

**LAPORAN AKHIR TAHUN/ TAHUN TERAKHIR*
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**ANALISIS MUTASI DAN PREDIKSI PROTEIN GEN X VIRUS HEPATITIS B
(VHB) (TAHUN PERTAMA) SERTA KADAR SITOKIN PRO DAN ANTI
INFLAMASI (TAHUN KEDUA) PADA PENDERITA *CHRONIC LIVER DISEASE*
(CLD) DI SURABAYA**

Tahun ke-1 dari rencana 2 tahun

Tim Peneliti:

Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D	NIDN 0012104803
Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D	NIDN 0017025004
Dr. Gwenny Ichsan Prabowo, dr., M.Kes	NIDN 0029096204

**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: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN/ TAHUN TERAKHIR*
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**

KKA
KK
LP 10/19
Han
a



**ANALISIS MUTASI DAN PREDIKSI PROTEIN GEN X VIRUS HEPATITIS B
(VHB) (TAHUN PERTAMA) SERTA KADAR SITOKIN PRO DAN ANTI
INFLAMASI (TAHUN KEDUA) PADA PENDERITA *CHRONIC LIVER DISEASE*
(CLD) DI SURABAYA**

Tahun ke-1 dari rencana 2 tahun

Tim Peneliti:

Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D	NIDN 0012104803
Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D	NIDN 0017025004
Dr. Gwenny Ichsan Prabowo, dr., M.Kes	NIDN 0029096204

**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: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ANALISIS MUTASI DAN PREDIKSI PROTEIN GEN X VIRUS HEPATITIS B (VHB) (TAHUN PERTAMA) SERTA KADAR SITOKIN PRO DAN ANTI INFLAMASI (TAHUN KEDUA) PADA PENDERITA CHRONIC LIVER DISEASE (CLD) DI SURABAYA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : dr. RETNO HANDAJANI, S.Ked, M.S, Ph.D
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0012104803
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Pendidikan Profesi Dokter
Nomor HP : 08165417225
Alamat surel (e-mail) : retno-h@fk.unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Dr SOETJIPTO M.S, Ph.D
NIDN : 0017025004
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : dr. GWENNY ICHSAN PRABOWO M.Kes
NIDN : 0029096204
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 201,420,000

Mengetahui,
Dekan FK Unair



(Prof. Dr. Soetjo, dr., Sp.U(K))
NIP/NIK 19560608 198612 1001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
Ketua,



(dr. RETNO HANDAJANI, S.Ked, M.S, Ph.D)
NIP/NIK 194810121976032001

Menyetujui,
Ketua LPI Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 19670507 199102 1001

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

HALAMAN PENGANTAR

Judul	Penelitian/klasifikasi
ANALISIS MUTASI DAN PREDIKSI PROTEIN CLN X VIRUS HERPES BETAH (TAHAP PERTAMA) SPKTA (ZDAR) SIFOKIN PRO DAN ANTI INTEGROKSI (AHUK) KETUA) PADA PENDEKITA LIFROGIC LIVER DISEASE (CLD) DI SURABAYA	Nama Lengkap Retno Handayani Program Studi Jabatan Nomor HP Alamat
Retno Handayani, S.Ked., M.S., Ph.D.	Nama Lengkap Retno Handayani
Fakultas Kedokteran Jember Jember Jember	Alamat Jember
081234567890	Nama Lengkap Retno Handayani
081234567890	Alamat Jember
Fakultas Kedokteran Jember	Alamat Jember
Retno Handayani, S.Ked., M.S., Ph.D.	Alamat Jember
Fakultas Kedokteran Jember	Alamat Jember
081234567890	Alamat Jember
081234567890	Alamat Jember

Kota Jember, 12 - 11 - 2018
Retno

Dekan FK Unair
Jember

Retno Handayani, S.Ked., M.S., Ph.D.
NIP. 194810121970032001

Retno Handayani, S.Ked., M.S., Ph.D.
NIP. 194810121970032001

Retno Handayani
Jember

Retno Handayani, S.Ked., M.S., Ph.D.
NIP. 194810121970032001

RINGKASAN

Infeksi VHB merupakan permasalahan utama dunia, terutama di negara berkembang termasuk Indonesia. Mutasi pada gen X VHB banyak ditemukan pada penderita CLD, terutama pada sirosis dan KHS. Protein X VHB bersifat multifungsional dan dapat mempengaruhi transkripsi gen, jalur persinyalan, respon stres sel, kontrol siklus sel, replikasi virus, dan apoptosis. Data mengenai prevalensi mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Indonesia terutama Surabaya masih belum diketahui sehingga diperlukan penelitian mengenai hal tersebut.

Jenis penelitian ini adalah *cross sectional* dengan *purposive sampling* yang mengambil sampel di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Indonesia. Penelitian ini menggunakan *nested PCR* dengan menarget gen X VHB menggunakan 2 pasang primer. Penggunaan *nested PCR* dilakukan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan PCR. Dari hasil penelitian ini didapatkan sebanyak 60 sampel penderita CLD dengan HbsAg positif di SMF Ilmu Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Sebagian besar penderita CLD pada penelitian ini berjenis kelamin laki-laki. Dari 60 sampel tersebut, didapatkan 73,33% (44 sampel) menunjukkan DNA VHB positif pada pemeriksaan PCR berbasis gen X. Dari hasil *multiple alignment sequence* 44 sampel tersebut, didapatkan 15 dari 44 sampel (34,1%) mengalami mutasi regio X VHB. Mutasi tersebut kebanyakan menempati daerah fungsional regio X VHB. Mutasi gen X pada penelitian ini didapatkan pada 3/21 (14,28%) penderita Hepatitis Kronis, 7/12 (58,33%) penderita Sirosis Hati, dan 4/11 (36,36%) penderita KHS. Ditemukan 10 jenis mutasi gen X VHB yang terutama berupa substitusi asam amino dengan jenis mutasi yang dominan K130M dan V131I, dimana kedua jenis mutasi tersebut ditemukan bersamaan. Didapatkan pula 1 sampel dengan insersi 32 asam amino dan delesi 20 asam amino pada penelitian ini. Selain itu, didapatkan juga 5 jenis varian sekuens gen X VHB (L37I, S43P, H86P/R, L98I, dan T105A).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Subhanallahu Wa Ta'ala, pemilik segala yang ada, dan dengan kekuasaan Nya Dia memberi hikmah kepada siapapun yang dikehendaki. Syukur Alhamdulillah, atas berkah, rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penyusun dapat menyelesaikan Laporan Akhir PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI dengan judul **Analisis Mutasi dan Prediksi Protein Gen X Virus Hepatitis B (VHB) (Tahun Pertama) serta Kadar Sitokin Pro dan Anti Inflamasi (Tahun Kedua) pada Penderita *Chronic Liver Disease* (CLD) di Surabaya.**

Tim peneliti menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung dan membantu dalam menyelesaikan penelitian ini. Terima kasih yang mendalam kami sampaikan kepada ketua *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga beserta ketua dan tim kelompok studi hepatitis, ketua SMF dan seluruh staf serta pegawai SMF Ilmu Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Kami mohon maaf atas segala kekurangan yang terdapat dalam penelitian ini. Kami mengharapkan kritik dan saran demi perbaikan penelitian ke depannya.

Laporan penelitian ini disusun untuk memenuhi persyaratan kelengkapan evaluasi dari pelaksanaan penelitian PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI Kemristekdikti tahun anggaran 2018.

Surabaya,

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

JUDUL.....	1
HALAMAN PENGESAHAN.....	2
RINGKASAN	3
PRAKATA.....	4
DAFTAR ISI.....	5
DAFTAR TABEL.....	7
DAFTAR GAMBAR	8
BAB 1. PENDAHULUAN	9
1.1 Latar Belakang	9
1.2 Rumusan Masalah	10
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	11
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	16
3.1 Tujuan	16
3.1.1 Tujuan Umum	16
3.1.2 Tujuan Khusus	16
3.2 Manfaat	16
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	17
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	17
4.2 Lokasi Penelitian.....	17
4.3 Prosedur Pengumpulan Data	17
4.4 Kerangka Operasional Penelitian.....	18
4.5 Bahan Penelitian.....	19
4.5.1 Ekstraksi DNA VHB.....	19
4.5.2 PCR Gen X VHB	19
4.5.3 <i>Electrophoresis Gel</i>	19
4.5.4 Bahan untuk pemeriksaan <i>sequencing</i>	19
4.5.4.1. Bahan untuk purifikasi DNA hasil PCR	19
4.5.4.2 Bahan untuk <i>labelling</i> DNA murni dengan PCR <i>pro-sequencing</i>	19
4.5.4.3 Bahan untuk purifikasi DNA hasil <i>labelling pro sequencing</i>	19
4.5.4.4 Bahan untuk <i>sequencing</i> pada mesin ABI 310	19
4.6 Instrumen Penelitian.....	20
4.6.1 Ekstraksi DNA VHB.....	20
4.6.2 PCR Gen X VHB	20
4.6.3 <i>Electrophoresis gel</i> dan dokumentasi	20

4.6.4 Instrumen untuk pemeriksaan <i>sequencing</i>	20
4.6.4.1 Purifikasi DNA hasil PCR	20
4.6.4.2 <i>Labelling</i> DNA murni dengan PCR <i>pro-sequencing</i>	20
4.6.4.3 Purifikasi DNA hasil <i>labelling pro sequencing</i>	20
4.6.4.4 <i>Sequencing</i> pada mesin ABI 310	20
4.7 Prosedur Pemeriksaan	21
4.7.1 Pengambilan Darah	21
4.7.2 Pemisahan serum darah.....	21
4.7.3 Deteksi Mutasi Gen X VHB	21
4.7.3.1 Ekstraksi DNA VHB.....	21
4.7.3.2 PCR Gen X VHB	21
4.7.3.3 <i>Electrophoresis gel</i> dan dokumentasi	22
4.7.3.4 Purifikasi DNA hasil PCR	22
4.7.3.5 <i>Labelling</i> DNA murni dengan PCR <i>pro-sequencing</i>	22
4.7.3.6 Purifikasi DNA hasil <i>labelling pro sequencing</i>	22
4.7.3.7 <i>Sequencing</i> pada mesin ABI 310	23
4.7.3.8 Analisis hasil <i>sequencing</i>	23
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	24
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	38
6.1 Kesimpulan	38
6.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Jenis kelamin dan kelompok umur penderita CLD.....	24
Tabel 5.2 Profil Sampel Berdasarkan Diagnosis CLD.....	24
Tabel 5.3 Profil mutasi regio X VHB pada penderita CLD dengan PCR DNA VHB berbasis gen X positif	34
Tabel 5.4 Varian gen X VHB pada pasien CLD di penelitian ini.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1 Contoh hasil <i>sequencing</i> regio X VHB.....	27
Gambar 5.2 <i>Multiple Alignment sequence</i> nukleotida dengan program <i>Clone Manager 9</i>	27
Gambar 5.3 <i>Multiple Alignment sequence</i> asam amino dengan program <i>Clone Manager 9</i>	32

BAB 1. PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Sekitar 240 juta penduduk dunia menderita infeksi Virus Hepatitis B (VHB) kronis dan sekitar 600.000 jiwa meninggal setiap tahunnya akibat penyakit terkait infeksi VHB dan Karsinoma Hepatoseluler (KHS) (Yano *et al.*, 2015). Infeksi VHB merupakan infeksi yang mengancam jiwa, karena selain menyebabkan penyakit hati kronis, virus ini juga dapat mengakibatkan sirosis dan KHS yang berpotensi besar menimbulkan kematian (WHO, 2016). Prevalensi infeksi VHB kronis di Indonesia berdasarkan data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia adalah sekitar 8%. Sekitar 50% dari jumlah tersebut memiliki penyakit hati yang berpotensi menuju *Chronic Liver Disease* (CLD) (Depkes RI, 2016).

Mutasi pada gen X VHB banyak ditemukan pada penderita CLD, terutama pada sirosis dan KHS. Protein X VHB bersifat multifungsional dan dapat mempengaruhi transkripsi gen, jalur persinyalan, respon stres sel, kontrol siklus sel, replikasi virus, dan apoptosis (Kim, 2014). Mutasi gen X, terutama pada bagian C terminal, sering ditemukan pada CLD dikarenakan daerah ini memiliki peranan penting dalam pertumbuhan, proliferasi, transformasi, dan transaktivasi sel (Salarnia *et al.*, 2017). Gen X juga tumpang tindih dengan beberapa gen VHB penting lainnya yang penting bagi replikasi sel (Barbini *et al.*, 2012).

Keseimbangan antara sitokin pro inflamasi dan anti inflamasi juga memiliki peranan penting bagi respon sel imun suatu organ (Luedde and Schwabe, 2011). Produksi TNF- α yang tinggi dapat mengaktivasi faktor transkripsi NF- κ B yang menstimulasi gen pro inflamasi pada hepar serta memicu karsinogenesis (Driessler *et al.*, 2004; Suneetha *et al.*, 2006). Sebaliknya, IL-10 sebagai sitokin anti inflamasi memiliki mekanisme yang berlawanan dengan TNF- α . Pada model kanker payudara dan kanker kulit, IL-10 menunjukkan sifat protektif terhadap kanker melalui inhibisi terhadap NF- κ B (Asadullah *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2016).

Protein X VHB yang disandi oleh gen X dapat meningkatkan stres oksidatif yang berperan dalam kerusakan hepar, melalui induksi ekspresi TNF- α (Yi *et al.*, 2003). Ekspresi HBx yang berlebihan juga dapat menginduksi sekresi sitokin pro inflamasi seperti IL-1 β dan TNF- α serta menekan sitokin anti inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-13, dan IL-14 pada limfosit T (Lou *et al.*, 2013). Sebaliknya, TNF- α dapat meningkatkan stabilitas protein X VHB sehingga kedua faktor tersebut dapat bekerja secara sinergis (Shukla *et al.*, 2011).

Data mengenai prevalensi mutasi gen X VHB serta kadar sitokin pro inflamasi dan anti inflamasi pada penderita CLD di Indonesia terutama Surabaya masih belum diketahui sehingga diperlukan penelitian mengenai hal tersebut. Penelitian tahun pertama bertujuan mendeteksi

mutasi dan prediksi protein gen X VHB, sedangkan penelitian tahun kedua mendeteksi kadar sitokin pro dan anti inflamasi yang berupa TNF- α , IL-10, dan NF- κ B pada penderita CLD di Surabaya. Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat memberikan kontribusi untuk penelitian lebih lanjut serta upaya pencegahan yang sesuai untuk penderita CLD di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

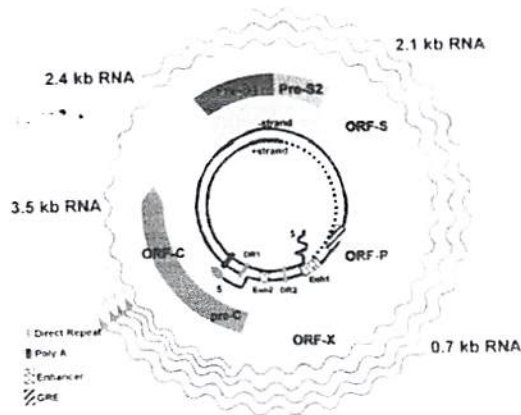
1. Berapa frekuensi hasil PCR DNA VHB berbasis gen X positif pada penderita CLD di Surabaya?
2. Berapa frekuensi mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Surabaya?
3. Bagaimanakah pola mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Surabaya?

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infeksi VHB

Infeksi VHB adalah infeksi yang menyerang hepar dan dapat bersifat akut maupun kronis yang berpotensi mengancam jiwa (WHO, 2016). Sebanyak dua milyar penduduk dunia atau mencakup sepertiga populasi dunia pernah terinfeksi VHB berdasar bukti serologis dan sebanyak 5% terinfeksi VHB secara kronis. Prevalensi infeksi VHB ditemukan cukup tinggi di negara Asia Timur dan Asia Tenggara, termasuk Indonesia dengan angka kejadian lebih dari 8% (Yano *et al.*, 2015; Lusida *et al.*, 2016). *Chronic Liver Disease* yang berhubungan dengan infeksi VHB merupakan masalah kesehatan utama di negara dengan prevalensi VHB tinggi. (Liang *et al.*, 2009).

Genom VHB mengkode empat *Open Reading Frame* (ORF), dimana keempat ORF tersebut saling tumpang tindih. Keempat ORF tersebut meliputi S (Pre-S1/Pre-S2/S), C (*precore/core*), P (polimerase), dan X. Gen Pre-S1/Pre-S2/S mengkode protein selubung VHB, gen *precore/core* mengkode protein nukleokapsid *Hepatitis B core Antigen* (HbcAg) dan protein non struktural *Hepatitis B envelope Antigen* (HbeAg), gen polimerase mengkode enzim *reverse transcriptase*, dan gen X mengkode protein HBx yang merupakan regulator replikasi VHB (İnan & Tabak, 2015; Lamontagne *et al.*, 2016).



Gambar 1. Struktur VHB (Liang, 2009)

Virus Hepatitis B (VHB) tidak memiliki efek sitopatik yang langsung terhadap sel hepar. Hal ini dibuktikan dengan tidak adanya hubungan antara derajat kerusakan hepar dan *viral load* VHB. Kematian hepatosit pada infeksi VHB kronis disebabkan oleh apoptosis melalui jalur *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Kerusakan jaringan hepar disebabkan oleh reaksi imun terhadap antigen virus dan aktivasi sel T sitotoksik (CD8⁺, CTL) (Balmasova *et*

al., 2014). Produksi sitokin dan *subset* sel T pada infeksi VHB berbeda di setiap fase infeksi. Pada fase awal, Th2 dan sitokin anti inflamasi seperti IL-4, IL-5, dan IL-10 mendominasi dibandingkan Th1. Pada fase lanjut, terjadi perubahan dominasi Th dari Th2 menjadi Th1 dan sekresi berbagai sitokin pro inflamasi seperti IL-2, IFN, dan TNF- α yang menyebabkan kerusakan hepatosit, nekroinflamasi hepar, peningkatan enzim hepar, dan fibrosis (Liaw & Chu, 2009; Balmasova *et al.*, 2014).

2.2 Chronic Liver Disease

Pada CLD terjadi kerusakan hati kronis akibat inflamasi, nekrosis, fibrosis, dan dapat berlanjut ke karsinogenesis, serta secara klinis yang disebut CLD meliputi hepatitis B kronis, sirosis hati, dan KHS (Kotsafti *et al.*, 2012). Infeksi VHB kronis merupakan penyumbang kejadian sirosis yang besar di daerah endemis infeksi VHB. Sekitar satu juta orang meninggal tiap tahunnya dikarenakan sirosis dekompensata akibat infeksi VHB dan VHC (Lin *et al.*, 2014). Terdapat beberapa faktor kompleks yang mempengaruhi perjalanan infeksi VHB menjadi CLD, di antaranya respon imunologis, faktor virus (*viral load*, genotipe, mutasi), faktor lingkungan (alkohol, aflatoksin), dan faktor genetik (Zeng, 2014). *Chronic Liver Disease* menempati urutan keduabelas penyebab terbanyak kematian di Amerika Serikat. Sekitar 40% penderita CLD tidak menunjukkan gejala (asimtomatik) hingga terjadi suatu dekompensasi hati (Heidelbaugh and Bruderly, 2006).

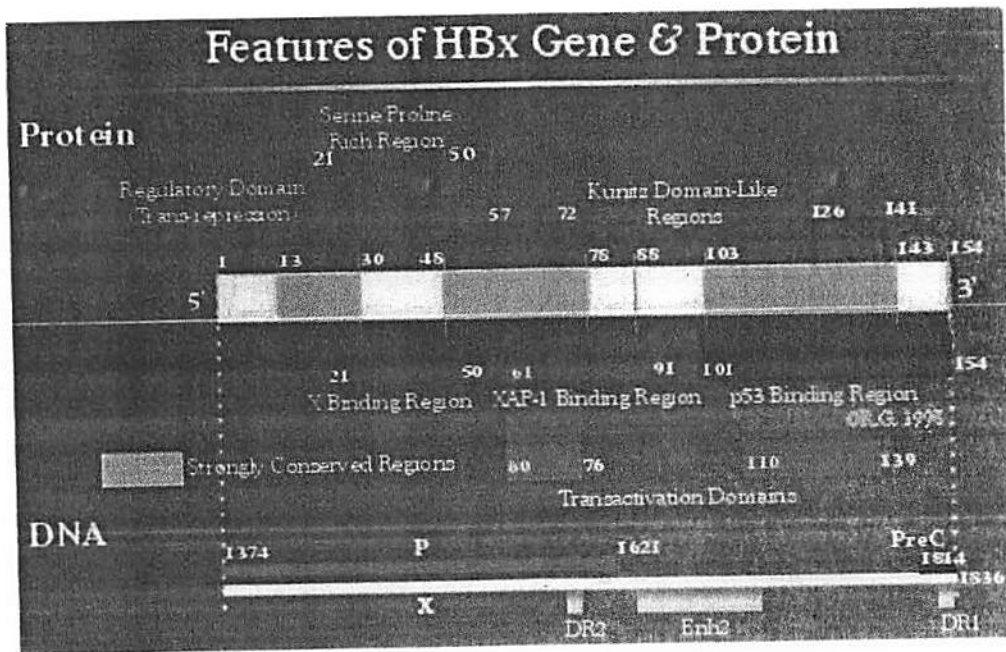
Dalam proses fibrogenesis hati, terdapat beberapa faktor yang merangsang aktivasi dari miofibroblas, di antaranya aktivitas sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan, mediator lipid, dan stres oksidatif. Faktor stres oksidatif akibat pelepasan spesies oksigen reaktif memegang peranan penting (Ha *et al.*, 2010; Mallat and Lotersztajn, 2013). Mekanisme perkembangan VHB menjadi KHS secara langsung ataupun melalui sirosis masih belum sepenuhnya dimengerti. Terdapat beberapa hipotesis yang dirumuskan untuk menjelaskan mekanisme tumorigenesis VHB, meliputi inflamasi dan regenerasi hati yang berhubungan dengan sitotoksitas imun, mutasi virus, dan faktor onkogenik virus (Lu, 2011; Su *et al.*, 2014).

2.3 Mutasi Gen X Virus Hepatitis B

Walaupun mekanisme terjadinya CLD belum sepenuhnya dimengerti, salah satu faktor yang diduga berperan adalah protein *Hepatitis B X antigen* (HbxAg) yang disandi oleh VHB. Gen X VHB dapat berintegrasi langsung ke dalam DNA *host* pada banyak tempat dan mempengaruhi transkripsi gen yang ada dalam sel *host* melalui berbagai jalur persinyalan,

seperti ras, NF- κ B, *activating protein-1* (AP-1), dan *janus kinase* (JAK/STAT) (Tufan et al., 2002).

Gen X merupakan ORF terkecil yang mengkode HBx. Protein HBx merupakan protein multifungsional non struktural sepanjang 465 bp (nt 1374-1838) atau 154 asam amino dengan berat molekul 16,5 kDa yang mengandung elemen penting seperti EnhII (nt 1636-1744), *core promoter* (nt 1613-1849), dan daerah pengikat mikro RNA (nt 1362-1383). Hal ini menyebabkan mutasi HBx juga dapat mempengaruhi beberapa daerah tersebut (Kim et al., 2016). Protein HBx dinamakan demikian dikarenakan *sequence* gen X tidak homolog dengan berbagai protein yang telah diketahui (Ali et al., 2014).



Gambar 2 Struktur HBx (Robert, 2000)

Protein HBx diekspresikan pada 70% penderita KHS dengan infeksi VHB serta lebih dari 95% penderita sirosis dengan infeksi VHB. Mutasi gen X VHB pada karboksi terminal memudahkan integrasi HBx ke *host* dan mempengaruhi promotor virus maupun *host* secara tidak langsung melalui interaksi dengan faktor transkripsi yang terletak pada inti sel (Bharadwaj et al, 2013; Ali et al, 2014). Domain C terminal gen X memiliki kemampuan transaktivasi berbagai elemen transkripsi virus, seperti *Activator Protein* (AP)-1, AP-2, *cAMP Response Element* (CRE), *C/EBP*, *Serum Response Element* (SRE), dan NF- κ B (Andrisani &

Barnabas, 1999). Daerah ujung C HBx memiliki peranan penting dalam mengontrol proliferasi, viabilitas, dan transformasi sel (Kim *et al.*, 2016).

Pada berbagai penelitian sebelumnya, baik pada penelitian eksperimental yang menggunakan tikus transgenik (Koike, 2009) maupun penelitian observasional pada manusia (Fan *et al.*, 2011; Barbini *et al.*, 2012), terdapat hubungan antara protein X dengan karsinogenesis hepar. Lebih lanjut lagi, protein X dapat menginduksi kerusakan DNA dan kematian sel melalui lokalisasi pada mitokondria, terutama pada protein X yang mengalami mutasi (Koike, 2009). Lokalisasi protein X pada mitokondria menyebabkan hilangnya potensial membrane mitokondria dan peningkatan produksi ROS mitokondria (Rawat *et al.*, 2012).

Terdapat dua jenis mutasi gen X VHB yang sering ditemukan pada infeksi VHB kronis, yaitu tipe I dan tipe II. Mutasi tipe I merupakan mutasi nukleotida tunggal pada beberapa tempat, sedangkan tipe II merupakan mutasi daerah karboksi terminal yang menyebabkan akumulasi protein HBx yang lebih tinggi daripada normal (Geng *et al.*, 2015).

Jenis mutasi gen X VHB berbeda di setiap populasi. Pada populasi Eropa dan Afrika, mutasi daerah karboksi terminal banyak ditemukan pada KHS, sedangkan mutasi pada asam amino 130 dan 131 banyak ditemukan pada hepatitis ringan (Baptista, Kramvis & Kew, 1999; Iavarone *et al.*, 2003). Hal ini berbeda dengan penelitian Song *et al.* (2005) di Vietnam yang menunjukkan bahwa mutasi asam amino 130 dan 131 dominan pada KHS dan hanya sedikit mutasi karboksi terminal yang ditemukan (Song *et al.*, 2005). Penelitian lain oleh Chen *et al.* (2005) di Hongkong menunjukkan bahwa terdapat 54 jenis mutasi gen X VHB yang berbeda (Chen *et al.*, 2005).

Ali *et al.* (2014) juga merangkum sebanyak 17 jenis mutasi gen X yang berbeda dari berbagai penelitian. Mutasi pada *hotspot* tertentu gen X pada intinya dapat meningkatkan kemampuan transaktivasi HBx, menurunkan kemampuan anti proliferasi, meningkatkan proliferasi hepatosit, serta menghambat perbaikan DNA (Ali *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2005). Mutasi di daerah *Basal Core Promotor* (BCP) yang *overlap* dengan gen X, yaitu di daerah A1762T/ G1764A juga banyak dilaporkan berhubungan dengan KHS. Hal ini diduga terjadi melalui peningkatan derajat inflamasi dan invasi virus (Kim *et al.*, 2016).

Protein HBx dapat menyebabkan transaktivasi, *upregulation* maupun *downregulation* berbagai gen *host* (Ayub *et al.*, 2013; Bharadwaj *et al.*, 2013). Protein X VHB dapat menyebabkan transaktivasi serta *upregulation* dari ekspresi gen TNF- α dan NF- κ B di hepar. Hal ini diduga terjadi melalui mekanisme persinyalan faktor transkripsi yang banyak didapatkan pada daerah promotor dari TNF- α , yaitu *cAMP Responsive Element*

Binding/Activating Transcription Factor (CREB/ATF), AP-1/AP-2, *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), NF- κ B (Lara-Pezzi et al., 1998), Ras/Raf/Rac (Ayub, Ashfaq & Haque, 2013), dan *Extracellular Signal Regulated Kinase* (ERK) (Lu & Zhou, 2013). Induksi TNF- α oleh HBx dapat menyebabkan kerusakan hepar (Yi et al., 2003). Protein HBx bahkan memiliki kooperativitas dengan TNF- α dalam menginduksi NF- κ B (Wu et al., 2016).

Kemampuan transaktivasi HBx juga dapat menekan kemampuan apoptosis TGF- β melalui jalur persinyalan Protein Kinase B (Akt)/*mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) dan Ras/*Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK). Protein HBx menyebabkan *upregulation* dari TGF- β 1 sehingga memicu proliferasi HSC dan fibrosis (Ayub et al., 2013; Kgatele et al., 2017). Sebaliknya, gen p53 mengalami *downregulation* dan deregulasi transkripsi oleh HBx. Hal ini menyebabkan aktivitas p53 dalam menyebabkan apoptosis sel kanker menurun (Ayub, Ashfaq & Haque, 2013; Chan et al., 2016).

Protein X VHB juga diketahui dapat mempengaruhi keseimbangan antara Th1 dan Th2 pada sistem imun *host*. Pada sel yang dilakukan transfeksi gen X VHB, mRNA dari sitokin pro inflamasi Th1 (IL-1 β dan TNF- α) meningkat secara signifikan, sedangkan mRNA dari sitokin anti inflamasi Th2 (IL-4, IL-10, IL-13, dan IL-14) justru menurun (Lou et al., 2013). Protein HBx memiliki keistimewaan karena seringkali dapat berintegrasi ke dalam genom *host* dan mempengaruhi promotor virus maupun *host* secara tidak langsung melalui interaksi dengan faktor transkripsi yang terletak pada inti sel (Ali et al., 2014). Protein HBx dapat mempertahankan infeksi kronis VHB melalui pengaturan sistem imun *host*. Protein HBx dapat mempengaruhi sinyal apoptosis seperti NF- κ B, PI3K, Fas, dan TNF- α . Mutasi pada HBx dapat mempengaruhi persinyalan berbagai molekul tersebut (Kim et al., 2016).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan

3.1.1 Tujuan Umum

Mendeteksi mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Surabaya

3.1.2 Tujuan Khusus

1. Mendeteksi DNA VHB berbasis gen X dengan hasil PCR pada penderita CLD di Surabaya
2. Mengetahui frekuensi mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Surabaya.
3. Menganalisis pola mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Surabaya.

3.2 Manfaat

3.2.1 Manfaat Teoritis

1. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat dideteksi mutasi gen X VHB pada pasien CLD yang dapat digunakan untuk menambah khazanah teoritis bagi peneliti lain.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data molekuler mengenai mutasi gen X VHB pada populasi Surabaya, Indonesia yang secara genetik tentu memiliki karakteristik tersendiri.



BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan rancangan penelitian *cross sectional*. Populasi yang diambil dalam penelitian ini adalah 60 penderita CLD yang berobat jalan/dirawat di SMF Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pengambilan sampel dilakukan secara *Purposive sampling*.

Kriteria inklusi sampel:

- Penderita infeksi VHB kronis yang dibuktikan dengan riwayat HBsAg positif 6 bulan atau lebih dan dibuktikan masih positif pada saat diambil darah.
- Dewasa (berusia lebih dari 16 tahun).
- Terdapat data diagnosis penderita yang dinyatakan terinfeksi VHB kronis, sirosis hati, atau KHS oleh dokter spesialis penyakit dalam konsultan gastroenterohepatologi di RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
- Penderita yang menjadi sampel pada penelitian ini bersedia ikut dengan menandatangani pernyataan persetujuan (*informed consent*).

4.2 Lokasi Penelitian

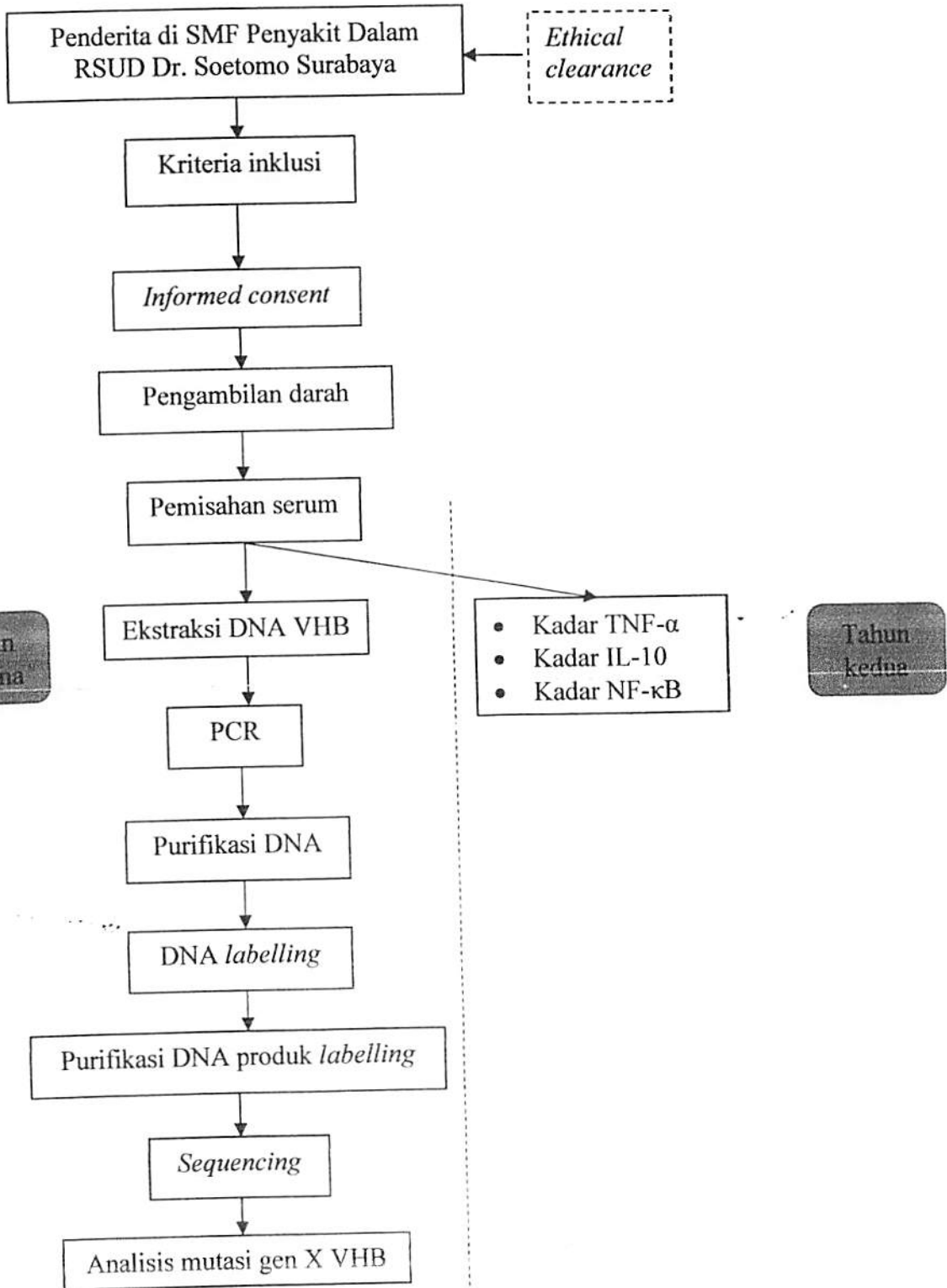
Penelitian ini dilaksanakan di beberapa lokasi, yaitu:

- Pengambilan sampel di SMF Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya
- Pemeriksaan molekuler berupa pemisahan serum, ekstraksi DNA, PCR, *sequencing*, serta analisis mutasi gen X VHB di Laboratorium *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.

4.3 Prosedur Pengumpulan Data

Alur penelitian dimulai dengan pengurusan *ethical clearance* di rumah sakit. Setelah ijin etik didapat, dilakukan pemilihan pasien yang berobat jalan/dirawat di SMF Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya sesuai dengan kriteria inklusi. Apabila didapatkan penderita CLD dengan kriteria yang diinginkan, pasien dimintakan persetujuan *informed consent* dan diambil darahnya sebanyak 5 cc. Setelah didapatkan sampel darah dari pasien tersebut maka dilakukan pemisahan serum, ekstraksi DNA, PCR, *sequencing*, serta analisis mutasi gen X VHB pada tahun pertama. Pada tahun kedua dilanjutkan pemeriksaan ELISA TNF- α , IL-10, dan NF- κ B dan dianalisis hubungan antara mutasi gen X serta kadar ELISA sitokin tersebut.

4.4 Kerangka Operasional Penelitian



4.5 Bahan Penelitian

4.5.1 Ekstraksi DNA VHB

Serum sampel, kit ekstraksi DNA *QIAamp DNA Blood Mini Kit* dengan Cat.No.51104 dari *Qiagen*, Jerman, ethanol absolut 96-100%, *mini spin column*, *collection Tubes*, tabung *centrifuge*, *blue tips* steril, *yellow tips* steril, tabung *ependorf* 1,5 mL steril.

4.5.2 PCR Gen X VHB

Tap Taq Master Mix dari *Qiagen* (cat.no 200403), *primer* luar: XOP-5: TGCCAAGTATTTGCTGACG dan XOP-3: CAACACAAAATAGCTTGCC, *primer* dalam: Xi-5: CGCTTGTTTTGCTCGCAGC dan Xi-3: AAGCCACCCAAGGCACAGC, sampel DNA, *distilled water*, tabung *ependorf* 0,2 mL, *yellow tips* steril.

4.5.3 Electrophoresis Gel

Agarose gel 2% (*FMC Bioproducts, Rockland, ME*), 0.5 µg/ml *ethidium bromide* (*Merck, Inc., Darmstadt, Germany*), *TBE buffer 0,5x*, *loading buffer 1,5 µl* (*Fermentas 6x DNA Loading Dye R 0611 Lot 00071285*, *loading Marker Fermentas ΦX174 DNA/Hae III Fragments 0,5 µg/µl 3 µl*, *parafilm*.

4.5.4 Bahan untuk pemeriksaan sequencing

4.5.4.1. Bahan untuk purifikasi DNA hasil PCR

QIA quick gel extraction kit (*Qiagen*, cat.no. 28704), tabung *ependorf* 1,5 mL steril, *yellow tips* steril.

4.5.4.2 Bahan untuk labelling DNA murni dengan PCR pro-sequencing

DNA murni, salah satu *primer*, *Big Dye terminator purification kit* (*Applied Biosystem*, part no 4337449), *water*, *yellow tips* steril, tabung *ependorf* 0,2 ml.

4.5.4.3 Bahan untuk purifikasi DNA hasil labelling pro sequencing

BigDye X Terminator Purification Kit dengan Cat.No. 4376486 dari *Applied Biosystem*, *SAM Solution* dengan Lot.No.1410050 dari *Applied Biosystem*, *yellow tips* steril, tabung *ependorf* 2 ml steril, *tube* untuk *sequencing* 0,5 mL dengan septa.

4.5.4.4 Bahan untuk sequencing pada mesin ABI 310

POP 6 (*Performance Optimized polymer 6*) (P/N: 402837).

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Ekstraksi DNA VHB

Mikropipet 20 μ L, 200 μ L dan 1000 μ L, vortex: *Genie-2*, microcentrifuge: *Millipore*, timer, Biosafety Cabinet: *Bio Clean Bench MCV-16BSF (Sanyo)*, centrifuge: *High Speed Micro Refrigerator Centrifuge MRX-150 (Tomy)*, Freezer, Inkubator.

4.6.2 PCR Gen X VHB

Mikropipet 20 μ L, 200 μ L dan 1000 μ L, vortex: *Genie-2*, microcentrifuge: *Millipore*, timer, Biosafety Cabinet: *Bio Clean Bench MCV-16BSF (Sanyo)*, thermal Cycler: *Applied Biosystem Veriti 96 Well*

4.6.3 Electrophoresis gel dan dokumentasi

Timbangan mikro, gelas ukur, tabung Erlenmeyer, microwave, cetakan agarose gel, sample combs, electrophoresis gel apparatus: *Mupid 2 electrophoresis and power supply*, transilluminator UV dan kamera *IJVP Mamiya RB67 Pro SD*

4.6.4 Instrumen untuk pemeriksaan sequencing

4.6.4.1 Purifikasi DNA hasil PCR

Scalpel, pinset, Transilluminator UV, mikropipet 20 μ l dan 200 μ l, inkubator, centrifuge: *High Speed Micro Refrigerator Centrifuge MRX-150 (Tomy)*.

4.6.4.2 Labelling DNA murni dengan PCR pro-sequencing

Mikropipet 20 μ l dan 200 μ l, microsentrifuge: *Millipore*, vortex: *Genie-2*, thermal Cycler: *Applied Biosystem Veriti 96 Well*.

4.6.4.3 Purifikasi DNA hasil labelling pro sequencing

Mikropipet 20 μ l dan 200 μ l, centrifuge: *High Speed Micro Refrigerator Centrifuge MRX-150 (Tomy)*, vortex: *Genie-2*

4.6.4.4 Sequencing pada mesin ABI 310

Capillary 5-47 cm dengan *Performance Optimizer Polymer 6 (POP 6) (P/N: 402837)*, mesin *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* dari *Applied Biosystem, Inc.*

4.7 Prosedur Pemeriksaan

4.7.1 Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan melalui *vena cubiti* sebanyak 5mL darah pada tabung *venoject* tanpa EDTA.

4.7.2 Pemisahan serum darah

Serum yang telah diambil pada tabung *venoject* tanpa EDTA didiamkan selama 0,5 jam kemudian dipisahkan dengan *centrifuge* dengan kecepatan 3000rpm selama 10 menit. Kemudian serum dimasukkan ke dalam tiga tabung *eppendorf* 2 mL.

4.7.3 Deteksi Mutasi Gen X VHB

4.7.3.1 Ekstraksi DNA VHB

DNA VHB diekstraksi dari 140 µl serum menggunakan kit ekstraksi *QIAamp DNA Blood Mini Kit* dengan Cat.No.51104 dari Qiagen, Jerman dengan prosedur kerja sesuai dengan prosedur yang terdapat dalam kit.

4.7.3.2 PCR Gen X VHB

Pelaksanaan PCR Gen X VHB menggunakan *nested primer* yang dipilih, yaitu: *primer* luar: XF1 (*forward*): 5-CATGCGTGGAACCTTTGTG-3 (nt:1233-1251) dan XR1 (*reverse*): 5-CTTGCCTKAGTGCTGTATGG-3 (nt: 2072-2053), *primer* dalam: XF2 (*forward*): 5-TCCTCTGCCGATCCATACTG-3 (nt: 1254-1263) dan XR2 (*reverse*): 5-CAGAAGCTCCAAATTCTTTATA-3 (nt: 1937-1916) (Lee *et al.*, 2011). Pemeriksaan PCR ini menggunakan *Master Mix Promega* dengan prosedur sesuai petunjuk kit. Hasil PCR DNA VHB yang negatif pada ronde pertama akan diteruskan dengan PCR ronde kedua hingga diperoleh hasil PCR DNA VHB yang positif.

Proses PCR pada *first round* diawali dengan 94°C selama 5 min untuk *hot start*, dilanjutkan dengan siklus denaturasi 94°C selama 50 detik, *annealing* 50°C selama 50 detik, elongasi 72°C selama 60 detik, dimana ketiganya berlangsung selama 35 siklus, kemudian diakhiri dengan *final extension* pada 72°C selama 7 menit. Proses PCR pada *second round* meliputi *hot start* pada 94°C selama 5 menit, siklus *denaturasi* pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, elongasi pada 72°C selama 45 detik dimana ketiganya berlangsung selama 35 siklus, lalu diakhiri dengan *final extension* pada 72°C selama 7 menit.

Apabila *nested* PCR dengan menggunakan kedua pasang *primer* tersebut di atas tidak memberikan hasil yang positif, dilakukan *nested* PCR dengan menggunakan *primer* yang lain

dengan pasangan *primer* ronde pertama: XproF1 (*forward*): 5'-CTCTGCCAAGTGTGGCTGA-3' (nt 1171-1190) dan XproR1 (*reverse*): 5'-CAAGGCACAGCTTGGAGGCT-3' (nt 1886-1867). Apabila hasil PCR ronde pertama negatif, dilakukan PCR ronde kedua dengan pasangan *primer*: XproF2 (*forward*): 5'-TTGCTCGCAGCCGGTCTGGA-3' (nt 1295-1314) dan XproR2 (*reverse*): 5'-TGAACAGTAGGACATGAACA-3' (nt 1847-1866). Prosedur PCR dilakukan dengan 94°C selama 2 menit untuk denaturasi awal, dilanjutkan dengan 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, 54°C *annealing* selama 45 detik, dan elongasi 72°C selama 1 menit. Terakhir, *final extension* dilakukan dalam 72°C selama 10 menit (Kim et al., 2008).

Apabila DNA VHB masih negatif, dilakukan PCR dengan *primer*: HB6F: TTGTYTACGTCCCGTCGGCG (1421-1440) dan HB6R: AACAGACCAATTTATGCCTA (1803-1784) (Sugauchi et al., 2001). Apabila masih negatif, digunakan *primer*: HB7F GAGACCACCGTGAACGCCA (1611-1630) dan HB7R CCTGAGTGCTGTATGGTGAGG (2072-2048) (Sugauchi et al., 2001). Apabila masih negatif juga, dilakukan PCR dengan menarget daerah *Surface* menggunakan *primer* HBS1: 5'CAAGGTATGTTGCCCGTT3' (455-474) dan HBS2: 5'AAAGCCCTACGAACCACT3' (713-694) (Telenta et al., 1997).

4.7.3.3 Electrophoresis gel dan dokumentasi

Pembacaan hasil PCR dengan elektroforesis menggunakan *agarose gel* 2% yang mengandung *ethidium bromide*. *Electrophoresis gel apparatus* ditutup dan dijalankan dengan 100 volt selama kurang lebih 30 menit, selanjutnya dilihat di bawah sinar ultra violet dan didokumentasikan.

4.7.3.4 Purifikasi DNA hasil PCR

Purifikasi dilakukan pada produk PCR yang memberikan hasil positif ketika dielektroforesis. Purifikasi DNA dilakukan menggunakan kit purifikasi DNA *QIAquick® PCR Purification Kit* dengan Cat.No. 28106 dari *Qiagen*, Jerman sesuai prosedur yang terdapat dalam kit.

4.7.3.5 Labelling DNA murni dengan PCR *pro-sequencing*

Labelling dilakukan dengan menggunakan *Ready Reaction Premix 2.5X* dan *BigDye Terminator Sequencing Buffer 5X* dan menggunakan mesin *Thermal Cycler*.

4.7.3.6 Purifikasi DNA hasil *labelling pro sequencing*

Purifikasi DNA *pro sequencing* dilakukan menggunakan reagen *SAM™ Solution* (Lot.No.1410050) dan *XTerminator™ Solution* (Cat.No. 4376486) yang dicampurkan dengan DNA hasil *labelling*.

4.7.3.7 Sequencing pada mesin ABI 310

Sequencing DNA dilakukan dengan menggunakan *ABI Prism 310 Genetic Analyzer*.

4.7.3.8 Analisis hasil sequencing

Hasil yang didapat dibandingkan dengan *reference strains* dari urutan nukleotida yang telah dipublikasikan sebelumnya di *GenBank* menggunakan program komputer *Clone Manager 9*.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi secara molekuler adanya mutasi di regio X VHB pada penderita CLD menggunakan teknik *nested* PCR. Dalam penelitian ini, telah dikumpulkan 60 sampel dari serum penderita CLD dengan infeksi VHB yang diperoleh dari instalasi rawat jalan/inap SMF Ilmu Penyakit Dalam, RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Tabel 5.1. Jenis kelamin dan kelompok umur penderita CLD

Jenis Kelamin	Jumlah Penderita	Rentang Usia (tahun)			
		≤40	41-50 tahun	51-60 tahun	>60 tahun
Laki-laki	44 (73,33%)	12	13	13	6
Wanita	16 (26,66%)	6	4	4	2
TOTAL	60 (100%)	18	17	17	8

Penderita CLD di SMF Ilmu Penyakit Dalam, RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang termuda dalam penelitian ini berumur 16 tahun dan tertua berumur 72 tahun, serta didominasi oleh rentang usia ≤40 tahun.

Didapatkan penderita sebagian besar (73,33%) berjenis kelamin laki-laki. Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa penderita CLD dan infeksi VHB pada laki-laki lebih banyak daripada perempuan (Huang et al., 2011). Penyebab banyaknya penderita laki-laki yang menderita CLD dapat dikemukakan karena adanya pengaruh dari faktor hormonal. Hormon seks laki-laki, yaitu androgen dapat meningkatkan transkripsi genom VHB. Transkripsi genom VHB ini dapat menyebabkan peningkatan progresivitas perjalanan infeksi VHB menjadi CLD (El-Serag, 2012).

Tabel 5.2. Profil Sampel Berdasarkan Diagnosis CLD

Diagnosis	Jumlah
Hepatitis Kronis	35
Sirosis Hati	17
Karsinoma Hepatoseluler	8

Dalam penelitian ini, penderita CLD dengan hepatitis kronis ditemukan lebih banyak daripada penderita sirosis hati dan atau KHS (Tabel 5.2). Hal ini sesuai dengan data WHO

(2015) yang menyebutkan bahwa kejadian sirosis hati dan atau KHS pada penderita dengan infeksi VHB kronis sebesar 20-30% (WHO, 2016). Penderita KHS didapatkan dalam jumlah yang sedikit karena memang penderita KHS memiliki *survival rate* yang rendah, yaitu sekitar 5 bulan apabila tanpa mendapatkan terapi yang adekuat (Nguyen et al., 2008).

Pada seluruh sampel dilakukan pemisahan serum, isolasi DNA VHB, dilanjutkan pemeriksaan *nested* PCR berbasis regio X VHB untuk mendeteksi keberadaan DNA VHB dengan menggunakan PCR *first round primer* XF1 dan XR1. Amplikon pada PCR ronde pertama sebesar 839 kb. Apabila hasil negatif baru dilakukan PCR *second round*. PCR *second round* menggunakan *primer* XF2 dan XR2. Amplikon pada PCR ronde kedua sebesar 683 kb. Penggunaan teknik *nested* PCR dimaksudkan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas dan hasil PCR.

Apabila *nested* PCR dengan menggunakan kedua pasang *primer* tersebut di atas tidak memberikan hasil yang positif, dilakukan *nested* PCR dengan menggunakan *primer* yang lain dengan pasangan *primer* ronde pertama XproF1 dan XproR1 dengan amplikon sebesar 715 bp. Apabila hasil PCR ronde pertama negatif, dilakukan PCR ronde kedua dengan pasangan *primer* XproF2 dan XproR2 dengan amplikon sebesar 571bp. Apabila dengan pasangan *primer* tersebut DNA VHB masih negatif, dilakukan PCR dengan *primer* HB6F dan HB6R dengan amplikon sebesar 382 bp. Apabila masih negatif, digunakan *primer* HB7F dan HB7R dengan amplikon sebesar 461 bp. Apabila DNA VHB masih negatif, dilakukan PCR yang menarget daerah *Surface* menggunakan *primer* HBS1 dan HBS2. Apabila HBS1 dan HBS2 masih negatif, dilakukan pemeriksaan HBsAg untuk memastikan keberadaan antigen VHB di dalam serum.

Dengan menggunakan prosedur PCR tersebut, dari 60 penderita CLD, didapatkan 54 penderita dengan DNA VHB positif (90%) dan 44 penderita yang berhasil dilakukan *sequencing* regio X (73,33%). Sebanyak 10 penderita menunjukkan hasil PCR DNA VHB regio X yang negatif tetapi positif pada pemeriksaan menggunakan regio *surface*. Dari 44 sampel yang telah dilakukan *sequencing*, sebanyak 19 sampel didiagnosis Hepatitis Kronis, 15 Sirosis Hati, dan 11 Karsinoma Hepatoseluler. Dari 6 sampel dengan DNA VHB negatif setelah diperiksa dengan menggunakan berbagai pasangan *primer* tersebut di atas, 3 sampel memiliki HBsAg negatif setelah dilakukan pemeriksaan ulang.

Penyebab dari hasil PCR DNA VHB yang negatif pada sampel dengan HBsAg positif dapat disebabkan oleh bervariasinya tempat melekatnya *primer* atau *primer* melekat pada tempat lain di luar target yang diharapkan (Keum et al., 1997). Terdapat beberapa sampel menunjukkan hasil PCR DNA VHB yang negatif dengan *primer* yang menarget regio X tetapi

positif dengan *primer surface*. Walaupun gen X mengandung daerah *hyperconserved* (Gonzalez et al., 2018), PCR gen S paling sensitif untuk deteksi DNA VHB di serum, sedangkan PCR gen X paling sensitif untuk deteksi DNA VHB di hepar (Torbenson and Thomas, 2002). Kemungkinan lain adalah kadar DNA VHB yang terlalu rendah karena ada kemungkinan penderita telah mengkonsumsi obat antivirus yang menekan DNA VHB sebelumnya. Pada 3 sampel, DNA VHB masih tetap negatif walaupun menggunakan *primer* lain diakibatkan kadar DNA VHB terlalu rendah hingga tidak dapat terdeteksi. Diketahui bahwa ketiga sampel tersebut sedang menjalani terapi antivirus, dimana 2 sampel diterapi dengan Telbivudin (Sebivo) dan 1 sampel menggunakan Peg-Interferon. Penggunaan obat antivirus sebagai terapi infeksi VHB, baik berupa injeksi interferon maupun penggunaan analog nukleosida oral dapat menekan DNA VHB hingga kadar yang tidak dapat dideteksi yang merupakan penanda keberhasilan terapi meskipun HBsAg tetap positif (Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia, 2013).

Pada sampel dengan DNA VHB positif, dilakukan purifikasi DNA, *labelling* DNA, serta *sequencing*. Kemudian, pada hasil *sequencing* yang didapat dilakukan analisis mutasi regio X VHB dengan *multiple alignment* menggunakan program *Clone Manager 9*. Analisis genotipe dan homologi dengan program *nucleotide BLASTN* di internet (NCBI) dilakukan untuk menentukan *reference strains* yang digunakan sebagai pembanding. Dari hasil pemeriksaan genotipe menggunakan analisis filogenetik menunjukkan bahwa semua sampel terdiri dari genotipe B, maka *reference strains* yang digunakan adalah B-Indonesia (EF473977), B-Jepang (D23678), dan B-Filipina (AB219430).



DS-07-P.XF1_A10_01_B04Seq2018_POP74_2.m4

KB 1.4.18 KB.m4

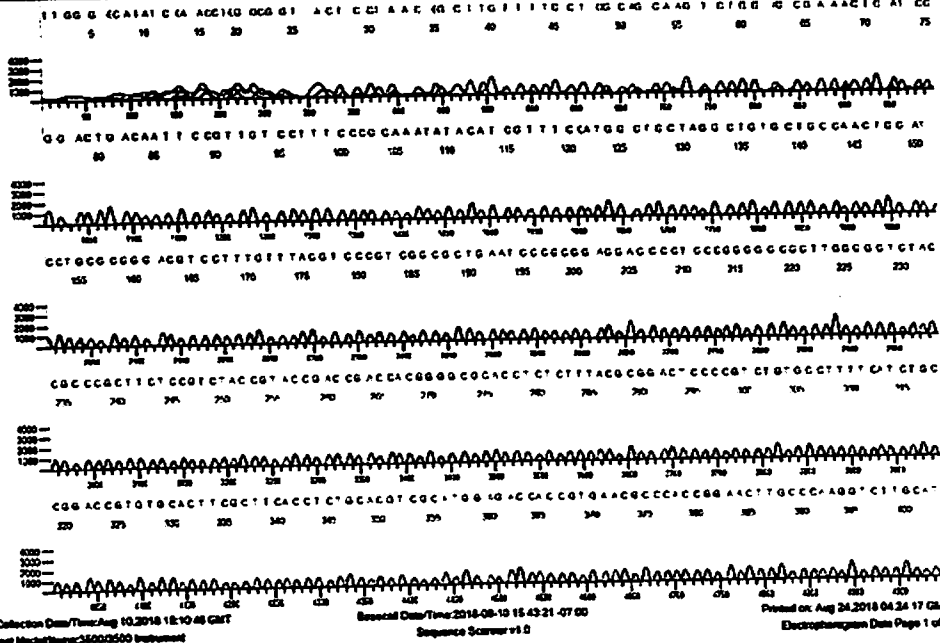
DS-07-P.XF1

KB_3600_POP7_80T13.m4

Signal: Q182A:188 T:301 C:255 AvgSig: 271

CR1 WA10 Plate Name: KEPATITIS-10Agustus2018

TS:48 CR1_083 CV20-355



Gambar 5.1 Contoh hasil sequencing regio X VHB

B3 (Indo)-EF47397	1 atggctgctaggctgtgctgccaaactggatcctgcggggacgtcctttgtttacgtccc
B3 (Phil)-AB21943	1G.....G.....G.....G.....
B1 (Japan)-D23676	1G.....G.....G.....G.....
DS-02-6f	1G.....G.....G.....G.....
DS-07-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-11-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-14-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-21-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-23-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-24-6f	1G.....G.....G.....G.....
DS-30-p.7F	1G.....G.....G.....G.....
DS-36-6f	1G.....G.....G.....G.....
DS-41-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-47-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-48-F.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-50-F.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-52-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-54-F.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-55-P.XF2	1G.....G.....G.....G.....
DS-64-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-65-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-71-P.Xf1	1G.....G.....G.....G.....
DS-73-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-74-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-75-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-83-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-84-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-85-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-87-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-92-P.XF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-94-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-97-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-99-6f	1G.....G.....G.....G.....
DS-103-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-112-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-115-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-120-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-121-PXF2	1G.....G.....G.....G.....
DS-126-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-135-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-136-PXF2	1G.....G.....G.....G.....
DS-140-PXF1	1G.....G.....G.....G.....
DS-155-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-192-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-194-P.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-198-F.6F	1G.....G.....G.....G.....
DS-203-p.7F	1G.....G.....G.....G.....

B3 (Indo)-EF47397 181 tgtgccttctcatctgccggaccgtgtgcacttcgcttcacctctgcacgtcgcctggag
 B3 (Phil)-AB21943 181
 B1 (Japan)-D23678 181
 DS-02-6f 181
 DS-07-P.XF1 181
 DS-11-P.XF1 181
 DS-14-P.XF1 181
 DS-21-PXF1 181
 DS-23-P.XF1 181
 DS-24-6f 181
 DS-30-p.7F 181
 DS-36-6f 181
 DS-41-P.XF1 181
 DS-47-P.XF1 181
 DS-48-P.6F 181
 DS-50-P.XF1 181
 DS-52-PXF1 181
 DS-54-P.XF1 181
 DS-55-P.XF2 181
 DS-64-P.XF1 181
 DS-65-P.6F 181
 DS-71-P.XF1 181
 DS-73-PXF1 181
 DS-74-P.6F 181
 DS-75-P.XF1 181
 DS-83-P.XF1 181
 DS-84-P.XF1 181
 DS-85-P.XF1 181
 DS-87-P.XF1 191
 DS-92-P.XF1 181
 DS-94-PXF1 181
 DS-97-PXF1 181
 DS-99-6f 181
 DS-103-PXF1 181
 DS-112-P.6F 181
 DS-119-PXF1 181
 DS-120-PXF1 181
 DS-121-PXF2 181
 DS-126-P.6F 181
 DS-135-PXF1 181
 DS-136-PXF2 181
 DS-140-PXF1 181
 DS-155-P.6F 181
 DS-192-P.6F 181
 DS-194-P.6F 181
 DS-198-P.6F 181
 DS-203-p.7F 181

B3 (Indo)-EF47397 241 accaccgtgaacgccaccgggaacttgcccaaggtcttgcataagaggactcttgactt
 B3 (Phil)-AB21943 241
 B1 (Japan)-D23678 241
 DS-02-6f 241
 DS-07-P.XF1 241
 DS-11-P.XF1 241
 DS-14-P.XF1 241
 DS-21-PXF1 241
 DS-23-P.XF1 241
 DS-24-6f 241
 DS-30-p.7F 241
 DS-36-6f 241
 DS-41-P.XF1 241
 DS-47-P.XF1 241
 DS-48-P.6F 241
 DS-50-P.XF1 241
 DS-52-PXF1 241
 DS-54-P.XF1 241
 DS-55-P.XF2 241
 DS-64-P.XF1 241
 DS-65-P.6F 241
 DS-71-P.XF1 241
 DS-73-PXF1 241
 DS-74-P.6F 241
 DS-75-P.XF1 241
 DS-83-P.XF1 241
 DS-84-P.XF1 241
 DS-85-P.XF1 241
 DS-87-P.XF1 241
 DS-92-P.XF1 241
 DS-94-PXF1 241
 DS-97-PXF1 241
 DS-99-6f 241
 DS-103-PXF1 241
 DS-112-P.6F 241
 DS-119-PXF1 241
 DS-120-PXF1 241
 DS-121-PXF2 241
 DS-126-P.6F 241
 DS-135-PXF1 241
 DS-136-PXF2 241
 DS-140-PXF1 241
 DS-155-P.6F 241
 DS-192-P.6F 241
 DS-194-P.6F 241
 DS-198-P.6F 241
 DS-203-p.7F 241

B3 (Indo)-EF47397	301	tca-----gcaatgtcaacaaccgaccttgagg
B3 (Phil)-AB21943	301
B1 (Japan)-D23678	301
DS-02-6f	301
DS-07-P.XF1	301
DS-11-P.XF1	301
DS-14-P.XF1	301
DS-21-PXF1	301
DS-23-P.XF1	301
DS-24-6f	301
DS-30-p.7F	301
DS-36-6f	301
DS-41-P.XF1	301
DS-47-P.XF1	301
DS-48-P.6F	301
DS-50-P.XF1	301
DS-52-PXF1	301
DS-54-P.XF1	301
DS-55-P.XF2	301
DS-64-P.XF1	301
DS-65-P.6F	301	aggctcttgataagaggactcttggactttca
DS-71-P.XF1	301
DS-73-PXF1	301
DS-74-P.6F	301
DS-75-P.XF1	301
DS-83-P.XF1	301
DS-84-P.XF1	301
DS-85-P.XF1	301
DS-87-P.XF1	301
DS-92-P.XF1	301
DS-94-PXF1	301
DS-97-PXF1	301
DS-99-6f	301
DS-103-PXF1	301
DS-112-P.6F	301
DS-119-PXF1	301
DS-120-PXF1	301
DS-121-PXF2	301
DS-126-P.6F	301
DS-135-PXF1	301
DS-136-PXF2	301
DS-140-PXF1	301
DS-155-P.6F	301
DS-192-P.6F	301
DS-194-P.6F	301
DS-198-P.6F	301
DS-203-p.7F	301

B3 (Indo)-EF47397	329	catacttcaagactgtatgtttactgactggaatatttggggaatttgggttaa
B3 (Phil)-AB21943	329
B1 (Japan)-D23678	329
DS-02-6f	329
DS-07-P.XF1	329
DS-11-P.XF1	329
DS-14-P.XF1	329
DS-21-PXF1	329
DS-23-P.XF1	329
DS-24-6f	329
DS-30-p.7F	329
DS-36-6f	329
DS-41-P.XF1	329
DS-47-P.XF1	329
DS-48-P.6F	329
DS-50-P.XF1	329
DS-52-PXF1	329
DS-54-P.XF1	329
DS-55-P.XF2	329
DS-64-P.XF1	329
DS-65-P.6F	361
DS-71-P.XF1	329
DS-73-PXF1	329
DS-74-P.6F	329
DS-75-P.XF1	329
DS-83-P.XF1	329
DS-84-P.XF1	329
DS-85-P.XF1	329
DS-87-P.XF1	329
DS-92-P.XF1	329
DS-94-PXF1	329
DS-97-PXF1	329
DS-99-6f	329
DS-103-PXF1	329
DS-112-P.6F	329
DS-119-PXF1	329
DS-120-PXF1	329
DS-121-PXF2	329
DS-126-P.6F	329
DS-135-PXF1	329
DS-136-PXF2	329
DS-140-PXF1	329
DS-155-P.6F	329
DS-192-P.6F	329
DS-194-P.6F	329
DS-198-P.6F	361
DS-203-p.7F	329

```

B3 (Indo)-EF47397 389 aggtctttgtactaggaggctgtaggcataaattggctgttcaccagcaccatgcaact
B3 (Phil)-AB21943 389 .....
B1 (Japan)-D23678 389 .....
DS-02-6f 389 .....
DS-07-P.XF1 389 .....
DS-11-P.XF1 389 .....
DS-14-P.XF1 389 .....
DS-21-PXF1 389 .....
DS-23-P.XF1 389 .....
DS-24-6f 389 .....
DS-30-p.7F 389 .....
DS-36-6f 389 .....
DS-41-P.XF1 389 .....
DS-47-P.XF1 389 .....
DS-48-P.6F 389 .....
DS-50-P.XF1 389 .....
DS-52-PXF1 389 .....
DS-54-P.XF1 389 .....
DS-55-P.XF2 389 .....
DS-64-P.XF1 389 .....
DS-65-P.6F 413 .....
DS-71-P.XF1 389 .....
DS-73-PXF1 389 .....
DS-74-P.6F 389 .....
DS-75-P.XF1 389 .....
DS-83-P.XF1 389 .....
DS-84-P.XF1 389 .....
DS-85-P.XF1 389 .....
DS-87-P.XF1 389 .....
DS-92-P.XF1 389 .....
DS-94-PXF1 389 .....
DS-97-PXF1 389 .....
DS-99-6f 389 .....
DS-103-PXF1 389 .....
DS-112-P.6F 389 .....
DS-119-PXF1 389 .....
DS-120-PXF1 389 .....
DS-121-PXF2 389 .....
DS-126-P.6F 389 .....
DS-135-PXF1 389 .....
DS-136-PXF2 389 .....
DS-140-PXF1 389 .....
DS-155-P.6F 389 .....
DS-192-P.6F 389 .....
DS-194-P.6F 389 .....
DS-198-P.6F 389 .....
DS-203-p.7F 389 .....

```

```

B3 (Indo)-EF47397 449 ttttcacctctgcat
B3 (Phil)-AB21943 449 .....
B1 (Japan)-D23678 449 .....
DS-02-6f 449 .....
DS-07-P.XF1 449 .....
DS-11-P.XF1 449 .....
DS-14-P.XF1 449 .....
DS-21-PXF1 449 .....
DS-23-P.XF1 449 .....
DS-24-6f 449 .....
DS-30-p.7F 449 .....
DS-36-6f 449 .....
DS-41-P.XF1 449 .....
DS-47-P.XF1 449 .....
DS-48-P.6F 449 .....
DS-50-P.XF1 449 .....
DS-52-PXF1 449 .....
DS-54-P.XF1 449 .....
DS-55-P.XF2 449 .....
DS-64-P.XF1 449 .....
DS-65-P.6F 461 .....
DS-71-P.XF1 449 .....
DS-73-PXF1 449 .....
DS-74-P.6F 449 .....
DS-75-P.XF1 449 .....
DS-83-P.XF1 449 .....
DS-84-P.XF1 449 .....
DS-85-P.XF1 449 .....
DS-87-P.XF1 449 .....
DS-92-P.XF1 449 .....
DS-94-PXF1 449 .....
DS-97-PXF1 449 .....
DS-99-6f 449 .....
DS-103-PXF1 449 .....
DS-112-P.6F 449 .....
DS-119-PXF1 449 .....
DS-120-PXF1 449 .....
DS-121-PXF2 449 .....
DS-126-P.6F 449 .....
DS-135-PXF1 449 .....
DS-136-PXF2 449 .....
DS-140-PXF1 449 .....
DS-155-P.6F 449 .....
DS-192-P.6F 449 .....
DS-194-P.6F 449 .....
DS-198-P.6F 449 .....
DS-203-p.7F 449 .....

```

Gambar 5.2 Multiple Alignment sequence nukleotida dengan program Clone Manager 9

Dari hasil *multiple alignment* tersebut dilakukan analisis dengan mencocokkan perbedaan nukleotida antara sampel dengan *reference strains*. Apabila didapatkan perbedaan nukleotida dilakukan penentuan posisi mutasi, regio yang terkena dan adakah perubahan asam amino. Selanjutnya, dilakukan analisis *multiple alignment sequence* asam amino untuk mengetahui dengan lebih jelas adanya perubahan asam amino.

```

B3(Indo)-EF47397      1 maatlcqqlpdardviclrpvgaesigrpltpglgalppaspsavptdhuahlsirqlpv
B3(Phil)-AB21943     1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
B1(Japan)-D23679     1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-02-6f             1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-07-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-11-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-14-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-21-PXF1          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-23-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-24-6f            1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-30-p.7F          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-36-6f            1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-41-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-47-P.XF1         1 .....m.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-48-P.CF          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-50-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-52-PXF1          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-54-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-55-P.XF2         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-64-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-65-P.CF          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-71-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-73-PXF1          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-74-P.CF          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-75-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-83-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-84-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-85-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-87-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-92-P.XF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-94-PXF1          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-97-PXF1          1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-99-6f            1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-103-PXF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-112-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-119-PXF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-120-PXF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-121-PXF2         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-127-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-135-PXF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-136-PXF2         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-140-PXF1         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-155-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-172-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-174-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-178-P.CF         1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
DS-203-p.7F        1 .....G.....G.....KSS..S..SS.....I.....
    
```

```

B3(Indo)-EF47397 181 cafszagpcalrftsarimettwnahrnlpkvlhkrllqisamettileayfkdcvttew
B3(Phil)-AB21943 181 .....h.....k.....s.....h.....
B1(Japan)-D23678 181 .....h.....
DS-02-6f 181 .....h.....
DS-07-P.XF1 181 .....h.....
DS-11-P.XF1 181 .....h.....
DS-14-P.XF1 181 .....h.....
DS-21-PXF1 181 .....h.....
DS-23-P.XF1 181 .....h.....
DS-24-6f 181 .....h.....
DS-30-p.7F 181 .....h.....
DS-36-6f 181 .....h.....
DS-41-P.XF1 181 .....h.....
DS-47-P.XF1 181 .....h.....
DS-48-P.6F 181 .....h.....
DS-50-P.XF1 181 .....h.....
DS-52-PXF1 181 .....h.....
DS-54-P.XF1 181 .....h.....
DS-55-P.XF2 181 .....h.....
DS-64-P.XF1 181 .....h.....
DS-65-P.6F 181 .....h.....
DS-71-P.XF1 181 .....h.....
DS-73-PXF1 181 .....h.....
DS-74-P.CF 181 .....h.....
DS-75-P.XF1 181 .....h.....
DS-83-P.XF1 181 .....h.....
DS-84-P.XF1 181 .....h.....
DS-85-P.XF1 181 .....h.....
DS-87-P.XF1 181 .....h.....
DS-92-P.XF1 181 .....h.....
DS-94-PXF1 181 .....h.....
DS-97-PXF1 181 .....h.....
DS-99-6f 181 .....h.....
DS-103-PXF1 181 .....h.....
DS-112-P.6F 181 .....h.....
DS-119-PXF1 181 .....h.....
DS-120-PXF1 181 .....h.....
DS-121-PXF2 181 .....h.....
DS-126-P.CF 181 .....h.....
DS-135-PXF1 181 .....h.....
DS-136-PXF2 181 .....h.....
DS-140-PXF1 181 .....h.....
DS-155-P.6F 181 .....h.....
DS-182-P.6F 181 .....h.....
DS-184-P.6F 181 .....h.....
DS-198-P.6F 181 .....h.....
DS-203-P.7F 181 .....h.....

```

```

B3(Indo)-EF47397 361 eelpeelrkkvfele----amtklygpaahhllh.....
B3(Phil)-AB21943 361 .....
B1(Japan)-D23678 361 .....
DS-02-6f 361 .....
DS-07-P.XF1 361 .....
DS-11-P.XF1 361 .....
DS-14-P.XF1 361 .....
DS-21-PXF1 361 .....
DS-23-P.XF1 361 .....
DS-24-6f 361 .....
DS-30-p.7F 361 .....
DS-36-6f 361 .....
DS-41-P.XF1 361 .....
DS-47-P.XF1 361 .....
DS-48-P.6F 361 .....
DS-50-P.XF1 361 .....
DS-52-PXF1 361 .....
DS-54-P.XF1 361 .....
DS-55-P.XF2 361 .....
DS-64-P.XF1 361 .....
DS-65-P.6F 361 .....
DS-71-P.XF1 361 .....
DS-73-PXF1 361 .....
DS-74-P.CF 361 .....
DS-75-P.XF1 361 .....
DS-83-P.XF1 361 .....
DS-84-P.XF1 361 .....
DS-85-P.XF1 361 .....
DS-87-P.XF1 361 .....
DS-92-P.XF1 361 .....
DS-94-PXF1 361 .....
DS-97-PXF1 361 .....
DS-99-6f 361 .....
DS-103-PXF1 361 .....
DS-112-P.6F 361 .....
DS-119-PXF1 361 .....
DS-120-PXF1 361 .....
DS-121-PXF2 361 .....
DS-126-P.CF 361 .....
DS-135-PXF1 361 .....
DS-136-PXF2 361 .....
DS-140-PXF1 361 .....
DS-155-P.6F 361 .....
DS-182-P.6F 361 .....
DS-184-P.6F 361 .....
DS-198-P.6F 361 .....
DS-203-P.7F 361 .....

```

Gambar 5.3 Multiple Alignment sequence asam amino dengan program Clone Manager 9

Berdasarkan hasil *multiple alignment* yang telah dilakukan, pada 44 sampel hasil *sequencing* didapatkan mutasi pada regio X VHB yang terutama berupa substitusi asam amino. Sebanyak 15/44 sampel (34,1%) mengalami mutasi gen X VHB dengan 10 jenis mutasi substitusi yang pernah dipublikasikan dalam beberapa penelitian sebelumnya (Fan et al., 2011; Fatimawali and Kepel, 2014; Kim et al., 2016; Lin et al., 2005). Pada penelitian ini didapatkan juga 1 sampel yang mengalami mutasi dalam bentuk insersi 32 nukleotida dan delesi 20 nukleotida. Mutasi jenis ini menyebabkan pergeseran kerangka baca nukleotida dan menyebabkan protein X yang terpotong. Mutasi gen X pada penelitian ini didapatkan pada 3/21(14.28%) penderita Hepatitis Kronis, 7/12 (58.33%) penderita Sirosis Hati, dan 4/11 (36.36%) penderita KHS. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa mutasi gen X VHB lebih sering ditemukan pada stadium lanjut infeksi VHB, yaitu pada sirosis hati dan KHS (Lin et al., 2005; Salarnia et al., 2017). Jenis mutasi gen X VHB dan posisi asam amino pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.3 berikut.

Tabel 5.3 Profil mutasi regio X VHB pada penderita CLD dengan PCR DNA VHB berbasis gen X positif

No	Jenis mutasi	Jumlah sampel yang mengalami mutasi (n=44)	Daerah Fungsional yang Terkena
1	T36P	1 (2.3%)	Epitope limfosit B
2	P38S	1 (2.3%)	Epitope limfosit B
3	A44V/T	2 (4.55%)	Epitope limfosit B
4	P46S	2 (4.55%)	Epitope limfosit B
5	R87W/G	6 (13.64%)	Core promoter, EnhII
6	H94Y	1 (2.3%)	Box α , C/EBP, CCAAT/enhancing binding protein, Core promoter, EnhII
7	L123S/V	2 (4.55%)	BH3-like motif, core promoter, NRE
8	I127L/T/N/S	7 (15.9%)	BH3-like motif, core promoter, NRE
9	Insersi (32 nukleotida)	1 (2.3%)	Box α , C/EBP, CCAAT/enhancing binding protein, Core promoter, EnhII, BH3-like motif, epitope limfosit T
10	Delesi (20 nukleotida)	1 (2.3%)	epitope limfosit T, BH3-like motif, core promoter
11	K130M	11 (25%)	BH3-like motif, core promoter
12	V131I	11 (25%)	BH3-like motif, core promoter

Jenis mutasi yang dominan dalam penelitian ini adalah substitusi asam amino Lisin pada kodon 130 menjadi Metionin (K130M) serta substitusi asam amino Valin pada kodon 131

menjadi Isoleusin (V131I), yang ditemukan pada 11 dari 44 sampel penderita CLD (65,52%), dimana kedua jenis mutasi ini terjadi bersamaan pada sampel yang sama sebagai mutasi ganda.

Selain mutasi di lokasi yang pernah dipublikasikan di penelitian sebelumnya, pada penelitian ini juga ditemukan beberapa varian sekuens gen X VHB yang terletak di regio fungsional VHB. Beberapa varian ini belum pernah dilaporkan pada penelitian sebelumnya dan mungkin merupakan karakteristik sekuens VHB yang ada di Indonesia.

Tabel 5.4. Varian gen X VHB pada pasien CLD di penelitian ini

Nomor	Jenis mutasi	Jumlah sampel yang mengalami mutasi (n=44)	Daerah Fungsional yang Terkena
1	L37I	2 (4.55%)	B cell epitope
2	S43P	5 (11.36%)	B cell epitope
3	H86P/R	2 (4.55%)	Core promoter, EnhII
4	L98I	3 (6.82%)	Box a, C/EBP, CCAAT/enhancing binding protein, Core promoter, EnhII
5	T105A	2 (4.55%)	Core promoter, EnhII, BH3-like motif, T cell epitope

Hingga saat ini, pengaruh klinis mutasi gen X VHB masih belum sepenuhnya dimengerti. Mutasi gen X VHB pada beberapa daerah tertentu banyak dilaporkan berhubungan dengan patogenesis VHB baik di serum ataupun jaringan hepar pasien dengan infeksi VHB (Lee et al., 2011). Mutasi K130M (nt 1762) dan V131I (nt 1764) yang dominan dalam penelitian ini terletak pada *Basal Core Promoter* (BCP) yang *overlap* dengan gen X (Fan et al., 2011). Kedua mutasi ini seringkali ditemukan bersamaan sebagai mutasi ganda. Mutasi ganda ini banyak berkaitan dengan perkembangan infeksi VHB menjadi KHS. *Strain* HBV dengan mutasi ganda ini dikatakan memiliki keuntungan *survival* yang lebih tinggi dibandingkan mutasi tunggal. Hal ini ditunjukkan dengan replikasi VHB yang lebih tinggi pada VHB yang mengalami mutasi ganda. Replikasi VHB yang tinggi ini menyebabkan peningkatan inflamasi dan invasi virus (Kim et al., 2016, 2008). Mutasi ganda ini juga dapat menyebabkan supresi mRNA *precore* serta peningkatan ekspresi transkripsi pgRNA yang menyebabkan peningkatan replikasi virus, sehingga memicu terjadinya KHS (Wang et al., 2016; Wei et al., 2017). Mutasi pada K130M dibuktikan dapat menekan ekspresi regulator sel p21 dengan kuat sehingga menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol (Kwun and Jang, 2004).

Mutasi H94Y yang ditemukan pada 1 sampel dan I127L/T/N/S yang ditemukan pada 11

sampel penelitian ini juga berkaitan dengan K130M dan V131I pada beberapa penelitian sebelumnya. Mutasi H94Y dapat menyebabkan perubahan asam amino pada *box a* yang merupakan elemen aktivasi kuat dari *EnhII/core promoter*. Mutasi pada daerah ini dapat meningkatkan afinitas pengikatan *box a* dan *EnhII/core promoter* (Kim et al., 2016, 2008). Mutasi pada regio *EnhII* dapat menyebabkan perubahan konformasi yang membuat HBx mutant berinteraksi dengan *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF) dalam perkembangan infeksi VHB menjadi KHS (Fan et al., 2011).

Meskipun banyak studi termasuk juga meta analisis yang menunjukkan bahwa mutasi gen X VHB berhubungan dengan sirosis hati maupun KHS, hingga saat ini patogenesis beberapa mutasi gen X terhadap derajat keparahan infeksi VHB belum dapat dijelaskan sepenuhnya. Walaupun demikian, telah banyak penelitian yang menjelaskan mengenai pentingnya peranan berbagai mutasi tersebut, mengingat integrasi genom VHB merupakan hal yang telah lama diketahui sebagai faktor yang penting dalam perkembangan CLD (Liu et al., 2009; Wang et al., 2016; Wei et al., 2017).

Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi progresivitas infeksi VHB pada CLD, yaitu faktor *host*, faktor virus, dan faktor lain. Faktor *host* meliputi usia, jenis kelamin, dan kondisi imunologis penderita. Faktor virus meliputi genotype VHB, *viral load*, mutasi gen pre-S dan X. Faktor lain meliputi koinfeksi virus, aflatoksin, rokok, dan alcohol. Faktor virus dapat mempengaruhi satu sama lain sehingga dapat terbentuk pola mutasi yang berbeda antar genotype atau terjadinya mutasi ganda yang memiliki pengaruh berbeda terhadap kejadian CLD (Liaw and Sollano, 2006).

Penelitian mengenai mutasi gen X VHB di Indonesia sendiri masih sangat terbatas. Frekuensi mutasi ganda K130M/V131L pada penelitian ini ditemukan lebih tinggi dibandingkan penelitian yang ada sebelumnya. Artarini *et al* (2016) mendapatkan pola mutasi pada 44 sampel terinfeksi VHB sebagai berikut: V5L (2.3%), A47T (6.8%), I127T (4.5%), K130M/V131I (13.6%), dan 2 mutasi baru (G22S serta A85T). Namun demikian, status klinis penderita tidak dijabarkan lebih lanjut dalam penelitian tersebut sehingga tidak diketahui proporsi penderita dengan hepatitis kronis, sirosis hati, dan KHS (Artarini et al., 2016). Penelitian lain oleh Fatimawali & Kepel (2014) pada 10 sampel dengan infeksi VHB akut mendapatkan mutasi V45I/L, P46Q, R87G, N149T, V44A, L37I, T118N, dan A145T. Pada penelitian tersebut, tidak didapatkan mutasi ganda K130M/V131I. Selain jumlah sampel pada penelitian tersebut sedikit, jenis mutasi yang ditemukan pada penelitian tersebut tidak diketahui

memiliki hubungan dengan derajat keparahan infeksi VHB pada penelitian sebelumnya (Fatimawali and Kepel, 2014).

Sejauh ini, penelitian mengenai mutasi gen X VHB pada penderita CLD di Indonesia masih sangat terbatas dan belum diketahui penelitian mengenai hal tersebut di daerah lain sehingga masih memungkinkan bahwa distribusi genotipe VHB di Indonesia dapat menyebabkan keberagaman frekuensi dan jenis mutasi gen X VHB di daerah yang berbeda.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Terdeteksi 73,33% (44/60 sampel) DNA VHB PCR berbasis regio X VHB positif pada penderita CLD di Surabaya.
2. Didapatkan sebanyak 15/44 sampel (34,1%) mengalami mutasi regio X VHB pada penderita CLD di Surabaya.
3. Ditemukan 10 jenis mutasi gen X VHB yang terutama berupa substitusi asam amino dengan jenis mutasi yang dominan K130M dan V131L dimana kedua mutasi tersebut ditemukan bersamaan pada penderita CLD di Surabaya. Didapatkan pula 1 sampel dengan insersi 32 asam amino dan delesi 20 asam amino pada penelitian ini. Selain itu, didapatkan juga 5 jenis varian sekuens gen X VHB (L37I, S43P, H86P/R, L98I, dan T105A).

6.2 Saran

1. Penelitian tentang mutasi gen X VHB pada penderita CLD perlu dilakukan di berbagai daerah lain untuk melengkapi data mengenai mutasi VHB di Indonesia dan seluruh dunia.
2. Penelitian tentang mutasi gen X VHB dengan berbagai genotipe VHB pada penderita KHS perlu dilakukan untuk mengetahui kemungkinan hubungan antara keduanya.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., Abdel-hafiz, H., Suhail, M., Al-mars, A., Zakaria, M.K., Fatima, K., Ali, A., Suhail, M., Al-mars, A., Ahmad, S., 2014. Hepatitis B virus , HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20, 10238–10248. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10238>
- Andrisani, O.M., Barnabas, S., 1999. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int. J. Oncol.* 15, 373–379.
- Artarini, A., Jessica, H.G., Kartikasari, R.R., Riani, C., Retnoningrum, D.S., 2016. Detection of Hepatitis B Virus X Gene Mutation from Local Clinical Samples. *Microbiol. Indones.* 10, 9–14. <https://doi.org/10.5454/mi.10.1.2>
- Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D., 2003. Interleukin-10 Therapy — Review of a New Approach 55, 241–269. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.4.241>
- Ayub, A., Ashfaq, U.A., Haque, A., 2013. Review Article HBV Induced HCC : Major Risk Factors from Genetic to Molecular Level. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–14.
- Balmasova, I.P., Yushchuk, N.D., Mynbaev, O.A., Alla, N.R., Malova, E.S., Shi, Z., 2014. Immunopathogenesis of chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol.* 20, 14156–14171. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i39.14156>
- Baptista, M., Kramvis, A., Kew, M.C., 1999. High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology* 29, 946–953. <https://doi.org/10.1002/hep.510290336>
- Barbini, L., Tadey, L., Fernandez, S., Bouzas, B., Campos, R., 2012. Molecular characterization of hepatitis B virus X gene in chronic hepatitis B patients. *Virol. J.* 9, 1–7.
- Bharadwaj, M., Roy, G., Dutta, K., Misbah, M., Husain, M., Hussain, S., 2013. Tackling hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma - The future is now. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 229–268. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9412-6>
- Chan, C., Thurnherr, T., Wang, J., Gallart-Palau, X., Sze, S.K., Rozen, S., Lee, C.G., 2016. Global re-wiring of p53 transcription regulation by the hepatitis B virus X protein. *Mol. Oncol.* 10, 1183–1195. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.05.006>
- Chen, G.G., Li, M.Y., Ho, R.L.K., Chak, E.C.W., Lau, W.Y., Lai, P.B.S., 2005. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular

carcinoma. *J. Clin. Virol.* 34, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.01.006>

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2016. Sebagian Besar Kematian Akibat Hepatitis Virus Berhubungan dengan Hepatitis B dan C Kronis [WWW Document]. URL <http://www.depkes.go.id/article/view/16042700001/sebagian-besar-kematian-akibat-hepatitis-virus-berhubungan-dengan-hepatitis-b-dan-c-kronis.html>

Driessler, F., Venstrom, K., Sabat, R., Asadullah, K., Schottelius, A.J., 2004. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 135, 64–73. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2004.02342.x>

El-Serag, H.B., 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.061>

Fan, W., Shi, B., Wei, H., 2011. Comparison of hepatitis B X gene mutation between patients with hepatocellular carcinoma and patients with chronic hepatitis B. *Virus Genes* 42, 162–170. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0557-5>

Fatimawali, Kepel, B., 2014. Analisis Mutasi Gen Protein X Virus HBV pada Penderita Hepatitis B Akut di Manado. *J. LPPM Bid. Sains dan Teknol.* 1, 47–55.

Geng, M., Xin, X., Bi, L., Zhou, L., Liu, X., 2015. 2015 Advances in Hepatitis B virus Molecular mechanism of hepatitis B virus X protein function in hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 21, 10732–10738. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i38.10732>

Gonzalez, C., Taberero, D., Cortese, M.F., Gregori, J., 2018. Detection of hyper-conserved regions in hepatitis B virus X gene potentially useful for gene therapy. *World J. Gastroenterol.* 24, 2095–2107.

Ha, H.L., Shin, H.J., Feitelson, M.A., Yu, D.Y., 2010. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i48.6035>

Heidelbaugh, J.J., Bruderly, M., 2006. Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. *Am. Fam. Physician* 74, 756–62.

Huang, Y.-T., Jen, C.-L., Yang, H.-I., Lee, M.-H., Su, J., Lu, S.-N., Iloeje, U.H., Chen, C.-J., 2011. Lifetime Risk and Sex Difference of Hepatocellular Carcinoma Among Patients With Chronic Hepatitis B and C. *J. Clin. Oncol.* 29, 3643–3650. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.2335>

Iavarone, M., Trabut, J.-B., Delpuech, O., Carnot, F., Colombo, M., Kremsdorf, D., Bréchet, C., Thiers, V., 2003. Characterisation of hepatitis B virus X protein mutants in tumour and non-tumour liver cells using laser capture microdissection. *J. Hepatol.* 39, 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00217-4)

İnan, N., Tabak, F., 2015. Hepatitis B Virus : Biology and Life Cycle. *Viral Hepat. J.* 21, 1–7.

<https://doi.org/10.4274/vhd.36036>

- Keum, W., Parkt, C., Lee, J., Khil, L., Kang, I., Kim, S., Jung, J., Oh, S., Wo, H., Lee, J., Kim, Y., Yoon, Y., Choi, J., Ha, J., 1997. Primers Determine the Sensitivity of PCR-mediated Hepatitis B Virus DNA Detection and Pretreatment of PCR Mixture with 8-Methoxypsoralen Eliminates False-positive Results. *Mol. Cells* 7, 244–250.
- Kgatle, M.M., Kalla, A.A., Spearman, C.W., Hairwadzi, H.N., 2017. The Role of HBx-mediated Transcriptional Activities and Epigenetic Alterations in Hepatitis B Virus-induced Hepatocellular Carcinoma. *J. Emerg. Dis. Virol.* 3, 1–10. <https://doi.org/10.16966/2473-1846.126>
- Kim, B.-J., 2014. Hepatitis B virus mutations related to liver disease progression of Korean patients. *World J. Gastroenterol.* 20, 460–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i2.460>
- Kim, H.-J., Park, J.-H., Jee, Y., Lee, S.-A., Kim, H., Song, B.-C., Yang, S., Lee, M., Yoon, J.-H., Kim, Y.J., Lee, H.-S., Hwang, E.-S., Kook, Y.-H., Kim, B.-J., 2008. Hepatitis B Virus X Mutations Occurring Naturally Associated With Clinical Severity of Liver Disease Among Korean Patients With Chronic Genotype C Infection. *J. Med. Virol.* 80, 1337–1343. <https://doi.org/10.1002/jmv>
- Kim, H., Lee, S., Kim, B., Kim, H., Lee, S., Kim, B., 2016. X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J. Gastroenterol.* 22, 5467–5478. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i24.5467>
- Koike, K., 2009. Hepatitis B virus X gene is implicated in liver carcinogenesis. *Cancer Lett.* 286, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.010>
- Kotsafti, A., Farinati, F., Cardin, R., Cillo, U., Nitti, D., Bortolami, M., 2012. Autophagy and apoptosis-related genes in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol.* 12, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-118>
- Kwun, H.J., Jang, K.L., 2004. Natural variants of hepatitis B virus X protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res.* 32, 2202–2213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh553>
- Lamontagne, R.J., Bagga, S., Bouchard, M.J., 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res.* 2, 163–86. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2016.05>
- Lara-Pezzi, E., Majano, P.L., Gomez-Gonzalo, M., Garcia-Monzon, C., Moreno-Otero, R., Levrero, M., Lopez-CABRERA, M., 1998. The Hepatitis B Virus X Protein Up-regulates Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Expression in Hepatocytes. *Hepatology* 28, 1013–1021.
- Lee, J., Han, K., Lee, J.M., Park, J.H., Kim, H., 2011. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X

- Gene Mutations on Hepatocellular Carcinoma Development in Chronic HBV Infection
 □. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 914–921. <https://doi.org/10.1128/CVI.00474-10>
- Liaw, Y., Chu, C., 2009. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 373, 582–592.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60207-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60207-5)
- Liaw, Y.F., Sollano, J.D., 2006. Factors influencing liver disease progression in chronic hepatitis B. *Liver Int.* 26, 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01372.x>
- Lin, J., Wu, J.F., Zhang, Q., Zhang, H.W., Cao, G.W., 2014. Virus-related liver cirrhosis: Molecular basis and therapeutic options. *World J. Gastroenterol.* 20, 6457–6469.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i21.6457>
- Lin, X., Xu, X., Huang, Q., Liu, Y., Zheng, D., Chen, W., Lin, J., 2005. Biological impacts of “hot-spot” mutations of hepatitis B virus X proteins are genotype B and C differentiated. *World J. Gastroenterol.* 11, 4703–4708.
- Liu, S., Zhang, H., Gu, C., Yin, J., He, Y., Xie, J., Cao, G., 2009. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 1066–82. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp180>
- Lou, X., Hou, Y., Liang, D., 2013. Effects of hepatitis B virus X protein on human T cell cytokines. *Can. J. Microbiol.* 59, 620–626.
- Lu, H.Z., Zhou, J.H., 2013. Hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor- α expression in cultured mesangial cells via ERKs and NF- κ B pathways. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 217–222. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60053-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60053-2)
- Lu, X., 2011. Pathogenesis of Hepatitis B Virus (HBV) -Mediated Liver Injury 4.
- Luedde, T., Schwabe, R.F., 2011. NF- κ B in the liver—linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat. Publ. Gr.* 8, 108–118.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.213>
- Lusida, M.I., Juniastuti, Yano, Y., 2016. Current hepatitis B virus infection situation in Indonesia and its genetic diversity. *World J. Gastroenterol.* 22, 7264–7274.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i32.7264>
- Mallat, A., Lotersztajn, S., 2013. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *AJP Cell Physiol.* 305, C789–C799.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00230.2013>
- Martins, G.R., Gelaleti, G.B., Moschetta, M.G., Maschio-Signorini, L.B., De Campos Zuccari, D.A.P., 2016. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF- κ B Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. *Mediators Inflamm.* 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/9512743>

- Nguyen, V.T.T., Razali, K., Amin, J., Law, M.G., Dore, G.J., 2008. Estimates and projections of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma in Australia among people born in Asia-Pacific countries. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 922–929. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05065.x>
- Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia, 2013. Artikel Umum: Sirosis Hati [WWW Document]. URL <http://pphi-online.org/alpha/?p=570> (accessed 1.22.18).
- Rawat, S., Clippinger, A.J., Bouchard, M.J., 2012. Modulation of apoptotic signaling by the Hepatitis B Virus X protein. *Viruses* 4, 2945–2972. <https://doi.org/10.3390/v4112945>
- Salarnia, F., Besharat, S., Zhand, S., Javid, N., Khodabakhshi, B., Moradi, A., 2017. Mutations in hepatitis-B X-gene region: Chronic hepatitis-B versus cirrhosis. *J. Clin. Diagnostic Res.* 11, OC31-OC34. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22570.9498>
- Shukla, R., Yue, J., Siouda, M., Gheit, T., Hantz, O., Merle, P., Zoulim, F., Krutovskikh, V., Tommasino, M., Sylla, B.S., 2011. Proinflammatory cytokine TNF- α increases the stability of hepatitis B virus X protein through NF- κ B signaling. *Carcinogenesis* 32, 978–985. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr057>
- Song, L.H., Duy, D.N., Binh, V.Q., Luty, A.J.F., Kremsner, P.G., Bock, C.T., 2005. Low frequency of mutations in the X gene, core promoter and precore region of hepatitis B virus infected Vietnamese. *J. Viral Hepat.* 12, 160–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00560.x>
- Su, I.-J., Wang, L.H.-C., Hsieh, W.-C., Wu, H.-C., Teng, C.-F., Tsai, H.-W., Huang, W., 2014. The emerging role of hepatitis B virus Pre-S2 deletion mutant proteins in HBV tumorigenesis. *J. Biomed. Sci.* 21, 98. <https://doi.org/10.1186/s12929-014-0098-7>
- Sugauchi, F., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Kato, H., Suzuki, S., Kimura, Y., Ueda, R., Butterworth, L.A., Cooksley, W.G.E., 2001. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines: Complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.* 82, 883–892. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-883>
- Suneetha, P.V., Sarin, S.K., Goyal, A., Kumar, G.T., Shukla, D.K., Hissar, S., 2006. Association between vitamin D receptor , CCR5 , TNF- α and TNF- β gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J. Hepatol.* 44, 856–863. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.01.028>
- Telenta, P.F., Poggio, G.P., López, J.L., Gonzalez, J., Lemberg, a, Campos, R.H., 1997. Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1873–5.

- Torbenson, M., Thomas, D.L., 2002. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2, 479–86.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00345-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00345-6)
- Tufan, L.S., Lian, Z., Liu, J., Pan, J., Arbuthnot, P., Kew, M., Clayton, M.M., Zhu, M., Feitelson, M.A., 2002. Hepatitis Bx antigen stimulates expression of a novel cellular gene, URG4, that promotes hepatocellular growth and survival. *Neoplasia* 4, 355–368.
<https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900241>
- Wang, Y., Zeng, L., Chen, W., 2016. HBV X gene point mutations are associated with the risk of hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 4, 1045–1051. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.847>
- Wei, F., Zheng, Q., Li, M., Wu, M., 2017. The association between hepatitis B mutants and hepatocellular carcinoma. *Med. (United States)* 96, 1–8.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006835>
- WHO, 2016. Hepatitis B Fact Sheet [WWW Document]. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (accessed 12.27.16).
- Wu, S., Kanda, T., Nakamoto, S., Jiang, X.I.A., Nakamura, M., 2016. Cooperative effects of hepatitis B virus and TNF may play important roles in the activation of metabolic pathways through the activation of NF- κ B. *Int. J. Mol. Med.* 38, 475–481.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2643>
- Yano, Y., Utsumi, T., Lusida, M.I., Hayashi, Y., 2015. Hepatitis B virus infection in Indonesia. *World J. Gastroenterol.* 21, 10714–10720. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i38.10714>
- Yi, Y.-S., Park, S.G., Byeon, S.M., Kwon, Y.-G., Jung, G., 2003. Hepatitis B virus X protein induces TNF- α expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, Hepatitis B virus X protein induces TNF- α expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, HepG2. *Biochim. Biophys. Acta* 1638, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(03\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(03)00090-5)
- Zeng, Z., 2014. Human genes involved in hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 7696–7706. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7696>

Gmail

Search mail

Compose

Inbox

Starred

Spoozed

Important

Sent

Trash

Citrawati

No recent chats
Start a new one



[AJID] Submission Acknowledgement

Prof. Cyprian O. Onyenli
to me
dr. M Si Citrawati Dyan Kencana Wungu

Thank you for submitting the manuscript "HEPATITIS B VIRUS X GENE MUTATION ON CHRONIC LIVER DISEASE PATIENTS IN SURABAYA, INDONESIA" to African Journal of Infectious Diseases (AJID). With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site.

Manuscript URL:
<http://journals.sfu.ca/ajicam/index.php/ajid/author/submission/5225>
Username: angelicoidied

Please submit the e-mail and names of 5 people who could review your paper and confirm your ability to meet publication costs if accepted after the review.

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.