sistem surveilans untuk penyempurnaan sistem deteksi dini dan sistem pencegahan dengan vaksinasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Epidemiologi Virus Hepatitis B

Sejak HBsAg ditemukan pada tahun 1963, prevalensi penyakit Hepatitis B masih tinggi (Trépo et al., 2014), Telah banyak penelitian dilakukan sebagai usaha preventif pembuatan vaksin, dan telah berhasil menurunkan prevalensi VHB. (WHO, 2016) pengobatan terus berkembang namun upaya ini kurang memuaskan karena adanya resistensi terhadap obat dan mutasi VHB karena obat (Oliveri et al., 2016), Petanda infeksi VHB sampai saat ini yang digunakan adalah HBsAg positif dalam serum, tetapi deteksi HBsAg dalam serum belum sepenuhnya berhasil, karena dapat dijumpai adanya kegagalan deteksi HBsAg, pada infeksi kronik. (Moresco et al., 2014; Oliveri et al., 2016) Tingginya penderita Infeksi virus hepatitis B (VHB) merupakan masalah kesehatan global, diperkirakan 257 juta diantaranya menjadi infeksi kronik (HBsAg +) dan 4,5 juta kasus baru pertahun di seluruh dunia. (WHO, 2017)(Launay et al., 2011; Walsh et al., 2014; Oliveri et al., 2016). Infeksi VHB mempunyai spektrum yang luas dari asimtomatis , infeksi akut, infeksi kronik, sirosis hepatis dan hepatoselular karsinoma. (Locarnini et al., 2015; Sarin et al., 2016). Dilaporkan sekitar 15-40% pasien yang terinfeksi VHB akan berkembang menjadi sirosis, gagal ginjal, dan karsinoma hepatoseluler. Pada tahun 2015 diperkirakan 887,000 kematian diakibatkan dari komplikasi hepatitis B kronik termasuk



didalamnya sirosis, hepatitis, dan kanker hati, serta lebih dari 780.000 penderita meninggal akibat infeksi VHB per tahun (Roche and Samuel, 2011; Ott *et al.*, 2012; Stanaway *et al.*, 2016). Epidemiologi di Pasifik bagian Barat dan Asia Tenggara berkisar antara 15-40% dengan seropositif HBsAg (Raimondo *et al.*, 2008; Locarnini *et al.*, 2015), Di Indonesia, pengidap hepatitis B pada populasi sehat diperkirakan mencapai 3,4% – 20,3% dengan proporsi pengidap di luar Jawa lebih tinggi daripada di pulau Jawa. (Utama *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2015) Indonesia termasuk negara endemis dengan prevalensi 9,4 % (tinggi) infeksi VHB (KemenKes, 2007), pada Riskesdas 2013 turun 7,1 % (moderat-tinggi). Secara genotype B 66%, genotype C 26% ,genotype D 7% dan genotype A 0,8%. (Depamede *et al.*, 2011, Depamede *et al.*, 2010).

Diagnosis Infeksi VHB ditegakkan berdasarkan adanya HBsAg dalam serum (Kim Y Do, Song E.J,2016). Pada dewasa infeksi VHB umumnya HBsAg berlangsung 1-10 minggu, sedangkan bila menetap lebih dari 6 bulan digolongkan sebagai i hepatitis B kronik. Pada kondisi akut timbul IgM-anti HBc tetapi cepat menghilang, kemudian terbentuk IgG-anti HBc yang menetap lebih lama melewati *fase window periode*.(De Franchis *et al.*, 1993) Pada fase penyembuhan dibentuklah Anti-HBs yang merupakan petanda bahwa sudah terbentuk antibodi terhadap HBsAg.

Infeksi pada anak-anak 80-90% dapat menyebabkan Hepatitis B sedangkan pada masa dewasa 5-10% menjadi kronik. Pada infeksi B kronik , kadar HBsAg berubah bersifat kinetik tergantung pada



fase infeksi (Antaki N,2012) Dalam klasifikasi Hepatitis B kronik APASL 2015, dinyatakan bahwa salah satu bagian dari hepatitis B Kronik disebut *occult hepatitis B (OBI)*.(Sarin et al., 2016). Definisi *occult* Hepatitis B, (Raimondo et al, 2008) dan mempunyai banyak arti ,tetapi ada satu kesamaan keadaan adalah HBsAg serum tidak terdeteksi disertai DNA HBV dalam serum/ jaringan hati yang positif.(Raimondo G and Pollicino T, 2016). Definisi OBI terakhir adalah HBsAg serum negatif dan DNA-VHB positif, (Sarin et al, 2016)

II.2. Organisasi Virus Hepatitis B

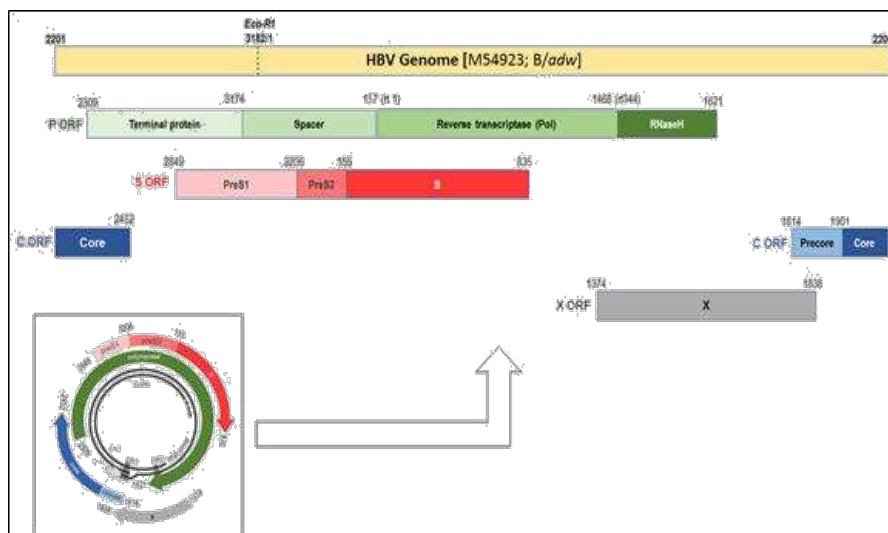
Virus Hepatitis B (VHB) pertama kali ditemukan oleh Dr. Baruch Blumberg tahun 1963 pada suku Aborigin di Australia. Pada waktu itu dikenal sebagai *Australian antigen (AuAg)*. VHB adalah suatu virus *Partial Double Stranded DNA*, yang termasuk dalam famili *Hepadnaviridae*, merupakan virus yang kecil dengan panjang genom 3,2 kb. Kekhususan dari virus Hepatitis B secara struktur terdiri dari rangkaian DNA asimetris dalam komposisinya. (Inan and Tabak, 2015)

VHB merupakan virus DNA, proses replikasinya terjadi melalui bentuk antara (*RNA intermediate*) yang memerlukan enzim *reverse transcriptase*. Virus ini adalah suatu virus *Partial Double Stranded DNA*, termasuk dalam family *Hepadnaviridae Virus*, merupakan virus yang kecil

panjang genom 3,2 kb.(Inan and Tabak, 2015). Hal ini abkan VHB memiliki kecepatan replikasi 10 kali lipat lebih besar

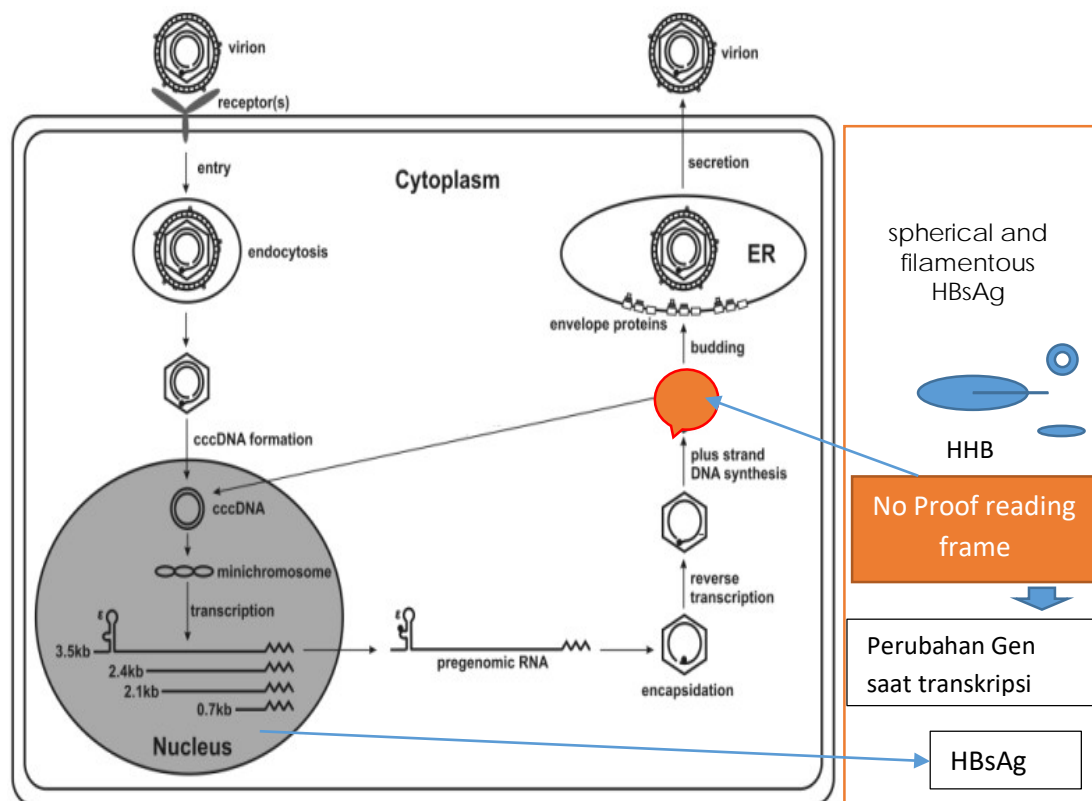


dibandingkan virus DNA lainnya, yaitu sekitar 2×10^5 /nukleotida/tahun. (Fung and Lok, 2004). Sebagian VHB mutan bersifat letal, sedangkan sebagian lagi yang mampu bertahan akan melawan sistem imunitas pejamu dan faktor lingkungan. Jika varian virus atau mutan tersebut dapat lolos dan tidak dikenali oleh sistem imun tubuh maka akan menjadi HBV mutan/ varian baru.(Pollicino et al., 2014). Mutasi gen Pre-S/S dapat mempengaruhi pembentukan HBsAg dan sekresi HBsAg oleh *apparatus Golgi* dari intrasel ke sirkulasi dan virion yang dilepaskan.(Su et al., 2014)



Gambar 1. Genom VHB dan produk protein. Genom VHB merupakan molekul DNA berbentuk sirkular, beruntai ganda. Untai luar merupakan lingkaran penuh yang terdiri 4 Open Reading Frame (ORF/daerah penyandi) P, S, C dan X yang saling tumpang tindih. Terlihat bahwa seluruh ORF S diliputi ORF P, yang berimplikasi bahwa perubahan pada gen P dapat mengubah gen S dan produk sintesis proteinnya, dan sebaliknya (Gambar diatas merupakan skema isolat VHB Indonesia, GenBank M54923; B/adw).





Gambar 2. Proses replikasi virus hepatitis B. 1. Lampiran organisasi VHB , 2. pada Pre-S1 (irreversible binding), 3. Melalui reseptor NTCP masuk kedalam sitoplasma hepatosit, 4. *Viral Nucleocapsid* dilepas, 5. Transportasi Nucleocapsid, 6. Setelah *nukleokapsid* terperangkap dalam basket NTCP terjadi pelepasan genom, 7. repair rc- DNA, 8. Pembentukan ccc DNA, 9. Setelah terbentuknya cccDNA mulai proses transkripsi, translasi, integrasi (Inan and Tabak, 2015)

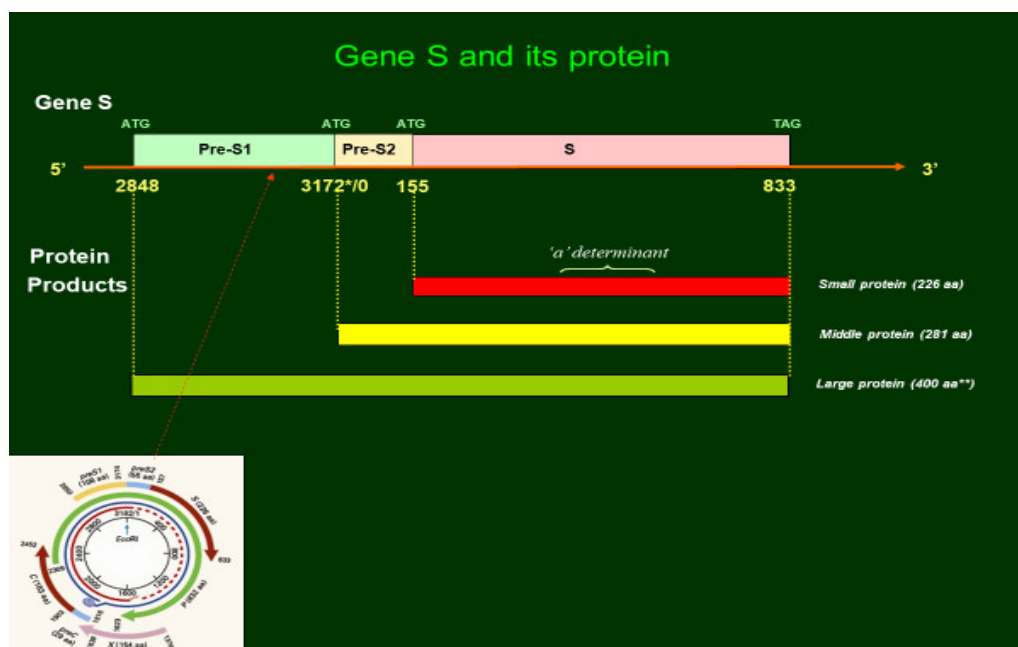
II.2.1. Gen S

Daerah ORF pertama merupakan daerah gen S (*surface*) terletak pada nukleotida 2848 hingga 833. Daerah ini menyandi polipeptida yang membuat selubung luar virus dan mempunyai **tiga tempat inisiasi transkripsi** terpisah sehingga terdapat 3 regio gen yaitu regio gen Pre-

S2 dan S (Gambar 2). Regio gen S terletak pada nukleotida 155 nukleotida 833, regio gen pre-S2 terletak pada nukleotida 3172



hingga nukleotida 155 dan regio gen Pre-S1 terJetak pada nukleotida 2848 hingga nukleotida 3172 (Tabel 1). Regio gen Pre-S1 hingga S akan mentranslasi protein besar (*large: LHBs*), gen Pre-S2 hingga S akan mentranslasi protein sedang (*middle: MHBs*) dan gen S akan mentranslasi protein kecil (*small = SHBs* atau HBsAg). (Seeger and Mason, 2000, Rabe et al., 2003).



Gambar 3. Gen S dan Produk Protein. ORF S VHB terdiri: gen S1, S2, S, gen P, gen C (disalin: Replikasi Hepatitis B virus sangat cepat dan mudah terjadi mutasi) A. struktur genomic dan panjang protein VHB, B . menunjukkan posisi gen S, gen p, gen c , yang saling tumpang tindih. C. gambar Virion VHB yang aktif. (Stuyver et al., 2000)

Gen S membentuk protein lapisan luar (selubung) virus dan menyandi daerah determinan untuk diagnosis, disebut determinan 'a' yang terletak pada gen s asam amino nomer 122-147.



Protein utama selubung virus terdiri dari 226 asam amino akan dihasilkan apabila inisiasi transkripsi dimulai pada regio gen S (tanpa pre-S2 dan pre-S1). Protein ini tersusun atas **tiga daerah hidrofobik** yang masing-masing dipisahkan oleh **dua daerah hidrofilik**. Ketiga daerah hidrofobik berada di posisi asam amino 7-23, 80-98 dan 169-226. Dua daerah hidrofobik pertama berada di lapisan lipid selubung ganda. Adanya variasi asam amino yang ditemukan pada genom VHB berada pada kedua domain hidrofilik. (Chiou et al., 1997, Weinberg et al., 2000)

Determinan 'a' adalah antigen utama yang dimiliki HBsAg, determinan antigenik, terletak pada **asam amino 124-149**. Strukturnya berbentuk lengkung ganda yang menghadap ke bagian luar, merupakan daerah hidrofilik, *conserved* dan bersifat imunogenik. Respon imun pejamu akan membentuk anti-HBs terhadap determinan 'a'. Anti-HBs yang terbentuk bersifat imunoprotektif bagi pejamu sehingga determinan 'a' merupakan target utama untuk diagnosis dan imunoprofilaksis. (Weinberg et al., 2000, Chiou et al., 1997) Sifat *conserved* dan struktur lengkung ganda protein diikat oleh ikatan disulfida diantara tujuh residu sistein yang terletak pada posisi asam amino 121, 124, 137, 139, 147 dan 149. Lengkung pertama terletak pada asam amino 124 hingga 137 dan lengkung kedua terletak pada asam amino 139 hingga 147. Penelitian *invitro* menunjukkan penurunan antigenisitas

bermakna, bila residu sistein pada posisi tersebut digantikan oleh serin. Hal ini memperlihatkan bahwa asam amino tersebut



berperan penting dalam **mengekspresikan antigenisitas protein.**(Chiou et al., 1997)

Determinan 'a' terdapat pada protein S (kecil), yang disintesis gen S dan terdapat pada semua tipe VHB. Perubahan bentuk ikatan asam amino di r e g i o “a” akan merubah susunan konfirmasi lengkung ganda ini dan mengakibatkan perubahan antigenitas HBsAg, sehingga antibodi yang timbul setelah vaksinasi atau setelah terinfeksi tidak bersifat protektif. Gen p berperan dalam pembentukan polimerase. Terdapat bagian gen p dan gen s yang *overlapping*. Pada beberapa pertemuan peneliti hati diusulkan bahwa HBsAg, digunakan untuk evaluasi pengobatan, karena obat golongan nucleosida bekerja pada gen p. VHB di dalam hepatosit HBsAg dibentuk oleh; gen S1 large, S2 medium, S *small* kecil. Mutasi pada nukleotida tertentu maka pembentukan *small surface proteins*.yang berisi “a” determinan akan terganggu.

Diagnostik hepatitis B sampai saat ini HBsAg di dalam darah. Sehingga bila pemeriksaan darah HBsAg negatip subyek dianggap bebas dari infeksi VHB.(Liaw and Chu, 2009) .Penelitian mutasi gen Pre-S(Andi,et al , 2011) prevalensi mutase gen Pre-S di Indonesia, pada HBsAg positif tidak tinggi dari subjek donor darah.

II.2.2. Gen P



Daerah ORF berikutnya adalah daerah gen P (*polymerase*) yang pada nukleotida 2357-1621 dan merupakan ORF terbesar. Daerah

gen P menyandi 832-845 asam amino dan mempunyai aktivitas polimerase dan endonuklease (*Tabel 1*). Susunan gen p tumpang tindih dengan gen S dan tumpang tindih sebagian dengan gen C dan gen X (*Gambar 2*). Bila ada mutasi pada gen S, C atau X maka akan mempengaruhi fungsi polimerase. Regio ini mengkode sintesis suatu protein dasar yang kaya histidin dengan berat molekul 90,000 Dalton, suatu BM yang mendekati DNA polimerase sehingga diduga ikut mengkode sintesis DNA polimerase yang mempunyai aktivitas *reverse transcriptase* yang dibutuhkan untuk replikasi VHB.(Harrison, 1996)

Gen P mempunyai 4 domain yaitu (1) primase atau protein terminal, mengawali proses replikasi; (2) *spacer*, yang masih belum diketahui fungsinya; (3) daerah *reverse transcriptase* menyandi RNA-*dependent* RNA polimerase dan RNA-*dependent* DNA polimerase yang diperlukan saat transkripsi balik dari siklus replikasi dan (4) RnaseH, domain terminal (C-terminal domain/RnaseH domain) menyandi enzim Ribonuclease-H berfungsi pada akhir replikasi.(Locarnini et al., 2003, Tiollais and Buendia, 1991)

II.2.3. Gen C

Gen C berfungsi mengkodekan protein structural dari nucleocapsid serta "a" antigen(HBeAg). Mempunyai susunan pre C – C, protein anti-
(HBcAg) dan protein HBeAg. Regio C menyandi HBcAg terdiri 183
merupakan unsur utama penyusun *nucleocapsid*, HBcAg tertutup



oleh selubung virus hal ini menyebabkan HBcAg tidak bisa terdeteksi menggunakan pemeriksaan serologi. Regio pre-C dan C menyandi HBeAg yang terdiri dari 214 aa, merupakan komponen yang infeksius.

II.2.4. Gen X

Gen X menyandi HBxAg, terletak pada nukleotida 1374-1836 dan terdiri dari 154 aa. berfungsi untuk mengkodekan protein multi fungsional X (Kim et al., 1991, Datta et al., 2012)

II.3. Infeksi Hepatitis B Tersamar (*Occult Hepatitis B Infection / OBI*)

Definisi *Occult Hepatitis B infection* (OBI) yang digunakan pada penelitian ini adalah: HBsAg negatif dengan DNA-VHB positif (WHO, 2015). Pada pemeriksaan anti-HBc dan anti-HBs merupakan antibodi yang langsung dibentuk terhadap HBcAg dan HBsAg, diperkirakan lebih dari 20 % subyek OBI dijumpai negatif pada seromaker infeksi.(Raimondo G and Pollicino T, 2016, Gerlich et al., 2010).

Penyebab timbulnya OBI belum diketahui dengan pasti. Patogenesis terjadinya OBI, merupakan hasil interaksi dari (1) Faktor virus, karena antara mutasi gen S; (2) Faktor pejamu atau inang; dan (3) Faktor lingkungan atau faktor eksternal hubungan interaksi pejamu dan virus lebih dominan dibanding faktor luar .



Faktor virus:

Mutasi virus hepatitis B jenisnya; delesi yang menyebabkan frame shift, substitusi aa , stop codon , dilaporkan penelitian tentang laju mutasi rata-rata genom VHB yakni sebesar $1,4-3,2 \times 10^5$ substitusi/nukleotida/tahun. Lebih spesifik lagi untuk daerah **pre-S/S laju substitusi** nukleotida adalah sebesar $2,6 \times 10^{-5}$, untuk daerah **pre-C/C** sebesar $2,2 \times 10^{-5}$, untuk daerah **gen X** sebesar $5,3 \times 10^{-5}$ dan untuk **daerah gen P** sebesar $2,2 \times 10^{-5}$ substitusi/ nukleotida/tahun.(Okamoto et al., 1988)

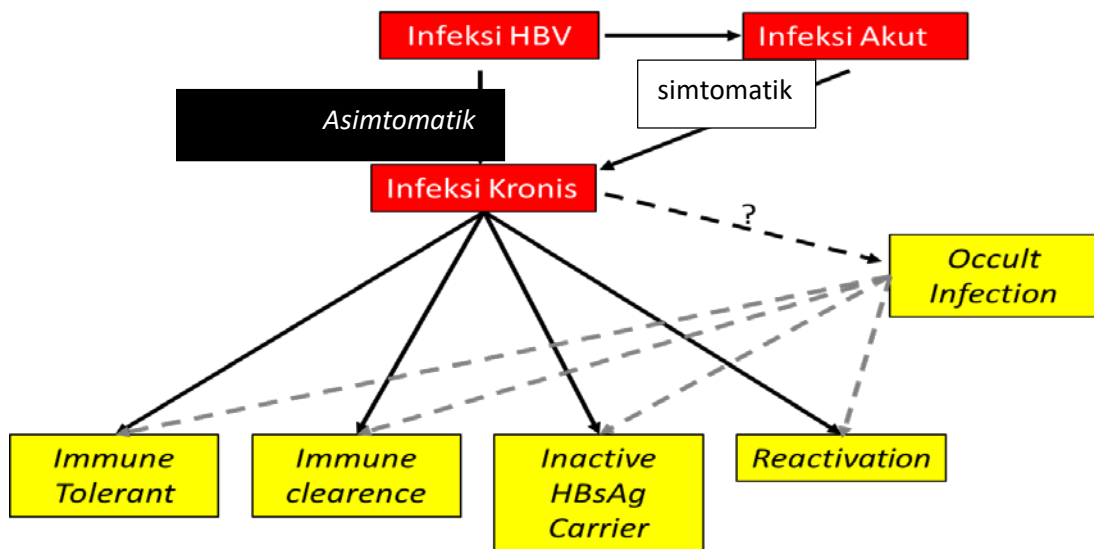
Masalah dalam memahami berbagai mutasi, timbulnya *overlapping* gen P domain polimerase dengan gen selubung virus gen S, sehingga perubahan pada urutan polymerase dapat mengubah urutan selubung dan sebaliknya.(Locarnini and Mason, 2006).

OBI adalah keadaan yang timbul dalam infeksi hepatitis B kronik , dimana HBsAg (-) dalam serum dan DNA-VHB (+) dalam jaringan hati atau serum.(Raimondo G and Pollicino T, 2016, Locarnini et al., 2015), definisi WHO(2017); HBsAg negatif dengan DNA-VHB positif dalam serum. Dalam Konsensus Hepatitis B kronik (APASL 2015) Terminologi HBV Kronik; meliputi terminologi klinis yang berhubungan dengan infeksi VHB dan telah diakui/dipakai sarana diagnosis, stadium penyakit dalam perjalanan alamiah, berhubungan dengan strategi pengobatan.(Sarin et al., 2016).



rkkan hal diatas dapat diklasifikasikan lima katagori:
erhubungan dengan infeksi VHB.

2. Berhubungan dengan perjalanan alamiah infeksi kronik HBV.
3. Berhubungan dengan respon terapi obat anti virus.
4. Berhubungan dengan resistensi obat nukleosida analog.
5. Berhubungan dengan Infeksi tersamar HBV (*OBI*).



Gambar 4. Perjalanan alamiah infeksi VHB. Dimodifikasi dari Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: update 2015.(Sarin et al., 2016)

Patogenesis timbulnya OBI , hubungan virus-pejamu dan lingkungan, OBI mempunyai makna klinis yang penting.(Samal et al., 2012, Pondé, 2013) Karena dengan adanya DNA HBV dalam darah berarti pasien ini sebenarnya sakit dan dapat menularkan virus ke orang sekitarnya kasus

darah.(Seo et al., 2015). Makna klinis lain yaitu adanya reaktivasi negatif bila mendapat obat immunosupresan pengobatan RA (timbul si HBsAg) keadaan lain lymfoma maligna, keganasan lain terapi



kemoterapi (reaktivasi OBI ec kemoterapi). Jadi dengan kondisi itu tidak terdeteksi dia sakit Hepatitis. Diperkirakan prevalensi *occult* hepatitis B adalah sekitar 5-90% dari penderita hepatitis kronik. Prevalensi OBI ini tergantung dari endemisitas Hepatitis B di daerah tertentu. Diperkirakan secara statistik terdapat 30% dari populasi asimtomatis. Patomekanisme *occult* Hepatitis B terjadi dari beberapa faktor yang termasuk faktor virus, pejamu, faktor luar (eksternal).

Salah satu **faktor virus** sebagai penyebab OBI adalah adanya mutasi gen pre-S/S, karena mutasi pada gen S mempengaruhi pengenalan 'a' dan mutasi pada pre-S1 dan/atau pre-S2 mempengaruhi pembentukan dan sekresi HBsAg kedalam serum yang menyebabkan tidak terdeteksinya dalam serum, Karena adanya retensi HBsAg dalam badan golgi hal ini menyebabkan kerusakan pada hepatosit.(Levrero and Zucman-Rossi, 2016, Ayub et al., 2013). Pembahasan OBI terutama adalah dalam kaitannya dengan deteksi, khususnya gen S, dan gen P yang tumpang tindih dengan gen S. Adanya mutasi mempengaruhi tingkat antigenisitas virus. **Faktor Pejamu** terutama adalah sistem imun humoral (anti-HBs), yang didapat setelah sembuh dari infeksi akut hepatitis B, atau yang didapat dari vaksinasi, adanya anti-HBs ternyata belum berarti bersifat protektif meskipun HBsAg tidak terdeteksi tetapi bila DNA-VHB masih positif berarti anti-HBs tidak protektif. **Faktor luar** yaitu faktor yang dapat

ngaruhi virus ataupun pejamu. Faktor luar yang berpengaruh
virus antara lain adalah faktor yang berpengaruh pada replikasi



VHB misalnya obat nukleotida analog, adanya epigenetic; metilasi dan astilasi (Samal et al,2012). Faktor luar lain yang berpengaruh terhadap pejamu adanya koinfeksi HIV dan atau HCV yang menyebabkan terganggunya sistem imun pejamu.

