

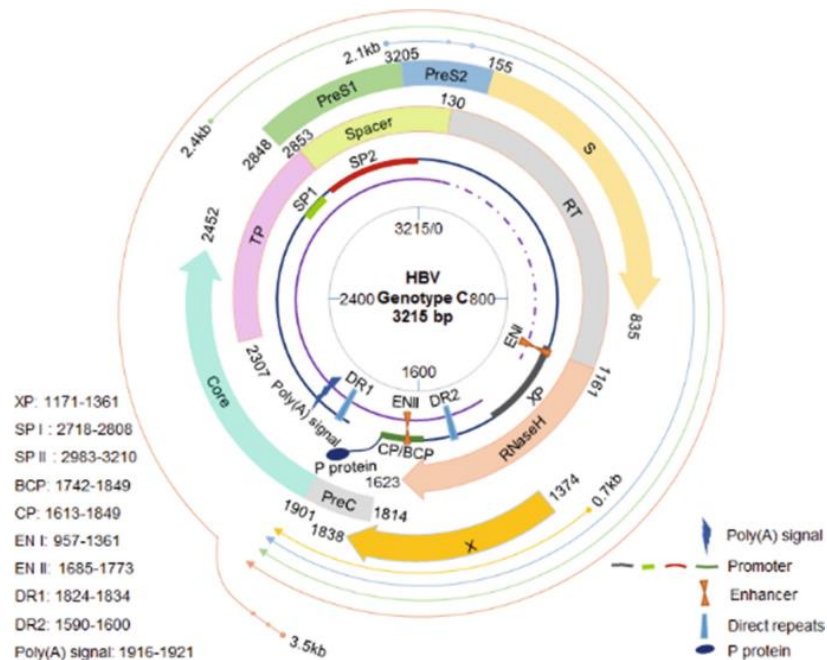
BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hepatitis B merupakan infeksi virus yang menyerang hepar yang dapat menyebabkan infeksi akut dan kronik. WHO (2024) mengestimasi, 254 juta orang yang mengalami infeksi hepatitis B kronik di tahun 2022, dengan jumlah infeksi baru 1,2 juta per tahun. Diperkirakan 15%–40% pasien yang terinfeksi virus Hepatitis B memiliki komplikasi seperti sirosis hati, gagal hati, dan hepatocellular carcinoma yang mewakili penyebab utama kasus kematian akibat Hepatitis B (Weinbaum, 2008). Indonesia dengan total populasi sekitar lebih dari 250 juta memiliki prevalensi antigen *surface* hepatitis (HBsAg) 7,1% sehingga diklasifikasikan sebagai negara endemik hepatitis tingkat sedang (Muljono, 2017).

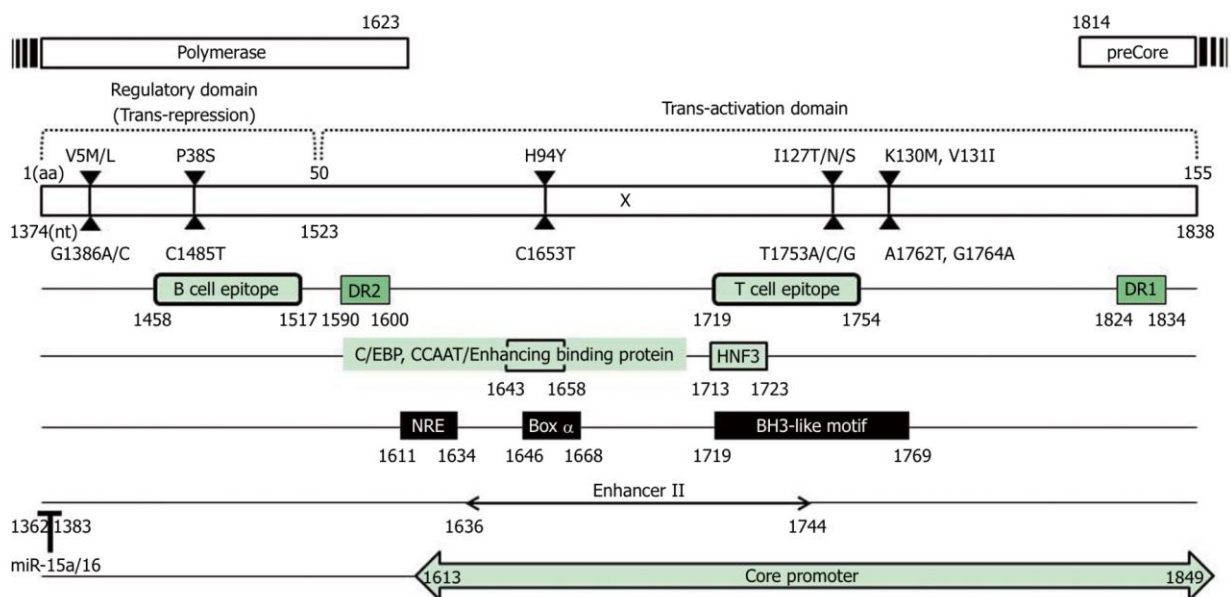
Virus Hepatitis B (HBV) adalah Hepadnavirus berselubung yang termasuk dalam keluarga *Hepadnaviridae*, dengan genom DNA rantai ganda parsial (*partially double-stranded DNA*) sepanjang sekitar 3,200 pasangan basa (bp), dan memiliki empat kerangka baca terbuka (open reading frames/ORFs) yang saling tumpang tindih. ORF ini mengkodekan polimerase (P), core (C), surface (S), dan X. Gen P mengkodekan *reverse transcriptase*, yang juga memiliki cara kerja seperti RNase dan *DNA polymerase*. Gen C mengkodekan *core antigen* (HBcAg) yang menyusun nukleokapsid, dimana proses *reverse transcription* dari pre-genomic RNA terjadi. Selain itu, gen C juga mengkodekan *e antigen* (HBeAg) yang merupakan seromarker untuk replikasi virus tingkat tinggi. Gen S mengkodekan polipeptida antigen permukaan (HBsAg) yang tertanam dalam *envelope* virus yang merupakan target utama diagnosis dan vaksin. Tiga bentuk HBsAg yaitu *small* (S), *middle* (M), dan *large* (L). Gen X mengkodekan protein X (HBx) yang berperan sebagai transaktivator transkripsi (Gurgis BS, et al., 2010, Kim H, et al., 2016).



Gambar 1. Struktur Genome Virus Hepatitis B (Wang, J. et al. 2020)

Protein X (HBx) adalah protein non-struktural multifungsi yang berkontribusi pada patogenesis HBV dengan merangsang replikasi virus atau mengubah ekspresi gen inang yang berkaitan dengan karsinoma hepatoseluler (HCC). HBx hanya terdiri dari 465 pasangan basa (bp) yang mengkode protein seberat 16,5 kDa, dan juga mengandung beberapa elemen cis penting seperti Enhancer II (Enh II) dan promotor inti (*core promotor*) (Kim H, et al., 2016). HBx berada di sitosol dan nukleus sel yang terinfeksi HBV, di mana ia dapat memodulasi berbagai jalur transduksi sinyal seluler dan berinteraksi dengan berbagai protein seluler. Semua hepadnavirus di mamalia menyandikan protein X (HBx), kecuali hepadnavirus di avian. Banyak data yang menunjukkan bahwa HBx meningkatkan replikasi HBV, kemungkinan melalui mekanisme langsung maupun tidak langsung, dan biasanya dengan bekerja sama dengan mesin transduksi sinyal seluler (Slagle, B.L & Bouchard M.J., 2016).

HBx memiliki peran penting dalam mempertahankan replikasi HBV, yang merupakan faktor risiko utama untuk perkembangan karsinoma hepatoseluler (HCC). Mekanismenya yaitu: transaktivasi enhancer atau promotor HBV, menginaktivasi *tumor suppressor gene* p53, penghambatan proteasom, induksi autofagi (Agustiniingsih, et.al., 2024). HBx juga dapat mengatur replikasi HBV melalui modifikasi epigenetik sehingga membantu mempertahankan infeksi kronis dengan mengubah pola imunitas bawaan inang, yang menyebabkan perkembangan penyakit hati kronis tanpa eliminasi virus. HBx juga berperan penting dalam hepatokarsinogenesis dengan menginaktivasi *tumor suppressor gene* p53 dan melemahkan mekanisme perbaikan DNA sehingga replikasi dapat tetap bertahan (Kim H, et al., 2016).



Gambar 2. Struktur gen X Virus Hepatitis B (Kim H, et al., 2016)

Mutasi pada wilayah ORF HBx tidak hanya dapat memengaruhi ORF HBx dan elemen cis yang tumpang tindih, tetapi juga kapasitasnya untuk berikatan dengan protein inang. Baru-baru ini telah ditemukan beberapa jenis mutasi HBx yang secara signifikan terkait dengan tingkat keparahan klinis, terutama pada pasien kronis yang terinfeksi genotipe C, meskipun mekanisme fungsional dalam sebagian besar kasus ini masih belum terpecahkan. Secara umum ada 3 tipe mutasi pada regio Enhancer II (EnhII)/ *basal core promoter* (BCP) yang merupakan mutasi HBx yang sering terjadi secara alami dan berkaitan dengan keparahan klinis pasien Hepatitis B Kronik tanpa mempertimbangkan genotipe atau distribusi geografis (Kim H, et al., 2016).

Mutasi BCP A1762T/G1764A BCP mengarah ke perubahan 2 asam amino HBx yang saling tumpang tindih, K130M dan V131I, yang pada banyak studi dikaitkan dengan risiko HCC. Mekanisme pasti yang mendasari peran mutasi ini pada hepatokarsinogenesis masih belum diketahui, namun mekanisme yang mendasari bahwa mutasi dapat menyebabkan penurunan ekspresi HBeAg dan peningkatan replikasi genom virus, akibatnya terjadi perburukan klinis karena meningkatnya inflamasi namun invasi virus tetap terjadi. (Kim H, et al., 2016).

Hepatitis B e-Antigen (HBeAg) adalah **protein non-struktural** yang dikodekan oleh **gen pre-core HBV** dan disekresikan oleh **hepatosit yang terinfeksi**. HBeAg dapat dideteksi **pada tahap awal infeksi HBV akut atau kronis**, biasanya muncul **tidak lama setelah HBsAg**, sekitar **6–12 minggu setelah terpapar HBV**. Adanya **HBeAg** menunjukkan **tingkat replikasi virus yang tinggi dan infektivitas yang kuat**, sehingga menjadi **indikator adanya penyakit hepar yang aktif**. HBeAg memiliki fungsi imunomodulator multifaset, termasuk menurunkan ekspresi TLR2, menghambat aktivasi NF- κ B, dan menekan ekspresi IFN- γ melalui IL-18. Hal ini mendukung replikasi virus dan membantu HBV menghindari respons imun bawaan. Studi pada model hewan dan manusia memberikan **bukti yang konsisten** bahwa **HBeAg berperan dalam pembentukan persistensi virus** tanpa menyebabkan **inflamasi pada hepar (Bonino F, Colombatto P, Brunetto MR, 2022)**.

Pada pasien kronis yang terinfeksi genotipe C2, mutasi tersebut juga dilaporkan berhubungan dengan delesi genom HBV atau memiliki korelasi positif dengan mutasi HBx M5V/L atau H94Y. Selain itu, mutasi ini juga dapat berkontribusi terhadap karsinogenesis hati dengan menurunkan ekspresi p21, yang menyebabkan proliferasi sel yang cepat dan tak terkendali. Mutasi C1653T, yang menyebabkan perubahan asam amino H94Y pada HBx, terletak di box α , yang merupakan elemen aktivasi kuat dari EnhII/core promoter. Mutasi ini dapat meningkatkan afinitas pengikatan box α serta aktivitas EnhII/core promoter. Mutasi tersebut dilaporkan sebagai faktor prediktif HCC di Jepang dan dikaitkan dengan HCC eksaserbasi akut (Kim H, et al., 2016).

Berdasarkan perbedaan antar kelompok dalam urutan genom lengkapnya, strain HBV diklasifikasikan secara filogenetik ke dalam 9 genotipe (A-I) (dengan genotipe ke-10 yang diduga, yaitu 'J', yang diisolasi dari seorang individu tunggal) dengan distribusi etnis dan geografis yang berbeda (Kramvis A, 2014). Setiap genotipe memiliki distribusi geografis yang khas dan biasanya menghasilkan berbagai hasil klinis. Sebagai contoh, genotipe B dan C, yang merupakan genotipe paling umum di Asia. Genotipe B dikaitkan dengan serokonversi HBeAg pada usia muda dan progresi ke sirosis lebih lambat dibanding genotipe C. Genotipe C lebih rentan terhadap mutasi dan dikaitkan dengan penyakit hati yang lebih parah serta respons antivirus yang lebih rendah dibandingkan dengan genotipe B meskipun mekanismenya masih belum terpecahkan (Kim H, et al., 2016). Di Indonesia, genotipe C paling banyak ditemukan (60%-72%) disusul genotipe B (27%-40%) (Ave, et.al.,2022, Arfianti, et.al, 2011). Keanekaragaman urutan (sequence) adalah salah satu karakteristik HBV karena enzim POL tidak memiliki kemampuan proofreading. Genom HBV diperkirakan berevolusi dengan tingkat kesalahan sekitar 10^{-3} hingga 10^{-6} substitusi nukleotida per situs per tahun (Kramvis A, 2014).

Karena informasi mengenai mutasi pada gen X virus Hepatitis B masih terbatas terutama pada pasien Hepatitis B kronik, peneliti bertujuan untuk menganalisis mutasi gen X yang terkait dengan Hepatitis B Kronik dan membandingkannya dengan tingkat keparahan penyakit Hepatitis B Kronik. Diharapkan dengan mengetahui mutasi tersebut, dapat digunakan sebagai prediktor munculnya HCC sehingga dapat dilakukan tindakan preventif untuk mencegah terjadinya HCC.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- 1.2.1. Bagaimana karakteristik pasien Hepatitis B kronik di RSUP Wahidin Sudirohusodo?
- 1.2.2. Bagaimana profil mutasi basal core promoter (BCP) gen X pada pasien Hepatitis B Kronik?

- 1.2.3. Bagaimana distribusi kejadian mutasi terhadap kerusakan struktur hati penderita hepatitis B Kronik?
- 1.2.4. Bagaimana distribusi kejadian mutasi terhadap tingkat keparahan penyakit hati penderita hepatitis B Kronik?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui korelasi antara kejadian mutasi dengan tingkat keparahan penyakit penderita hepatitis B Kronik.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui karakteristik pasien Hepatitis B kronik di RSUP Wahidin Sudirohusodo.
2. Untuk mengetahui profil mutasi basal core promoter (BCP) gen X pada pasien Hepatitis B Kronik
3. Untuk mengetahui distribusi kejadian mutasi dengan mutasi dengan kerusakan struktur hati
4. Untuk mengetahui korelasi antara kejadian mutasi dengan tingkat keparahan penyakit hati penderita hepatitis B Kronik

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu:

1.4.1. Pemahaman tentang Mutasi Gen HBx

Penelitian ini memberikan wawasan mengenai mutasi gen X yang terkait dengan hepatitis B kronik, terutama mutasi yang berhubungan dengan keparahan penyakit hepatitis B.

1.4.2. Identifikasi Risiko HCC

Dengan menganalisis mutasi seperti A1762T/G1764A yang dikaitkan dengan risiko HCC, penelitian ini dapat membantu mengidentifikasi pasien dengan potensi komplikasi lebih parah.

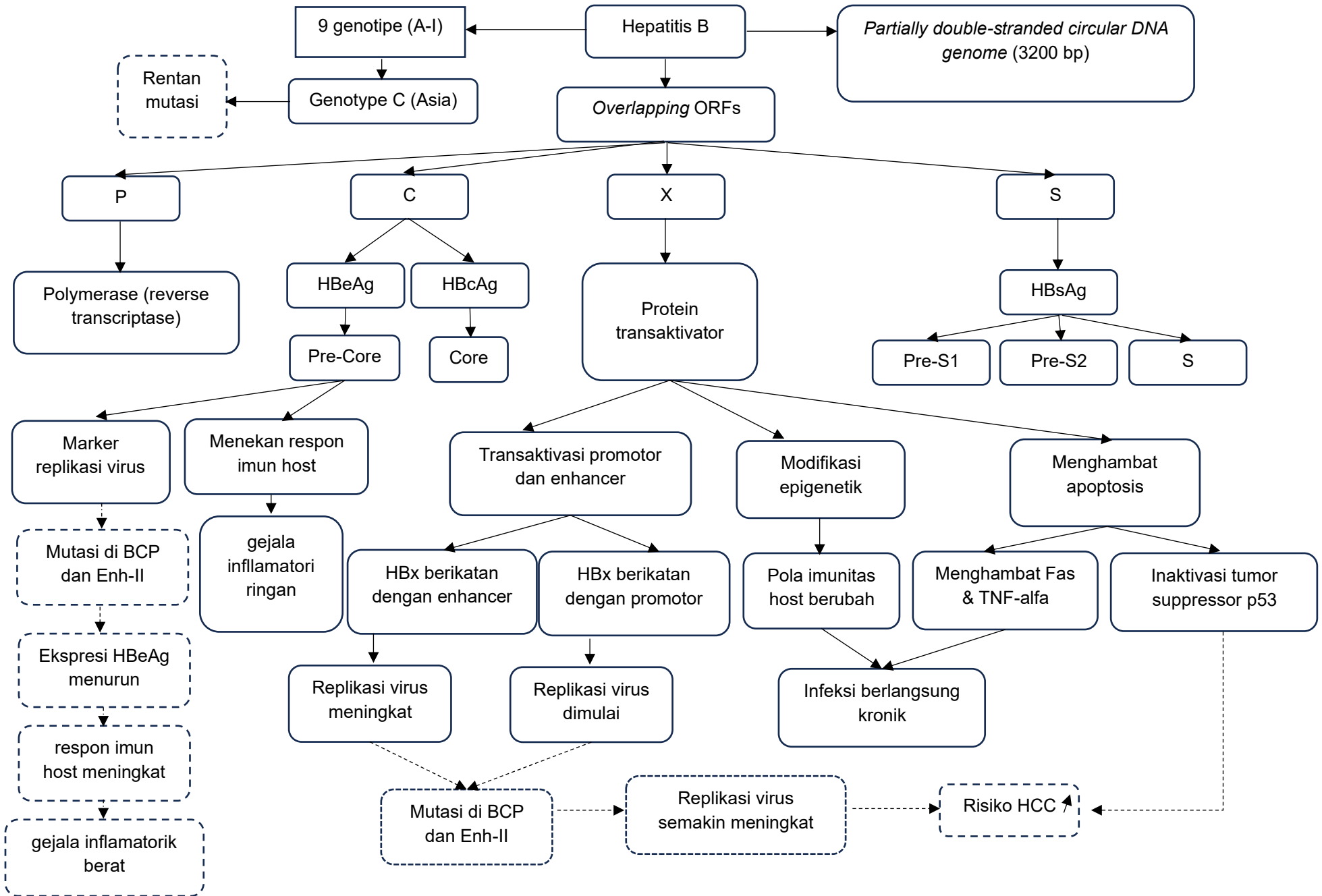
1.4.3. Kontribusi untuk Epidemiologi Hepatitis B di Indonesia

Penelitian ini memberikan kontribusi pada pemahaman epidemiologi Hepatitis B di negara dengan prevalensi tinggi, sehingga dapat mendukung kebijakan kesehatan yang lebih baik.

1.5. Definisi Operasional

- 1.5.1. Pasien Hepatitis B Kronik adalah pasien dengan riwayat HBsAg positif lebih dari 6 bulan.
- 1.5.2. Mutasi gen X Hepatitis B adalah perubahan nukleotida dalam gen HBx (Hepatitis B Virus X protein).
- 1.5.3. Mutasi ganda adalah dua mutasi yang terjadi secara bersamaan pada satu gen dalam satu sampel.
- 1.5.4. Mutasi multipel adalah lebih dari dua mutasi yang terjadi secara bersamaan pada satu gen dalam satu sampel
- 1.5.5. Asites adalah adanya cairan di rongga perut. Asites ringan ditandai dengan perut sedikit membesar, perasaan tidak nyaman, dan masih berespon dengan obat diuretik. Asites berat ditandai dengan perut sangat membesar, perasaan sesak, dan tidak berespon baik terhadap diuretik.
- 1.5.6. Ensefalopati hepatikum *grade* 1 dan 2 ditandai dengan lemas, gangguan tidur, disorientasi waktu, dan tremor (*asterixis*). *Grade* 3 dan 4 ditandai dengan penurunan kesadaran berat seperti stupor dan koma.

1.6. Kerangka Konsep



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RS Unhas Makassar, sedangkan pengambilan sampel dilakukan di *Gastroenterohepatology Center* RS Wahidin Sudirohusodo Makassar dengan periode penelitian dari Bulan Agustus – Oktober 2025.

2.2. Bahan dan Alat

2.2.1. Bahan yang Digunakan

1. sampel serum darah pasien Hepatitis B Kronik
2. Primer PCR (IDT, Integrated DNA Technologies) (Yong-Zhong Wang, 2014):
Forward (p3): 5'-GGA CTC TTG GAC TCT CAG C -3' (1660-1678)
Reverse (p4): 5'- ATT TAT GCC TAC AGC CTC CTA -3' (1794-1774)
3. Geneaid gSYNC™ DNA Extraction Kit GS100: GSB Buffer, GST Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer (ditambah etanol absolut), proteinase K, Elution Buffer, GS Column, collection tube.
4. Reagen PCR: dNTP mix 10 mM (Geneaid), MgCl₂, Taq DNA Polymerase, PCR buffer
5. Reagen elektroforesis: agarose, etidium bromide, DNA Ladder 100 bp, buffer TAE/TBE
6. Ethanol absolut
7. aquadest, tips mikropipet, tabung mikro 1.5ml

2.2.2. Alat yang Digunakan

PCR *machine*, mikropipet (10, 100, 1000 uL), microtube 1.5 mL, agarose gel electrophoresis set, gel casting tray dan comb, UV Transilluminator/ gel documentation system, vortex, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, rak tabung.

2.3. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan kuantitatif. Analisis dilakukan untuk mengevaluasi hubungan antara mutasi daerah BCP gen X HBV dengan derajat kerusakan hati dan tingkat keparahan penyakit.

2.4. Pelaksanaan Penelitian

2.4.1. Pengambilan Sampel dan Persetujuan Etik

Sampel diperoleh dari pasien Hepatitis B Kronik yang datang berobat dan kontrol di rumah sakit RS Wahidin Sudirohusodo Makassar selama periode Agustus-Oktober 2025. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Universitas Hasanuddin (No Protokol: UH25060388) dan mendapat persetujuan dari pasien.

2.4.2. Kriteria Sampel

Kriteria inklusi yaitu pasien yang terinfeksi Hepatitis B Kronik dengan hasil HBsAg positif > 6 bulan. Kriteria eksklusi yaitu pasien koinfeksi Hepatitis C, HIV, sampel yang hemolisis berat atau terkontaminasi, dan produk PCR tidak teramplifikasi.

Plasma dipisahkan dari darah dan disimpan pada suhu -20 °C. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan serum HBsAg-positif yang telah dikonfirmasi menggunakan metode sequencing (Salarnia, et al. 2022).

2.4.3. Ekstraksi DNA HBV

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Geneaid gSYNC™ DNA Extraction Kit* mengikuti protocol pabrik:

1. Tambahkan 200 μ L serum ke dalam microtube, lalu tambahkan 200 μ L GSB Buffer.
2. Tambahkan 20 μ L Proteinase K, vortex singkat.
3. Inkubasi pada 60°C selama 10 menit.
4. Tambahkan 200 μ L etanol absolut, campur dengan vortex.
5. Pindahkan campuran ke GS Column, sentrifuge 14.000-16.000 \times g selama 1 menit.
6. Cuci column dengan 400 μ L W1 Buffer, sentrifuge.
7. Tambahkan 600 μ L Wash Buffer, sentrifuge.
8. Keringkan column 3 menit.
9. Elusi DNA dengan 100 μ L *pre-heated elution buffer* (60°C), inkubasi 3 menit.
10. Sentrifuge 1 menit untuk memperoleh DNA murni.
11. DNA disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

2.4.4. Amplifikasi PCR Daerah Basal Core Promoter (BCP)

PCR dilakukan dengan volume total 25 μ L, berisi:

1. 2,5 μ L 10 \times PCR buffer
2. 1,5 mM MgCl₂
3. 0,2 mM dNTP
4. 0,3 μ M primer forward
5. 0,3 μ M primer reverse
6. 1 U Taq DNA polymerase
7. 2 μ L DNA template

Untuk siklus PCR:

1. Denaturasi awal: 94°C selama 2 menit
2. 35 siklus:
 - 94°C selama 30 detik (denaturasi)
 - 55-60°C selama 1 menit (annealing, disesuaikan dengan T_m primer IDT: 53-54°C)
 - 72°C selama 1-3 menit (elongasi)
3. Ekstensi akhir: 72°C selama 5 menit

Ukuran produk PCR \pm 135 bp sesuai target BCP (1660-1794) (Yong-Zhong Wang, 2014).

2.4.5. Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

1. Siapkan gel agarose 1,5-2% dalam buffer TAE/TBE.
2. Tambahkan 5 μ L produk PCR + loading dye.
3. Elektroforesis pada 100-120 V selama 30-45 menit.
4. Visualisasi menggunakan UV transilluminator.
5. Band dibandingkan dengan DNA ladder 100 bp.

2.5. Parameter Pengamatan

2.5.1. Identifikasi Mutasi BCP Gen X

Region gen X disekuensing menggunakan produk PCR positif dengan perangkat *Sanger sequencing automated device*. Urutan nukleotida di *aligned* menggunakan sekuens hepatitis B dari database Genbank (Mulyanto et al., 2022) [Accession number: AB644287]. Mutasi ditentukan berdasarkan pembacaan fragmen PCR menggunakan perangkat lunak *BioEdit 7.2*. Mutasi pada posisi A1762T dan G1764A dicatat sebagai mutasi ganda (*double mutation*), sementara perubahan tunggal dicatat sesuai posisinya.

2.5.2. Penilaian Derajat Kerusakan Struktur

Derajat kerusakan struktur hati dinilai dengan melihat struktural hepatosit, fibrosis, atau imaging menggunakan USG, CT Scan, dan Fibroscan. Penilaian dilakukan oleh radiolog dan internis. Kategori penilaian dibagi menjadi:

- Non-sirosis (F0-F2)
- Fibrosis berat (F3)
- Sirosis (F4)
- HCC

2.5.3. Penilaian Derajat Keparahan Penyakit (Child-Pugh Classification)

Derajat keparahan penyakit dievaluasi menggunakan Child-Pugh Classification, yang menilai fungsi hati berdasarkan lima parameter klinis: bilirubin total, albumin serum, *prothrombin time*/INR, asites, dan ensefalopati (Yap, et al. 2018). System ini mengkategorikan pasien ke dalam tiga kelas, dimana:

- Child-Pugh A: menunjukkan fungsi hati relatif baik
- Child-Pugh B menunjukkan gangguan fungsi hati sedang, dan
- Child-Pugh C menunjukkan gangguan hati berat dan prognosis paling buruk.

Pada penelitian ini, Child-Pugh digunakan untuk menilai derajat keparahan penyakit dan dianalisis hubungannya dengan status mutasi daerah BCP.

Tabel 1. *Child-Pugh Classification* untuk menilai derajat keparahan penyakit hati. PT = Prothrombin time; INR = International Normalized Ratio

	1	2	3
Encephalopathy	None	Grade 1-2 (or precipitant-induced)	Grade 3-4 (or chronic)
Ascites	None	Mild/moderate (diuretic responsive)	Severe (diuretic-refractory)
Bilirubin (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albumin (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
PT (s)	<4	4-6	>6
INR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
	Class A	Class B	Class C
Total points	5-6	7-9	10-15

2.5.3. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 24. Analisis deskriptif digunakan untuk menggambarkan karakteristik dasar pasien, termasuk usia, jenis kelamin, serologis HBeAg dan anti-HBe, diagnosis klinis, derajat kerusakan struktur hati, klasifikasi Child-Pugh, kadar ALT, AST, dan HBV DNA.

Variable kategorik (jenis kelamin, HBeAg, dan anti-HBe) dan ordinal ditampilkan dalam bentuk frekuensi dan persentase diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan dianalisis menggunakan *Fisher's exact test*. Variable numerik (umur, ALT, AST, dan HBV DNA) diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan dianalisis menggunakan *One-way ANOVA* untuk data yang terdistribusi normal dan *Kruskal-Wallis* untuk data yang tidak terdistribusi normal. Karena sebagian besar data ALT, AST, dan HBV DNA tidak terdistribusi normal, parameter tersebut disajikan sebagai *median* dan *interquartile range* (IQR).

- Analisis bivariat dilakukan untuk menilai hubungan antara mutasi BCP (ada/tidak) dengan:
1. Derajat kerusakan struktur hati (F0-F4, HCC)
 2. Derajat keparahan penyakit hati (Child-Pugh A, B, C)

Kedua variabel tersebut bersifat ordinal, sehingga uji statistik yang digunakan adalah:

- *Chi-square test*
- *Monte Carlo Simulation* apabila terdapat expected count <5
- *Linear-by-Linear Association* untuk mendeteksi tren linear antar kategori ordinal.

Kekuatan hubungan dinilai melalui nilai p , dengan batas signifikansi $p < 0,05$.

2.6. Diagram Alur Penelitian

