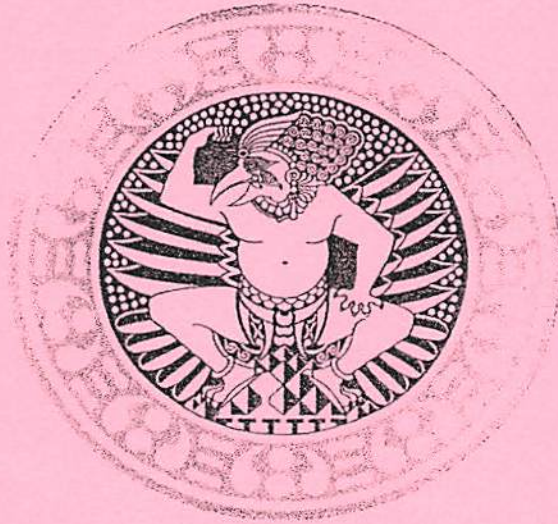


**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**ANALISIS SEROLOGIS DAN MOLEKULER VIRUS HEPATITIS A DAN B DI
INDONESIA**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. MARIA LUCIA INGE LUSIDA, Dr., M.Kes., Ph.D., Sp.MK(K)	0017095807
Dr. JUNIASTUTI, Dr., M.Kes	0024067104
DEWI SETYOWATI, S.Keb., Bd., M.Ked.Trop	011817017343

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**

kkA
kk
LP 09/19
Lus
a



**ANALISIS SEROLOGIS DAN MOLEKULER VIRUS HEPATITIS A DAN B DI
INDONESIA**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. MARIA LUCIA INGE LUSIDA, Dr., M.Kes., Ph.D., Sp.MK(K) 0017095807

Dr. JUNIASTUTI, Dr., M.Kes 0024067104

DEWI SETYOWATI, S.Keb., Bd., M.Ked.Trop 011817017343

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ANALISIS SEROLOGIS DAN MOLEKULER VIRUS
HEPATITIS A DAN B DI INDONESIA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dra MARIA LUCIA INGE LUSIDA,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0017095807
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Kedokteran
Nomor HP : +628123037884
Alamat surel (e-mail) : ingelusida@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : JUNIASTUTI M.Kes
NIDN : 0024067104
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dewi Setyowati S,Keb., Bd
NIDN :
Perguruan Tinggi :
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran



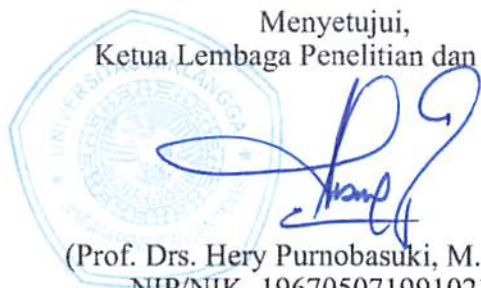
(Prof. Dr. dr. Soetjo, Sp. U (K))
NIP/NIK 195606081986121001

Kota Surabaya, 19 - 11 - 2018
Ketua,



(Dra MARIA LUCIA INGE LUSIDA,)
NIP/NIK 195809171986032001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M. Si.Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Identifikasi Infeksi Virus Hepatitis A secara Molekuler dan Serologis serta Hubungan antara Tingkat Pengetahuan dengan Wabah Hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan Tahun 2018

Latar Belakang: Hepatitis A adalah penyakit hati akut yang disebabkan oleh virus hepatitis A. Virus hepatitis A dapat menular ketika orang yang tidak divaksin memakan makanan atau meminum air yang terkontaminasi dari seseorang yang terinfeksi hepatitis A. Penyakit hepatitis A mempunyai hubungan yang erat dengan air dan makanan yang tidak aman serta sanitasi dan kebersihan diri yang lemah. Virus hepatitis A menyebabkan wabah di berbagai negara termasuk di Indonesia. Pada awal 2018 dilaporkan telah terjadi wabah di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan sehingga diperlukan identifikasi virus hepatitis A untuk mengatasi wabah di Indonesia. Pengetahuan merupakan faktor penting untuk tindakan promotif dan preventif infeksi hepatitis A sehingga dalam penelitian ini juga dilakukan analisis hubungan tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi IgM anti-HAV yang positif dan mengetahui subtipe dari virus hepatitis A yang menyebabkan wabah di Indonesia serta menganalisis hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A.

Metode: digunakan 172 sampel untuk penelitian ini. 88 sampel serum untuk penelitian terkait analisis serologis dan molekuler dengan manifestasi klinis *suspect* hepatitis A yang terdiri sebanyak 54 sampel dari SMA Lamongan dan sebanyak 34 sampel dari Pondok Pesantren Bangkalan, serta 84 sampel sebagai kontrol untuk analisis hubungan tingkat pengetahuan dengan tingkat infeksi hepatitis A. Sampel akan dilakukan pemeriksaan serologis dengan cara Rapid Test Diagnostic menggunakan SD BIO LINE HAV IgG/IgM untuk mendeteksi IgM anti HAV. Pemeriksaan molekuler yang dilakukan yakni RT-PCR pada daerah VP1-P2A dan VP3-VP1 dengan metode semi nested RT-PCR serta dilakukan sequencing untuk analisis filogenetik. Selain serologis dan molekuler semua sampel juga dilakukan uji terkait tingkat pengetahuan subyek penelitian dengan cara membagikan kuesioner yang terdiri dari pertanyaan terkait hepatitis A. Hasil kuesioner akan dilakukan uji statistik menggunakan SPSS versi 22 dengan uji *chi square*.

Hasil: hasil penelitian dari 172 sampel menunjukkan bahwa rentang usia subyek penelitian yakni 11-56 tahun dengan kelompok terbesar yang terkena wabah yaitu ≤ 17 tahun. Gejala yang banyak dirasakan subyek penelitian di SMA Lamongan dan Pondok pesantren di Bangkalan yaitu mual (59%) dan nyeri ulu hati (56%). Lebih dari 50% dari subyek penelitian dengan manifestasi klinis *suspect* hepatitis A positif IgM Anti-HAV. Hasil RT-PCR dan sequencing menunjukkan subtipe yang menyebabkan wabah yaitu IA. Analisis hubungan tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A menunjukkan hubungan ($p < 0.05$) di SMA Lamongan namun menunjukkan tidak ada hubungan tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di pondok pesantren Bangkalan.

Simpulan: Proporsi IgM Anti-HAV pada subyek penelitian dengan gejala klinis di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan berturut-turut yakni sebesar 32 (59.25%) dan 19 (55.9%). Subtipe virus hepatitis A penyebab wabah yakni IA. Pada multiple alignment asam amino terdapat perbedaan hasil *sequence* virus hepatitis A penyebab wabah di Lamongan dan di Pondok Pesantren Bangkalan. Ada hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di SMA Lamongan.

PRAKATA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga saya mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan naskah tesis ini. Penelitian tesis ini berjudul **“Hubungan Antara Tingkat Pengetahuan dengan Wabah Hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan Tahun 2018”**.

Dalam kesempatan ini saya ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE, Mt., Ak., CMA, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. dr. Soetojo, Sp. U (K), dan Ketua Program Magister Ilmu Kedokteran Tropis Dr. Juniastuti, dr., M.Kes atas kesempatan dan fasilitas sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan di Program Magister Ilmu Kedokteran Tropis.
2. Prof. Maria L.Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D., Sp.MK(K) selaku pembimbing I yang penuh perhatian dan telah memberikan waktu, dorongan bimbingan, solusi, serta motivasi selama menyusun naskah proposal, melakukan penelitian hingga penulisan tesis.
3. Dr. Juniastuti, dr., M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan waktu, dorongan bimbingan, solusi, serta motivasi selama menyusun naskah proposal, melakukan penelitian hingga penulisan tesis.
4. Muhammad Miftahussurur, dr., Sp.PD., M.Kes., Ph.D, dr. Teguh Mubawadi M.Si, Dr. Florentina Sustini, dr. M.S selaku penguji yang telah memberikan banyak perhatian, bimbingan, serta dengan penuh kesabaran selama proses penyusunan tesis.
5. Seluruh dosen pengajar program studi ilmu kedokteran tropis yang telah banyak memberikan ilmu, perhatian, dukungan dengan penuh kesabaran selama proses belajar mengajar.
6. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan dana penelitian PMDSU sehingga dapat membiayai penyusunan tesis ini.
7. Kepala BTTKL serta seluruh tim atas kerjasama dalam hal pengambilan sampel penelitian sehingga penelitian ini bisa terlaksana dengan lancar.
8. Kepala Sekolah SMA Negeri Babat, Lamongan, Pengasuh Pondok Pesantren Al-Thalhawiyah Bangkalan serta seluruh subyek penelitian atas kerjasamanya sehingga penelitian ini bisa berjalan.

9. Penguji Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan masukan dan perbaikan dalam penelitian ini.

10. Semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Semoga nantinya penelitian ini dapat memberikan manfaat dan kebaikan bagi banyak pihak demi kebaikan bersama serta bernilai ibadah di hadapan Tuhan Yang Maha Esa.

Surabaya, Oktober 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Rumusan Masalah	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
Definisi penyakit hepatitis A	3
Karakteristik virus hepatitis A.....	3
Manifestasi klinis infeksi hepatitis A	5
Diagnosis penyakit hepatitis A.....	6
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
Tujuan Penelitian	
Manfaat Penelitian	8
BAB 4 METODE PENELITIAN	9
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	
4.2 Bahan Penelitian	9
4.3 Prosedur Penelitian	10
4.4 Pengolahan Data	16
BAB 5 HASIL YANG DICAPAI	17
5.1 Hasil Penelitian	
5.2 Luaran yang dicapai	27
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	28
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	29
7.1 Kesimpulan	
7.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	32



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Tabel primer yang digunakan	9
Tabel 5.1	Karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur, pekerjaan dan gejala yang dirasakan	17
Tabel 5.2	Hasil Pemeriksaan serologis RTD IgM Anti HAV	18
Tabel 5.3	Hasil pemeriksaan PCR virus hepatitis A	19
Tabel 5.4	Rangkuman hasil serologis dan PCR virus hepatitis A.....	20
Tabel 5.5	Distribusi pengetahuan subyek penelitian terhadap kejadian hepatitis A.....	26
Tabel 5.6	Hasil analisis hubungan antara tingkat pengetahuan dengan infeksi hepatitis A di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren Bangkalan	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur virus hepatitis A	3
Gambar 2.2	Manifestasi klinis penderita hepatitis A.....	5
Gambar 2.3	Klinikal, virologi dan serologi yang terlibat dengan infeksi virus hepatitis A	6
Gambar 2.4	Kerangka konseptual penelitian	7
Gambar 5.1	Hasil elektroforesis cDNA produk RT-PCR VHA dengan primer second round HAV 3 dan HAV 4 dari target VP3-VP1. M marker 100bp, NC Negatif Control, No Sampel 1-3, 5-7. Sampel yang positif yakni no 1-3.	19
Gambar 5.2	Hasil elektroforesis cDNA produk RT-PCR VHA dengan primer second round Rj3 dan Br6 dari target VP1-P2A. M marker 100bp, NC Negatif Control, No Sampel 63-74. Sampel yang positif yakni nomor 74.	20
Gambar 5.3	Hasil multiple alignment asam amino pada daerah VP3-VP1	21
Gambar 5.4	Hasil analisis filogenetik pada daerah VP3-VP1	22
Gambar 5.5	Hasil multiple alignment asam amino pada daerah VP1-P2A	24
Gambar 5.6	Hasil analisis filogenetik pada daerah VP1-P2A	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Draft Jurnal	32
Lampiran 2	Sertifikat.....	51

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Hepatitis A adalah penyakit hati yang disebabkan oleh virus hepatitis A. Derajat keparahan dari penyakit hepatitis A yakni bervariasi dari ringan hingga berat namun jarang yang menyebabkan kematian. Virus ini dapat ditularkan melalui makanan dan air yang terkontaminasi dengan feses orang yang menderita penyakit hepatitis A. Risiko infeksi hepatitis A berhubungan dengan keamanan air dan sanitasi serta kebersihan yang kurang (CDC, 2017a; WHO, 2017). Virus hepatitis A menyebabkan wabah di berbagai negara. Pada tahun 2013, 2016 dan 2017 telah terjadi wabah di Amerika Serikat yang disebabkan oleh buah yang diimpor dari negara lain, serta wabah ini mengenai kelompok yang tidak mempunyai rumah, yang menggunakan jarum suntik dan pada kelompok yang tidak menggunakan jarum suntik namun berhubungan langsung dengan penderita hepatitis A. (CDC, 2013; CDC, 2016; CDC, 2017b). Pada tahun 2016 terjadi wabah di Hawaii yang disebabkan oleh kerang yang dihidangkan di restaurant di Oahu, sebanyak 74 penderita memerlukan perawatan di rumah sakit (*State of Hawaii*, 2016).

Prevalensi hepatitis A di Asia Tenggara yaitu termasuk rendah (<50% yang terinfeksi pada usia 30 tahun) hingga tinggi (>90% yang terinfeksi pada usia 10 tahun) (WHO, 2017). Infeksi hepatitis A banyak menyerang ketika usia anak-anak dan pada umumnya tidak menunjukkan tanda dan gejala. Berdasarkan data yang ada telah terjadi pergeseran usia terkenanya penyakit hepatitis A yakni dari anak-anak ke dewasa. Beberapa wabah telah dilaporkan yakni sebanyak 54 kasus terjadi di India selama tahun 2011-2013 serta pada tahun 2009 telah terjadi wabah yang besar di Srilanka yang menyebabkan terjadinya 13.000 kasus dan diperkirakan jumlah kematian akibat hepatitis A yakni sebanyak 5416 per tahun (WHO SEARO, 2017). Indonesia merupakan negara dengan endemisitas tinggi hepatitis A. Proporsi penderita hepatitis A di Indonesia sebesar 19.3% (Riskesdas, 2013). Di Indonesia beberapa kali tercatat terjadi wabah hepatitis A. Pada tahun 2011 terjadi wabah di Kulon Progo, Jogjakarta namun tidak disebutkan jumlah yang terkena wabah ini. Tahun 2015 juga terjadi wabah yang menyerang 28 mahasiswa di IPB (Institut Pertanian Bogor) (Kemenkes, 2018; Kemenkes, 2018a). Prevalensi hepatitis A di Provinsi Jawa Timur sebesar 17.5%

(Risikesdas. 2013). Beberapa kali terjadi wabah namun laporan terkait sangat terbatas, termasuk yang ada di Lamongan dan Bangkalan Jawa Timur.

Pada penelitian ini, juga diteliti terkait tingkat pengetahuan subyek penelitian mengenai hepatitis. Penelitian yang dilakukan oleh Nelson *et al.* 2017 sebanyak 50% koresponden mengerti mengenai informasi terkait gejala hepatitis A yang sering asimtomatis pada anak-anak. Penelitian lain yakni menyebutkan bahwa sebanyak 85.7% responden mengetahui mengenai cara penularan hepatitis dan tingkat pengetahuan dipengaruhi oleh usia, jenis kelamin, penghasilan keluarga serta profesi namun yang berpengaruh hanya umur berdasarkan analisis multivariat (Alhowaish, Ali *et al.* 2017). Pada akhir November yang puncaknya Desember 2017, telah dilaporkan terjadi wabah di SMA Lamongan dan pondok pesantren di Bangkalan dengan manifestasi klinis *suspect* hepatitis A. Penelitian ini untuk mengidentifikasi kejadian infeksi VHA serta analisis genotipe atau subtipe sehingga diketahui penyebab terjadinya wabah di Lamongan dan pondok pesantren di Bangkalan.

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dari darah subyek penelitian di Lamongan maupun Bangkalan akan dilakukan pemeriksaan anti-HAV IgM dan RT-PCR-Sequencing. Hasil pemeriksaan sequencing akan dilanjutkan dengan analisis filogenetik untuk mengetahui asal serta kekerabatan virus hepatitis A yang menyebabkan wabah di Lamongan dan Bangkalan. Penelitian ini juga mengidentifikasi gejala klinis yang timbul serta hubungan tingkat pengetahuan hepatitis A terhadap kejadian infeksi hepatitis A. Diharapkan informasi yang diberikan dari penelitian ini bermanfaat untuk memberikan data terkait epidemiologi dalam penentuan penanganan dari infeksi virus hepatitis A di komunitas.

1.1 Rumusan Masalah

1. Berapa prevalensi IgM positif pada subyek penelitian dengan gejala hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan?
2. Bagaimana distribusi genotipe dan subtipe virus hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan?
3. Bagaimana tingkat pengetahuan subyek penelitian dengan terjadinya infeksi virus hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan?
4. Apakah terdapat hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi virus hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan?

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

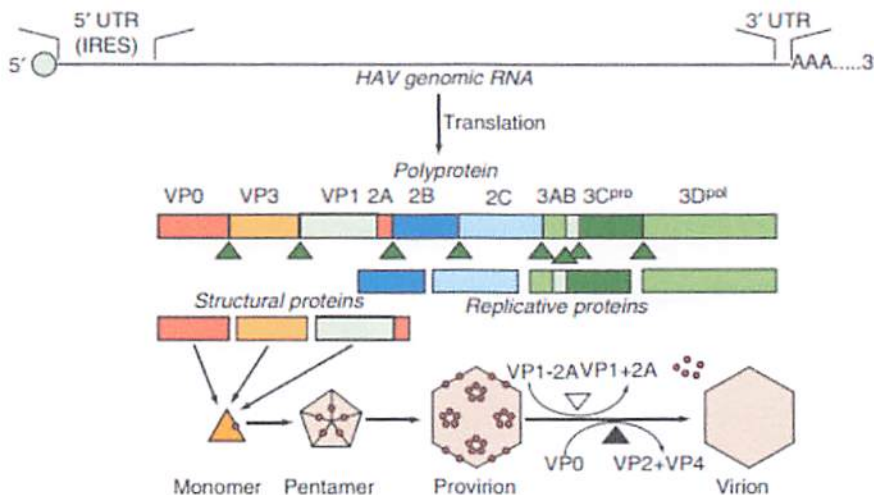
2.1 Hepatitis A

2.1.1 Definisi penyakit hepatitis A

Hepatitis A adalah penyakit hati akut yang disebabkan oleh virus hepatitis A. Virus hepatitis A dapat menular ketika orang yang tidak divaksin memakan makanan atau meminum air yang terkontaminasi dari seseorang yang terinfeksi hepatitis A. Penyakit hepatitis A mempunyai hubungan yang erat dengan air dan makanan yang tidak aman serta sanitasi dan kebersihan diri yang lemah (WHO, 2017). Gejala yang ditimbulkan dari hepatitis A meliputi anoreksia, lemah, berat badan menurun dan kuning (Averhoff, 2014). Prevalensi hepatitis A berhubungan dengan sosio-ekonomi yang rendah serta tingkat kebersihan karena transmisi virus hepatitis A melalui fekal-oral. Tingkat keparahan meningkat berdasarkan umur serta imunitas virus hepatitis A berlaku seumur hidup (Gripenberg et al., 2018)

2.1.2 Karakteristik virus hepatitis A

Virus hepatitis A termasuk genus hepatovirus yang masuk dalam famili Picornaviridae. Ukuran virion virus hepatitis A adalah 27-32 nm, tidak mempunyai selubung, mempunyai bentuk capsid icosahedral, positif-single stranded linier RNA virus yang mempunyai 7.5 kb genom (Setiati, 2014; Torok, 2014). Struktur virus hepatitis A dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Struktur virus hepatitis A (Averhoff,2014)

Genom tersebut mempunyai 3 regio, 5' untranslated region dengan 734-742

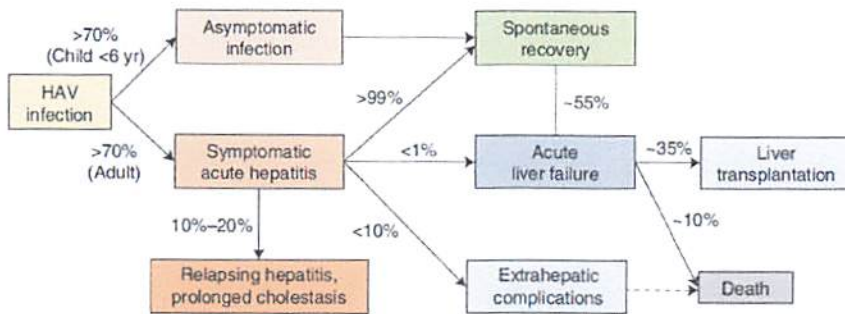
nukleotida: open reading frame tunggal yang mengkode poliprotein; dan 3' region non coding yang mengandung 40-80 nukleotida (63 nukleotida). Selama memasuki hepatosit, ribosompenjamu berikatan dengan RNA virus yang tidak berselubung. Selanjutnya HVA-RNA virus ditranslasikan menjadi protein utama yang mengandung 2225 asam amino. Poliprotein yang besar ini dibagi menjadi 3 regio: regio P1 mengkode protein struktural VP1, VP2 dan VP3; region P2; serta regio P3 yang mengkode tujuh protein non struktural, yang terlibat dalam proses replikasi virus c: Torok. 2014).

Virus hepatitis A sangat labil pada lingkungan dan bertahan hidup pada suhu 60°C selama 60 menit, tetapi menjadi tidak aktif pada suhu 81°C setelah pemanasan selama 10 menit. Virus hepatitis A dapat bertahan hidup pada feses, tanah, makanan dan air yang terkontaminasi. Virus hepatitis A resisten terhadap deterjen dan Ph yang rendah selama transisi menuju lambung (Setiati, 2014). HAV-RNA dapat dideteksi pada cairan tubuh dan feses menggunakan tehnik amplifikasi asam nukleat dan tehnik sekuensing. Sampai saat ini genotipe HAV yang di kenal sebanyak 6 virus. Variasi sekuens antara VP1/P2A junction digunakan untuk menentukan genotipe dan subgenotipe. Genotipe mempunyai variasi sekuens nukleotida sebanyak 15-25%, sedangkan pada subgenotipe variasi yang ditemukan sebanyak 7.5%. Genotipe I, II, III ditemukan pada manusia yang terinfeksi virus hepatitis A, sedangkan genotipe IV, V, dan VI ditemukan pada primata. Korelasi antara variasi genomik yang spesifik pada 5' NTR, 2B, dan 2C pada virus hepatitis A dengan virulensi, beratnya penyakit dan terjadinya hepatitis fulminant sejauh ini belum dapat dikonfirmasi (Setiati, 2014). Perbedaan fenotipe virus hepatitis A menyebabkan perbedaan tingkat keparahan penyakit. Hepatitis fulminant di Amerika Serikat disebabkan oleh genotipe IB, di Korea infeksi hepatitis A dengan tingkat keparahan tinggi didapatkan dengan infeksi virus hepatitis A genotipe IIIA dibanding IA. Mutasi yang terjadi di daerah coding 2B berhubungan dengan tingkat keparahan dan kejadian hepatitis fulminan (Averhoff, 2014)

Genotipe I merupakan genotipe yang tersebar di seluruh dunia dengan subtipe yang IA lebih didominasi dibanding IB. Subtipe IA merupakan fraksi utama dari genotipe I yang banyak di Amerika Utara dan Selatan, Eropa, Asia dan Afrika. IB dominan di wilayah Timur Tengah dan Afrika Utara. Subtipe IB dilaporkan terdapat pada 35% dan 70% pasien dengan hepatitis A genotipe I di wilayah barat laut Brazil dan Rio de Janeiro, hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa subtipe IB

merupakan subtipe yang berada di wilayah Amerika Utara. Genotipe II pertama kali diidentifikasi di Perancis tahun 1979 dan di Sierra Leone pada tahun 1988 namun deteksi genotipe II jarang dilaporkan. Subtipe IIA berasal dari Afrika Barat dan endemik di Benin, namun hanya subtipe IA yang ditemukan pada penelitian di Nigeria dan Cameroon yang berada di Afrika Tengah. Belum dapat dijelaskan alasan genotipe II jarang ditemukan di dunia. Genotipe III merupakan distribusi global dari virus hepatitis A. subtipe IIIA diidentifikasi di Asia dan Eropa serta Madagaskar dan Amerika Serikat. Kejadian luar biasa hepatitis A yang terjadi di India disebabkan oleh genotipe IIIA. Subtipe IIIA dan IIIB di Jepang ditemukan gabungan dengan subtipe IA dan IB (Vaughan et al., 2014)

2.1.3 Manifestasi klinis infeksi hepatitis A



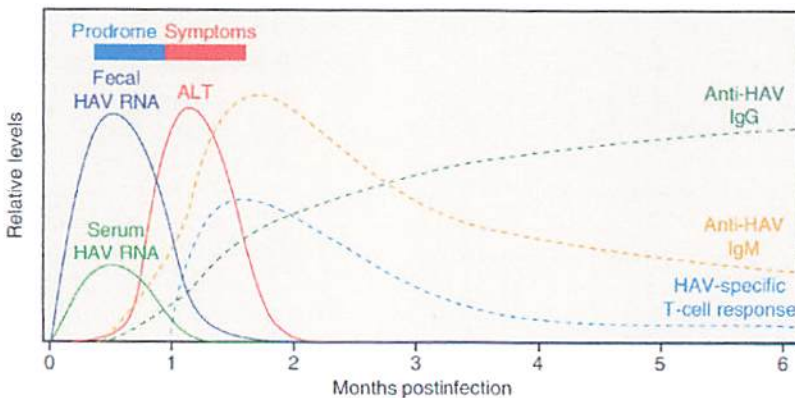
Gambar 2.2 Manifestasi klinis penderita hepatitis A (Shin & Jeong, 2018)

Manifestasi klinis dari hepatitis A yakni mulai asimtomatik hingga hepatitis fulminan. Manifestasi klinik dari hepatitis A tergantung oleh usia terkenanya infeksi. Pada anak-anak kurang dari 6 tahun 70% infeksi yang ditimbulkan asimtomatik namun pada orang dewasa akan timbul gejala *jaundice* yang terjadi diantara 40-70% kasus dan meningkatnya kadar serum aminotransferase. Pada masa prodromal akan muncul gejala seperti demam, *malaise*, mual, muntah, nyeri perut. Setelah beberapa hari hingga minggu akan muncul gejala urin kecoklatan, lemas, feses yang berwarna keabu-abuan hingga *jaundice*. Beberapa orang yang terinfeksi virus hepatitis A tidak menunjukkan gejala klinis hingga munculnya *jaundice*. Pada masa prodromal seseorang terdapat virus yang banyak pada darah dan pada feses. Gejala yang jarang muncul yakni meliputi myalgia, pruritus, diare, arthralgia dan muncul ruam pada kulit. Pada pemeriksaan fisik umumnya seseorang akan demam, *jaundice*, sclera berwarna kuning dan hepatomegali. Pada pemeriksaan laboratorium menunjukkan kenaikan bilirubin total puncaknya yakni mencapai 7 mg/dl, alkaline phosphatase 319 IU/I, serum aspartat aminotransferase 1,754 IU/I dan alanine aminotransferase 1,952

IU/I. gejala klinis dan hasil pemeriksaan laboratorium akan kembali normal sekitar 2 bulan setelah terjadinya infeksi. Manifestasi lain diluar hepar yakni meliputi anemia, anemia aplastic, efusi pleura atau efusi pericardial, artritis akut, pankreatitik akut dan gangguan ginjal (Jeong *et al*, 2010; Koenig *et al*, 2017)

2.1.4 Diagnosis penyakit hepatitis A

Hepatitis A secara klinis tidak bisa dibedakan dengan hepatitis akut yang disebabkan virus tipe lain. Diagnosis yang spesifik adalah ditemukannya IgM pada serum serta pada pemeriksaan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) ditemukan RNA virus hepatitis A. Pemeriksaan enzyme immunoassays dan PCR dapat mendeteksi partikel virus namun hasil pemeriksaan antigen HAV di feses dengan enzyme immunoassays atau RNA virus hepatitis A di serum, feses atau saliva dengan PCR tidak berarti seseorang dalam tahapan infeksius karena periode infeksius lebih pendek dibandingkan dengan ditemukannya RNA virus hepatitis A (Averhoff, 2014; WHO, 2017).

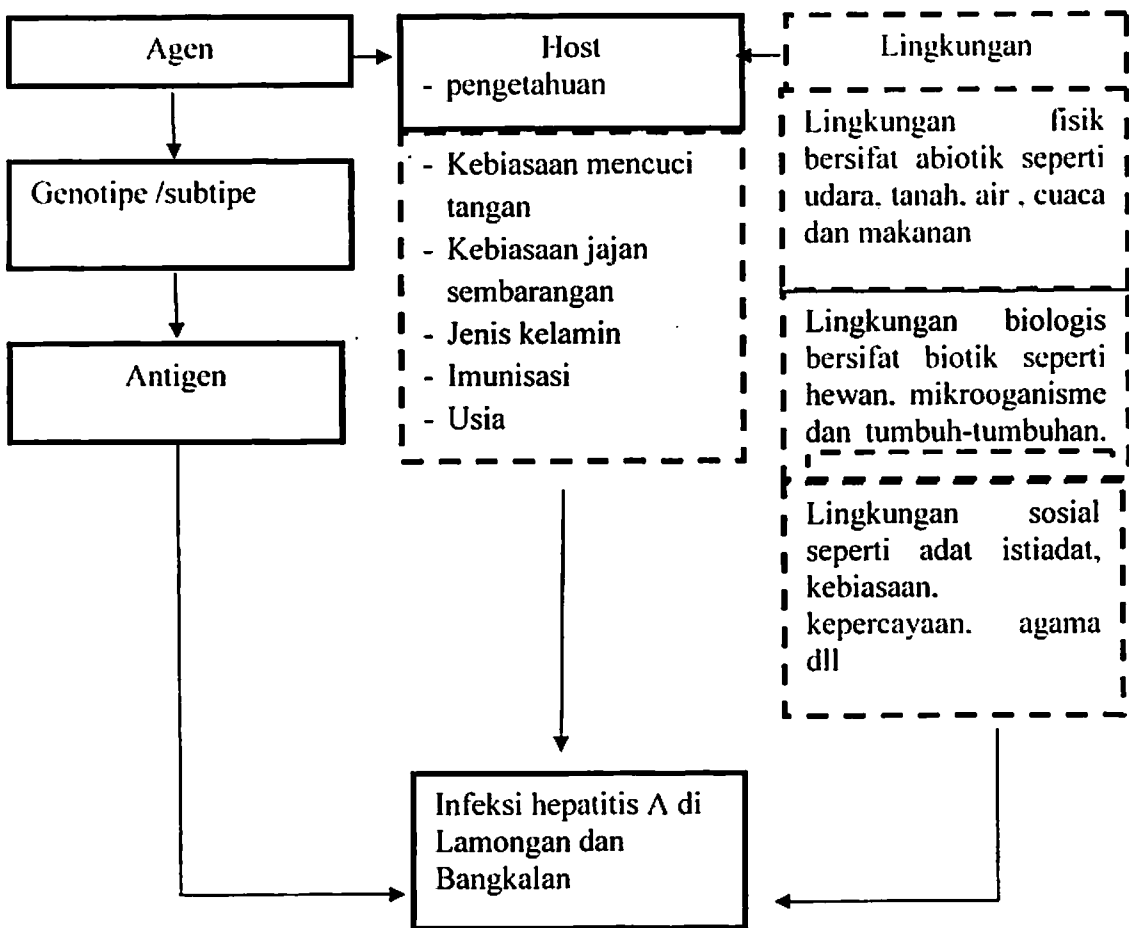


Gambar 2.3. Klinikal, virologi dan serologi yang terlibat dengan infeksi virus hepatitis A (Shin & Jeong, 2018)

Pada dewasa ditemukannya antibodi anti-HAV IgM tanpa gejala klinik mengindikasikan bahwa terjadi infeksi asimtomatik (namun paling sering pada anak), pada pasien yang pernah menderita penyakit hepatitis A atau hasil positif palsu, ditemukan anti-HAV IgM yang lebih lama. Anti-HAV IgM positif pada onset dari gejala, puncak selama terjadi infeksi yang akut yakni positif selama 4-6 bulan. Anti-HAV IgM bertahan dengan titer yang rendah selama 12-14 bulan pada pasien yang berulang mendapatkan infeksi hepatitis A. anti-HAV IgG ditemukan pada tahap awal proses penyembuhan. Pada dewasa yang melakukan vaksinasi, antibodi akan dideteksi 2 minggu setelah vaksin namun kadar titer lebih rendah dibandingkan dengan infeksi

yang disebabkan oleh *wild-type* (Torok, 2014). Pada pasien dengan hepatitis akut terjadi peningkatan kadar alanine aminotransferase (ALT), kadar aspartat aminotransferase (AST) dan bilirubin. Kadar bilirubin jumlahnya mencapai puncak yakni 7-8 mg/dL sedangkan kadar ALT dan AST mencapai 1.000 IU/L atau lebih. Perubahan kadar biokimia ini umumnya terjadi 1-6 minggu setelah terjadi infeksi. Sebanyak 85% pasien yang terinfeksi virus hepatitis A yang mempunyai gejala klinik dan biokimia akan sembuh 3 hingga 6 bulan (Koenig *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017)

Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.4 Kerangka konseptual penelitian

- : Diteliti
- : Tidak diteliti

BAB 3**TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1 Tujuan Penelitian****3.1.1 Tujuan umum**

Memberikan informasi terkait kejadian wabah hepatitis A terutama mengenai pemetaan genotipe dan subtipe virus hepatitis A serta hubungan pengetahuan terhadap kejadian wabah hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan.

3.1.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui prevalensi serologis (IgM) positif pada wabah di Lamongan dan Bangkalan.
2. Menganalisis genotipe dan subtipe dari virus hepatitis A yang menyebabkan wabah di Lamongan dan Bangkalan.
3. Mengetahui tingkat pengetahuan subyek penelitian dengan terjadinya infeksi virus hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan..
4. Menganalisis hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan.

3.2 Manfaat Penelitian**3.2.1. Manfaat teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai genotipe dan subtipe virus hepatitis A yang digunakan untuk mengetahui asal dari virus hepatitis A yang menyebabkan wabah di Lamongan dan Bangkalan tahun 2018.

3.2.2. Manfaat praktis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kesehatan terhadap subyek penelitian serta sebagai deteksi dini dan tindakan preventif terjadinya hepatitis A.
2. Hasil penelitian ini diharapkan mampu sebagai acuan pengetahuan IPTEK, sebagai dasar kebijakan pemerintah serta sebagai acuan untuk studi hepatitis A.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua jenis penelitian yaitu untuk analisis serologis dan molekuler menggunakan desain penelitian observasional, namun untuk analisis hubungan antara tingkat pengetahuan dengan infeksi hepatitis A menggunakan observasional analitik pendekatan kasus kontrol. Penelitian ini dilakukan di SMA, Lamongan serta pondok di Bangkalan (untuk pengambilan sampel) dan Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, Surabaya (untuk pemeriksaan laboratorium). Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2017 – Agustus 2020

4.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Sampel darah serum
2. Kit ekstraksi RNA Qiagen, yang terdiri dari *buffer AVL*, *buffer AW1*, *buffer AW2*, *buffer AVE*, tabung *spin column (Qiagen mini spin)*
3. Ethanol 96-100%
4. Gel agarosa untuk elektroforesis produk PCR
5. *Big Dye Deoxy Terminator sequencing kit*
6. Primer yang digunakan

Tabel 4.1 Tabel primer yang digunakan

Regio	Primer	5'-3'	Nomor nukleotida	Ukuran produk (bp)
VP1-P2A	BR-5 BR-9	External		
		TTGTCTGTCACAGAACAATCAG	2950-2972	361
	AGTCACACCTCTCCAGGAAAACCT	3310-3286		
	RJ-3 BR-6	Internal		
TCCCAGAGCTCCATTGAA		2984-3002	234	
AGGAGGTGGAAGCACTTCATTTGA	3217-3193			
VP3-VP1	HAV1 HAV2	External		
		GCTCCTCTTTATCATGCTATGGAT	2172-2196	244
	CAGGAAATGTCTCAGGTACTTTCT	2415-2391		
	HAV3 HAV4	Internal		
ATGTTAACTACACAAGTTGGAGAT		2195-2218	186	
GATCCTCAATTGTTGTGATAGCT	2380-2357			

(Yun et al., 2008).

4.3 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa tahap yaitu pengambilan dan penyimpanan specimen, pemeriksaan serologis Hepatitis A, pemeriksaan molekuler VHA dan analisis hasil DNA *sequencing* VHA.

4.3.1 Prosedur pengambilan dan penyimpanan spesimen

1. Darah dari subyek penelitian sebanyak 3-5ml dikumpulkan selanjutnya disentrifus 2000rpm selama 5 menit menjadi serum dengan jumlah 600-1000 μ l per sampel
2. Semua sampel serum darah disimpan hingga sampai Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Unair Surabaya kemudian disimpan dalam *freezer* suhu -80 $^{\circ}$ C.

4.3.2 Prosedur pemeriksaan serologis hepatitis A

Pemeriksaan serologis yang dilakukan yakni menggunakan rapid test SD BIO LINE HAV IgG/IgM (Standart Diagnosrics, INC. Republic of Korea).

Tahapan uji serologis yakni :

1. Serum sebanyak 5 μ l ditambahkan ke tempat sampel yang bertanda S
2. Pengencer sebanyak 4 tetes ditambahkan pada tempatnya
3. Hasil akan muncul setelah 20 menit.

4.7.3 Prosedur pemeriksaan molekuler virus hepatitis A

1) Ekstraksi RNA dari sampel serum darah

sampel dilakukan ekstraksi RNA dengan menggunakan kit ekstraktor RNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit: Qiagen, Tokyo, Japan). Prosedur ekstraksi RNA yakni :

- (1) Tabung *microsentrifus* 1.5ml disiapkan dengan kode sesuai sampel
- (2) Buffer AVL 560 μ l dan 5.6 μ l *carrier* RNA ditambahkan ke dalam tabung *microsentrifus*
- (3) Serum sebanyak 140 μ l ditambahkan dan melakukan vortek selama 15 detik
- (4) Inkubasi di dalam ruangan dengan suhu 15-25 $^{\circ}$ C selama 10 menit dan di sentrifus
- (5) Ethanol sebanyak 560 μ l ditambahkan (90-100%) dan vortex selama 15 detik

- (6) Campuran semua bahan dipindahkan ke dalam tabung 2 ml, tutup rapat dan di sentrifus 8000 rpm (6000 x g) selama 1 menit dan dipindahkan ke dalam tabung 2 ml yang bersih
- (7) Buffer AW1 500 µl ditambahkan, tutup rapat dan sentrifus 8000 rpm (6000 x g) selama 1 menit dan dipindahkan ke dalam tabung 2 ml yang bersih
- (8) Buffer AW2 500 µl ditambahkan, tutup rapat dan sentrifus 14.000 rpm (20.000 x g) selama 3 menit dan dipindahkan ke dalam tabung 2 ml yang bersih dan disentrifus ulang 14.000 rpm (20.000 x g) selama 1 menit
- (9) Buffer AVE sebanyak 60 µl ditambahkan dan dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml serta di inkubasi di suhu ruangan selama 1 menit dan disentrifus 8000 rpm (6000 x g) selama 1 menit.
- (10) Sampel disimpan dikulkas pada suhu 4°C.

2) *Reverse Transcriptase-PCR*

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan enzyme *reverse transcriptase* PCR dengan RNA hasil ekstraksi sebagai templatnya. Komposisi untuk setiap reaksi sintesis cDNA adalah 3 µl RNA, 1µl random primer (6mer) 100 pmol (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) (Kanda *et al.*, 2010), 3 µl 5x RT master mix dan 3 µl ddH₂O ReverTra Ace® cDNA synthesis kit (Toyobo Inc, Osaka, Japan) (Sasaki *et al.*, 2001). Sintesis cDNA dilakukan pada suhu 37°C selama 15 menit, 42°C selama 50 menit dan 98°C selama 5 menit.

3) Pemeriksaan cDNA VHA dengan metode *polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Pemeriksaan ini melakukan RT-PCR *two nested* dengan 2 pasang primer untuk mengidentifikasi daerah VP1-P2A *junction* dan VP3-VP1 *junction*. (Yun *et al.*, 2008).

A. VP1-P2A *junction*

1) Tahap RT-PCR 1st dengan primer BR-5 dan BR-9 (361bp)

- (1) Campuran reagen PCR 1st *round* dibuat sesuai jumlah tabung dengan rincian:

– Master mix Promega : 10 µl

- (16) ...
- Primer BR-5 : 1 μ l
 - Primer BR-9 : 1 μ l
 - d H₂O : 5 μ l
- (2) Ekstraksi cDNA sampel sebanyak 3 μ l dan kontrol negatif ditambahkan sesuai kode nomer pada tabung
- (3) Setting pada alat *thermocycler (PCR Machine)*
- Predenaturasi : 94⁰c selama 5 menit
 - Denaturasi : 94⁰c selama 30 detik (40 siklus)
 - *Annealing* : 55⁰c selama 30 detik (40 siklus)
 - Ekstensi : 72⁰c selama 45 detik (40 siklus)
 - Ekstensi final : 72⁰c selama 7 menit
- (4) Tabung PCR diletakkan pada *well* dialat *PCR Machine*
- (5) *Running* PCR dimulai

2) Tahap RT-PCR 2nd dengan primer RJ-3 dan BR-6 (234bp)

- (1) Campuran reagen PCR 2nd *round* dibuat sesuai jumlah tabung dengan rincian:

- Master mix Promega : 10 μ l
- Primer RJ-3 : 1 μ l
- Primer BR-6 : 1 μ l
- dH₂O : 6.5 μ l

- (2) Produk RT- PCR 1st sebanyak 1.5 μ l dan kontrol negative ditambahkan sesuai kode nomer pada tabung RT-PCR

- (3) Alat *thermocycler (PCR Machine)* dilakukan *setting*

- Predenaturasi : 94⁰c selama 5 menit
- Denaturasi : 94⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- *Annealing* : 55⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- Ekstensi : 72⁰c selama 45 detik (40 siklus)
- Ekstensi final : 72⁰c selama 7 menit

- (4) Tabung PCR diletakkan pada *well* dialat *PCR Machine*

- (5) *Running* PCR dimulai

B. VP3-VP1 *junction*

- 1) Tahap PCR 1st primer HAV1 dan HAV2 (244bp)

(1) Campuran reagen PCR 1st round dibuat sesuai jumlah tabung dengan rincian:

- Master mix Promega : 10 μ l
- Primer HAV1 : 1 μ l
- Primer HAV2 : 1 μ l
- d H2O : 5 μ l

(2) Ekstraksi cDNA sampel 3 μ l dan control negative ditambahkan sesuai kode nomer pada tabung

(3) Alat *thermocycler (PCR Machine)* dilakukan *setting*

- Predenaturasi : 94⁰c selama 5 menit
- Denaturasi : 94⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- *Annealing* : 57⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- Ekstensi : 72⁰c selama 45 detik (40 siklus)
- Ekstensi final : 72⁰c selama 7 menit

(4) Tabung PCR diletakkan pada *well* dialat *PCR Machine*

(5) *Running* PCR dimulai

2) Tahap PCR 2nd dengan primer HAV3 dan HAV4 (186bp)

(1) Campuran reagen PCR 2nd round dibuat sesuai jumlah tabung dengan rincian:

- Master mix Promega : 10 μ l
- Primer RJ-3 : 1 μ l
- Primer BR-6 : 1 μ l
- dH2O : 6.5 μ l

(2) Produk PCR 1st 1.5 μ l dan kontrol negative ditambahkan sesuai kode nomer pada tabung PCR

(3) Alat *thermocycler (PCR Machine)* dilakukan *setting*

- Predenaturasi : 94⁰c selama 5 menit
- Denaturasi : 94⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- *Annealing* : 55⁰c selama 30 detik (40 siklus)
- Ekstensi : 72⁰c selama 45 detik (40 siklus)
- Ekstensi final : 72⁰c selama 7 menit

(4) Tabung PCR diletakkan pada *well* dialat *PCR Machine*

(5) *Running PCR* dimulai

3) Visualisasi Hasil PCR

Setelah PCR telah selesai dilakukan maka tahapan selanjutnya adalah mendeteksi produk PCR menggunakan tehnik elektroforesis (ELP). Langkah-langkah ELP adalah :

- (1) Minigel agarose 2% yang mengandung Ethidium Bromide disiapkan dengan konsentrasi akhir 1 µl/ml
- (2) Gel agarose diletakkan pada *wells*
- (3) Gel agarose yang di *wells* dipindahkan ke dalam wadah ELP
- (4) Hasil produk PCR 2nd sebanyak 5 µl di pindahkan ke dalam gel
- (5) Alat ELP dinyalakan pada tegangan 100 V selama 40-45 menit atau sampai warna kuning berada pada batas paling bawah kolam ELP.
- (6) Alat ELP dimatikan apabila proses sudah selesai. Gel agarose diambil kemudian dibaca menggunakan mesin gel doc.

4) *Sequencing* produk PCR

Prosedur selanjutnya sebelum dilakukan sequencing yakni dilakukan purifikasi dan labeling. Alat dan bahan yang diperlukan yakni: Mesin PCR Thermal Cycler, pipet mikro, mesin setrifuse, mesin vortex, mesin ABI prism 310 sequencer, QIAquick PCR Purification Kit, ddH₂O, BigDye Terminator V1.1, V3.1 5X sequencing buffer, BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Dye, DNA yang telah dimurnikan, forward primer, XterminatorTM solution, dan SAMTM solution.

Langkah –langkah:

- (1) Produk amplikasi yang menunjukkan hasil positif dimurnikan dengan menggunakan QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).
- (2) 200µl buffer PBI ditambahkan ke dalam hasil PCR dan dihomogenisasi
- (3) Campuran selanjutnya dipindahkan ke dalam *QIAquick coloumn* dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit
- (4) Cairan yang terkumpul pada 2 ml collection tube dibuang dan collection tube dipasang kembali dengan *QIAquick coloumn*.

- (5) 750µl buffer PE ditambahkan ke dalam QIAquick coloumn dan disentrifuse pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Cairan yang terkumpul pada 2 ml collection tube dibuang dan collection tube dipasangkan kembali dengan QIAquick coloumn.
- (6) Sentrifuse dilakukan dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan.
- (7) QIAquick coloumn dipindahkan ke dalam 1.5 ml tube. Mengelusi DNA dilakukan dengan cara memasukkan 25 µl buffer EB ke dalam QIAquick coloumn, diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang dan disentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit untuk mendapatkan DNA yang sudah dimurnikan.

Setelah dimurnikan, DNA selanjutnya di labeling dengan komposisi sebagai berikut: 6µl ddH₂O, 1.5 µL BigDye Terminator V1.1, V3.1 5X *sequencing buffer*, 1 µL *BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Dye*, 1 µL DNA sebagai template dan 0.5 µL *forward* primer. Labeling dilakukan dengan menggunakan mesin PCR BioRad T100 Thermal Cycler (BioRad) dengan pengaturan suhu 95⁰C selama 5 menit, 96⁰C selama 10 menit, 50⁰C selama 5 menit, 60⁰C selama 4 menit, 60⁰C selama 5 menit. Produk PCR sequencing dimurnikan dengan menambahkan 45 µL Xterminator™ dan 10 µL SAM™ solotion serta dilakukan homogenisasi selama 30 menit. Sampel selanjutnya dijalankan pada performance-optimized polymer (POP6) on ABI prism 310 sequencer. Hasil yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan MEGA version X.

4.7.4 Prosedur Analisis Hasil cDNA *Sequencing* Virus Hepatitis A

Analisis multiple alignment dibuat menggunakan program BioEdit version 7.2.5. Hasil urutan sekuens gen dianalisis dengan pencocokan gen yang diambil dari *Gene Bank* selanjutnya pohon filogenetik disusun dengan Unweight Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) menggunakan pengelompokkan pada MEGA version X.

4.7.5 Prosedur pengambilan kelompok Kontrol

Kelompok kontrol dipilih berdasarkan hasil wawancara menggunakan kuesioner kepada siswa sehat di SMA Lamongan dan santri di

Pondok Pesantren Bangkalan.

4.4 Pengolahan dan Analisis Data

4.4.1 Pengolahan Data

Kegiatan pengolahan data ini sangat penting dan memerlukan ketelitian dan kecermatan dalam pelaksanaannya. Pengolahan data adalah kegiatan merubah atau membuat seluruh data yang dikumpulkan menjadi suatu bentuk yang disajikan, dianalisa dan ditarik suatu kesimpulan. Langkah-langkah pengolahan data antara lain :

1. Editing

Merupakan kegiatan memeriksa kembali kuesioner (daftar pertanyaan) yang telah diisi pada saat pengumpulan data.

2. Coding

Merupakan kegiatan merubah data ke dalam bentuk yang lebih ringkas dengan menggunakan kode-kode tertentu.

3. Pemasukan Data

Setelah data diedit dan dilakukan pemberian kode (coding) langkah selanjutnya adalah pemasukan data. Pemasukan data ini bisa menggunakan komputer dan manual.

4. Tabulasi Data

Tabulasi adalah proses pengolahan data yang bertujuan untuk membuat tabel-tabel yang dapat memberikan gambaran statistika.

4.4.2 Analisis Data

Analisa data yang dilakukan mencakup :

1. Analisa Univariat

Digunakan untuk menggambarkan hasil analisis serologis dan molekuler virus hepatitis A yang menyebabkan terjadinya wabah di Lamongan dan Bangkalan. selain itu juga menggambarkan tingkat pengetahuan responden terkait infeksi hepatitis A.

2. Analisa Bivariat

Analisis ini dilakukan untuk menguji dan menjelaskan hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di Lamongan dan Bangkalan. Analisis bivariat dilakukan dengan uji *chi square*.

BAB 5

HASIL YANG DICAPAI

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Gambaran karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur, pekerjaan dan gejala yang dirasakan

Penelitian ini dilakukan di dua tempat yang mengalami wabah hepatitis A yakni SMA di Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan. Karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur, pekerjaan dan gejala yang dirasakan dapat dilihat pada tabel 5.1

Tabel 5.1 Karakteristik subyek penelitian berdasarkan jenis kelamin, umur, pekerjaan dan gejala yang dirasakan

Karakteristik	SMA di Lamongan (N=54)		Pondok Pesantren di Bangkalan (N=34)	
	N	%	n	%
Jenis kelamin				
P	35	65%	6	18%
L	19	35%	28	82%
Umur (tahun)				
≤17	33	61%	16	47%
18-25	5	9%	12	35%
26-45	10	19%	6	18%
≥46	6	11%	0	0%
Pekerjaan				
PKM	4	7%	0	0%
Siswa/Santri	34	63%	27	79%
Guru/pengasuh pondok pesantren	4	7%	3	9%
Penjamah makanan/Juru masak	12	22%	4	12%
Gejala				
Demam	23	43%	18	53%
Berkeringat	7	13%	14	41%
Sakit kepala	21	39%	10	29%
Malaise	13	24%	12	35%
Perut kembung	14	26%	13	38%
Mual	32	59%	16	47%
Muntah	24	44%	10	29%
Kurang nafsu makan	28	52%	14	41%
Nyeri ulu hati	13	24%	19	56%
Mata kuning	27	50%	15	44%
Kencing pekat seperti teh	23	43%	10	29%

Dari tabel 5.1 didapatkan hasil bahwa kelompok yang terkena wabah sebagian besar yakni kelompok usia ≤ 17 dan kelompok pelajar maupun santri. hal ini disebabkan karena wabah tersebut terjadi di lingkungan pondok pesantren dan sekolah sehingga sebagian besar subyek yang terkena yakni kelompok usia ≤ 17 dan kelompok pelajar maupun santri.

5.1.2 Gambaran Genotipe Virus Hepatitis A di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren Bangkalan

5.1.2.1 Pemeriksaan serologis rapid test diagnostik IgM Anti HAV

Penelitian ini menggunakan sampel yang berasal dari tempat terjadinya wabah hepatitis A yakni SMA Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan Jawa Timur. Sampel yang dilibatkan dalam penelitian ini sebanyak 88 sampel yang terdiri dari 54 berasal dari SMA Lamongan dan 34 dari Pondok pesantren di Bangkalan. Semua sampel yang terkumpul akan dilakukan pemeriksaan serologis menggunakan metode Rapid Test Diagnostic (RTD) IgM Anti HAV. Hasil pemeriksaan RTD IgM Anti HAV dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Pemeriksaan serologis RTD IgM Anti HAV

Jenis Pemeriksaan	SMA Lamongan (n=54)	Pondok Bangkalan (n=32)	Pesantren
IgM Anti HAV (+)	32 (59,25%)	19 (55,9%)	

Hasil pemeriksaan serologis menunjukkan bahwa sebagian besar sampel menunjukkan hasil positif yang berarti bahwa infeksi hepatitis A baru didapatkan dari wabah yang terjadi pada periode waktu tertentu.

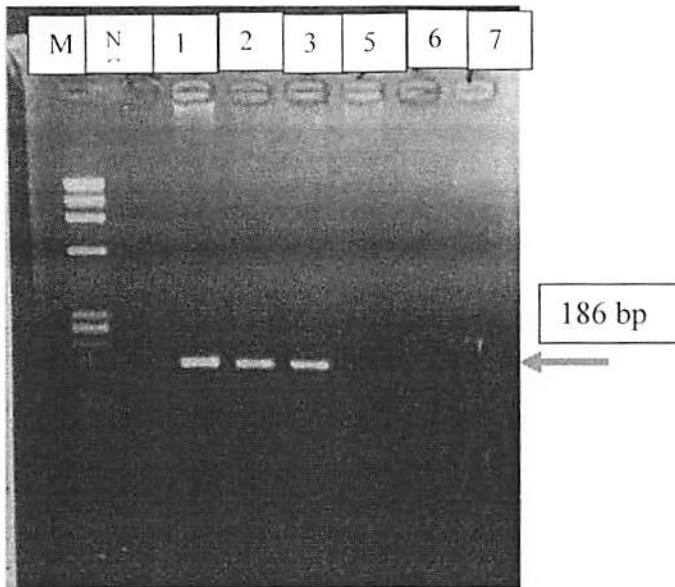
5.1.2.2 Hasil pemeriksaan RT-PCR virus hepatitis A

Pemeriksaan RT-PCR dilakukan pada semua sampel penelitian yang menunjukkan hasil pemeriksaan serologis negatif maupun positif. Sampel Lamongan nomor urut 1-54 sedangkan dari pondok pesantren Bangkalan nomor 55-88. Pada tahap ini dimulai dengan ekstraksi RNA, *reverse transcriptase*-PCR, nested PCR, visualisasi hasil PCR dengan tehnik elektroforesis (ELP). Semua sampel akan dilakukan pemeriksaan PCR pada dua daerah yakni VP1-P2A dan VP3-VP1. Pada daerah VP1-P2A menggunakan 2 pasang primer yakni BR-5 dan BR-9 (361bp) serta RJ-3

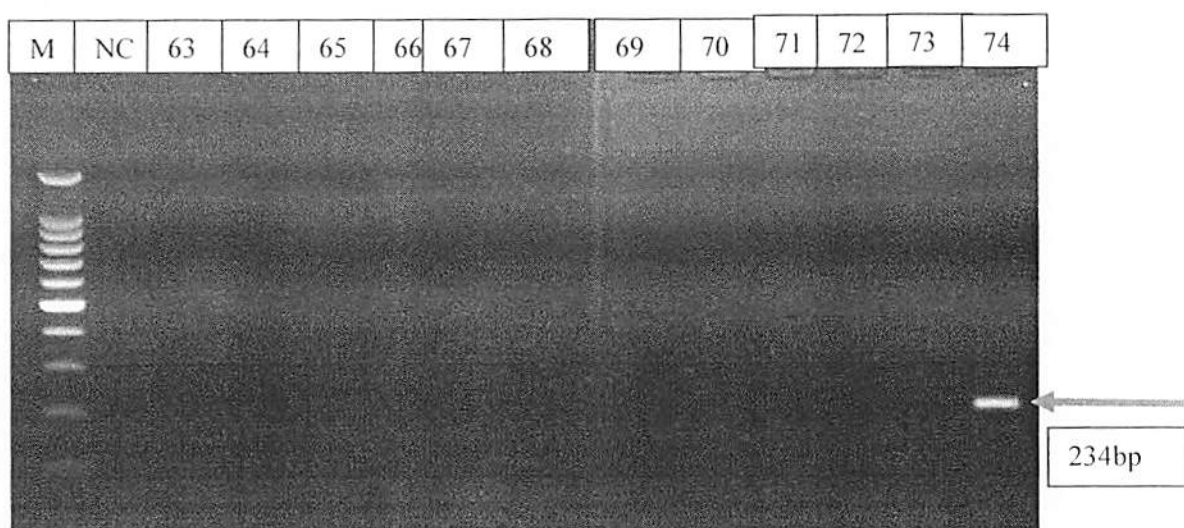
dan BR-6 (234bp). Pada daerah VP3-VP1 menggunakan primer HIAV1 dan HAV2 (244bp) serta HAV3 dan HAV4 (186bp). Visualisasi hasil RT-PCR menggunakan hasil PCR pada masing-masing daerah pada tahap second round. Hasil pemeriksaan RT-PCR dapat dilihat pada tabel 5.2 serta gambar 5.1, 5.2.

Tabel 5.3 Hasil pemeriksaan PCR virus hepatitis A

Jenis pemeriksaan	Region	
	VP3-VP1	VP1-P2A
SMA di Lamongan	8/54 (15%)	16/54 (30%)
Pondok Pesantren di Bangkalan	6/34 (18%)	2/34 (6%)



Gambar 5.1 hasil elektroforesis cDNA produk RT-PCR VHA dengan primer second round HAV 3 dan HAV 4 dari target VP3-VP1. M marker 100bp. NC Negatif Control. No Sampel 1-3, 5-7. Sampel yang positif yakni no 1-3.



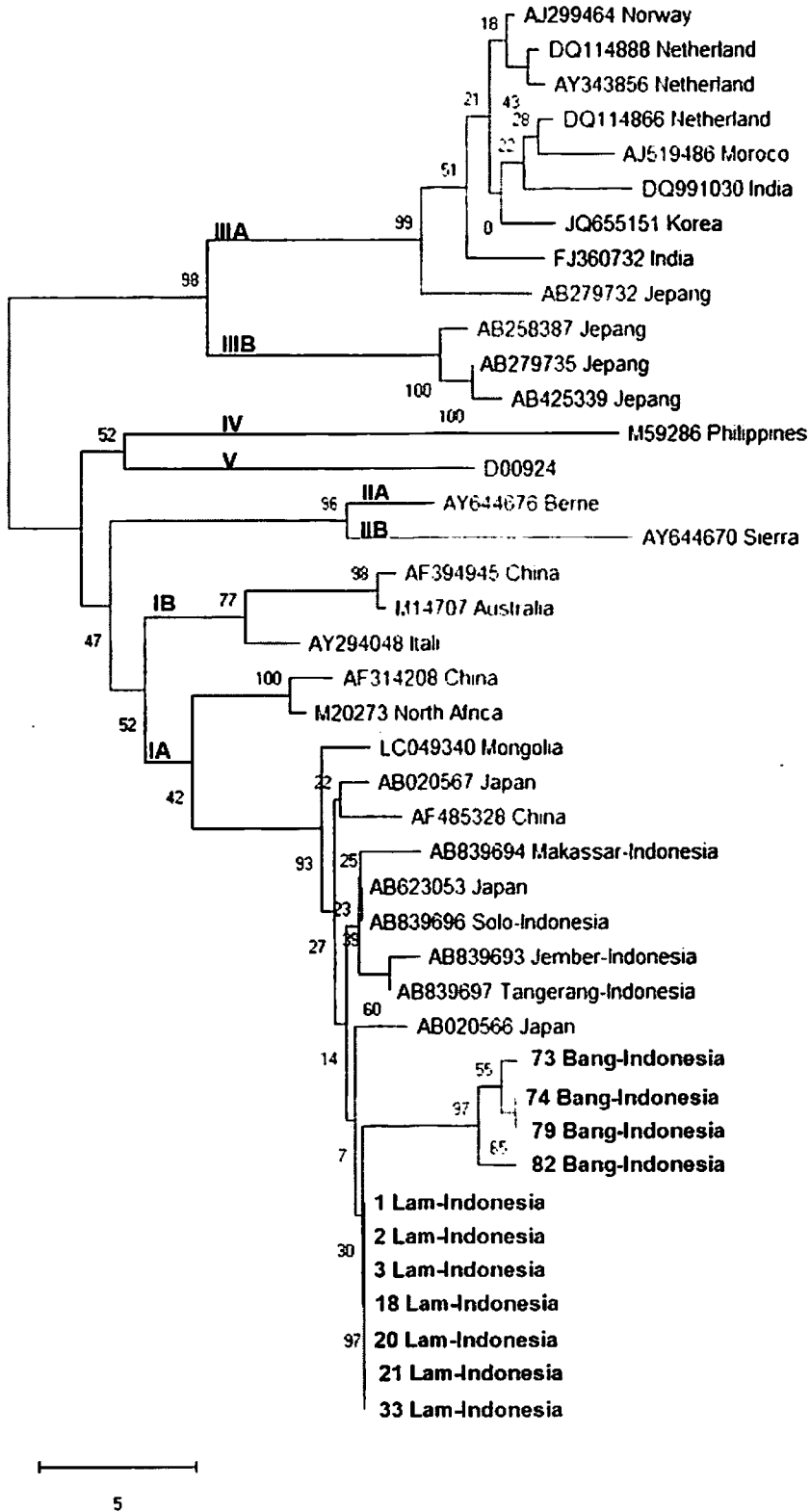
Gambar 5.2 hasil elektroforesis cDNA produk RT-PCR VHA dengan primer second round Rj3 dan Br6 dari target VP1-P2A. M marker 100bp, NC Negatif Control, No Sampel 63-74. Sampel yang positif yakni nomor 74.

Tabel 5.4 Rangkuman hasil serologis dan PCR virus hepatitis A

Jenis pemeriksaan	IgM (-) dan RT-PCR (+)	IgM dan RT-PCR (+)
SMA di Lamongan	5/54 (9,25%)	13/54 (24,07%)
Pondok Pesantren di Bangkalan	2/34 (5,9%)	5/34 (14,7%)

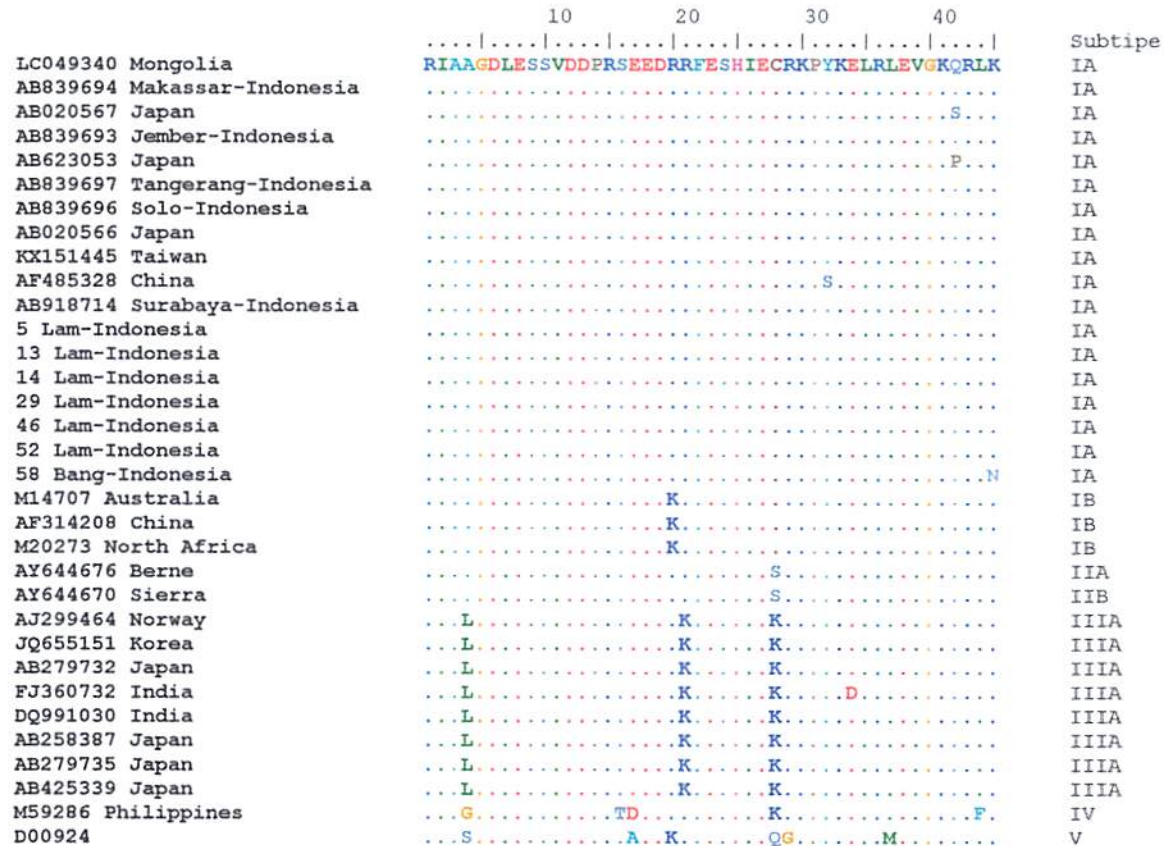
5.1.2.3 Hasil sequencing dan analisis filogenetik virus hepatitis A

Pemeriksaan sequencing dilakukan pada sampel yang menunjukkan hasil positif pada pemeriksaan RT-PCR dan elektroforesis. Hasil sequencing dianalisis menggunakan MEGA X dengan membandingkan terhadap sekuens VHA yang sudah dipublikasikan yang diambil dari database NCBI GenBank yang diunduh dari internet. *Multiple Alignment* dilakukan untuk mengetahui perbedaan asam amino sampel dengan *reference strain*. Hasil *Multiple Alignment*, asam amino dan analisis filogenetik dapat dilihat pada gambar 5.13-5.16.

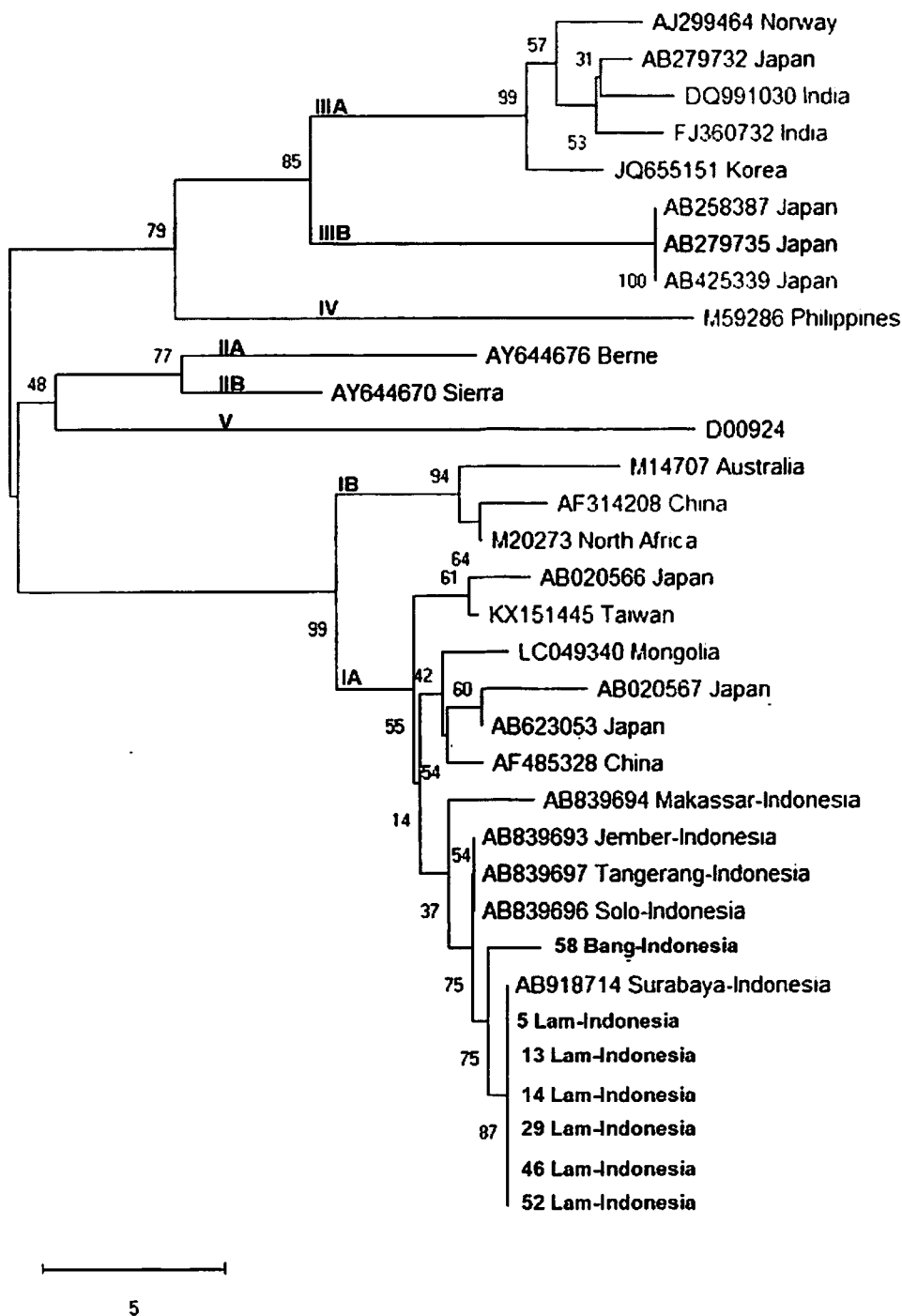


Gambar 5.4 Hasil analisis filogenetik pada daerah VP3-VP1 (186bp) virus hepatitis A. Sampel penelitian yakni dengan kode Lam-Indonesia (Lamongan) dan Bang-Indonesia (Bangkalan)

Sampel penelitian yang positif PCR pada daerah VP3-VP1 sebanyak 14, namun yang berhasil dilakukan analisis filogenetik sebanyak 11. 3 tidak berhasil dilakukan analisis filogenetik. Analisis homologi dilakukan untuk mengetahui tingkat homologi sampel dengan *reference strain* serta sampel dengan sampel. Hasil analisis homologi menunjukkan bahwa homologi sampel antara dua tempat SMA Lamongan dan Pondok Pesantren Bangkalan yakni sebesar 96%. sedangkan hasil analisis homologi sampel dengan *reference strain* pada sub tipe IA mempunyai rentang 94-99% namun apabila dibandingkan antar sub tipe menunjukkan hasil antara 79-99%.



Gambar 5.5 Hasil *Multiple Alignment* asam amino pada daerah VP1-P2A (234bp) virus hepatitis A. Sampel penelitian yakni dengan kode Lam-Indonesia (Lamongan) dan Bang-Indonesia (Bangkalan)



Gambar 5.6 Hasil analisis filogenetik pada daerah VP1-P2A (234bp) virus hepatitis A. Sampel penelitian ini yakni dengan kode Lam-Indonesia (Lamongan) dan Bang-Indonesia (Bangkalan)

Sampel penelitian yang positif PCR pada daerah VP1-P2A sebanyak 18, namun yang berhasil dilakukan analisis filogenetik sebanyak 7. 5 sampel penelitian masuk analisis filogenetik pada daerah VP1-VP2, 6 lainnya tidak

berhasil dilakukan analisis filogenetik. Hasil analisis homologi antar sampel menunjukkan hasil 99%. sampel dari daerah Lamongan menunjukkan homologi 100% dengan *reference strain* dari Surabaya dengan *accession number* AB918714 sedangkan dari Bangkalan sebesar 99%. Homologi sampel dengan sub tipe IA lainnya yakni berkisar 94-100% namun apabila dibandingkan dengan seluruh *reference strain* menunjukkan hasil antara 76-100%.

5.1.3 Hubungan antara pengetahuan dengan kejadian hepatitis A di SMA Lamongan dan pondok pesantren Bangkalan

Pengetahuan merupakan pemahaman subyek penelitian tentang hepatitis A yang meliputi pengertian, penyebab, cara penularan, cara pencegahan, cara diagnosis dan epidemiologi hepatitis A. Distribusi pengetahuan subyek penelitian terhadap kejadian hepatitis A dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.5 distribusi pengetahuan subyek penelitian terhadap kejadian hepatitis A

Pengetahuan	SMA Lamongan				Pondok Pesantren Bangkalan			
	Kontrol		Kasus		Kontrol		Kasus	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Baik	43	84%	21	39%	18	55%	19	56%
Cukup	7	14%	22	41%	14	42%	12	35%
Buruk	1	2%	11	20%	1	3%	3	9%
Total	51	100%	54	100%	33	100%	34	100%

Tabel 5.6 Hasil analisis hubungan antara tingkat pengetahuan dengan infeksi hepatitis A di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren Bangkalan

No	Tempat	P value	OR		Kuatnya hubungan antar variabel	α (CI=95%)
			Kategori pengetahuan buruk-baik	Kategori pengetahuan buruk-cukup		
1	SMA di Lamongan	0,001	22,523	3,5	42.8%	0.05
2	Pondok Pesantren di Bangkalan	0.558	-	-	13.1%	
3	SMA di Lamongan	0,001	10.67	4,32	29.5%	

dan
Pondok
Pesantren
di
Bangkalan

Skala kategori tingkat pengetahuan pada penelitian ini adalah ordinal namun diturunkan menjadi skala nominal sehingga bisa dilakukan analisis menggunakan *chi-square*. Berdasarkan analisis statistik menggunakan *chi-square* didapat hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di SMA Lamongan. Hasil di Pondok Pesantren Bangkalan menunjukkan tidak terdapat hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A, namun gabungan di kedua tempat SMA Lamongan dan Pondok Pesantren Bangkalan menunjukkan hubungan antara tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A. *Odds Ratio* berfungsi untuk menganalisis besarnya hubungan antara faktor resiko kejadian suatu penyakit. Pada penelitian faktor resiko terjadinya infeksi hepatitis A yaitu tingkat pengetahuan.

5.2 Luaran Yang Dicapai

5.2.1 Jurnal Internasional

Jurnal masih dalam bentuk draft sebanyak 1

5.2.2 Seminar Internasional

- 1) Sebagai poster presentation dalam 2nd International Conference on Agromedicine and Tropical Disease
- 2) Sebagai poster presentation dalam The 1st Indonesia Symposium on Microbial Ecology 2018

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

- 6.1. Melakukan analisis serologis dan molekuler virus hepatitis B koinfeksi dengan HIV yang mendapatkan terapi lamivudin
- 6.2. Melakukan analisis serologis dan molekuler virus hepatitis B koinfeksi dengan HIV yang mendapatkan terapi selain lamivudin



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. Prevalensi IgM pada subyek penelitian dengan gejala klinis di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan yakni sebesar 32 (59.25%) dan 19 (55.9%).
2. Genotipe dan subtipe virus hepatitis A di SMA Lamongan dan Pondok Pesantren di Bangkalan sama yakni IA
3. Tingkat pengetahuan subyek penelitian terkait infeksi hepatitis A di SMA Lamongan didominasi oleh tingkat pengetahuan buruk sebesar 61.1% dan Pondok Pesantren di Bangkalan didominasi oleh tingkat pengetahuan yang baik sebesar 55.9%.
4. Tidak ada hubungan tingkat pengetahuan dengan kejadian infeksi hepatitis A di Bangkalan, namun menunjukkan hubungan pada hasil di Lamongan dan gabungan di Lamongan dan Bangkalan.

7.2. Saran

Penelitian selanjutnya diharapkan mampu menghubungkan beberapa faktor risiko dari infeksi hepatitis A tidak hanya faktor pengetahuan sehingga dapat memberikan informasi yang lengkap terkait infeksi hepatitis A secara serologis, molekuler serta faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya infeksi di Indonesia.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



DAFTAR PUSTAKA

- Ali Alhowaish, J., Ali Alhowaish, M., Hamoud Alanazi, Y., Mana Alshammari, M., Saeid Alshammari, M., Ghadeer Alshamari, N., Abdullah Algarni, S. (2017). Knowledge, attitudes and practices toward prevention of hepatitis B virus infection among medical students at Northern Border University, Arar, Kingdom of Saudi Arabia. *Electronic Physician*, (September), 2008, hal 5842. <https://doi.org/10.19082/5388>
- Averhoff, Francisco Yury Khudyakov, B. P. B. (2014). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, Eight Edition*. (R. Dolin, Ed.) (Eight edit). Canada: Elsevier.
- Center for Diseases Control and Prevention. (2013). Multistate outbreak of hepatitis A virus infections linked to pomegranate seeds from Turkey (Final Update). Retrieved from <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2013/a1b-03-31/index.html> diakses pada 19 Februari 2018 pukul 22.00 WIB.
- Center for Diseases Control and Prevention. (2017). Viral Hepatitis. Retrieved from <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm> diakses pada 19 Februari 2018 pukul 22.30 WIB.
- Gripenberg, M., Aloysia, N., Cor, D., Azou, M. L., Marsh, G., Druelles, S., & Nealon, J. (2018). International Journal of Infectious Diseases Changing sero-epidemiology of hepatitis A in Asia Pacific countries: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 68, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.12.021>
- Jeong, S. H., & Lee, H. S. (2010). Hepatitis a: Clinical manifestations and management. *Intervirolgy*, 53(1), 15–19. <https://doi.org/10.1159/000252779>
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2018a). *28 mahasiswa ipb positif hepatitis a*. Retrieved from <http://www.depkes.go.id/article/view/15121400033/28-mahasiswa-ipb-positif-hepatitis-a.html> diakses pada 18 Februari 2018 pukul 08.00 WIB.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2018b). *Pengendalian hepatitis secara komprehensif di indonesia*. Retrieved from <http://www.depkes.go.id/article/view/2271/pengendalian-hepatitis-secara-komprehensif-di-indonesia.html> diakses pada 18 Februari 2018 pukul 08.30 WIB.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (2018). *Kemenkes tinjau kasus malaria dan hepatitis a di kulon progo*. Retrieved from <http://www.depkes.go.id/article/view/1776/kemenkes-tinjau-kasus-malaria-dan-hepatitis-a-di-kulon-progo.html> diakses pada 18 Februari 2018 pukul 09.00 WIB.
- Koenig, K. L. (2017). Hepatitis A Virus: Essential Knowledge and a Novel Identify-Isolate-Inform Tool for Frontline Healthcare Providers, 18 (October 2016), 1000–1007. <https://doi.org/10.5811/westjem.2017.10.35983>
- Nelson, N. P., Allison, M. A., Lindley, M. C., Brtnikova, M., Crane, L. A., Beaty, B. L., Kempe, A. (2017). Physician Knowledge and Attitudes About Hepatitis A and Current Practices Regarding Hepatitis A Vaccination Delivery. *Academic Pediatrics*, 17(5), 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.acap.2017.01.001>

- Park, S., & Choi, J. S. (2016). Predictors of hepatitis A vaccine coverage among university students in Korea. 75–82. <https://doi.org/10.1111/jjns.12088>
- Shin, E.-C., & Jeong, S.-H. (2018). Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis A. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, a031708. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031708>
- Shin, E., Seok, J., Oh, K., Suck, S., Kwon, M., Kim, S., ... Kim, J. (2017). Short communication A waterborne outbreak involving hepatitis A virus genotype IA at a residential facility in the Republic of Korea in 2015. *Journal of Clinical Virology*, 94(July), 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.006>
- Shin, S. Y., Jeong, S., Sung, P. S., & Lee, J. (2016). Comparative Analysis of Liver Injury-Associated Cytokines in Acute Hepatitis A and B, 57(3), 652–657. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.3.652>
- Siti Setiati, Idrus Alwi, Aru W. Sudoyo, Marcellus Simadibrata K., A. F. S. (Ed.). (2014). *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam (Edisi Keen, pp. 1945–1962)*. Jakarta: InternaPublising.
- State of Hawaii, D. of H. (2016). Hepatitis A Outbreak 2016. Retrieved from
- Torok, M. E. (2014). *Manson's Tropical Diseases (Twenty-Thi)*. China: Elsevier.
- Tsatsralt-od, B., Baasanjav, N., Nyamkhuu, D., Ohnishi, H., Takahashi, M., Kobayashi, T., ... Nishizawa, T. (2016). Molecular Analysis of Hepatitis A Virus Strains Obtained From Patients With Acute Hepatitis A in Mongolia . 2004 – 2013, 630(September 2015), 622–630. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Utsumi, T., Yano, Y., Amin, M., Lusida, M. I., Hotta, H. A. K., & Hayashi, Y. (2014). Acute Hepatitis due to Hepatitis A Virus Subgenotype IA as an Imported Infectious Disease from Indonesia, 60(2), 43–47.
- Vaughan, G., Maria, L., Rossi, G., Forbi, J. C., Paula, V. S. De, Purdy, M. A., Khudyakov, Y. E. (2014). Infection . Genetics and Evolution Hepatitis A virus: Host interactions . molecular epidemiology and evolution. *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION*, 21, 227–243. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.023>
- World Health Organization. (2017). Hepatitis A. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>
- Yun, H., Kim, S., Lee, H., Byun, K. S., Kwon, S. Y., Yim, H. J., Jee, Y. (2008). Genetic Analysis of HAV Strains Isolated From Patients With Acute Hepatitis in Korea . 2005 – 2006. 784, 777–784. <https://doi.org/10.1002/jmv>

LAMPIRAN

Lampiran 1: Draft Jurnal

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS A OUTBREAKS IN
TWO DISTRICTS IN INDONESIA 2018: SAME SUBTYPE BUT
DIFFERENT CAUSATIVE HAV**

Dewi Setyowati¹, Teguh Mubawadi³, Yudied Agung Mirasa³, Didik Purwanto³, Mochammad Amin², Takoko Utsumi^{2,4}, Soetjipto², Juniastuti², Maria Inge Lusida^{2*}

¹ Doctoral program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia;

² Indonesia-Japan Collaborative Research Center for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya, Indonesia;

³ Surveillance team from the Surabaya Center for Environmental Health Engineering and Disease Control;

⁴ Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

*Address correspondence to Maria Inge Lusida, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Campus C, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia.

E-mail: ingelusida@yahoo.com

Abstract

Background: Hepatitis A virus (HAV) is an important causative agent of acute hepatitis in humans worldwide. Its transmission occurs fecal oral from person to person contact. Hepatitis A outbreaks in Indonesia occurred in several regions including Senior high school at Lamongan and Islamic boarding school at Bangkalan. Habit, attitude, knowledge level could play a role in the incidence of hepatitis A in affected regions.

Aims: The aim of this study was to describe an outbreak of acute hepatitis and also to know the related knowledge level on hepatitis A infection in affected districts in Indonesia in 2018.

Material and methods: Serum samples obtained from 88 individuals with clinical manifestation of acute hepatitis in Lamongan (n=54), Bangkalan (n=34)

were analyzed to detect IgM anti-HAV and RNA HAV in VP1-P2A and VP1-VP3 junction. The positive sera would be sequenced to analyzed phylogenetic tree using MEGA X. A control group with total member of 84 were taken from health students. A total samples of 172 consisted of control and case groups were analyzed statistically.

Results: Phylogenetic analysis showed that the HAV strains detected in this study belong to the "HAV 1A" cluster, even though the causative HAV in Lamongan was different from those found in Bangkalan, as shown in the multiple alignment. The knowledge level of the students in Lamongan showed a significant relation with the incidence, vice versa with that in Bangkalan. The school styles in both affected community play a role in this difference.

Conclusions: The subtype of hepatitis A virus in both areas is IA as those found in Indonesia before, but they were not originated from the same strain. There was a relationship between knowledge of the students in school of Lamongan, which is a half day school, while there was no relationship in that of Bangkalan, which is a full-day school.

Keywords : *Hepatitis A; knowledge; outbreak; Indonesia; 2018*

Introduction

Infection with hepatitis A virus (HAV), a major cause of acute hepatitis, presents an important public health problem worldwide (1) (2). The virus can spread through the fecal-oral route and also ingestion of contaminated food and water or direct contact with an infectious person. The manifestation could be asymptomatic or symptoms, ranging from mild symptoms to fulminant hepatitis, but it is rarely (3) (4). Lack of safe water, poor sanitation and hygiene are risk factors of HAV infection. In another side, the substantial economic loss also can make hepatitis virus A epidemics (4).

Hepatitis A virus (HAV) is a group of family Picornaviridae and the genus is Hepatovirus. HAV have genome 7.5 kb with positive-sense, single-stranded RNA. HAV have six genotypes (I-VI), genotype I-III can infect human. The Subtype of HAV are A and B which divided by differences of VP1-P2A junction, the nucleotide variation between isolates is about 15% and nucleotide

variation between subgenotype ranging from 7-7.5% (5) (6) (7). Indonesia is a region with endemicity of hepatitis A virus high. based on research from six regions from four islands different in Indonesia showed that genotype in Indonesia is IA were identical each other ranging from 96.3-100% (8).

Hepatitis A outbreaks in Indonesia occurred in several regions including Senior high school at Lamongan and Islamic boarding school at Bangkalan. Habit, attitude, knowledge level could play a role in the incidence of hepatitis A in affected regions. In Lamongan, the samples could choice facility and food what they want to use and eat, but in Bangkalan everything has regulation from Islamic boarding school board, so they no had the choice to use another facility. High-level knowledge about hepatitis A infection no offset with attitude to avoid hepatitis A infection. Water and food in Bangkalan used together and same every individual. Wells used as water sources in there, and also the water was not flowing but in the form of a pool so that it made one of the factors causing hepatitis A infection.

Indonesia was a country with high endemicity of hepatitis A but genetic information related with HAV is very limited. This study was the first study that related the knowledge and incidence of hepatitis A infection so that it was expected to give genetic information and epidemiological data of hepatitis A virus causing outbreaks on Lamongan and Bangkalan District East Java, Indonesia.

Materials and Methods

Study population

The serum samples were collected from a total of 88 samples from two districts regions on East Java where outbreaks hepatitis A occurred. The samples were who have a sign and symptom hepatitis infection in senior high school at Lamongan (n=54) and Islamic boarding school at Bangkalan (n=34) East Java in January-Juli 2018. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee Faculty of Medicine Airlangga University Indonesia.

HAV serological test, RNA extraction, and PCR amplification

The serum samples were screened for IgM using rapid test SD BIO LINE HAV IgG/IgM (Standart Diagnostics, INC, Republic of Korea). Viral RNA was extracted from 140µl of serum using a QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen).

Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Then all of the samples purified RNA was used to generate cDNA with ReverTra Ace[®] (Toyobo, Toyobo Co., LTD, Osaka, Japan) following the manufacturer's recommendations. A Part of the VP1-P2A and VP3-VP1 junctions were amplified using reverse transcription PCR. Primer representing the VP1-P2A and VP3-VP1 were outer forward and reverse and inner also forward and reverse. The primers for region VP1-P2A were Primer BR-5 & BR-9 for first round PCR then continued with Primer RJ-3 & BR-6 for second PCR. The primers for region VP3-VP1 were Primer HAV1 & HAV2 for first PCR and continued with Primer HAV3 & HAV4 for second round PCR. The condition of PCR used primers HAV 1 & HAV2 were 5-min at 94°C, 40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 57°C, 45 sec at 72°C and 7 min at 72°C. Second round PCR for HAV3 & HAV4 has condition 5-min at 94°C, 40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 45 sec at 72°C and 7 min at 72°C. The first and second-round in region VP1-P2A using primers BR-5 & BR-9 and Primer RJ-3 & BR-6 has same condition PCR with second-round PCR using primers HAV3 & HAV4. The primers used in this process mention in the tables 1(9).

Table 1. Primers used for HAV RNA Amplification

Region	Name of primers	Sequence 5'-3'	Nucleotide number	Product size
VP1-P2A				
External	BR-5	TTGTCTGTCACAGAACAATCAG	2950-2972	361
	BR-9	AGTCACACCTCTCCAGGAAAACCTT	3310-3286	
Internal	RJ-3	TCCCAGAGCTCCATTGAA	2984-3002	234
	BR-6	AGGAGGTGGAAGCACTTCATTGA	3217-3193	
VP3-VP1				
External	HAV1	GCTCCTCTTTATCATGCTATGGAT	2172-2196	244
	HAV2	CAGGAAATGTCTCAGGTACTTTCT	2415-2391	
Internal	HAV3	ATGTTAACTACACAAGTTGGAGAT	2195-2218	186
	HAV4	GATCCTCAATTGTTGTGATAGCT	2380-2357	

Sequence and phylogenetic analysis

The nucleotide sequences of samples HAV were determined using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit with an Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Foster City, CA, USA). The result of sequencing would be compared with data from the international DNA databank

(DDBJ/EMBL/GenBank). The phylogenetic analysis. the following GenBank accession number of the published HAV strains were used and using the neighbor-joining method using 1000 replicates of bootstrap re-sampling as implemented in the MEGA X software program.

Statistical analysis

The samples for statistical divided to two groups. there were control and case group. The control group were from healthy student in Lamongan (n=51) and Bangkalan (n=33) and the case group were individuals with clinical manifestation of acute hepatitis in Lamongan (n=54) and Bangkalan (n=34), so total samples for statistical analysis were 172 samples. SPSS version 22 for Windows was used for the analysis of data and summary statistics. Chi Square is used to find relationship of knowledge level with incidence of hepatitis A infection. The level of significance is set as 0.05. therefore. if any p-value observed less than 0.05 was considered as statistical significance.

Result

Characteristic of Research Subjects Based on Gender, Age, Job and Symptoms

Characteristic of research subjects have many same condition because the outbreaks occurred on senior high school and Islamic boarding school but surrounding condition among two places have differences on sanitation. eating habit and personal hygiene. Characteristic of Research Subjects Based on Gender, Age and Job mention in table 2.

Table 2 Characteristic of Research Subjects Based on Gender, Age, Job and Symptoms

Characteristic	Senior High School, Lamongan (N=54)		Islamic Boarding School, Bangkalan (N=34)	
	n	%	n	%
Gender				
Female	35	65%	6	18%
Male	19	35%	28	82%
Age (year)				
≤17	33	61%	16	47%
18-25	5	9%	12	35%
26-45	10	19%	6	18%

≥46	6	11%	0	0%
Job				
Public Health	4	7%	0	0%
Student	34	63%	27	79%
Teacher	4	7%	3	9%
Chef	12	22%	4	12%
Symptoms				
Fever	23	43%	18	53%
Sweating	7	13%	14	41%
Headache	21	39%	10	29%
Malaise	13	24%	12	35%
Flatulence	14	26%	13	38%
Nausea	32	59%	16	47%
Vomiting	24	44%	10	29%
Lack of appetite	28	52%	14	41%
Heartburn	13	24%	19	56%
Yellow eyes	27	50%	15	44%
Urine like a tea	23	43%	10	29%

Prevalence of IgM anti-HAV and HAV RNA

All of 88 serum samples with clinically suspected of Hepatitis A were tested for the presence of IgM anti-HAV and HAV RNA. Thirty two (59.25%) of 54 and 19 (55.9%) of 34 from Lamongan and Bangkalan district, respectively, were positive for IgM Anti-HAV. The VP3-VP1 and VP1-P2A junction regions were amplified from all serum samples, whether they were IgM Anti-HAV positive or negative. HAV RNA of VP3-VP1 Junction was positive in 8 of 54 and 6 of 34, from Lamongan and Bangkalan, respectively. While that of VP1-P2A junction was positive in 16 of 54 from Lamongan and 2 of 34 from Bangkalan.

Sequencing and phylogenetic analyses

VP1-P2A region

A total of 7 sequences consists of 1 from Bangkalan and 6 from Lamongan. HAV strains obtained in the present study were 99-100% identical to each other in the VP1-P2A region and were most closely related to HAV strains of subgenotype IA. Samples from Lamongan have 100% homology with AB918714 (Surabaya-Indonesia) (Fig 1).

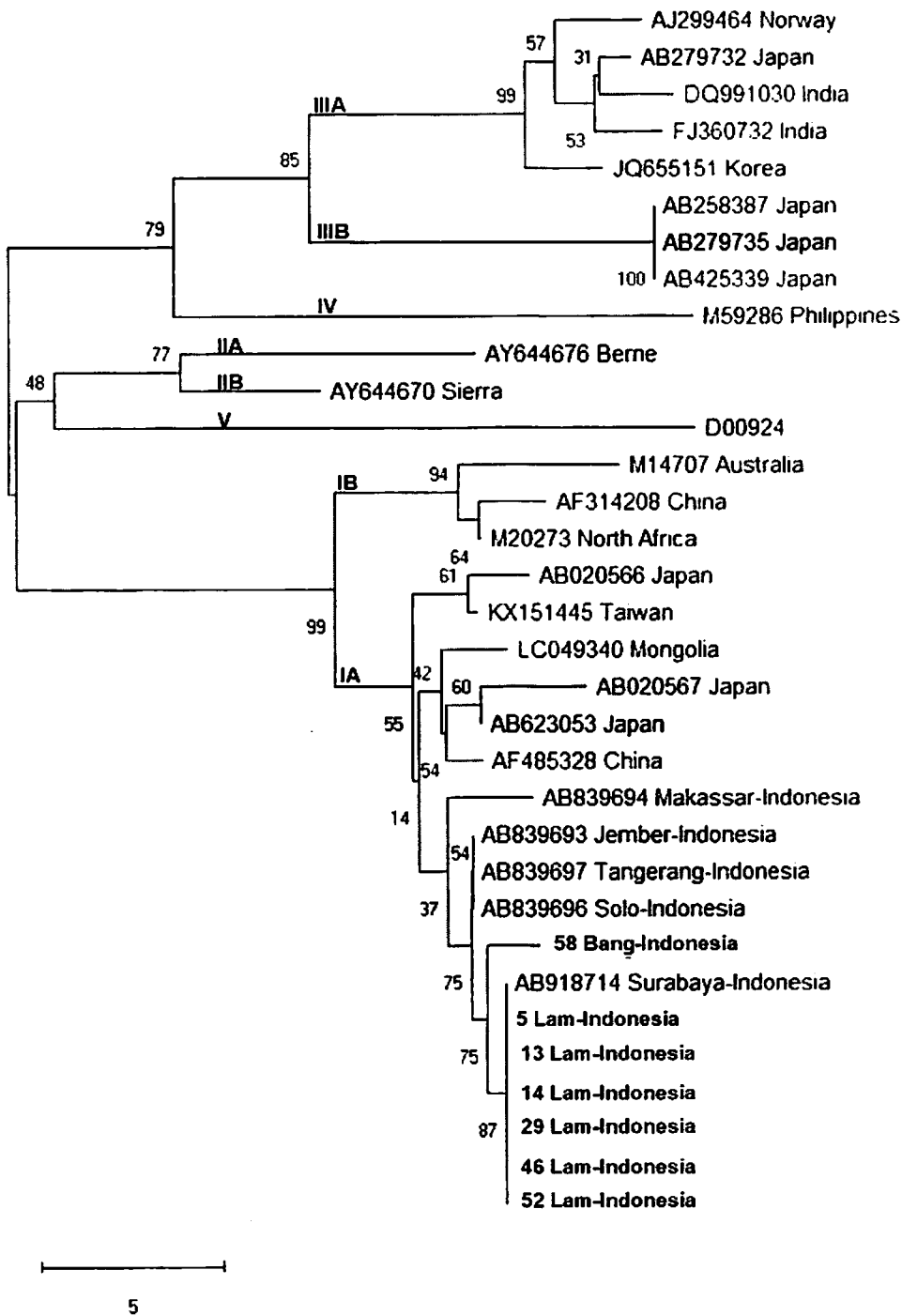


Fig.1 Phylogenetic tree generated using the sequences obtained from the VP1-P2A junction region. Bang=Bangkalan, Lam=Lamongan and the number was shown number of the samples.

VP3-VP1 region

A total of 11 sequences, four samples from Bangkalan and 7 from Lamongan. HAV strains obtained in the present study were 99% identical to each other in the VP3-VP1 junction region sequence and were most closely related to HAV strains of subgenotype IA (Fig 2).

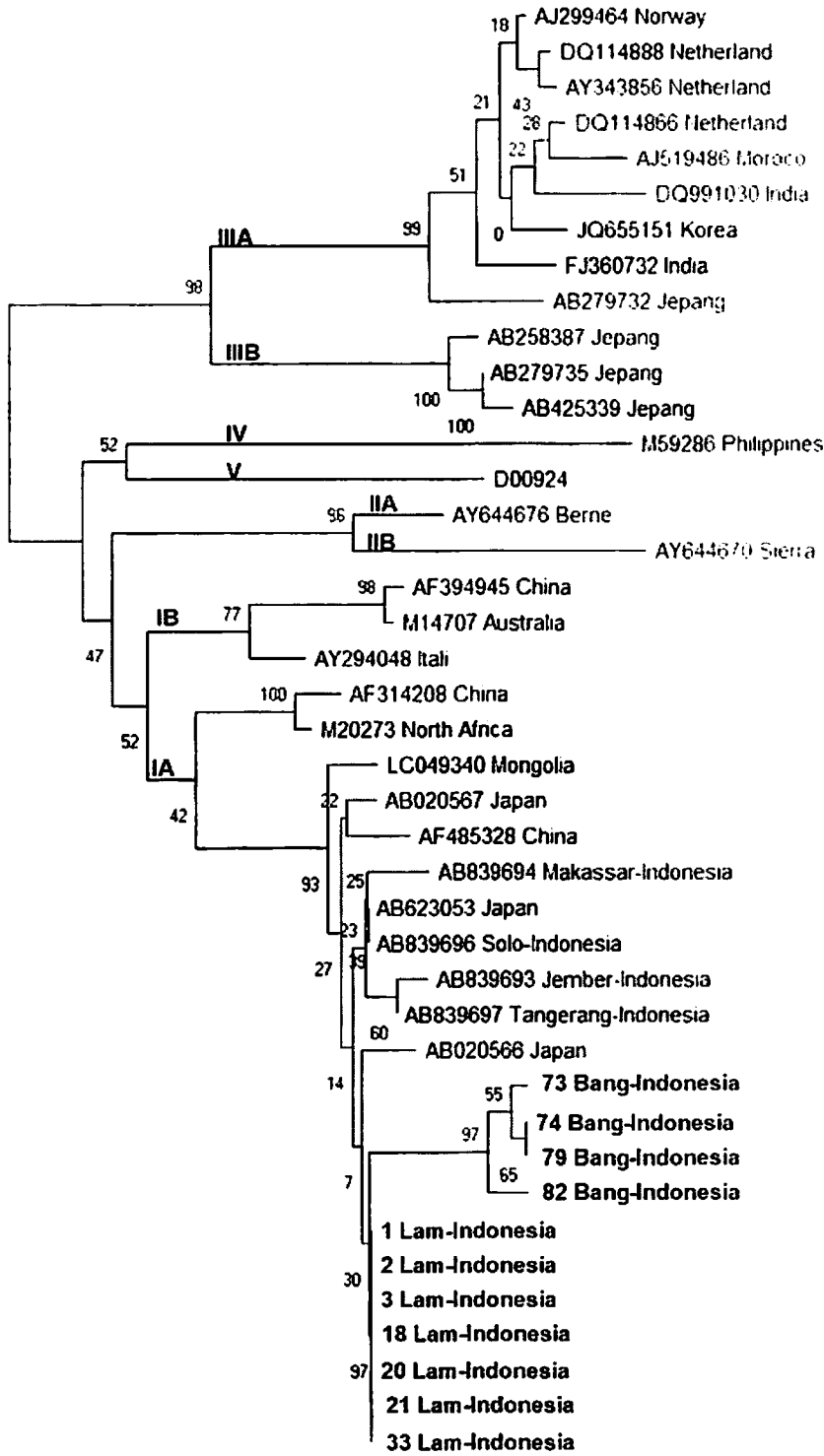


Fig.2 Phylogenetic tree generated using the sequences obtained from the VP3-VP1 junction region. Bang=Bangkalan, Lam=Lamongan and the number was shown number of the samples.

Alignment of Amino Acid Sequences

A comparison of the predicted amino acid sequences of the VP1-P2A regions and VP3-VP1 regions samples of this study comparing to other previously reported strains. representative of all genotypes and subgenotypes are described in figure 3 and 4. The samples from Bangkalan have amino acids that are not owned by any other strain. On the VP1-P2A junction amino acid K813N and on the VP3-VP1 junction amino acid P549R, P549L and P549I.

VP1-P2A regions

	769	778	788	798	808	813	
						Subtype
LC049340 Mongolia	RIAAGDLESSVDDPRSEEDRRFESHIECRKPYKELRLEVQKQRLK						IA
AB839694 Makassar-Indonesia						IA
AB020567 JapanS.....						IA
AB839693 Jember-Indonesia						IA
AB623053 JapanP.....						IA
AB839697 Tangerang-Indonesia						IA
AB839696 Solo-Indonesia						IA
AB020566 Japan						IA
KX151445 Taiwan						IA
AF485328 ChinaS.....						IA
AB918714 Surabaya-Indonesia						IA
5 Lam-Indonesia *						IA
13 Lam-Indonesia *						IA
14 Lam-Indonesia *						IA
29 Lam-Indonesia *						IA
46 Lam-Indonesia *						IA
52 Lam-Indonesia *						IA
58 Bang-Indonesia **N.....						IA
M14707 AustraliaK.....						IB
AF314208 ChinaK.....						IB
M20273 North AfricaK.....						IB
AY644676 BerneS.....						IIA
AY644670 SierraS.....						IIB
AJ299464 Norway	..L.....K.....K.....						IIIA
JQ655151 Korea	..L.....K.....K.....						IIIA
AB279732 Japan	..L.....K.....K.....						IIIA
FJ360732 India	..L.....K.....K.....D.....						IIIA
DQ991030 India	..L.....K.....K.....						IIIA
AB258387 Japan	..L.....K.....K.....						IIIA
AB279735 Japan	..L.....K.....K.....						IIIA
AB425339 Japan	..L.....K.....K.....						IIIA
M59286 Philippines	..G.....TD.....K.....F.....						IV
D00924	..S.....A.K.....QG.....M.....						V

Fig.3. Comparison of the predicted amino acid sequences of the VP1-P2A regions. Dots indicate conserved amino acids, differences are shown by appropriate single letter amino acid code. * samples from Lamongan, ** samples from Bangkalan.

VP3-VP1 region

	503	512	522	532	542	549	Subtype
LC049340 Mongolia	V	S	T	E	Q	N	IA
AB839694 Makassar-Indonesia	V	S	T	E	Q	N	IA
AB020567 Japan	V	S	T	E	Q	N	IA
AB839693 Jember-Indonesia	V	S	T	E	Q	N	IA
AB623053 Japan	V	S	T	E	Q	N	IA
AB839697 Tangerang-Indonesia	V	S	T	E	Q	N	IA
AB839696 Solo-Indonesia	V	S	T	E	Q	N	IA
AB020566 Japan	V	S	T	E	Q	N	IA
AF485328 China	V	S	T	E	Q	N	IA
1 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
2 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
3 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
18 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
20 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
21 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
33 Lam-Indonesia *	V	S	T	E	Q	N	IA
73 Bang-Indonesia **	V	S	T	E	Q	N	IA
74 Bang-Indonesia **	V	S	T	E	Q	N	IA
79 Bang-Indonesia **	V	S	T	E	Q	N	IA
82 Bang-Indonesia **	V	S	T	E	Q	N	IA
AF394945 China	V	S	T	E	Q	N	IB
M14707 Australia	V	S	T	E	Q	N	IB
AY294048 Itali	V	S	T	E	Q	N	IB
AF314208 China	V	S	T	E	Q	N	IB
M20273 North Africa	V	S	T	E	Q	N	IB
AY644676 Berne	V	S	T	E	Q	N	IIA
AY644670 Sierra	V	S	T	E	Q	N	IIB
AJ299464 Norway	V	S	T	E	Q	N	IIIA
DQ114866 Netherland	V	S	T	E	Q	N	IIIA
DQ114888 Netherland	V	S	T	E	Q	N	IIIA
AJ519486 Morocco	V	S	T	E	Q	N	IIIA
JQ655151 Korea	V	S	T	E	Q	N	IIIA
AY343856 Netherland	V	S	T	E	Q	N	IIIA
FJ360732 India	V	S	T	E	Q	N	IIIA
DQ991030 India	V	S	T	E	Q	N	IIIA
AB279732 Jepang	V	S	T	E	Q	N	IIIA
AB258387 Jepang	V	S	T	E	Q	N	IIIB
AB279735 Jepang	V	S	T	E	Q	N	IIIB
AB425339 Jepang	V	S	T	E	Q	N	IIIB
M59286 Philippines	V	S	T	E	Q	N	IV
D00924	V	S	T	E	Q	N	V

Fig.4. Comparison of the predicted amino acid sequences of the VP3-VP1 region. Dots indicate conserved amino acids, differences are shown by appropriate single letter amino acid code. * samples from Lamongan, ** samples from Bangkalan.

Relationship of Knowledge Level with Incidence of Hepatitis A Infection

In this study, the category of knowledge divided into three categories. The category high if more than or same of 75% right, moderate was 50 until 74% right and low was less than 50% right. The distribution of knowledge of subjects in this study mention in table 3. The relationship of knowledge level with incidence of hepatitis A infection mention in table 4.

Table 3. The distribution of knowledge of subjects toward incident infection of hepatitis A

Knowledge	Senior High School. Lamongan				Islamic Boarding School. Bangkalan			
	Control		Case		Control		Case	
	n	%	N	%	N	%	n	%
High	43	84%	21	39%	18	55%	19	56%
Moderate	7	14%	22	41%	14	42%	12	35%
Low	1	2%	11	20%	1	3%	3	9%
Total	51	100%	54	100%	33	100%	34	100%

Table 4. The result of the relationship of knowledge level with incidence of hepatitis A infection

No	Place	<i>p</i> value	OR		The strong relationship between variables	α (CI=95%)
			Category of knowledge low-high	Category of knowledge low-moderate		
1	Senior High School. Lamongan	0.001	22.523	3.5	42.8%	
2	Islamic Boarding School. Bangkalan	0.558	-	-	13.1%	
3	Combination of Senior High School. Lamongan. and Islamic Boarding School. Bangkalan	0.001	10.67	4.32	29.5%	0.05

The category of knowledge in this study was ordinal but relegated to the nominal scale so could be analyzed used chi-square. The knowledge level of the students in Lamongan showed a significant relation vice versa with that in Bangkalan. The combination of Lamongan, and

Bangkalan showed the relationship between knowledge level with incidence of hepatitis A infection. The function of Odds Ratio (OR) was to analyzed relationship problem between risk factors for a disease.

Discussion

Among the 88 total samples for analyzed serologies for IgM using rapid test SD BIO LINE HAV IgG/IgM (Standart Diagnostics. INC, Republic of Korea) were positive 51 samples collected from Lamongan and Bangkalan. HAV specific humoral and cellular immune responses typically appear 4–5 weeks after onset of hepatitis symptoms (5,10,11). Serological testing (IgM anti-HAV) will establish the diagnosis of acute hepatitis A. IgM, IgG and IgA anti-HAV antibodies appear shortly before or concurrently with the onset of symptoms. Anti-HAV IgM antibodies are detectable in both symptomatic and asymptomatic patients. In symptomatic patients, these antibodies appear within 5–10 days of symptom onset, which correlates with the phase of greatest liver enzyme increases, and persist for about four months (range 30–420 days) (5).

Testing for anti-HAV IgM in the adult population should not be neglected, especially for people from rural areas or from regions with high population density or poor sanitation conditions, since socioeconomic indicators are closely associated with hepatitis A endemicity (12,13). In addition, it should be noted that cases of acute hepatitis A can occur without the production of detectable IgM antibodies, so in this study also cases of acute hepatitis A virus infection can be diagnosed by detection of HAV RNA. This molecular marker is detectable approximately 14 days before the appearance of the acute-phase serological marker and remains persistently detectable for an average of 79 days after symptom onset and the peak of hepatic enzymes (13).

In this study, all of the samples also checked for HAV RNA by RT-PCR, then analyzed sequences. Currently, molecular epidemiology was needed to analyze the source of infection and the mode of transmission from an outbreak. In this study, the genetic analysis of HAV used the VP1 region because it was an area that has a variety of amino acids that were diverse. Molecular typing had a crucial role for identification of epidemic cases lacking any epidemiological link (9,14). The result of this study showed that genotype HAV belonged to IA. It was same with a previous study from other regions in Indonesia were clustered with genotype IA strains (8,15).

Worldwide, genotype I is most prevalent, with subtype IA being more common than IB. As subgenotype IA is markedly prevalent, genotyping / subgenotyping alone can rarely be utilized to identify the source of an HAV outbreak or the chain of transmission. The HAV

isolates that have so far been identified display a high degree of genetic conservation, and modest genetic heterogeneity exists in several genomic regions, except for the 5' UTR, which is preferred for the sensitive detection of HAV RNA by RT-PCR (1,16).

Amino acid sequences of the VP3-VP1 (186bp, 47 amino acids) were compared with diverse subgenotype strains reported from various countries showed that the samples from Bangkalan have a unique amino acid sequence change such as P549R, P549L and P549I (fig.4). In the case of the VP1-P2A (234bp, 45 amino acid) the samples from Bangkalan also have a unique amino acid sequence change K813N (fig.3). Amino acid the samples from Lamongan have no difference with structure from other countries, so the meaning was HAV causative outbreaks in two districts came from the different country and possible common evolutionary ancestor (14,17,18).

The results sequence from VP3-VP1 junction the samples from Lamongan and four from Bangkalan showed 99% homology with AB839697 (Solo-Indonesia) and from VP1-P2A junction samples from Lamongan showed 100% homology with AB918714 (Surabaya-Indonesia). Based on the results of variations of amino acids from Lamongan and Bangkalan used to determine the comparison of strains in the area of the outbreak, a comparison of the level of knowledge related to hepatitis A infection was needed to evaluate the source of outbreaks (14), so in this study also looking for the level of knowledge related to hepatitis A infection and the result in Lamongan and combination of Lamongan, and Bangkalan have significant statistics with P value 0.001 vice versa with that in Bangkalan (P value 0.558).

The result of the questionnaire about infection of hepatitis A in Lamongan showed that on control group was dominated by high knowledge and on case group was dominated by moderate knowledge. Meanwhile, in Bangkalan on control and case group was dominated by high knowledge, but there was no significant statistical about level knowledge with an incidence of hepatitis A because, in Bangkalan all of the facility was used by all occupant in there, so there were no choices to use others and if there were infection would fastly spread. On other hands, In Lamongan, the students have the chance to a choice facility what they used and were not live together thus reducing the risk of transmission of hepatitis A infection. So level of knowledge in Bangkalan was not affected attitudes to avoid hepatitis A infection. It was similar with other study although public awareness was high, practical knowledge regarding differences in the mode of transmission, consequences, and prevention was very low in low endemic country, especially among those with a lower level of education and also no differences were found in knowledge in intervention group in knowledge acquiring any of the hepatitis viruses. Age, gender, geographic location no related with level knowledge and

practical to avoid hepatitis A infection (19–21).

The samples' knowledge of the hepatitis A virus was found to be good. To improve knowledge, attitude, and practice of the public through health education campaigns, personal counseling, add curriculum to discuss health topic, and future public health initiatives are warranted to increase knowledge as (20–23). To our knowledge, this is the first report on the sequence of an HAV isolate from Indonesia related knowledge level with incidence of hepatitis A infection. The result of this study will be useful for further evolutionary studies involving other currently identified strains or future isolates. Further studies on the molecular characteristics of different HAV isolates are still needed to gain more insights into the genetic variability and its evolution.

Conclusions

The subtype of hepatitis A virus in both areas is IA, although the causative HAV in Lamongan was different from those found in Bangkalan, as shown in the multiple alignment. The knowledge level of the students in Lamongan, which is a half day school, showed a significant relation with the incidence, vice versa with that in Bangkalan, which is a full day school with dormitory.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

The author deliver gratitude to The Ministry of Research, Technology and Higher Education of the Republic of Indonesia, Directorate General Institution Center of Excellence Program, Institute of Tropical Disease-Airlangga University, and The Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID) program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan.

References

1. Vaughan G, Maria L, Rossi G, Forbi JC, Paula VS De, Purdy MA, et al. Infection, Genetics and Evolution Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;21:227–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.023>
2. Shin E, Seok J, Oh K, Suck S, Kwon M, Kim S, et al. Short communication A waterborne outbreak involving hepatitis A virus genotype IA at a residential facility in the Republic of Korea in 2015. *J Clin Virol* [Internet]. 2017;94(July):63–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.006>

3. Lin K-Y, Chen G-J, Lee Y-L, Huang Y-C, Cheng A, Sun H-Y, et al. Hepatitis A virus infection and hepatitis A vaccination in human immunodeficiency virus-positive patients: A review. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017;23(20):3589. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i20/3589.htm>
4. WHO. Hepatitis A [Internet]. 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>
5. Lemon SM, Ott JJ, Damme P Van, Shouval D. Type A viral hepatitis : A summary and update on the molecular virology , epidemiology , pathogenesis and prevention. *J Hepatol* [Internet]. 2018;68(1):167–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.034>
6. Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Kawabata K. Epidemiological and genetic analysis of a 2014 outbreak of hepatitis A in Japan. *Vaccine* [Internet]. 2015;33(45):6029–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.04.061>
7. Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Nakamura M, Jiang X, Haga Y, et al. Direct-acting Antivirals and Host-targeting Agents against the Hepatitis A Virus. *J Clin Transl Hepatol* [Internet]. 2015;3(3):205–10. Available from: http://www.jcthn.com/index.php?option=com_content&view=article&id=218&Itemid=852
8. Dewa MI, Wibawa N, Benedictus J. The complete genomes of subgenotype 1A hepatitis A virus strains from four different islands in Indonesia form a phylogenetic cluster. 2014:935–45.
9. Yun H, Kim S, Lee H, Byun KS, Kwon SY, Yim HJ, et al. Genetic Analysis of HAV Strains Isolated From Patients With Acute Hepatitis in Korea . 2005 – 2006. 2008;784:777–84.
10. Hong S, Lee HW, Chang D-Y, You S, Kim J, Park JY, et al. Antibody-Secreting Cells with a Phenotype of Ki-67low, CD138high, CD31high, and CD38high Secrete Nonspecific IgM during Primary Hepatitis A Virus Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(1):127–34. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203540>
11. Walker CM, Feng Z, Lemon SM. ScienceDirect Reassessing immune control of hepatitis A virus. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2015;11:7–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.003>
12. Wang Z, Chen Y, Xie S, Lv H. Changing epidemiological characteristics of hepatitis a in Zhejiang Province, China: Increased susceptibility in adults. *PLoS One*.

- 2016;11(4):1–9.
13. Pondé RA de A. The serological markers of acute infection with hepatitis A, B, C, D, E and G viruses revisited. *Arch Virol*. 2017;162(12):3587–602.
 14. Bruni R, Taffon S, Equestre M, Chionne P, Madonna E, Rizzo C, et al. Key role of sequencing to trace hepatitis A viruses circulating in Italy during a large multi-country European foodborne outbreak in 2013. *PLoS One*. 2016;11(2):1–14.
 15. Utsumi T, Yano Y, Amin M, Lusida MI, Hotta HAK, Hayashi Y. Acute Hepatitis due to Hepatitis A Virus Subgenotype IA as an Imported Infectious Disease from Indonesia. 2014;60(2):43–7.
 16. Tsatsralt-od B, Baasanjav N, Nyamkhuu D, Ohnishi H, Takahashi M, Kobayashi T, et al. Molecular Analysis of Hepatitis A Virus Strains Obtained From Patients With Acute Hepatitis A in Mongolia, 2004 – 2013. 2016;630(September 2015):622–30.
 17. Hamza H, Abd-Elshafy DN, Fayed SA, Bahgat MM, El-Esnawy NA, Abdel-Mobdy E. Detection and characterization of hepatitis A virus circulating in Egypt. *Arch Virol*. 2017;162(7):1921–31.
 18. Lee AR, Lee SG, Kang LH, Jheong WH, Paik SY. Full-length genomic sequence of subgenotype IIIA hepatitis A virus isolate in Republic of Korea. *Biomed Res Int*. 2013;2013:19–23.
 19. Tenner CT, Herzog K, Chaudhari S, Bini EJ, Weinshel EH. Knowledge, attitudes and barriers regarding vaccination against hepatitis A and B in patients with chronic hepatitis C virus infection: A survey of family medicine and internal medicine physicians in the United States. *Int J Clin Pract*. 2012;66(10):1009–13.
 20. Larios SE, Masson CL, Shopshire MS, Hettema J, Jordan AE, McKnight C, et al. Education and counseling in the methadone treatment setting improves knowledge of viral hepatitis. *J Subst Abuse Treat [Internet]*. 2014;46(4):528–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsat.2013.10.012>
 21. Crutzen R, Göritz AS. Public awareness and practical knowledge regarding Hepatitis A, B, and C: A two-country survey. *J Infect Public Health [Internet]*. 2012;5(2):195–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2011.12.001>
 22. Ali Alhowaish J, Ali Alhowaish M, Hamoud Alanazi Y, Mana Alshammari M, Saïd Alshammari M, Ghadeer Alshamari N, et al. Knowledge, attitudes and practices toward prevention of hepatitis B virus infection among medical students at Northern Border University, Arar, Kingdom of Saudi Arabia. *Electron Physician*. 2017;(September):2008–5842.

23. Yamazhan T, Durusoy R, Tasbakan M, Tokem Y, Pullukcu H, Sipahi O, et al. Nursing students' immunisation status and knowledge about viral hepatitis in Turkey: A multi-centre cross-sectional study. *Int Nurs Rev.* 2011;58(2):181–5.



Lampiran 2: Sertifikat



DECLARATION OF ATTENDANCE

Yogyakarta, Indonesia, 7th - 8th November 2018

The First Indonesian Symposium on Microbial Ecology- InSME 2018 Organizing Committees hereby declare that the following delegate attended the InSME 2018 at University Club, Universitas Gadjah Mada in Yogyakarta, Indonesia from 7th - 8th November 2018:

Dewi Setyowati

Universitas Airlangga

And contributed to a poster presentation with the title:

Genotypes of Hepatitis A virus in outbreaks region, Lamongan and Bangkalan Districs, East Java, Indonesia in 2018

Sincerely yours,

Dr. Windi Muziasari

InSME 2018 - Co-Chairs Organizing Committee

Dr. M. Pramono Hadi

InSME 2018 - Co-Chairs Organizing Committee