

**POLA MUTASI GEN POLIMERASE DAN GEN *SURFACE*
VIRUS HEPATITIS B PADA PASIEN HEPATITIS B KRONIS
PRAPENGOBATAN ANALOG NUKLEOS(T)IDA**

*MUTATION PATTERN OF HEPATITIS B VIRUS POLYMERASE
AND SURFACE GENE IN NUCLEOSI(T)IDE ANALOGUE
PRETREATMENT CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS*

NORMA TIKU KAMBUNO



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2013**

**POLA MUTASI GEN POLIMERASE DAN GEN *SURFACE*
VIRUS HEPATITIS B PADA PASIEN HEPATITIS B KRONIS
PRAPENGOBATAN ANALOG NUKLEOS(T)IDA**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

NORMA TIKU KAMBUNO

kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

2013

TESIS

POLA MUTASI GEN POLIMERASE DAN GEN *SURFACE*
VIRUS HEPATITIS B PADA PASIEN HEPATITIS B KRONIS
PRAPENGOBATAN ANALOG NUKLEOS(T)IDA

Disusun dan diajukan oleh

NORMA TIKU KAMBUNO

Nomor Pokok P1506211007

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 22 Juli 2013

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Komisi Penasehat

Prof. dr. M. Nasrum Massi, Ph.D
Ketua

Prof dr. David H. Muljono SpPD Ph.D
Anggota

Ketua Program Studi
Biomedik

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D

Prof. Dr.Ir. M. Natsir Nessa,M.S

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Norma Tiku Kambuno
Nomor mahasiswa : P150621007
Program studi : Biomedik

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

Makassar, ... Juli 2013
Yang menyatakan

Norma Tiku Kambuno

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa, bagi Dialah segala kemuliaan. Atas penyertaan dan perkenaanNyalah tulisan dengan judul “Pola Mutasi Gen P dan S pasien hepatitis B kronis prapengobatan” dapat terselesaikan. Penelitian ini dimulai sejak Desember 2012 dengan mengumpulkan sampel, hingga Juni 2013 penulisan laporan. Perjuangan yang panjang akhirnya selesai dalam Rahmat dan kemurahanNya semata.

Kesempatan ini juga, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Prof dr. David H.Muljono PhD. Beliau adalah orang pertama yang memperkenalkan materi hepatitis B lewat kuliah umum di UNHAS, Nopember 2011. Beliau juga memberikan kesempatan untuk mengerjakan penelitian ini di lembaga Eijkman-Jakarta dengan segala fasilitas. Kiranya Tuhan akan membalas segala kebaikan beliau selama ini. Kepada Prof dr. Nasrum Massi PhD, atas bimbingan sejak semester 1 hingga akhir masa perkuliahan di biomedik. Atas segala kesempatan belajar, memotivasi dan mendorong untuk selalu memanfaatkan setiap peluang belajar yang ada. Kepada seluruh staf dosen Biomedik, dr Rizalinda Syahrier, Prof dr. Asaad Maidin, SpMK, Prof dr. M. Hatta, SpMK atas segala ilmu yang telah dibagikan semasa perkuliahan.

Tidak lupa penulis mengucakan terima kasih kepada staf Laboratorium Hepatitis Lembaga Eijkman, Rahmi Safitri, Turyadi, Dias Nursanti, Susan Irawati Ie, Erick Sidarta, Erica Darmawan, dr Meta Dewi

Theджа, dan dr Martono Roni, SpPK atas penyambutan yang hangat dan dukungan dan bantuannya selama saya berada di Eijkman Institute. Khususnya Korri El Khobar. Terima kasih sudah menjadi guru dan mentor yang baik, untuk segala perhatian dan ilmu yang sudah dibagikan. Bisa ada di Eijkman selama 3 bulan adalah kesempatan istimewa yang tidak akan penulis lupakan.

Teman seperjuangan peminatan Mikrobiologi 2011, Anita, Salsa Aengraeny, Arniati Samaila, Andini Umiati, Semmy Koemadji, Syahruni Hidayatullah, Suhartati, Alhawaris, Munawir, Fardi, Aslim Taslim dan Phia Asri, terima kasih atas segala kebersamaan selama masa perkuliahan. Kekompakan dan kerjasama kita adalah momen yang istimewa.

Kedua orangtua yang selalu menjadi motivator, bapak Drs Kambuno Samuel, Ibu Yosphina Limbong serta kakak dan adik-adik saya. Suami saya tercinta Senny Pellokila SE. M.Div, terima kasih atas dukungan dan doanya setiap saat dan anakku Pray Limbong Pellokila. Tak ada kata yang bisa menggantikan kebersamaan yang hilang selama masa perjuangan ini.

Makassar, Juli 2013

Norma Tiku Kambuno

ABSTRACT

NORMA T. KAMBUNO. *The Mutation Patterns of Gene P and S in the Patients of Chronic Hepatitis B of Nucleos(t)ide Analogue Pretreatment* (supervised by Nasrum Massi and David H. Muljono)

The aim of the research is to investigate the mutation patterns of gen P and the implication and gen s in gene s in the patients of chronic hepatitis B of NA pretreatment.

VHB genome was isolated from 100 patients of chronic hepatitis B which had not been treated by antivirus, 72 patients from Wahidin Sudirohusodo Hospital, Makassar, and 28 patients referred to Eijkman Institute, Jakarta. HVB DNA was used for detection, amplification, and sequencing of gene P. Nucleotida sequence was analyzed to find out mutation patterns of amino acid in polymerase and HBsAg, followed by bioinformatics analysis to predict HBsAg antigenicity index.

The results of the research indicate that the amplification of gene P. is successfully performed in 45 patients. There are 45 (91.1%) of them who have mutations in gene P. There are six mutations of rtV207M in 6 patients who are known related to resistance on lamivudine and have implications on the failure of hepatitis B vaccination. The most mutation on polymerase is rtL269I (39.02%) followed respectively by rtQ238H (34.14%), rtT332N (24.39%), and rtM145L (21.95%), while the most mutation on HBsAg is F200Y (31.42%) followed respectively by S210N (22,85%) and M213L (22.85%). Mutations of rtQ130E, rtS135F, rtN139K, rtY141F, and rtS213T in polymerase cause mutations of C121W, P127S, T131N, M133S, and S204R in HBsAg. There is no mutation of gene P related to resistance on antivirus in other patients, so it indicates that NA treatment can be given. There are mutations of HBsAg in positions of 121, 127, 131, 133, and 204 known to cause the change of conformation of determinant 'a' with the change of index value of antigenicity of HBsAg which is potential to influence the effectiveness of VHB diagnosis and vaccination.

Key words : gene P and S, chronic hepatitis B, pretreatment



ABSTRAK

NORMA T KAMBUNO. *Pola Mutasi Gen P dan S pada Pasien Hepatitis B Kronis Prapengobatan Nucleos(t)ide Analogue* (dibimbing oleh Nasrum Massi dan David Handojo Muljono).

Penelitian ini bertujuan mengetahui pola mutasi pada gen P dan implikasinya pada gen S pada pasien hepatitis B kronis prapengobatan NA.

Genom VHB diisolasi dari 100 pasien hepatitis B kronis yang belum pernah mendapat pengobatan antivirus, 72 dari RSUD Wahidin Sudirohusodo, Makassar, dan 28 yang dirujuk ke Lembaga Eijkman, Jakarta. DNA VHB digunakan untuk deteksi, amplifikasi dan sekuensing gen P. Sekuen nukleotida dianalisis untuk mengetahui pola mutasi asam amino pada polimerase dan HBsAg, dilanjutkan analisis bioinformatik untuk memprediksi indeks antigenisitas HBsAg.

Amplifikasi gen P berhasil dilakukan pada 45 pasien. Sebanyak 41 (91.1%) dari jumlah tersebut memiliki mutasi pada gen P. Pada 6 pasien ditemukan mutasi rtV207M yang dikenal terkait dengan resistensi terhadap lamivudine dan berimplikasi pada kegagalan vaksinasi hepatitis B. Mutasi terbanyak pada polimerase adalah rtI269I (39,02%), rtQ238H (34,14%), rtT332N (24,39%), dan rtM145L (21,95%). Adapun mutasi terbanyak pada HBsAg adalah F200Y (31,42%), S210N (22,85%) dan M213L (22,85%). Mutasi rtQ130E, rtS135F, rtN139K, rtY141F, dan rtS213T pada polimerase menyebabkan mutasi C121W, P127S, T131N, M133S, dan S204R pada HbsAg. Tidak ditemukannya mutasi gen P yang terkait dengan resistensi terhadap antivirus pada pasien yang lain menunjukkan bahwa pengobatan NA dapat diberikan. Adapun terdapat mutasi HBsAg pada posisi 121, 127, 131, 133 dan 204, yang dikenal menyebabkan perubahan konformasi determinan 'a', disertai perubahan nilai indeks antigenisitas HBsAg, yang berpotensi memengaruhi efektivitas diagnosis dan vaksinasi VHB.

Kata kunci: Gen P dan S, Hepatitis B kronik, prapengobatan



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	vi
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian	
1. Tujuan Umum	5
2. Tujuan Khusus	6
D. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Karakteristik Virus	7
B. Organisasi Genom Virus Hepatitis B	9
1. Gen S	11
2. Gen P	15
3. Gen C	16

4. Gen X	17
C. Replikasi Virus	18
D. Mutasi Virus	20
1. Mutasi pada gen Pre-S dan gen S	21
2. Mutasi pada gen Precore dan core	22
3. Mutasi pada gen P	24
4. Mutasi pada gen X	26
E. Perjalanan Alamiah Hepatitis B	27
F. Manajemen Hepatitis B	31
G. Kerangka Konsep	36
H. Skema Penelitian	39
I. Defenisi Operasional	40
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
A. Desain Penelitian	41
B. Waktu dan Lokasi Penelitian	
1. Waktu dan lokasi	41
2. Alat dan bahan penelitian	
a. Alat penelitian	41
b. Bahan penelitian	42
C. Populasi dan Sampel Penelitian	
1. Populasi dan sampel	42
2. Kriteria sampel	42
D. Cara Kerja	
1. Ekstraksi DNA	43
2. Amplifikasi DNA	44
3. Elektroforesis gel agarosa	47
4. Pemurnian fragmen DNA	48
5. Sekuensing DNA	50
E. Teknik Analisa Data.	52

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Karakteristik Demografi dan Virologi	54
2. Analisis Gen Polimerase	56
3. Mutasi pada Gen P yang mempengaruhi gen S	58
4. Analisis Gen S	
a. Mutasi pada gen S dan varian HbsAg	60
b. Makna yang terjadi substitusi asam amino HbsAg	62
c. Karakterisasi substitusi asam amino HbsAg	65

B. Pembahasan

1. Mutasi pada gen P	68
a. Pola yang berkaitan dengan resistensi antiviral	69
b. Pola substitusi yang belum diketahui maknanya	71
2. Mutasi pada gen P yang mempengaruhi gen S	73
3. Mutasi pada gen S	74
a. Pengelompokan menurut makna	74
1) Mutan yang berhubungan dengan permasalahan diagnostik	75
2) Mutan yang berhubungan dengan kegagalan imunisasi aktif	77
3) Mutan yang berhubungan dengan kegagalan imunisasi pasif	78
b. Karakterisasi asam amino HbsAg	79
1) Substitusi asam amino yang berdampak pada perubahan konfirmasi determinan 'a'	80
2) Substitusi asam amino yang berdampak pada perubahan indeks antigenesis	81
3) Substitusi asam amino yang belum diketahui dampaknya jika terjadi tunggal	82

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	83
B. Saran	84

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Nomor	halaman
1. Partikel Dane	9
2. Organisasi genom virus hepatitis B	11
3. Gen S menyandi 3 macam protein	14
4. Daerah Gen P terbagi atas 4 domain	16
5. Skema Replikasi Virus	20
6. Mutasi yang dikenal pada daerah <i>reverse transcriptase</i>	25
7. Empat fase perjalanan alamiah Hepatitis B kronis	29
8. Pasangan Primer yang spesifik yang digunakan pada <i>nested PCR</i>	46
9. Jumlah sampel yang mengalami substitusi asam amino pada polimerase	58
10. Mutasi gen P yang berkaitan dengan resistensi antivirus	60
11. Jumlah subjek dengan substitusi asam amino HBsAg	62
12. Posisi 6 mutasi yang berkaitan dengan kegagalan tes diagnostik	64
13. Posisi 8 mutasi yang berkaitan dengan kegagalan vaksinasi aktif	64
14. Posisi 2 mutasi yang berkaitan dengan kegagalan vaksinasi pasif	65

DAFTAR TABEL

Nomor	halaman
1. Daerah gen VHB, posisi nukleotida dan protein yang ditranslasinya	12
2. Sekuens primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA VHB	46
3. Demografi dan karakteristik virologi	55
4. Pola substitusi asam amino pada gen polimerase	57
5. Mutasi gen P yang mempengaruhi mutasi pada gen S	59
6. Substitusi asam amino HBsAg dengan jumlah subjek	61
7. Distribusi varian HBsAg yang ditemukan menurut kelompok makna	63
8. Karakterisasi 13 asam amino yang belum pernah dilaporkan	66
9. Prediksi perubahan indeks antigenisitas determinan 'a' HBsAg	67

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Surat persetujuan komisi etik	
2. Contoh surat persetujuan keikutsertaan (<i>inform consent</i>)	
3. Daftar subjek penelitian	93
4. Hasil elektroforesis gel agarosa	94
5. Elektroferogram hasil proses sekuensing DNA gen P	95
6. Hasil analisis bioedit sekuensing gen P	96
7. Hasil analisis bioedit sekuesing asam amino gen P	98
8. Hasil analisis bioedit sekuensing gen S	100
9. Hasil analisis bioedit sekuesing asam amino gen S	102
10. Hasil analisis penentuan genotype	103
11. Hasil analisis indeks antigenisitas dengan algoritma Jameson-Wolf algoritma	104
12. Grafik perubahan indeks antigenisitas	106

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
ALT	Alanine aminotransferase
Anti-HBcAg	<i>Anti Hepatitis B core antigen</i>
Anti-HBsAg	<i>Anti Hepatitis B surface antigen</i>
Anti-HBeAg	<i>Anti Hepatitis B e antigen</i>
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ENH	<i>'e' negative hepatitis B</i>
HBeAg	<i>Hepatitis B e antigen</i>
HBcAg	<i>Hepatitis B core antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
LHBs	<i>Large hepatitis B surface protein</i>
LR	<i>Low replicative</i>
mg	Miligram
MHBs	<i>Middle hepatitis B surface protein</i>
mL	Mililiter
mM	Milimolar
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	Polimerase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

Lanjutan daftar arti lambang dan singkatan

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>
UV	Ultra violet
V	Volt
VHB	Virus Hepatitis B
µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
µM	mikromolar

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hepatitis B adalah penyebab utama penyakit hati di seluruh dunia. Di seluruh dunia diperkirakan sekitar 2 milyar penduduknya telah terinfeksi oleh virus hepatitis B dan lebih dari 240 juta mengidap penyakit infeksi hati kronis. Sekitar 600.000 penderitanya meninggal setiap tahun akibat konsekuensi dari penyakit tersebut. Lebih penting lagi 75% dari pengidap tersebut tinggal di daerah Asia Pasifik, belahan bumi dimana Indonesia berada (Jang *et al*, 2004; Lavanchy, 2004). Kementerian Kesehatan melalui hasil risetnya pada tahun 2008 menunjukkan bahwa Indonesia memiliki prevalensi HBsAg 9,4% dan prevalensi anti-HBc 32,8%. Hal ini bermakna hampir sepertiga dari penduduk Indonesia pernah terinfeksi hepatitis B dan berdasarkan klasifikasi WHO, Indonesia masuk dalam kategori endemis tinggi (Kemenkes RI, 2008).

Penyebab hepatitis B adalah virus hepatitis B (VHB), suatu virus yang memiliki struktur dan organisasi genetik yang tersusun dengan kompak. Genom VHB merupakan genom kecil yang berupa sepasang rantai DNA yang berbentuk lingkaran dan beruntai ganda, untai luar berupa lingkaran penuh disebut untai negatif dan untai dalam berupa lingkaran tidak lengkap disebut untai positif. Untai luar memiliki 4 daerah

open reading frame (ORF); gen S menyandi selubung VHB, gen C menyandi HBcAg dan HBeAg, gen P menyandi enzim polimerase DNA dan gen X menyandi HBxAg. Keempat gen tersebut saling tumpang tindih sehingga digunakan menyandi lebih dari satu protein (Correy, 2008; Zoulim, 2009; Dienstag, 1995; Liaw, 2005; Locarnini, 2003; Tiollais, 1995).

Virus RNA lebih mudah bermutasi dibandingkan dengan virus DNA karena pada replikasi RNA terjadi proses transkripsi balik dimana sering terjadi penempatan nukleotida yang salah dan tidak ada mekanisme untuk membetulkan kesalahan tersebut (*proofreading*). Meskipun VHB merupakan virus DNA, proses replikasinya terjadi melalui bentuk antara (*RNA intermediate*) yang memerlukan enzim *reverse transcriptase*. Hal ini menyebabkan VHB memiliki kecepatan mutasi 10 kali lipat lebih besar dibandingkan virus DNA lainnya, yaitu sekitar 2×10^{-5} /nukleotida/tahun (Muljono, 2009; Fung, 2004). Sebagian mutan yang dihasilkan dapat bersifat letal, sedangkan sebagian lagi yang mampu bertahan akan berhadapan dengan sistem imunitas pejamu. Jika varian virus atau mutan tersebut dapat lolos dan tidak dikenali oleh sistem imun tubuh maka akan menjadi mutan/varian baru tanpa dipengaruhi oleh adanya terapi antiviral (Muljono, 2009; Fung, 2004).

Mutasi pada VHB merupakan masalah utama dalam penanganan hepatitis B baik pada kondisi prapengobatan maupun saat proses pengobatan sedang berlangsung. Dampak dari adanya mutasi adalah kenaikan tingkat virulensi, yang antara lain ditunjukkan dengan adanya

kenaikan tingkat replikasi virus, kegagalan deteksi pada pemeriksaan laboratorium dan adanya resistensi terhadap antivirus yang digunakan (Hunt *et al*, 2000; Dienstag, 1999; Dienstag, 1995; Lok, 2003; Pei *et al*, 2005; Torresi, 2002). Mutasi yang terjadi pada kondisi prapengobatan juga menjadi masalah penting untuk pemilihan terapi antiviral yang tepat berikutnya setelah klinisi memutuskan bahwa pasien berada pada kondisi membutuhkan terapi (Dienstag, 1999; Dienstag, 1995; Lok, 2003).

Mutasi VHB dapat terjadi pada seluruh gen yang ada. Struktur yang kompak pada VHB menunjukkan adanya tumpang tindih antara gen P dan gen S. Akibatnya perubahan pada nukleotida gen P dapat disertai dengan perubahan pada nukleotida gen S dan perubahan pada protein HBsAg (Liaw, 2000; Liaw, 2004; Fattovich, 2004; Dandri, 2012; Torresi, 2002). Mutasi pada gen P yang menyebabkan resistensi pada lamivudin dapat menyebabkan substitusi asam amino pada gen S dan akan mengurangi efektivitas perlindungan dari vaksin VHB atau hepatitis B imunoglobulin (Torresi, 2002). Mutasi pada bentuk YMDD, rtM204V dan rtM204I menghasilkan substitusi pada kodon 195 dan 196 dari permukaan protein (sI195M dan sW196S) dan perubahan pada rtL180M menyebabkan adanya mutasi diam pada protein S (Torresi, 2002).

Resistensi lamivudin juga terlihat pada pasien karier asimtomatik tanpa pengobatan atau pasien hepatitis B kronis (Kobayashi, 2001; Huang, 2005; Matsuda, 2004). Resistensi ini berhubungan dengan perubahan struktural pada gen dari enzim polimerase. Resistensi

lamivudin juga dapat meningkatkan potensi resistensi silang terhadap nukleosida analog lainnya dan meningkatkan kepekaan terhadap entecavir, sehingga membatasi pilihan pengobatan (Locarnini, 2005). Pengujian untuk mengetahui adanya mutasi resistensi obat pada pasien tertentu akan berguna untuk penentuan terapi obat alternatif.

Telah banyak hasil penelitian yang mengusulkan pemeriksaan mutasi resistensi obat sebelum pemberian pengobatan antiviral untuk menyeleksi spesies virus yang dominan yang sesuai dengan pemilihan terapi (Fung, 2004; Locarnini, 2009). Kobayashi (2001) dan beberapa peneliti dari Jepang telah melaporkan adanya tingkat resistensi lamivudin pada 5 dari 18 (28%) pasien yang belum diobati.

Belum ada data penelitian mengenai pola mutasi gen polimerase dan gen S pasien hepatitis B pengobatan pada RSUD Wahidin Sudirohusodo. Hal itulah yang mendorong kami untuk melakukan penelitian ini dengan harapan akan menjadi sumber informasi dan sebagai bahan evaluasi pasien kronis hepatitis virus B yang menunjukkan adanya mutasi pada gen P dan gen S dan perencanaan pengobatan yang sesuai sehingga dapat mencegah komplikasi resistensi dan dapat meningkatkan efektivitas pengobatan.

Dalam penelitian ini, akan dilakukan pemeriksaan kualitatif DNA VHB. Akan dilakukan sekuensing produk PCR VHB mengidentifikasi adanya mutasi pada gen S dan gen P. Hasil sekuensing kemudian dianalisis lebih lanjut, untuk melihat adanya perubahan asam amino pada

Polimerase yang disandi oleh gen P, dan HBsAg yang disandi oleh gen S. Metode ini diharapkan dapat mendeteksi secara sensitive dan spesifik, pola mutasi gen P dan gen S pada pasien hepatitis B kronis prapengobatan.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimanakah pola mutasi gen polimerase (P) VHB pada pasien hepatitis B kronis yang belum mendapatkan pengobatan?
2. Bagaimanakah dampak mutasi gen polimerase pada gen S VHB pada pasien hepatitis B kronis yang belum mendapatkan pengobatan?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum:

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi pola mutasi gen P VHB pada pasien hepatitis B kronis yang belum pernah mendapat terapi antivirus, dan melihat dampak mutasi tersebut pada gen S VHB yang tumpang tindih dengan gen P.

2. Tujuan khusus:

- a. Mendeteksi mutasi gen P VHB pada pasien hepatitis B kronis yang belum diterapi dengan *nested* PCR, sekuensing dan analisis sekuens gen

- b. Mendeteksi perubahan pada gen S yang terjadi akibat mutasi gen P VHB dengan analisis sekuens nukleotida
- c. Menilai perubahan protein gen S dan akibatnya pada indeks antigenisitas protein tersebut dengan menggunakan analisis bioinformatika

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian secara teoritis yaitu:

1. Memberikan informasi genetik sekuens genom VHB dari pasien hepatitis B kronis prapengobatan di Makasar yang dapat dipublikasi di *GenBank* sehingga dapat memberikan kontribusi dalam bidang kesehatan dunia.
2. Memberikan masukan bagi dokter tentang variasi genetik genom VHB yang resisten terhadap antivirus tertentu sehingga dapat memberikan pengobatan yang tepat dan akurat pada penderita.
3. Evaluasi pasien hepatitis B kronis yang mengalami mutasi pada gen P dan gen S VHB sebagai acuan untuk perencanaan pengobatan yang sesuai, sehingga dapat mencegah komplikasi dan meningkatkan efektivitas pengobatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Karakteristik Virus

Penemuan virus hepatitis B diawali oleh Blumberg dkk., yang pada tahun 1965 melakukan penelitian untuk mencari antibodi yang timbul terhadap suatu lipoprotein. Mereka menemukan bahwa pasien hemofilia yang sering menerima transfusi darah memiliki suatu antibodi yang bereaksi dengan antigen yang berasal dari seorang aborigin Australia. Antigen ini kemudian dinamakan sebagai antigen Australia, dan sekarang disebut sebagai HBsAg. Pada tahun 1970 Dan dkk., untuk pertama kalinya berhasil mengamati partikel HBsAg dan partikel virus hepatitis B (VHB) utuh, yang selanjutnya dinamakan partikel Dane, dengan menggunakan mikroskop elektron (Soemoharjo, 2008).

Prince, pada tahun 1968, kemudian melaporkan adanya Hepatitis B *surface antigen* (HBsAg) pada penderita serum hepatitis yang pada akhirnya dikenal sebagai virus hepatitis B dan identik dengan antigen Australia. VHB merupakan virus DNA untai ganda terkecil yang tergolong dalam genus *Orthohepadnavirus*, keluarga *Hepadnaviridae*. VHB menyebabkan infeksi kronis terutama pada mereka yang terinfeksi saat bayi, VHB merupakan faktor utama pada perjalanan akhir penyakit hati dan timbulnya karsinoma hepatoseluler pada orang-orang tersebut (Wang, 1993; Jawetz, 2008).

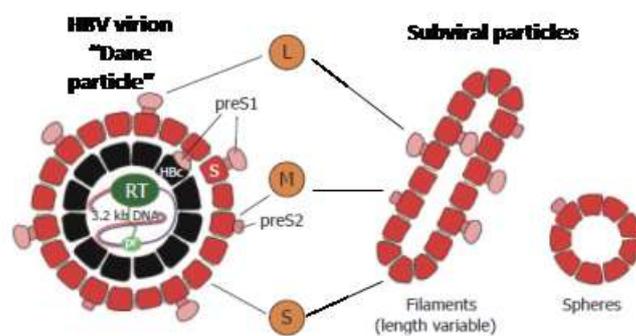
Lapisan pertama dari permukaan virus merupakan lapisan selubung luar (*envelope*) dengan ketebalan 7 um terdiri dari antigen *surface* hepatitis B (HBsAg) dan lapisan luar merupakan nukleokapsid berdiameter 27 nm, berisi antigen *core* hepatitis B (HBcAg). Komposisi selubung luar terdiri atas protein, karbohidrat dan lipid dengan molekul glikoprotein di antara komponen lipid.

Selubung luar virion terdiri atas 3 jenis protein yang disebut protein kecil, sedang dan besar, yang ketiganya disandi oleh gen yang berbeda. Di dalam nukleokapsid terdapat molekul DNA untai ganda yang sirkuler dan DNA polimerase yang mempunyai aktivitas protein-kinase. Virus dengan komponen lengkap atau virion dikenal sebagai partikel Dane, sesuai dengan nama orang yang pertama kali menemukannya lewat mikroskop elektron. Keberadaan virion di dalam serum menunjukkan adanya multiplikasi aktif virus di dalam sel hepar (Tiollais dkk., 1995; Pei dkk., 2005; Lok, 2003; Torresi, 2002; Look dkk., 2000).

Selain partikel Dane, di dalam darah dapat pula dideteksi adanya virus yang tidak lengkap, tanpa molekul DNA yang disebut sebagai partikel virus non infeksius karena hanya berisi komponen HBsAg saja. Partikel ini mempunyai ukuran dan bentuk yang bervariasi, dapat berbentuk sferis dengan diameter antara 18-25 nm atau tubular dengan diameter 20 nm dan panjang hingga 500 nm (Gambar 1). Pada beberapa kasus infeksi kronis hanya bentuk ini yang ditemukan sedangkan pada orang yang terinfeksi VHB akut walaupun ditemukan partikel Dane tetapi partikel virus non infeksius jauh lebih tinggi dibanding partikel Dane. Perbandingannya dari

1000 hingga 1 juta partikel virus non infeksius berbanding dengan 1 partikel Dane. (Lok, 2003; Torresi, 2002; Look dkk., 2000).

Pada orang yang terinfeksi VHB, kadar virion di dalam serumnya bervariasi dari hanya beberapa virion hingga 100 juta virion per mililiter serum (Weinberger dkk, 2000). Tingginya kadar virion di dalam serum membuat pemeriksaan HBsAg menjadi mudah dan dengan alasan yang sama dikembangkan vaksin plasmid-*derived* berisi HBsAg untuk mendapatkan imunitas terhadap virus ini.



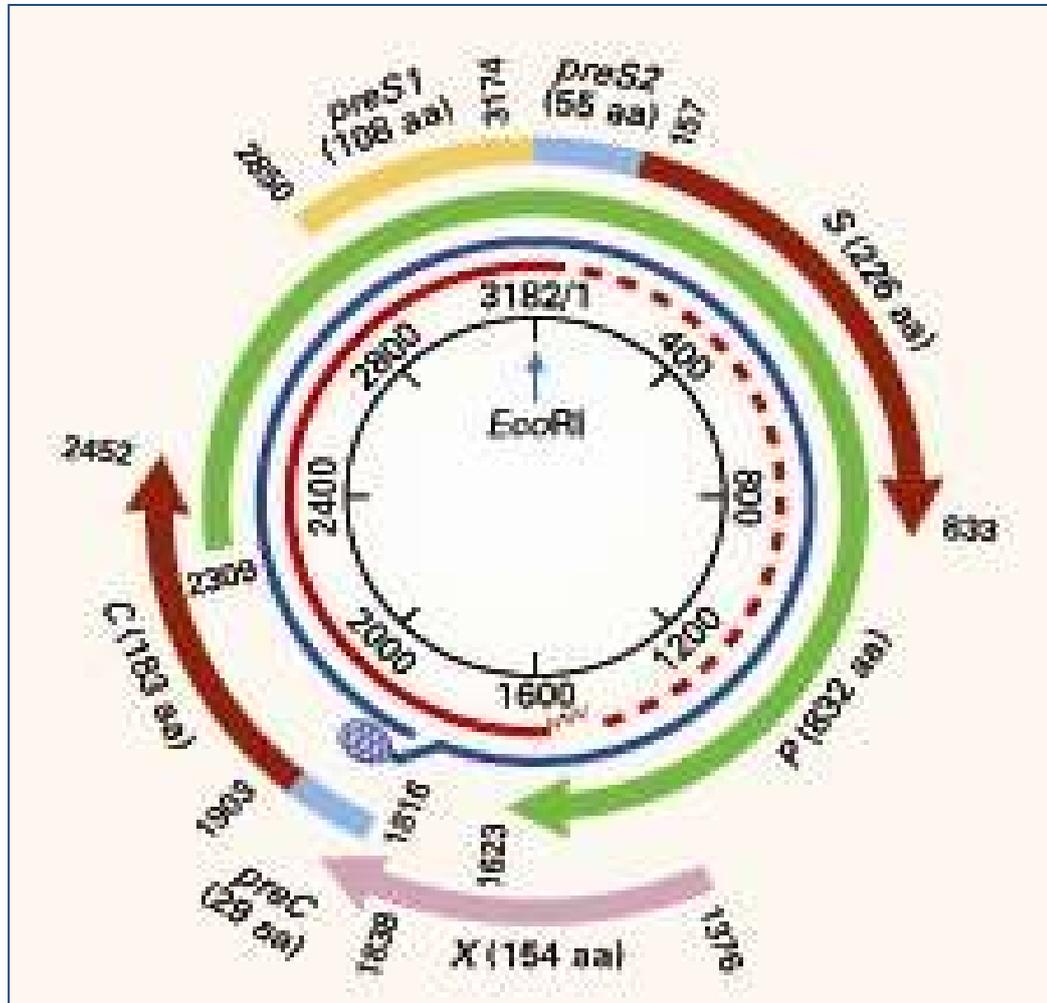
Gambar 1. Partikel Dane, partikel virus yang infeksius lengkap dengan VHB DNA sedangkan partikel filamen dan sferis adalah partikel non infeksius tanpa VHB DNA. Sumber ; Thomas C.H dkk., 2005

B. Organisasi Genom Virus Hepatitis B

VHB mempunyai DNA berbentuk lingkaran, tidak mempunyai intron dan terdiri atas 3200 nukleotida yang berfungsi menyandi protein virus. Untai luar berupa lingkaran penuh disebut sebagai untai negatif (*negative chain*) dan untai dalam berupa lingkaran tidak lengkap disebut untai positif (*positive chain*). Semua informasi genetik disimpan dalam 4 *open reading frame* (ORF) yang terdapat pada untai negatif.

Keempat ORF, gen S, C, P dan X menyandi protein struktural dan fungsional dari virus. Gen S menyandi protein selubung VHB (HBsAg dan 2 protein lainnya), gen C menyandi HBcAg dan suatu protein yang terdapat dalam serum (HBeAg), gen P menyandi enzim polimerase DNA, dan gen X menyandi HbxAg (Gambar 2) (Locarnini, 2003; Tiollais, 1995). Diantaranya, gen S luar tumpang tindih dengan gen polimerase (Locarnini, 1998).

Circular, Double-stranded DNA



Gambar 2. Organisasi genom virus hepatitis B. Genom VHB berukuran 3,2 kpb dan terdiri dari untai ganda tidak lengkap dimana materi genetiknya tersimpan dalam 4 *open reading frames* (ORFs) yang terdapat pada untai negatif. Keempat ORFs tersebut yaitu gen S, gen C, gen X dan gen P masing-masing menyandi protein struktural dan fungsional virus. Sumber : Zolium,2009

1. Gen S

Daerah ORF pertama merupakan daerah gen S (*surface*) terletak pada nukleotida 2848 hingga nukleotida 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-S1, Pre-S2 dan S (Gambar 2). Regio gen S terletak pada nukleotida 155 hingga nukleotida 833, regio gen Pre-S2 terletak pada nukleotida 3172 hingga nukleotida 155 dan regio gen Pre-S1 terletak 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, 2000; Kann, 2002).

Tabel 1. Daerah gen VHB, posisi nukleotida dan protein yang ditranslasinya

Daerah gen	Posisi nukleotida	Protein	Jumlah Asam amino	Berat molekul (kDa)
Pre-S1	2848 – 3172	Pre-S1	128	39
Pre-S2	3172-155	Pre-S2	55	33
S	155-833	HBsAg	226	24
Pre-C + C	1814-2450	HBeAg	214	15
C	1901-2450	HbcAg	183	19
P	2357-1621	DNA polimerase	832-845	92
X	1374-1836	HbxAg	145-154	16

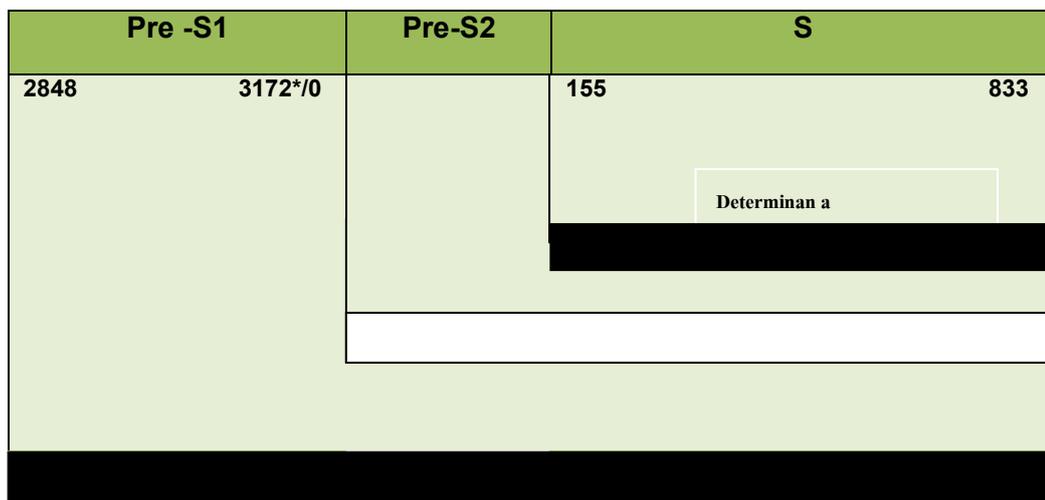
Gen S terbagi menjadi regio Pre-S1, Pre-S2 dan S sedangkan gen C terbagi menjadi regio Pre-C dan C (Hoofnagle, 1995).

Protein utama selubung virus yang 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 tersebut kemungkinan 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 (Weinberger dkk., 2000; Chiou dkk., 1997).

Determinan 'a' adalah antigen utama yang dimiliki HBsAg, determinan antigenik, yang 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 (Weinberger dkk., 2000; Chiou dkk., 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 *in vitro* menunjukkan penurunan antigenisitas secara bermakna, bila residu sistein pada posisi tersebut digantikan oleh residu serin. Hal ini memperlihatkan bahwa asam

amino tersebut berperan penting dalam mengekspresikan antigenisitas protein (Chiou, 1997).

Determinan 'a' terdapat pada ketiga jenis protein (besar, sedang dan kecil) yang disintesis gen S dan terdapat pada semua tipe VHB. Perubahan asam amino di daerah determinan 'a' akan merubah konformasi lengkung ganda ini dan mengakibatkan perubahan antigenitas HBsAg sehingga antibodi yang timbul setelah vaksinasi atau setelah terinfeksi tidak mampu berikatan dengan antigen ini (Chiou, 1997). Lebih lanjut, determinan 'a' terletak tumpang tindih dengan regio katalitik utama dari protein polimerase VHB (asam amino 454-524) yang dikenal dengan domain A dan B (Bartholomeus, 1997). Akibatnya, perubahan pada asam amino di determinan 'a' HBsAg dapat berdampak pada domain katalitik dari gen polimerase dan sebaliknya (Locarnini, 1998).



Gambar 3. Gen S menyandi tiga macam protein (1) Protein besar (*large protein*, 400 aa) disandi oleh regio pre-S1, pre-S2 dan S, (2) Protein sedang (*middle protein*, 281 aa) disandi oleh regio pre-S2 dan S dan (3) Protein kecil (*small protein* = HBsAg, 226 aa) disandi oleh gen S. Pada bagian tengah regio S terdapat regio penting untuk antigenisitas HBsAg yakni determinan 'a' (asam amino 124-147) (Sumber ; Howard, 1995).

2. Gen P

Daerah ORF berikutnya adalah daerah gen P (*polymerase*) yang terletak 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 (Harrison, 1999).

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, 1999).

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, 2003; Tiollais, 1995)

HBeAg dan HBcAg merupakan jenis protein yang berbeda, dimana HBeAg bersifat terlarut sedangkan HBcAg berupa partikel. Partikel HbcAg merupakan target penting dalam pengenalan respon imun terhadap infeksi VHB. Antibodi terhadap HBcAg (anti-HBc) merupakan satu-satunya petanda seseorang pernah atau sedang terinfeksi VHB (Feitelson, 1994). HBcAg dan HBeAg mempunyai epitop yang berbeda sehingga antibodi terhadap HbeAg (anti-HBe) tidak dapat berikatan dengan HBcAg dan begitu pula sebaliknya. Namun, hasil percobaan dengan mencit menunjukkan bahwa kedua protein ini saling berbagi epitop pengenalan sel T, sehingga sel T sitolitik yang mengenali HBcAg dapat pula mengenali HBeAg (Hoofnagle, 1995).

4. Gen X

Gen X terletak pada nukleotida 1374-1836. Gen X merupakan daerah gen terkecil dan menyandi antigen x hepatitis B (HBxAg), yang terdiri dari 145 hingga 154 asam amino (Tabel 1). HBxAg ditemukan dalam serum dan hati penderita yang kadar virusnya tinggi sehingga timbulnya antibodi terhadap HBxAg (anti-HBx) dihubungkan dengan hilangnya virus tipe liar (*wild type*). HBxAg juga berfungsi sebagai faktor transaktivasi virus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein HBx yang tidak mempunyai asam amino ke-24 pada ujung karboksil tidak mampu berfungsi sebagai transaktivator transkripsi VHB (Runkel dkk., 1992). Ekspresi HBxAg yang persisten dan tinggi pada penelitian menggunakan mencit transgenik juga

dihubungkan dengan perkembangan dari tumor hati (Takada dkk., 1994; Feitelson, 1994).

C. Replikasi virus

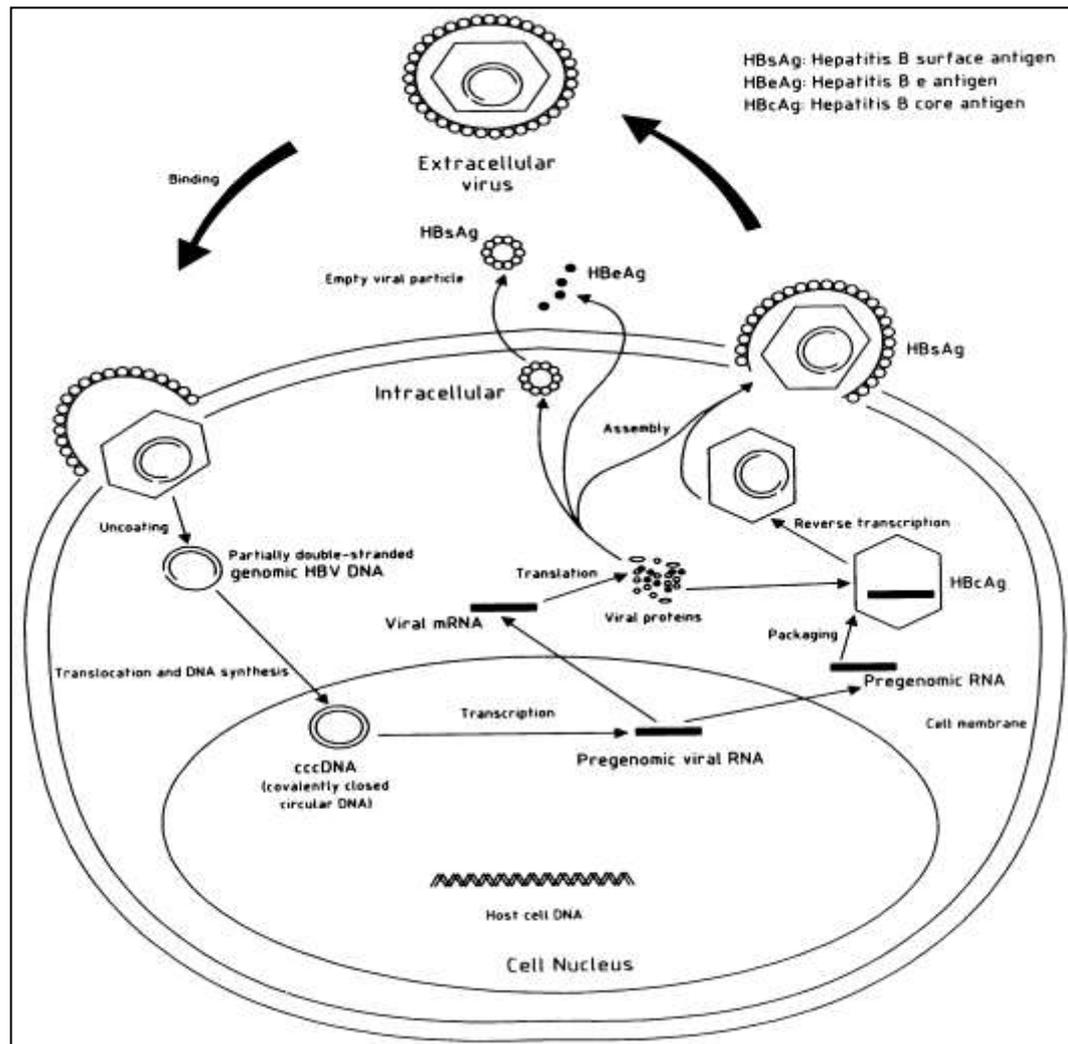
Replikasi VHB terjadi di hepatosit. Sistem replikasi ini merupakan suatu proses rumit, yang banyak melibatkan faktor-faktor yang terdapat pada virus itu sendiri maupun pejamu. Proses masuknya VHB ke dalam sel hati dimulai dengan menempelnya partikel Dane pada sel hati. Ada dua cara penempelan virus pada sel hati, yaitu melalui reseptor spesifik pada permukaan sel hati yang mengenali dan mengikat daerah pre-S1 dari HBsAg atau melalui reseptor *polymerized human serum albumin* (pHSA) yang mengenali HBsAg di daerah pre-S2 (Hoofnagle, 1995). Virus memasuki sitoplasma setelah melepaskan selubung protein (*uncoating*) selanjutnya nukleokapsid menghilang sehingga yang tertinggal adalah DNA dalam bentuk *relaxed circular* (rcDNA) yang akan memasuki inti sel hati dengan proses yang belum diketahui (Locarnini, 2003).

rcDNA akan mengalami perubahan menjadi cccDNA didalam nukleus (Gambar 5). rcDNA yang masuk berbentuk *partially double stranded* yakni DNA yang tidak sama panjang. rcDNA VHB terdiri atas untai ganda, untai negatif merupakan untai lengkap dan untai positif yang merupakan untai yang tidak lengkap. Kedua untai akan mengalami pemanjangan menjadi untai lengkap yang sama panjang dan keduanya akan diligasi membentuk *covalently closed circular* (ccc) DNA. cccDNA akan menetap di dalam inti sel hati sehingga infeksi dapat bertahan dan

berfungsi sebagai cetakan proses transkripsi, membentuk dua macam mRNA. mRNA yang pertama akan masuk kembali ke sitoplasma dan akan mengalami translasi menjadi protein selubung HBsAg yang terdiri dari LHbs, MHbs dan SHbs (Liaw, 2005; Kann, 2002).

mRNA yang kedua yang disebut sebagai *pregenomic viral RNA* (pgRNA) akan ditranslasi menjadi nukleokapsid (HBcAg), HBeAg dan enzim DNA-polimerase. pgRNA juga akan ditranskripsi kembali menjadi DNA oleh enzim *reverse transcriptase DNA-pol* di dalam nukleokapsid yang baru terbentuk. Pada proses ini tidak ada fungsi kontrol *proofreading* sehingga dapat terjadi kesalahan acak pada inkorporasi basa-basa ke dalam untai DNA sebagai hasil replikasi. Tingkat kesalahan pembacaan menjadi tinggi sehingga menyebabkan kecenderungan mutasi genom VHB (Liaw, 2005; Kann, 2002).

DNA VHB yang baru terbentuk akan mengalami proses enzimatik menjadi rcDNA, yang kemudian akan dikemas di dalam nukleokapsid lengkap yang diselubungi HBsAg, kemudian disekresikan melalui retikulum endoplasma keluar sel menjadi virus yang siap menginfeksi sel hati lain (Locarnini, 2003; Ghani, 1998) (Gambar 5). Sebagian lagi dari rcDNA akan kembali masuk ke dalam nukleus untuk diubah menjadi bentuk cccDNA. cccDNA akan bertahan di dalam inti sel hati dan tidak akan terjangkau oleh sistem imun dan obat-obat antiviral. cccDNA merupakan kode genetik yang sewaktu-waktu dapat menyandi protein VHB sampai terbentuknya partikel VHB baru (Locarnini, 2003; Kann, 2002; Kidd-Ljunggren, 1999) .



Gambar 5. Skema replikasi virus hepatitis B dalam sel hepatosit. (Locarnini dkk, 2003)

D. Mutasi Virus

Sistem replikasi genom VHB yang mengalami transkripsi balik menyebabkan mudah terjadinya mutasi pada susunan genomnya. Pada saat transkripsi balik yang berperan adalah enzim polimerase virus dan enzim ini tidak mempunyai kemampuan *proofreading* sehingga tidak mampu memperbaiki pembacaan basa yang salah. Hal ini menyebabkan munculnya tingkat mutasi yang tinggi pada VHB. Keadaan ini ditunjang

oleh struktur genom VHB yang kompak dimana sebagian ORF yang menyandi protein virus saling tumpang tindih (Pei dkk., 2005; Lok, 2003; Torresi, 2002; Look dkk., 2000).

Kebanyakan dari mutan VHB baru tidak dapat hidup atau gagal berkompetisi dengan populasi *wild type* (wt=tipe normal). Namun, adanya tekanan lingkungan, misalnya imunoterapi dan pemberian analog nukleosida yang bekerja dengan menghambat aktivitas polimerase, maka populasi virus wt akan tertekan hingga ke tingkat yang tidak terdeteksi dan membuat strain mutan VHB menjadi populasi yang lebih dominan (Coleman, 2006). Pada tahun 1987 Okamoto dkk. melaporkan 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 X sebesar $5,3 \times 10^{-5}$ dan untuk daerah P sebesar $2,2 \times 10^{-5}$ substitusi/nukleotida/tahun.

1. Mutasi pada gen Pre-S dan gen S

VHB dengan variasi genetik khususnya yang memiliki mutasi pada regio gen S lebih bersifat patogenik dibanding virus tipe liar. Virus mutan ini bahkan diperkirakan turut berperan dalam patogenesis hepatitis B fulminan (Hsu dkk., 1997; Bartholomeuz dkk., 2001; Kalinina dkk., 2001). Penelitian *in vitro* (Kalinina dkk., 2001) menunjukkan bahwa virus mutan ini mampu mensekresikan partikel virus sekitar 30% lebih banyak dibanding virus tipe liar dalam kondisi lingkungan yang sama. Keadaan demikian

menggambarkan besarnya masalah infeksi VHB termutasi di masa mendatang dan adanya laporan kenaikan prevalensi virus termutasi pada determinan 'a' (Hsu dkk.,1999).

Sebuah penelitian di Spanyol melaporkan adanya perubahan sekuens determinan 'a' yang terdapat pada donor darah, yaitu substitusi asam amino pada posisi 143 dan 144 yang ditemukan pada 7 peserta donor darah. Mutasi ini menyebabkan virus lolos dari saringan menggunakan antibodi monoklonal terhadap determinan 'a' (Wallace, 1994). Pollicino, 1997 juga melaporkan mutasi G145R yang merupakan variasi mutasi yang sering dijumpai, walaupun variasi lain pada tempat ini bisa dijumpai. Berdasarkan laporan-laporan penelitian yang telah dilakukan perubahan pada determinan 'a' baik substitusi, delesi atau insersi berhubungan dengan perubahan yang juga terjadi di daerah pre-S.

2. Mutasi pada gen Precore dan core

Gen ini diketahui mengatur program sintesis protein inti atau kapsid. Regio pre-C yang mendahului gen C ikut mengatur program sintesis peptida hidrofobik yang berperan dalam penyatuan partikel virus. Regio pre-C dan gen C juga mengatur program sintesis protein inti yaitu HBeAg. Adanya regio pre-C menyebabkan HBeAg dapat berikatan dengan retikulum endoplasmik dan berakibat dapat disekresikannya HBeAg. HBeAg dalam darah menunjukkan bahwa VHB sangat infeksius dan merupakan petanda infektivitas sera (Wright, 2004; Scalm, 2009).

Pada beberapa keadaan di mana terjadi serokonversi HBeAg menjadi anti-HBe dapat ditemukan VHB DNA dalam darah. Hal tersebut diduga disebabkan karena cacat pada regio Pre-C (*Pre C region defects*) dan karenanya terjadi perubahan susunan asam amino sehingga HBeAg tidak dapat diekspresikan (Bonino & Brunetto, 1993).

Salah satu akibat dari adanya mutan *precore* adalah ketidakmampuan VHB untuk memproduksi HBeAg walaupun VHB ada dalam fase replikatif dan pada keadaan tersebut justru anti-Hbe positif. Dengan demikian pada mutan ini sistem HBeAg/anti-Hbe tidak dapat dipakai untuk menilai status replikasi VHB. Dalam hal ini hanya penanda VHB DNA yang dapat dipakai. Seorang penderita infeksi VHB dengan mutan *precore* dapat menderita hepatitis akut ataupun kronik dan dapat pula asimtomatik. Beberapa peneliti bahkan melaporkan adanya kasus mutan *precore* dengan hepatitis fulminan (Qi dkk., 2004; Tenney dkk., 2004; Lai dkk., 2005; Sheldon dkk., 2005).

Ada dua kelompok mutasi yang sudah umum dikenal dan berhubungan dengan ekspresi HBeAg. Pertama mutasi G1896A pada regio *precore* yang terletak pada basa ke-1896, perubahan basa 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. Mutasi kedua yang mempengaruhi ekspresi HBeAg adalah yang terjadi pada daerah *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 (Lim, 2006; Locarnini, 2004).

Studi yang dilakukan Turyadi, 2010 melaporkan bahwa prevalensi mutasi G1896A berbeda pada fase hepatitis B kronis di Indonesia, dan ditemukan lebih sering pada usia lebih tua dan fase lanjut. Mutasi A1762T/G1764A berkorelasi dengan genotipe dan subtipe VHB, namun sebaliknya tidak berhubungan dengan fase infeksi. Studi ini mengindikasikan bahwa mutasi BCP tidak berhubungan dengan serokonversi HBeAg pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis.

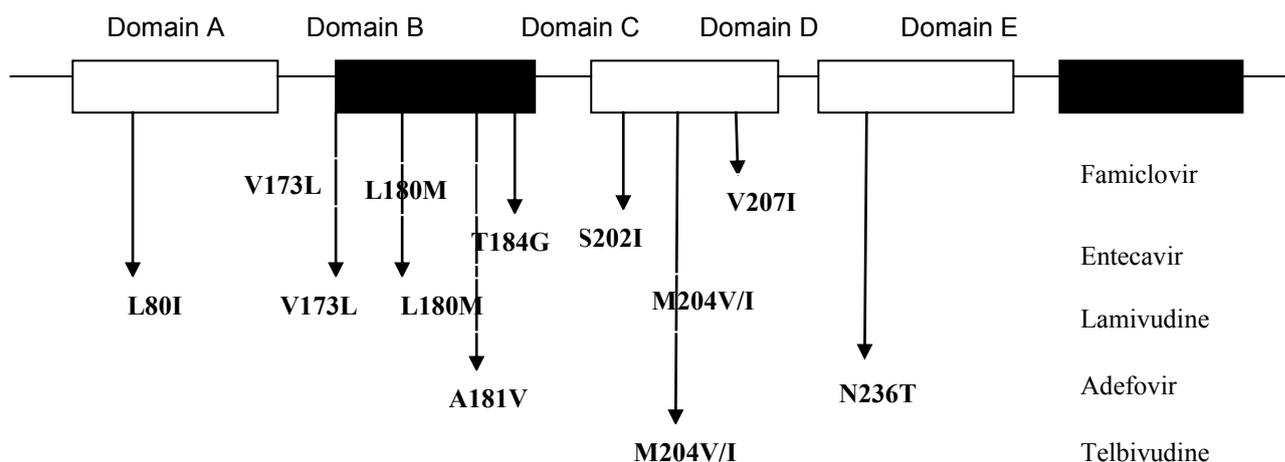
3. Mutasi pada gen P

Mutasi pada gen P dapat terjadi pada penderita infeksi VHB yang mendapat terapi obat antiviral misalnya lamivudin. Pada penderita yang mendapat lamivudin, mutasi dapat terjadi pada motif YMDD (*tyrosine-methionine-aspartate-aspartate*) yang merupakan bagian yang aktif dalam fungsi *reverse transcriptase* dan menjadi titik tangkap lamivudin. Bila terjadi mutasi pada motif YMDD, maka lamivudin harus diganti dengan analog nukleosida lainnya yang titik tangkapnya bukan pada motif YMDD seperti adefovir (Soemoharjo, 2008).

Resistensi terhadap penggunaan lamivudin umumnya mulai terjadi setelah 8 bulan pengobatan (Lau, 2000; Chayama, 1998). Mutasi resistensi lamivudin mempengaruhi bentuk YMDD dari domain katalitik dari DNA polymerase VHB. Perubahan yang paling umum dijumpai pada kodon rt204 adalah perubahan asam amino dari M (metionin) ke V (valin) (rtM204V)

atau dari M ke I (isoleusin) (rtM204I). Situs penting mutasi lain terletak pada posisi 24 asam amino (aa) di hulu dari motif YMDD, dimana leusin (L) menggantikan metionin (M) (rtL180M) (Heo J, 2004; Locarnini, 2005; Lau, 2000, Hsieh, 2009).

Masalah tambahan dalam memahami berbagai mutan selama pengobatan adalah bahwa *overlapping* DNA antara domain polimerase dengan gen selubung virus, khususnya gen S, dan perubahan pada urutan polimerase dapat mengubah urutan pada selubung/*envelope*, dan sebaliknya (Locarnini, 2006, Hsieh, 2009).



Gambar 6. Mutasi resistensi antiviral yang umum dikenali pada daerah *reverse transcriptase* yang telah diidentifikasi (Fung & Lok, 2004).

Selain mutasi M204V/I yang umum dikenali pada resistensi lamivudin, mutasi yang juga muncul selama proses terapi adalah L80I, V173L dan L180M. Mutasi pada bentuk YMDD, rtM204V dan rtM204I menghasilkan substitusi pada kodon 195 dan 196 dari protein selubung yang menghasilkan sI195M dan sW196S (Fung & Lok, 2004). Resistensi

terhadap antiviral telbivudin dikode oleh M204V/I, sedangkan resistensi pada antiviral adefovir dikode oleh A181V dan N236T pada domain D.

Resistensi pada entecavir telah dilaporkan pada 2 orang pasien dengan resistensi lamivudin dimana pasien tersebut telah menerima lamivudin selama 80-100 minggu (Locarnini, 2004). Beberapa mutasi yang telah dideteksi menyebabkan resistensi terhadap entecavir adalah rt169T, rtM250V, rtT184G dan rtS202I (Fung & Lok, 2004).

4. Mutasi pada gen X

Regio ini mengatur program sintesis protein X yang terdiri dari 145-154 asam amino. Fungsi produk proteinnya hingga kini belum diketahui dengan jelas, namun protein X diduga berperan dalam merangsang penampilan semua gen VHB yaitu dengan cara mengadakan interaksi dengan suatu urutan DNA spesifik yang terdapat dalam genom VHB. Produk protein gen X diduga juga berperan dalam proses tumoregenik fase dini. Regio P saling tumpang tindih dengan ketiga regio yang lain (Putra, 1997).

Mutasi pada gen X sejak lama telah menjadi perhatian para ahli. Telah dilaporkan adanya mutasi pada nukleotida 130 dan 131 yang ditemukan pada karier, tetapi tidak didapati pada penderita yang sembuh dari hepatitis akut. Disamping itu, sering dilaporkan hilangnya beberapa pasang basa (delesi) pada gen X oleh banyak penulis pada pasien dengan hepatitis B kronik dan penderita yang mengalami hemodialisis kronik pada waktu infeksi hepatitis B kronis (Lai dkk., 2005; Sheldon dkk., 2005).

Protein HBxAg beredar dalam jumlah yang sedikit dalam waktu yang singkat karena secara cepat akan didegradasi. Pada studi epidemiologi yang dilakukan hingga kini diketahui bahwa ekspresi protein X terkait ternyata ada kaitan antara infeksi VHB dengan kanker hati (Weinberg dkk., 2000). Pada tahun 1991, Kim dkk dan pada tahun 1994 Koike dkk melaporkan bahwa pada mencit transgenik yang diberi ekspresi HBxAg berlebih rentan terhadap perkembangan hepatoma spontan 10 kali lebih besar dibanding mencit dari strain sama yang mengekspresikan HBxAg dalam kadar yang lebih rendah. Berdasarkan hal tersebut diperkirakan keberadaan protein X ini banyak dihubungkan dengan perkembangan karsinoma hati (Qi dkk., 2004; Tenney dkk., 2004; Lai dkk., 2005; Sheldon dkk., 2005).

E. Perjalanan Alamiah Hepatitis B

Manifestasi klinis hepatitis akut timbul pada seseorang yang terinfeksi virus setelah melewati masa inkubasi. Masa inkubasi infeksi VHB bervariasi tergantung pada berbagai hal, diantaranya respon imun penderita dan jumlah inokulat yang masuk. Umumnya masa inkubasi bervariasi antara 30 sampai 180 hari dengan rata-rata 4 hingga 12 minggu. Gejala yang timbul bersifat sistemik, prodormal dimulai dengan demam yang tidak terlalu tinggi (sekitar 38°C), mual, muntah, lemah, nyeri tulang, nyeri otot, batuk, photofobia, sakit kepala dan sebagainya (Soemoharjo, 2008; Sudoyo, 2008; Dandri, 2012).

Bila seseorang terinfeksi VHB pada usia dewasa maka terdapat tiga kemungkinan dalam perjalanan penyakitnya. Sebanyak 65% penderita akan mengalami infeksi subklinis yang kemudian sembuh total, 25% akan menjadi infeksi akut dengan 99% mengalami penyembuhan dan 1% sisanya akan mengalami hepatitis B fulminan. Sedangkan 10% sisanya akan berkembang menjadi infeksi kronis. Pada infeksi kronis, 70-90% berkembang menjadi karier kronik yang asimtomatik, sisanya berkembang menjadi hepatitis kronis dimana 10-30% diantaranya akan menjadi sirosis hepatitis. Sebagian kecil kasus sirosis menjadi sirosis inaktif sementara sebagian lainnya mengalami displasia yang mengarah ke karsinoma hepatoselular (KHS) primer yang diikuti kematian (Hoofnagle, 1995).

Replikasi VHB dalam sel hepatosit tidak bersifat sitolitik sehingga keberadaan VHB dan proses replikasi VHB dalam sel hepatosit tidak menimbulkan manifestasi klinis. Manifestasi klinis dari infeksi VHB berasal dari respon imun inang yang berusaha mengeliminasi VHB dengan cara merusak sel hepatosit yang terinfeksi. Proses inilah yang menyebabkan terjadinya inflamasi dan menimbulkan peradangan pada hati (Bertoletti, 2006).

Perjalanan alamiah pada infeksi kronis virus hepatitis B (VHB) dapat ditemukan pada salah satu dari 4 fase infeksi yakni (1) fase *immunotoleran* = *IT*, (2) fase *immunoclearance* = *IC*, (3) fase *low/non replicative* = *LR*, dan (4) fase *HBeAg negative Hepatitis B chronic* = *ENH* (Fattovich, 2008; Hui dkk., 2007; McMahon, 2009). Keempat fase tersebut dijelaskan dalam gambar berikut ini:

	Immune tolerant	HBeAg-positive CHB [immune clearance]	Immune control [low or non-replicative]	HBeAg-negative CHB [immune escape]
HBeAg	Positive (2000–5000 PEIU/ml)	Positive (100–1000 PEIU/ml)	Negative	Negative
Anti-HBe				
HBsAg (log IU/ml)	4.5–5	4.0–4.5	2.9–3.0	3.3–3.9
Anti-HBs				
HBV DNA (IU/ml)	>20 000	>20 000	<2000	>2000
Viral diversity (PC/C ORF)				
Serum ALT level (U/l)	Persistently normal	Elevated (1–2x) and fluctuating	Normal	Elevated and fluctuating
Liver histology	Normal or mild hepatitis	Moderate to severe hepatitis	Normal to mild hepatitis. May have cirrhosis	Moderate to severe hepatitis. May have cirrhosis
Intra-hepatic HBV replicative intermediates	rcDNA/cccDNA (100–1000) >1 cccDNA/cell	rcDNA/cccDNA (10–1000) 1 cccDNA/cell (0.1–10/cell)	rcDNA/cccDNA (10–100) 0.1 cccDNA/cell (0.001–1/cell)	rcDNA/cccDNA (100–1000) 1 cccDNA/cell (0.1–10/cell)

Gambar 7. Empat fase yang menggambarkan perjalanan hepatitis B kronis fase *immunotoleran* = IT, fase *immunoclearance* = IC, fase *low/non replicative* = LR, dan fase *HBeAg negative Hepatitis B chronic* = ENH (Sumber ; Fattovich, 2008; Dandry M, Locarnini; 2012)

Fase *immunotoleran* adalah fase dimana tidak terjadinya respon imun yang berarti dari sel inang, ditandai dengan kadar DNA VHB yang tinggi yakni lebih dari 10^5 kopi/ml dan status HBeAg positif. Pada fase ini tidak terjadi nekroinflamasi atau fibrosis pada hati, hal ini ditandai dengan kadar SGPT dan hasil pemeriksaan histologi pada biopsi hepatic yang normal. Fase imun toleran ini banyak ditemukan pada usia muda (Liaw & Chu, 2009).

Fase *immunoclearance* ditandai dengan respon imun yang aktif, sehingga menyebabkan inflamasi hepatic dengan peningkatan kadar SGPT serum (Chan dkk., 2010). HBeAg positif namun akan menghilang perlahan

diikuti dengan serokonversi dengan ditemukannya anti-HBe. Fase ini umumnya terjadi pada remaja dan dewasa, saat dimana respon imun terhadap antigen VHB telah berkembang, meskipun belum cukup untuk mengeliminasi VHB. Akibatnya, kadar transaminase meningkat (berfluktuasi), demikian pula halnya dengan kadar DNA VHB berkurang karena eliminasi massa hepatosit yang terinfeksi dan terjadinya serokonversi HBeAg yang spontan (10-20% per tahun, 70-85% per dekade). Fase ini dapat berlangsung selama bertahun-tahun atau dekade (Liaw dkk., 1997; McMahon dkk., 2001). Jika pada fase ini sistem imun sangat aktif dan berlangsung lama, maka dapat terjadi sirosis pada periode inaktif karier (Liaw dkk., 1997; Mc Mahon dkk., 2001).

Fase imun kontrol, disebut juga fase *low replicative* = *LR*. Respon imun inang pada fase *low replicative* telah menetap dan diikuti dengan terjadinya serokonversi HBeAg dengan ditemukannya anti-HBe yang merupakan proses yang penting pada perjalanan infeksi hepatitis B kronis. Pada fase ini kadar DNA VHB sangat rendah serta inflamasi hepatis yang terjadi sangat minimal. Fase *low replicative* merupakan fase akhir dari *immunoclearance*, pada fase ini jumlah sel yang terinfeksi dan replikasi virus berkurang, diikuti dengan meredanya respon imun sehingga pada periode ini kadar transaminase normal, replikasi virus rendah sampai tidak terdeteksi, dan aktivitas nekroinflamasi ringan. Setelah tidak terdeteksi kadar VHB dapat mengalami reaktivasi kembali. 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 tipe mutan dimana replikasi virus tanpa memproduksi HBeAg dan memasuki fase berikutnya (Liaw dkk., 1997; Mc Mahon dkk., 2001)

Fase *HBeAg-negatif Hepatitis B chronic (ENH)* ditandai dengan kembali tingginya kadar DNA, HBeAg negatif dan kadar ALT yang tinggi. Reaktivasi spontan VHB pada fase *low/non replicative* biasanya diikuti dengan peningkatan aktivitas hati dan nilai ALT. Hal ini telah dilaporkan pada lebih dari 10% pasien HbeAg negatif. Peningkatan aktivitas hati disebabkan karena respon imun yang kembali merespon infeksi melawan VHB jika proses ini berlangsung dalam waktu yang lama akan mendorong pada fase sirosis (Dandri, Locarnini 2012, Brunetto dkk., 2009; Chan dkk., 2010)

F. Manajemen Hepatitis B

Setelah pasien didiagnosa awal dengan infeksi VHB, uji laboratorium dilakukan untuk memantau perjalanan penyakit dan menilai apakah diperlukan terapi antivirus. Pilihan terapi yang ada saat ini hanya dapat menekan tetapi tidak mengeliminasi VHB. Selain itu, efektivitas jangka panjangnya terbatas karena munculnya resistensi terhadap antivirus yang digunakan. Penentuan terapi perlu mempertimbangkan usia pasien, tingkat keparahan penyakit hati, dan kemungkinan respon pasien terhadap terapi, serta resiko timbulnya resistensi terhadap antivirus.

Tujuan terapi adalah untuk menekan replikasi HBV dan mencegah progresi penyakit hati. Respon terapi antivirus dapat diklasifikasikan menjadi biokimia (menormalkan ALT), virologis (pembersihan DNA VHB), serologis (menghilangkan HBeAg, serokonversi HBeAg, menghilangkan HBsAg), atau histologis (perbaikan histologi hati). Penting untuk menilai respon virologis tidak saja selama terapi antivirus, namun juga setelah terapi dihentikan, dan menilai apakah muncul resistensi pada pasien yang melanjutkan terapi untuk jangka panjang (Soemoharjo, 2008; Sudoyo 2008, Dandri, 2012)

Terapi yang tersedia untuk penanganan infeksi hepatitis B kronis meliputi tujuh obat, dua diantaranya adalah interferon (IFN- α 2b) dan interferon terpegilasi (*pegylated* interferon, pegIFN- α 2a), dan lima analog nukleotida dan nukleosida oral (lamivudin, adefovirdipivoxil, entecavir, telbivudin dan tenofovir disoproksil fumarat). Semua obat mempunyai manfaat dan kerugian masing-masing, dan pemilihan obat antivirus dipengaruhi oleh efektivitas, keamanan, resiko resistensi obat, metode pemberian, biaya dan faktor-faktor lain sebelum terapi (misalnya petanda serologis dan virologis, kadar ALT serum, tahap dan keparahan penyakit hati) (Correy, 2008; Dienstag, 1999; Dienstag, 1995; Lok, 2003).

Selama dekade terakhir, analog nukleotida/nukleosida berkontribusi secara bermakna pada kemajuan terapi infeksi VHB dengan profil kenyamanan dan keamanan yang lebih baik dibanding IFN atau pegIFN. (Dienstag, 1995; Lok, 2003). Namun, durasi respon lebih rendah, sehingga memerlukan terapi dengan jangka waktu yang lebih lama dan berasosiasi

dengan peningkatan resiko resistensi dibanding IFN dan pegIFN. Uji laboratorium untuk menilai respon, dan munculnya resistensi harus dilakukan setiap 3-6 bulan sekali selama terapi menggunakan analog nukleotida/nukleosida (Allen dkk., 1999).

Salah satu analog nukleosida yang banyak digunakan adalah lamivudin yang telah menunjukkan keuntungan terapi seperti menekan replikasi virus, mengurangi aktivitas penyakit, meningkatkan histologi hati, dan penundaan perkembangan klinis penyakit (Das dkk., 2001). Lamivudin (*dideoxy -2',3'-thiacytidine*) adalah inhibitor proses *reverse-transcriptase* (RT) pada hepatitis B (HBV) yang pertama dipakai untuk pengobatan hepatitis B kronis (Dienstag, 1995; Liaw, 2004; Dienstag, 1999; Lok, 2003).

Mekanisme anti-polimerase paling penting dari lamivudin dan nukleosida analog lain adalah menghambat perpanjangan dari untai negatif DNA VHB melalui kompetisi dengan substrat polimerase alami dCTP dan dengan bertindak sebagai terminator rantai yang dipasang pada untai DNA yang baru (Severine, 1995; Zoulim, 1996).

Lamivudin juga diindikasikan untuk anak-anak yang terinfeksi VHB dan HIV. Lamivudin efektif menekan DNA VHB pada pasien HBeAg-positif dan negatif, dan dapat menstabilkan atau memperbaiki fungsi hati pada pasien dengan penyakit hati tingkat lanjut termasuk sirosis terdekompensasi. Manfaat lamivudin antara lain pemberian secara oral yang nyaman, relatif murah dibanding obat lain, dan ditoleransi dengan sangat baik serta aman. Namun, manfaat lamivudin sebagai monoterapi

untuk infeksi VHB kronis sangat dibatasi oleh tingginya angka resistensi. (Dienstag, 1995; Liaw, 2004; Dienstag, 1999; Lok, 2003).

Resistensi lamivudin meningkat seiring dengan durasi terapi dan dilaporkan terjadi pada sekitar 16-32%, 42% dan 60-70% pasien setelah 1, 2 dan 5 tahun terapi. Lamivudin masih berperan pada beberapa pasien khusus namun karena tingginya tingkat resistensi, monoterapi lamivudin tidak lagi menjadi pilihan untuk pasien dengan infeksi VHB kronis yang memerlukan terapi jangka panjang. (Heathcote, 2003; Hadziyanna, 2003; Lai, 2003; Wright, 2004; Liaw, 2005).

Adefovir dipivoxil, diindikasikan untuk terapi infeksi VHB kronis pada pasien dewasa dan remaja usia paling sedikit 12 tahun. Adefovir efektif menekan DNA VHB baik yang *wild-type* maupun yang resisten terhadap lamivudin. Dibandingkan dengan lamivudin, resistensi terjadi lebih lambat selama terapi adefovir, angka resistensi berkisar 0%, 3% dan 30% setelah penggunaan 48 minggu, 96 minggu dan 240 minggu (Hadziyanna, 2003; Lai, 2003; Wright, 2004; Liaw, 2005).

Entecavir diindikasikan sebagai terapi VHB kronis pada dewasa dan remaja usia minimum 16 tahun, termasuk pasien yang terbukti terinfeksi VHB yang resisten terhadap lamivudin. Manfaat utama entecavir adalah potensi yang sangat baik dan resistensi yang jarang terjadi pada pasien yang belum pernah menggunakan analog nukleotida/nukleosida sebelumnya. Resistensi terhadap entecavir pada pasien yang belum pernah menggunakan entecavir sebelumnya kemudian diterapi entecavir

berkisar antara 0,2%, 0,5% dan 1,2 % setelah 48 minggu, 96 minggu dan 192 minggu terapi. (Correy, 2008; Zoulim, 2009).

Sebaliknya, jika entecavir diberikan pada pasien dengan infeksi VHB yang resisten lamivudin, resistensi lebih tinggi dan dilaporkan sekitar 6%, 15% dan 46% pada pasien yang mendapat terapi selama 48 minggu, 96 minggu dan 192 minggu. Secara keseluruhan, pada pasien yang belum pernah menggunakan analog nukleotida/nukleosida sebelumnya entecavir cukup ampuh, ditoleransi dengan baik dan angka resistensinya sangat rendah. Namun karena resistensi entecavir lebih besar pada pasien yang telah mengalami resistensi lamivudin, maka entecavir bukan obat pilihan untuk pasien golongan ini (Correy, 2008; Zoulim, 2009).

Telbivudin digunakan untuk terapi infeksi VHB kronis pada pasien dewasa. Telbivudin bekerja efektif dan cepat menurunkan DNA VHB baik pada pasien dengan HBeAg positif maupun negatif. Resistensi genotipe B dilaporkan sekitar 3-4% dan 9-22% pada pasien yang mendapat terapi telbivudin setelah 1 tahun dan 2 tahun terapi. Walaupun telbivudin mempunyai potensi yang lebih tinggi dan angka resistensi lebih rendah dibanding lamivudin, telbivudin tidak efektif untuk infeksi VHB yang resisten lamivudin. Telbivudin dapat ditoleransi dengan baik, namun beberapa melaporkan terjadinya miopati dan peningkatan kreatinin fosfokinase beberapa minggu sampai bulan sejak terapi mulai (Correy, 2008; Zoulim, 2009)

Tenofovir disopoxil fumarate adalah obat antiviral paling baru yang mendapat persetujuan FDA untuk digunakan pada pasien dewasa dengan infeksi VHB kronis. Tenofovir juga diindikasikan untuk terapi infeksi HIV. Walaupun secara struktur mirip dengan adefovir, tenofovir dapat digunakan dengan dosis lebih tinggi dan nampaknya mempunyai aktivitas antivirus yang lebih tinggi dengan efek samping yang setara. Tenofovir bekerja efektif terhadap VHB yang resisten- lamivudin dan efektif bagi pasien yang kurang merespon pemberian adefovir (Correy, 2008; Zoulim 2009).

G. Kerangka Konsep

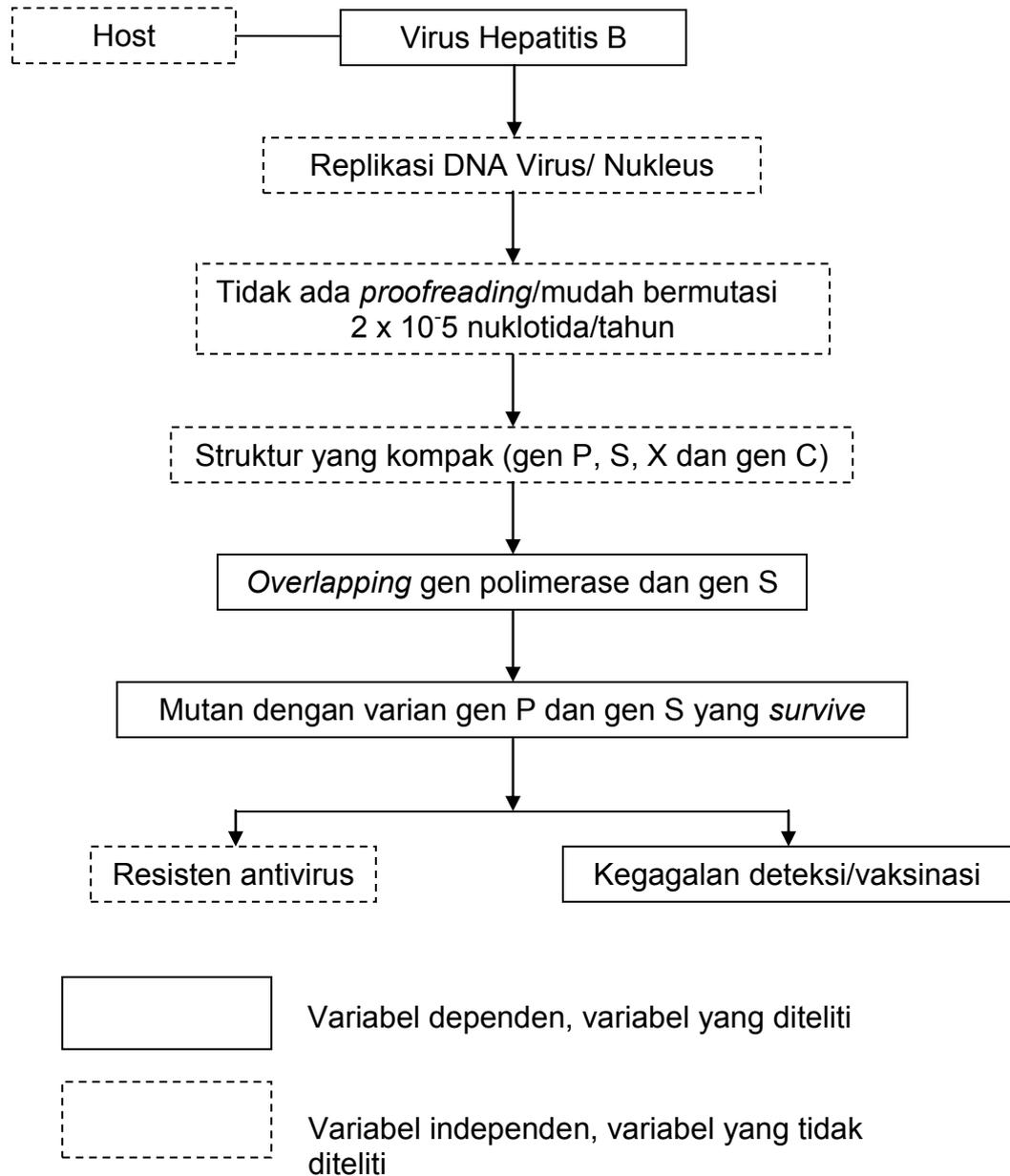
1. Coleman, 2006 menyatakan bahwa replikasi VHB terjadi melalui RNA intermediat yang memerlukan enzim transkriptase balik yang memiliki kekurangan '*proofreading*' akibatnya VHB memiliki kecepatan mutasi 10 kali lebih besar dibandingkan virus DNA lainnya.
2. Muljono, 2009 & Fung, 2004 menyatakan tidak adanya sistem koreksi (*proofreading*) pada saat transkripsi balik adalah penyebab mudahnya VHB bermutasi, yaitu sekitar 2×10^5 /nukleotida/tahun.
3. Tuncbilek dkk., 2008 menemukan mutasi pada pasien VHB kronis yang belum diterapi. Mutasi YMDD ditemukan pada 3 dari 24 pasien dengan HBeAg positif, 3 dari 53 anti-HBe positif dengan rata-rata 7,8%. Dua dari mutasi yang ditemukan adalah YIDD dan 4 lainnya adalah YVDD.
4. Torresi dkk., 2002 menyatakan bahwa resistensi lamivudin pada gen P dapat menyebabkan substitusi asam amino yang bertumpang tindih dengan gen S yang berasosiasi dengan kegagalan dari HBIg dan

kegagalan vaksin menginduksi antibodi anti-HBs untuk menetralkan VHB. Mutasi pada motif YMDD, rtM204V dan rtM204I menghasilkan substitusi pada kodon 195 dan 196 pada permukaan protein (sI195M dan sW196S).

5. Locarnini dkk., 2006 menyatakan bahwa VHB dengan mutasi pada rtA181V/T pada domain B dari polimerase VHB bersifat dominan pada spesies yang resisten lamivudin di beberapa pasien, dan bahwa mutasi tersebut memperkenalkan stop kodon ke gen S yang tumpang tindih dengan gen P (rtA181T/sW172).
6. Thedja dkk., 2010 menemukan mutasi pada determinan 'a' yaitu T123A, M133L dan T143M pada donor darah Indonesia. Perubahan nuklotida pada gen S ini berasosiasi dengan perubahan asam amino pada domain transkriptase balik dari protein polimerase VHB yaitu rtY487F, rtM491V dan *silent mutation*.
7. Damerow, 2010 menjelaskan bahwa beberapa mutasi pada gen polimerase berasosiasi dengan gen selubung. rtL80I berasosiasi dengan sG71 dan sY72, rtV173 berasosiasi dengan sE/V164 dan sW/L165, rtL180 berasosiasi dengan ss171 dan sW172 dan rtM204 berasosiasi dengan sI195 dan sW196. Mutasi-mutasi tersebut ditemukan pada 136 pasien.
8. Hindarto, 2011 menemukan mutasi pada gen polimerase yakni substitusi asam amino M475L, V519L, L526M, dan M550V juga menemukan mutasi pada gen pengkode HBsAg yang menyebabkan substitusi asam amino M120L, V164L, L171M, dan M195V. Mutasi

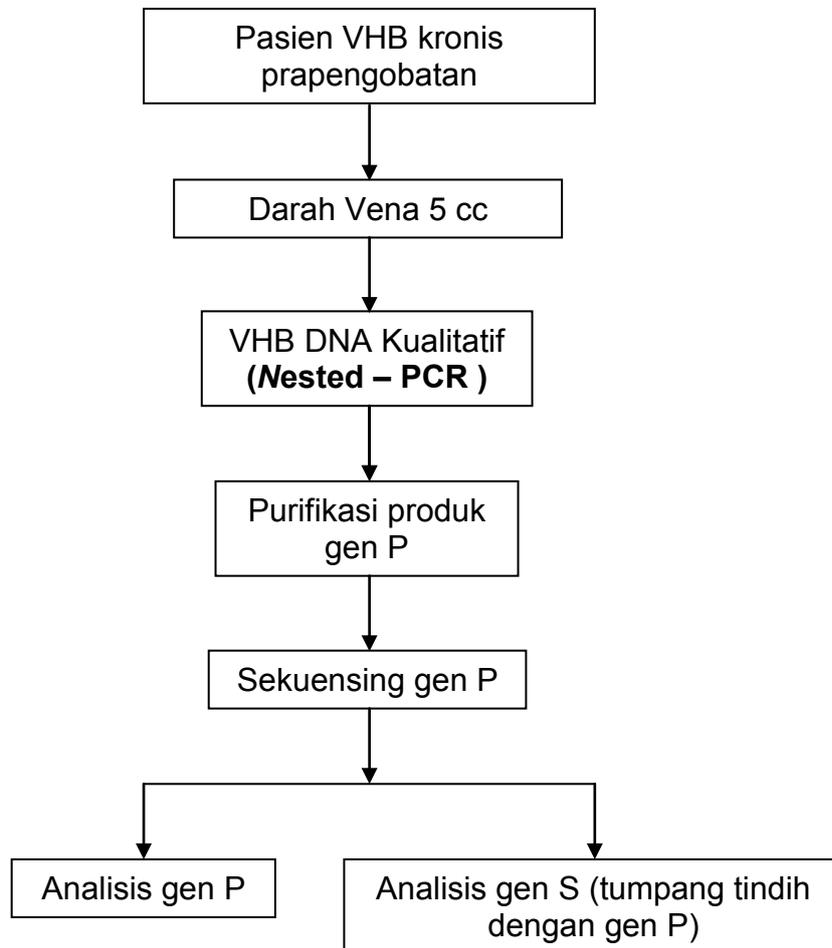
tersebut terletak di daerah yang tumpang tindih dengan gen pengkode DNA polimerase, dan di luar determinan 'a'.

Adapun bagan kerangka konsep digambarkan dibawah ini:



H. Skema Penelitian

Adapun skema alur kerja penelitian adalah sebagai berikut :



I. Definisi Operasional

1. Serum : Sampel penelitian yang diperoleh dari darah lengkap (*whole blood*) yang disentrifuge untuk memisahkan bagian plasma, serum berada pada bagian atas.
2. DNA VHB : DNA virus hepatitis B yang ada di dalam darah pasien yang diukur secara kualitatif dengan Nested PCR.
3. Gen Polimerase (P) : Gen yang menyandi protein polimerase yang diidentifikasi menggunakan primer spesifik.
4. Gen S : Gen yang menyandi protein HBsAg terletak tumpang tindih dengan gen P maka identifikasinya dengan membaca urutan nukleotida yang sama dengan gen P dengan start codon yang berbeda.
5. Nested PCR : Metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi kehadiran DNA VHB dengan menggunakan 2 pasang primer yang spesifik.
6. Sekuensing : Metode molekuler untuk mendeteksi adanya mutasi dengan cara mengurutkan susunan nukleotida gen target yang dihomologkan dengan gen normal.
7. Jameson wolf algoritma : Metode algoritma komputer yang digunakan untuk mengukur perubahan nilai indeks antigenisitas asam amino menggunakan urutan asam amino dari gen S.