

1. HEPATITIS B SUR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2. IMMUNOGENETICS.

Diterbitkan untuk ujian Tahap II
penelitian Disertasi

**PERBEDAAN IMUNOGENISITAS HEPATITIS B
SURFACE ANTIGEN (HBsAG)
DARI BERBAGAI SUBTIPE
STUDI SEROEPIDEMIOLOGIK DAN EKSPERIMENTAL**

kk
Drs k 44/02
Mul
P



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Oleh :

Mulyanto

Nim : 098910652D

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
1992**

PERBEDAAN IMUNOGENISITAS HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN
(HBsAg) DARI BERBAGAI SUBTIPE
STUDI SEROEPIDEMIOLOGIK DAN EKSPERIMENTAL

Disertasi

untuk memperoleh gelar Doktor
dalam Ilmu Kesehatan pada
Universitas Airlangga
dibawah pimpinan Rektor Universitas Airlangga
Profesor dr. H.R. Soedarso Djojonegoro
untuk dipertahankan dihadapan
Rapat Senat Terbuka Universitas Airlangga, pada
hari Sabtu
tanggal 25 Januari 1992
jam 10.00 WIB

Oleh

Mulyanto

lahir di Cilacap pada 20 Mei 1948

Dibawah bimbingan :

Promotor : Profesor Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi

Ko-promotor : Profesor dr. R. Soemarto

Pembantu promotor : Dr.dr. Soewignjo Soemohardjo

Diuji pada tanggal 18 Desember 1991

PANITIA PENGUJI DISERTASI :

Ketua : Profesor dr. Rachmat Santoso
Anggota : 1. Profesor dr. Sri Utari Purnomo
2. Profesor dr. Eddy Pranowo Soedibjo MPH
3. Profesor Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi
4. Profesor dr. R. Soemarto
5. Dr.dr. Soewignjo Soemohardjo

Ditetapkan dengan
Surat Keputusan Rektor
Universitas Airlangga
No. 10452/PT03.H/I/1991
Tanggal : 24 Desember 1991

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadapan Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan taufik dan hidayah-Nya kepada saya sekeluarga, sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan Doktor ini.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Prof. Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi, Guru Besar dalam Ilmu Patologi Klinik, Kepala Lab/UPF Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD dr. Soetomo dan promotor saya, yang telah memberikan dorongan dan semangat serta membimbing saya dalam menyelesaikan disertasi; yang dari sejak awal telah memberikan petunjuk-petunjuk dan dorongan kepada saya untuk segera mengikuti Pendidikan Doktor;

Prof. dr. R.Soemarto, Guru Besar dalam Ilmu Penyakit Dalam, selaku ko-promotor, yang telah membimbing saya dengan efisien dan memberikan saya rasa percaya diri;

Dr.dr. Soewignjo Soemohardjo, Kepala UPF Penyakit Dalam RSU Mataram dan Kepala Laboratorium Hepatitis Bumi Gora NTB, selaku pembantu promotor, yang telah membimbing saya mengenal lebih jauh Ilmu Penyakit Dalam/Penyakit Hati sejak lebih dari 15 tahun yang lalu, pembimbing yang sekaligus juga berperan sebagai mitra kerja memungkinkan timbulnya suasana bebas sehingga menumbuhkan kreativitas, pembimbing yang juga sebagai sponsor dana telah memberikan kepada saya kesempatan untuk lebih berkonsentrasi dalam menyelesaikan disertasi ini;

Prof. Makoto Mayumi MD, Kepala Divisi Imunologi Fakultas Kedokteran Jichi di Jichi, Jepang, yang telah membimbing dalam imunologi hepatitis B dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti kursus-kursus imunologi hepatitis B di Jepang;

Ucapan terima kasih saya sampaikan pula kepada :

Rektor Universitas Airlangga, Profesor dr. H.R. Soedarso Djojonegoro atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Pascasarjana Strata 3;

Rektor dan Senat Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mempertahankan disertasi saya ini di depan Rapat Senat Terbuka;

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soetarjadi Apt., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan ini sampai selesai;

Para Penguji Disertasi/Penilai Proposal yang telah memberikan masukan, saran, sanggahan dan koreksi sehingga disertasi ini dapat selesai pada waktunya; beliau adalah : Prof. Dr.dr. Marsetio Donosepoetro, Prof. dr. Rachmat Santoso, Prof. dr. Sri Utari Purnomo, Prof. dr. Eddy Pranowo Soedibjo MPH, Prof. Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi, Prof. dr. R. Soemarto, Dr.dr. Soewignjo Soemohardjo, Prof. Dr.dr. Thomas Kardjito, Dr. M. Zaenuddin, dr. Widodo JP, MPH, Dr. PH, dan dr. Widawati Soemarto;

Gubernur Kepala Daerah Tingkat I Propinsi Nusa Tenggara Barat, Bapak H. Warsito, selaku Ketua Umum Yayasan Hati Sehat Mataram atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menggunakan fasilitas Laboratorium Hepatitis Bumi Gora NTB dalam rangka penelitian disertasi ini;

Rektor Universitas Mataram, Ir. M. Qazuini MSc dan Dekan Fakultas Peternakan Universitas Mataram, Ir. Hasjim, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan doktor ini;

Direktur Laboratorium Hepatika Mataram, dr. D. Sumarsidi, atas bantuan dan fasilitas yang diberikan untuk penelitian disertasi ini, pengaturan managerial dan kesediaannya menggantikan tugas-tugas rutin saya telah sangat membantu selesainya disertasi ini;

dr. Stevanus Gunawan, staf Balai Laboratorium Kesehatan Mataram dan Laboratorium Hepatitis Bumi Gora NTB, atas kesediaannya memikul beban tugas rutin saya di laboratorium Hepatika dan atas diskusi yang hangat serta koreksinya dalam rangka menyusun disertasi ini;

Kepala DTD PMI DKI Jakarta, dr. Sukenthini dan mantan Kepala DTD PMI Surabaya, dr. Loekman Ichsan, atas bantuannya mengirim darah donor pengidap virus hepatitis B untuk penelitian disertasi ini;

Tetsuo Nakamura PhD, Presiden Institute of Immunology di Tokyo, Jepang, atas bantuan reagen Elisa dan fasilitas laboratorium untuk penelitian disertasi ini;

Fumio Tsuda PhD dan Dr. Tanaka dari Institute of Immunology, Tokyo, atas bimbingan dan bantuannya melakukan pemeriksaan silang dan pemeriksaan elektronmikroskopik dalam rangka penelitian disertasi ini;

Saudara Imam Basuki, Ir. Sulaiman Ngongu D, Dra. Nuryandari beserta staf Laboratorium Hepatika, atas bantuan teknis selama saya melakukan penelitian disertasi ini;

Ir. Yahya Mugiyono SU, Ir. Samiadi SU dan Ir. Sri Widhiharti SU, dari Puskom Unram dan Fakultas Peternakan Universitas Mataram, atas bantuannya dalam analisa data;

dr. Gomeus Effendy, dr. David Handoyo Mulyono dan dr. Herry Purbayu, atas bantuan teknik komputer dalam mengedit naskah disertasi serta suasana kondusif yang diberikan selama saya berada di Surabaya dalam rangka program pendidikan ini;

Drs. Redjani, Ketua Kelas, yang telah banyak membantu kelancaran urusan administratif dan penggandaan disertasi;

Bapak Abdoel Rasjid SH,LLM beserta keluarga, yang dengan penuh rasa kekeluargaan telah memberikan suasana belajar yang baik selama saya tinggal di rumah beliau;

Guru-guru saya yang telah memberikan bekal ilmu kepada saya, serta semua pihak yang telah memberikan bantuannya selama ini tetapi belum tertulis dalam ucapan terima kasih ini.

Pada Kesempatan ini saya juga menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu dan mendiang Ayah saya yang telah mengasuh dan membesarkan saya, memberikan dasar-dasar berpikir logis dan suasana demokratis sehingga tercipta lahan yang baik untuk berkembangnya kreativitas.

Akhirnya ucapan terima kasih saya sampaikan kepada istri saya Enny serta anak-anak kami Aang dan Joko, yang dengan penuh pengertian serta pengorbanannya telah memberikan kepada saya kesempatan untuk lebih berkonsentrasi menyelesaikan disertasi ini.

Semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang selalu melimpahkan kurnia dan rahmatNya kepada semua yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian disertasi saya.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
LAMPIRAN	xiii
I. PENDAHULUAN	
1. Latar Belakang	1
2. Masalah	4
3. Tujuan Penelitian	4
4. Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Virologi Virus Hepatitis B (VHB)	6
1. Hepatitis Core Antigen (HBcAg)	8
2. Hepatitis e Antigen (HBeAg)	9
3. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg)	10
4. Antigen Pre-S	16
B. Biologi Molekuler VHB	17
1. Struktur DNA Virion	18
2. Organisasi Genetik VHB	19
3. Heterogenitas Viral	26
4. DNA Virus Dalam Hepatosit	27
5. Replikasi DNA	29
C. Petanda Infeksi VHB	31
D. Epidemiologi Infeksi VHB	33
1. Prevalensi Subtipe HBsAg	35
2. Frekuensi HBeAg	37
E. Mekanisme Terjadinya Kerusakan Sel Hati	38

	Halaman
F. Perjalanan Penyakit	42
1. Subtipe HBsAg dan Perjalanan Penyakit	44
2. HBeAg dan Perjalanan Penyakit	45
3. Antigen Pre-S dan Subtipe HBsAg	46
4. Antigen Pre-S Pada Berbagai Pengidap HBsAg	46
G. Imunisasi	50
1. Sifat-sifat Antigen	50
2. Imunisasi Pada Binatang Percobaan	51
H. Vaksin Hepatitis B	54
I. Antibodi Terhadap HBsAg (anti-HBs)	57
1. Respon Anti-HBs Pada Vaksinasi Hepatitis B	58
2. Respon Anti-HBs Pada Percobaan Binatang	60
3. Heterogenitas Anti-HBs	61
J. Ultrasentrifugasi	63
K. Pemurnian HBsAg	66
III. MATERI DAN METODA	71
1. Tempat dan Waktu Penelitian	71
2. Materi Penelitian	71
3. Metoda Penelitian	72
IV. HASIL DAN BAHASAN	83
V. KESIMPULAN DAN SARAN	124
RINGKASAN	127
DAFTAR PUSTAKA	133
LAMPIRAN	158

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tinjauan Pustaka	
1. Petanda serologik infeksi VHB	32
2. Distribusi subtype utama HBsAg di Indonesia	36
Hasil dan Bahasan	
1. Umur donor darah menurut subtype HBsAg	83
2. Prevalensi relatif subtype HBsAg pada donor darah DTD PMI Jakarta dan Surabaya	84
3. Perbandingan kandungan antigen pre-S2 (titer S2/ titer S) pada donor darah pengidap HBsAg menurut subtype HBsAg	85
4. Frekuensi antigen pre-S2 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg	86
5. Frekuensi antigen pre-S2 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg titer tinggi	86
6. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg titer tinggi menurut subtype HBsAg	87
7. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg	88
8. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg titer tinggi	88
9. Frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg titer tinggi menurut subtype HBsAg	90
10A. Hasil pemurnian HBsAg subtype adw	104
10B. Hasil pemurnian HBsAg subtype adr	105
10C. Hasil pemurnian HBsAg subtype ayw	105
11. Perbandingan aktifitas spesifik HBsAg murni menurut subtype	108
12. Perbandingan kandungan antigen pre-S2 (titer S2/ titer S) HBsAg murni menurut subtype HBsAg	111
13. Perkiraan dosis vaksin yang dapat diperoleh dari DTD PMI DKI Jakarta dan Surabaya	114
14. Perbandingan sensitivitas sel PHA/adw, PHA/adr dan PHA/ayw untuk mendeteksi anti-HBs	116
15. Respon anti-HBs pada mencit Balb/c yang mendapat imunisasi HBsAg dari berbagai subtype, 10 hari setelah suntikan II	119

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Tinjauan Pustaka	
1. Virus Hepatitis B (partikel Dane)	7
2. Partikel HBsAg	11
3. Peta genome VHB	20
4. Regio S dan pre-S genome VHB	23
5. Model replikasi VHB	30
6. Immunopatogenesis kerusakan sel hati	41
7. Petanda infeksi VHB pada hepatitis akut	47
8. Petanda infeksi VHB pada hepatitis akut	48
9. Differential centrifugation	64
10. Density gradient centrifugation	65
Hasil dan Bahasan	
1. Frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw	89
2A. Pemeriksaan <i>optical density scanning</i> hasil pemurnian HBsAg sub tipe adw	106
2B. Pemeriksaan <i>optical density scanning</i> hasil pemurnian HBsAg sub tipe adr	107
2C. Pemeriksaan <i>optical density scanning</i> hasil pemurnian HBsAg sub tipe ayw	107
3. Pemeriksaan <i>SDS PAGE</i> hasil pemurnian HBsAg	109
4A. Pemeriksaan elektronmikroskopik HBsAg murni/adw	112
4B. Pemeriksaan elektronmikroskopik HBsAg murni/adr	112
4C. Pemeriksaan elektronmikroskopik HBsAg murni/ayw	113

LAMPIRAN

	Halaman
1. Cara Pemurnian HBsAg	158
2. Cara Pengawetan Eritrosit	161
3. Cara Pembuatan Sel PHA-antiHBs	162
4. Cara Pemurnian Anti-HBs Dengan Affinity Column Chromatography	163
5. Cara Pemeriksaan Sensitifitas Sel PHA-antiHBs	164
6. Cara Pemeriksaan Laboratorium	165
7. Kurikulum Vite	168



I. PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Infeksi virus hepatitis B (VHB) telah menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia termasuk di Indonesia. Selain menyebabkan penyakit hepatitis akut infeksi VHB juga dapat menyebabkan akibat ikutan penyakit hati kronik seperti hepatitis kronik, sirosis hati dan hepatoma. Di seluruh dunia terdapat lebih dari 300 juta pengidap VHB, dengan sekitar 250 ribu kasus baru hepatoma per tahun dan sekitar 40% dari penderita sirosis hati (akibat VHB) meninggal karena hepatoma (Anderson & Murray-Lyon, 1985; Purcell, 1985; WHO, 1988; Zuckerman and Harrison, 1987).

Didalam darah individu yang terinfeksi VHB terdapat tiga macam partikel virus yaitu virion utuh (partikel Dane), partikel HBsAg tubuler dan partikel HBsAg bulat dalam jumlah yang cukup banyak (Hoofnagle, 1981; Vyas and Blum, 1984). Partikel Dane merupakan partikel yang terdiri atas selubung luar yaitu *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) yang membungkus bagian dalam virus yang mengandung *hepatitis B core antigen* (HBcAg), *hepatitis B e antigen* (HBeAg), *partially double stranded DNA*, *DNA polymerase* dan suatu aktifitas protein kinase.

HBeAg merupakan komponen nukleokapsid virus yang bisa disekresikan kedalam sirkulasi darah (Vyas & Blum, 1984). Adanya HBeAg dalam serum menunjukkan bahwa virus dalam fase replikatif sehingga darah individu banyak mengandung virion dan sangat infeksius (Baraldini *et al.*, 1981; Miyakawa & Mayumi, 1985). HBsAg tersusun atas protein S (*major protein*), protein pre-S2 (*middle protein*) dan protein pre-S1 (*large protein*). Protein pre-S2 merupakan *imunodominant epitope*, sedang protein pre-S1 diduga mempunyai reseptor yang merupakan tempat untuk menempelnya VHB pada permukaan sel hati (Wong *et al.*, 1985; Neurath *et al.*, 1984, 1985, 1986, 1987a, 1988; Ou & Rutter, 1987).

Komposisi protein HBsAg dari ketiga partikel virus (partikel Dane, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat) dipengaruhi oleh aktifitas replikasi virus. Pada fase replikasi, HBsAg virion dan partikel HBsAg tubuler mengandung sekitar 15% *large protein*; sedangkan partikel HBsAg bulat hanya mengandung 1-2% *large protein*. Sebaliknya komposisi *middle protein* pada ketiga partikel tersebut sama yaitu sekitar 5-10% (Heerman *et al.*, 1984). Pada fase nonreplikatif, hanya terdapat sedikit sekali *middle protein* pada partikel HBsAg bulat dan praktis tidak terdapat *large protein* (Stibbe and Gerlich, 1982; Tiollais *et al.*, 1985). Ada tidaknya protein yang di kode oleh regio pre S genome VHB, membawa pengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg. HBsAg yang mengandung *middle protein* ternyata lebih imunogenik dibanding HBsAg yang tidak mengandung *middle protein* (Millich *et al.*, 1985a dan 1985b).

Pada protein S terdapat determinan antigenik yang menentukan sub tipe HBsAg. Diketahui ada determinan kelompok a dan determinan subtipik d/y dan w/r; sehingga terdapat empat sub tipe utama HBsAg (sub tipe VHB) yaitu adw, adr, ayw dan ayr (Le Bouvier, 1971; Bancroft *et al.*, 1972). Sub tipe adw, adr dan ayw tersebar luas di seluruh Indonesia, sedang sub tipe ayr sangat jarang ditemukan. Prevalensi sub tipe adw, adr dan ayw di P. Jawa masing-masing adalah sekitar 80%, 15% dan 5% (Sulaiman *et al.*, 1981; Gunawan dkk., 1985; Mulyanto, 1987; Mulyanto *et al.*, 1990).

VHB sebetulnya bukan virus yang sitopatik, terjadinya kerusakan sel hati pada infeksi VHB adalah akibat reaksi imunologis tubuh penderita terhadap sel-sel hati yang terinfeksi VHB. Manifestasi klinik yang terjadi sangat tergantung pada reaksi imunologik tersebut, terutama imunitas selular. Dengan demikian hepatitis yang terjadi tergantung pada interaksi yang kompleks antara agent yang menginfeksi dan respon imun host (Dienstag, 1984; Klingenstein & Dienstag, 1985). Sub tipe virus diduga dapat berpengaruh terhadap perjalanan penyakit (Dudley *et al.*, 1972); menurut Holland *et al.* (1972)

dan Gerety *et al.* (1975), sub tipe ad cenderung lebih banyak menyebabkan infeksi yang mengakibatkan antigenemia yang menetap dan hepatitis kronis dibanding sub tipe ay.

VHB mempunyai molekul DNA yang panjangnya bervariasi tergantung sub tipe virus, yaitu antara 3182-3221 pasangan basa. Perbedaan molekul DNA VHB antar sub tipe yang berbeda dapat mencapai 8-10%; sedang pada VHB dengan sub tipe yang sama hanya sebesar 1,5%-2% (Tiollais *et al.*, 1984 & 1988). Didalam genome VHB terdapat empat *open reading frame* (ORF) yaitu ORF S, C, P dan ORF X. ORF S, C dan ORF P masing-masing mengkode sintesa protein HBsAg, protein core dan DNA *polym-erase*, sedang ORF X berfungsi dalam proses transaktivasi translasi. ORF S dibagi menjadi gena S yang mengkode sintesa protein S dan regio pre-S (pre-S1 dan pre-S2) yang mengkode sintesa protein pre-S. ORF C terdiri atas gena C dan regio pre-C; gena C mengkode sintesa HBcAg, sedang regio pre-C bersama gena C berfungsi mengatur sintesa dan sekresi HBeAg. Produk dari masing-masing gena tersebut ternyata berbeda tergantung sub tipe virus dan perbedaan tersebut terutama terdapat pada regio pre-S. Menurut Neurath *et al.* (1986) perbedaan komposisi asam amino produk gena C, S dan regio pre-S dari sub tipe VHB yang berbeda masing-masing adalah sebesar 4%, 8% dan 23% (Neurath *et al.*, 1986).

Pada umumnya para ahli berpendapat bahwa sub tipe VHB tidak berpengaruh terhadap kuantitas berbagai komponen prote- in yang menyusun VHB, seperti HBeAg dan protein pre-S2. Laporan-laporan dari berbagai daerah di dunia belum memberi cukup bukti yang dapat menunjukkan bahwa sub tipe virus berpe- ngaruh terhadap frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg (Nath *et al.*, 1978; Maynard *et al.*, 1978; Courouce-Pauty & Plancon, 1978). Tentang apakah sub tipe VHB pengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2, sampai saat ini belum pernah dilaporkan baik di Indonesia maupun di negara lain. Mulyanto (1989) yang pertama kali melaporkan adanya hubungan antara sub tipe HBsAg dengan kandungan antigen pre-S2. Penelitian pendahuluan yang

dilakukan terhadap darah donor pengidap HBsAg di Jakarta dan Surabaya memberi petunjuk bahwa sub tipe VHB berpengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2 serum; serum pengidap HBsAg sub tipe adr mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding pengidap HBsAg sub tipe adw.

Dari laporan-laporan tersebut dapat disimpulkan adanya petunjuk bahwa ekspresi genome VHB (yaitu protein pre-S2 dan HBeAg) dapat dipengaruhi oleh sub tipe HBsAg. Oleh karena itu, diduga perbedaan sub tipe HBsAg akan membawa perbedaan kandungan antigen pre-S2 sehingga akan menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBeAg dan perbedaan sub tipe HBsAg akan membawa perbedaan frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg.

2. Masalah

- a). Apakah terdapat perbedaan kandungan protein pre-S2 dan frekuensi HBeAg pada serum pengidap HBsAg dari berbagai sub tipe?
- b). Apakah sub tipe HBsAg dapat menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBeAg murni.

3. Tujuan Penelitian

- a). mempelajari perbedaan kandungan antigen pre-S2 pada serum pengidap HBsAg dari berbagai sub tipe, sehingga dapat diketahui perbedaan imunogenisitasnya.
- b). mempelajari perbedaan frekuensi HBeAg pada serum pengidap HBsAg dari berbagai sub tipe.
- c). mempelajari apakah perbedaan sub tipe HBsAg dapat menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBeAg murni.
- d). mempelajari apakah perbedaan imunogenisitas HBeAg murni antar sub tipe tersebut disebabkan oleh perbedaan kandungan antigen pre-S2.

4. Hipotesis

1. Kandungan antigen pre-S2 pada serum pengidap HBsAg subtipe adr lebih tinggi dibanding pengidap subtipe adw dan ayw.
2. Terdapat perbedaan frekuensi HBeAg pada serum pengidap HBsAg dari berbagai subtipe HBsAg (adw, adr dan ayw).
3. HBsAg murni subtipe adr lebih imunogenik dibanding HBsAg murni subtipe adw dan ayw.

5. Kegunaan Penelitian

a). Kegunaan teoritik :

Dapat memberi sumbangan dalam pengembangan teori biologi molekuler tentang peranan subtipe HBsAg terhadap kandungan protein pre-S2. Terdapat kemungkinan bahwa perbedaan kandungan protein pre-S2 tersebut disebabkan oleh karena perbedaan rangkaian (akibat perbedaan subtipe) dalam regio yang bertanggung jawab untuk memacu transkripsi gena pre-S2.

b). Aplikasi klinik :

Dapat mendasari penelitian untuk mengetahui seberapa besar pengaruh subtipe terhadap gejala dan prognosa penyakit.

c). Aplikasi laboratorik :

Pemanfaatan subtipe untuk mendapatkan HBsAg murni dengan imunogenisitas tinggi dalam rangka produksi vaksin dan reagen diagnostik.

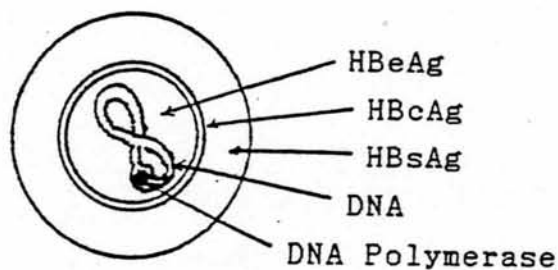
II. TINJAUAN PUSTAKA

Virus hepatitis B bukan merupakan virus yang sitopatik. Kerusakan sel yang terjadi pada hepatitis B adalah akibat respon imunologik tubuh host terhadap antigen virus yang menempel pada permukaan membran sel hati. Virus hepatitis B mempunyai 3 determinan antigenik utama yaitu HBsAg, HBcAg dan HBeAg. Pada HBsAg terdapat antigen pre-S yang merupakan *immunodominant epitope* dan subdeterminan antigenik yang menentukan sub tipe virus. Perbedaan sub tipe membawa perbedaan genome virus; perbedaan tersebut cukup besar, bisa mencapai 10% dari seluruh rangkaian genome virus. Pemurnian HBsAg dilakukan untuk memperoleh HBsAg murni, baik untuk kepentingan produksi reagen diagnostik maupun produksi vaksin. Vaksin hepatitis B yang sekarang beredar telah terbukti aman dan imunogenik. Namun demikian ada sebagian individu yang tidak memberi respon anti-HBs setelah vaksinasi hepatitis B. Penambahan peptida pre-S diketahui dapat meningkatkan imunogenisitas vaksin hepatitis B.

A. Virologi Virus Hepatitis B

Virus hepadna merupakan virus yang hepatotropik, termasuk dalam famili virus ini adalah Virus hepatitis B (VHB), wood-chuck hepatitis virus (WHV), beechey ground squirrel hepatitis virus (GSVH), Pekin duck hepatitis virus dan tree squirrel hepatitis virus atau THBV (Feitelson *et al.*, 1986 cit. Tiollais *et al.*, 1988).

Pengetahuan mengenai VHB berkembang dengan pesat sejak Blumberg *et al.* (1965), melaporkan temuannya tentang antigen Australia (HBsAg). Dilaporkan bahwa antibodi yang terdapat dalam dua serum penderita hemophilia yang sering mendapat transfusi darah ternyata bereaksi dengan salah satu panel serum yang berasal dari suku Aborigin Australia; karena itu antigen tersebut dinamakan antigen Australia. Disusul pada tahun 1970, Dane, Cameron dan Briggs menemukan partikel VHB berdiameter 42 nm -disamping partikel HBsAg 22 nm- didalam serum dari penderita dengan antigen Australia positif. Partikel tersebut sekarang dikenal sebagai partikel Dane, yang merupakan virus utuh. Tahun 1970 Almeida *et al.*, menggunakan detergen untuk memisahkan antigen core dari selubung HBsAg; berikutnya Magnius dan Espmark menemukan HBeAg pada tahun 1972, sehingga lengkaplah temuan seluruh determinan antigenik utama VHB.



Gambar 1. Virus hepatitis B (partikel Dane)

(Sumber : Miyakawa and Mayumi, 1985)

Virus hepatitis B (VHB) adalah virus yang *species specific*, hanya menginfeksi manusia dan beberapa primata lain; sampai sekarang belum bisa dibiakkan dalam kultur jaringan (WHO, 1977; Metselaar & Simpson, 1982; Vyas & Blum, 1984). Virus hepatitis B (partikel Dane) merupakan partikel yang terdiri atas selubung luar yaitu *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) yang membungkus bagian dalam virus yang mengandung *hepatitis B core antigen* (HBcAg), *hepatitis B e antigen* (HBeAg), *partially double stranded DNA*, *DNA polymerase* dan suatu aktivitas protein kinase.

Menurut Jawetz *et al.* (1976), virus hepatitis B stabil pada suhu -20 derajat C sampai 20 tahun atau lebih dan tahan terhadap pembekuan serta pencairan berulang kali. Stabil pada suhu 37 derajat C selama 60 menit dan tahan terhadap iradiasi ultraviolet. Pada suhu 100 derajat C selama 10 menit, 60 derajat C selama beberapa jam dan pada pH 2,4 selama 6 jam infektifitasnya hilang, tetapi antigenisitasnya tetap. Sodium hipoklorid 0,5% menyebabkan hilangnya antigenisitas HBsAg dan infektifitas virion dalam waktu 3 menit, tetapi dalam serum yang tidak diencerkan dibutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi lagi (5%).

1. Hepatitis B Core Antigen (HBcAg).

HBcAg adalah komponen nukleokapsid VHB; terdapat dalam sel hati dan didalam partikel Dane. Dengan pemeriksaan mikroskop elektron, HBcAg tampak sebagai partikel dengan diameter 27 nm terletak didalam nukleus sel hati; sedang HBsAg terdapat didalam retikulum endoplasmik sitoplasma. Tidak

terdapat HBcAg bebas dalam sirkulasi darah; antigen ini dapat dideteksi hanya setelah selubung virus dipecah (Sherlock, 1987). Pada penderita hepatitis akut, antibodi terhadap HBcAg (anti-HBc) muncul dalam darah 3-5 minggu setelah munculnya HBsAg, sebelum munculnya gejala klinik. IgM anti-HBc muncul lebih dahulu dan bertahan dalam konsentrasi tinggi selama 6 bulan atau lebih; sedang IgG anti-HBc muncul segera setelah IgM anti-HBc dan bertahan selama hidup. Pada individu yang sembuh dari infeksi, HBsAg akan hilang disusul dengan munculnya anti-HBs. Bila infeksi menetap, terjadilah pengidap kronik yang ditandai dengan tetap adanya HBsAg dan anti-HBc (CDC Atlanta, 1989).

2. Hepatitis B e Antigen (HBeAg).

HBeAg merupakan komponen nukleokapsid seperti halnya HBcAg tetapi mempunyai determinan antigenik yang berbeda; selain itu HBeAg berbeda dengan HBcAg karena HBeAg dapat disekresi kedalam darah (Vyas & Blum, 1984). Eratnya hubungan antara HBeAg dalam serum dengan adanya partikel Dane dan dengan petanda imunologik dan biokemik VHB (HBcAg dan DNA VHB), menyokong pendapat bahwa HBeAg menunjukkan VHB yang sangat infeksius dan secara tidak langsung menunjukkan infektifitas sera (Baraldini *et al.*, 1981; Miyakawa & Mayumi, 1985). Sera HBsAg positif dengan HBeAg positif 1000.000 kali lebih infeksius dari pada sera HBsAg positif dengan anti-HBe positif (Miyakawa & Mayumi, 1985).

HBeAg merupakan parameter dari replikasi virus, karena itu prevalensinya dipengaruhi oleh konsentrasi HBsAg. Pada konsentrasi HBsAg tinggi (2 mg/cc atau lebih) didapatkan prevalensi HBeAg sebesar 80%; sedang pada konsentrasi HBsAg antara 0,05 mg/cc - 1,5 mg/cc, lebih sering didapatkan anti-HBe (Vranckx *et al.*, 1980). Menurut Miyakawa & Mayumi (1985) status HBeAg pada pengidap kronik VHB dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk status imunologik, etnik, sosioekonomik/gizi, jenis kelamin dan umur host.

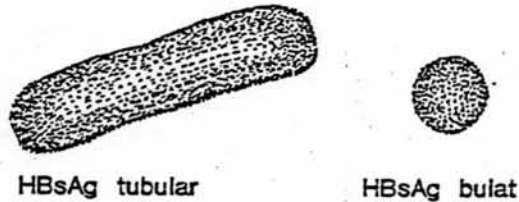
3. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg)

Didalam darah individu yang terinfeksi Virus Hepatitis B, HBsAg terdapat dalam 3 bentuk yaitu HBsAg sebagai selubung partikel Dane, partikel HBsAg bulat dengan diameter 22 nm dan partikel HBsAg tubular dengan diameter 22 nm dan panjang antara 50-200 nm (Gambar 2). Konsentrasi HBsAg dalam darah 1000-1000.000 kali konsentrasi partikel Dane, bisa mencapai 10 pangkat 13 partikel tiap cc serum; ekuivalen dengan 500 mcg protein HBsAg/cc (Hoofnagle, 1981; Metzelaar & Simpson, 1982; Robinson, 1985). HBsAg merupakan komponen antigenik VHB, tetapi tidak infeksius; tersusun atas karbohidrat, lipid dan protein (Vyas & Blum, 1984, Robinson, 1985). Buoyant density dalam CsCl untuk partikel Dane, HBsAg bentuk bulat dan HBsAg tubular masing-masing adalah 1,28 g/ml, 1,20 g/ml dan antara 1,20-1,28 g/ml (Millman *et al.*, 1970; Dreesman *et al.*, 1972; Vyas *et al.*, 1972; WHO, 1977; dan Robinson, 1985). Koefisien sedimentasinya adalah antara 33-54S untuk HBsAg bulat dan 145 S untuk partikel Dane (Gerin *et al.*, 1971; CDC Atlanta, 1977; WHO, 1977; Miyamoto, komunikasi pribadi).

PARTIKEL DANE :



PARTIKEL HBsAg :



HBsAg tubular

HBsAg bulat

Gambar 2. Partikel HBsAg

3a. Struktur dan Komposisi HBsAg

HBsAg terdiri atas protein (70,0%), karbohidrat (7,5%) dan lipid (22,5%); merupakan suatu glikoprotein yang terikat pada 2 lapisan lemak (Vyas & Blum, 1984; Tiollais *et al.*, 1984). Polipeptida HBsAg mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan sel-sel lipid dan membentuk partikel lipoprotein (Patzner *et al.*, 1984). Hubungan antara polipeptida HBsAg dengan lipid terdapat pada segmen hidrofobik polipeptida, yaitu pada 2 segmen hidrofobik pertama dari 3 segmen hidrofobik yang terdapat pada polipeptida protein S (Tiollais, 1984). Polipeptida HBsAg terutama terdiri atas prolin (10%) yang tersebar diseluruh bagian polipeptida, sistein (6%) di bagian tengah polipeptida, triptofan (6-14%), tirosin (3%), serin (10%) dan treonin (8%) yang pada umumnya merupakan tempat

menempelnya molekul gula pada peptida (WHO, 1977; Robinson, 1985). Banyaknya asam amino aromatik yang menyusun HBsAg menyebabkan absorben (pada 280 nm, larutan 1%) yang cukup tinggi yaitu 37,26 (Vyas *et al.*, 1972). Hal ini mempermudah pengukuran protein HBsAg secara spektrofotometrik; larutan dengan absorben (pada 280 nm) = 3,726 mengandung 1 mg HBsAg.

HBsAg tersusun atas 3 macam protein; masing-masing protein menginduksi antibodi spesifik, karena itu dikenal tiga epitope pada HBsAg yaitu antigen S, antigen pre-S2 dan antigen pre-S1 yang masing-masing terdapat pada *major protein*, *middle protein* dan *large protein* (Neurath *et al.*, 1986).

Major protein merupakan rangkaian 226 asam amino dan didapatkan dalam 2 bentuk yaitu bentuk glikoprotein dengan berat molekul (BM) 27 KD (GP27) dan bentuk nonglikosilat dengan BM 24 KD (P24). Kedua bentuk *major protein* tersebut identik susunan asam aminonya, tetapi pada bentuk pertama ada tambahan molekul karbohidrat (glikan). Pada polipeptida ini terdapat 3 segmen hidrofobik dan 2 segmen hidrofilik (Machida *et al.*, 1983; Tiollais *et al.*, 1984). *Major protein* merupakan protein tertier dan bentuknya ditentukan oleh jembatan disulfida antar sistein. Reaktifitas *major protein* sangat dipengaruhi oleh jembatan disulfida tersebut (Heerman *et al.*, 1984).

Middle protein (pre-S2) merupakan rangkaian 281 asam amino dan terdapat dalam 2 bentuk, yaitu glikoprotein dengan 2 kompleks glikan BM 36 KD atau disebut GP36 dan glikoprotein dengan 1 kompleks glikan BM 33 KD atau disebut GP33. *Large*

protein (pre-S1) merupakan rangkaian 389-400 asam amino, terdiri atas 2 bentuk yaitu bentuk glikoprotein dengan BM 42 KD atau disebut GP42 dan bentuk nonglikosilat dengan BM 39 KD atau disebut P39 (Heerman *et al.*, 1984; Tiollais *et al.*, 1985).

HBsAg selubung VHB mengandung 300-400 *major protein* dan 40-80 (*middle + large protein*). Komposisi protein HBsAg bentuk tubuler identik dengan protein HBsAg selubung VHB, sedang komposisi protein partikel HBsAg bulat tergantung pada ada atau tidaknya replikasi virus. Pada pengidap kronik dengan replikasi virus, partikel HBsAg bulat mengandung protein S dan protein pre-S2 dengan ratio yang sama dengan HBsAg selubung VHB tetapi dengan jumlah protein pre-S1 hanya 5% HBsAg selubung. Pada keadaan tanpa replikasi virus, kandungan protein HBsAg bentuk bulat sebagian besar protein S, protein pre-S2 hanya 1% dan tanpa protein pre-S1 (Tiollais, 1985; Takahashi, 1986). HBsAg bentuk bulat tersusun atas 60-100 molekul protein, merupakan sekitar 25% dari luas HBsAg selubung VHB (Heerman *et al.*, 1984).

3b. Sifat-sifat HBsAg

Menurut WHO Expert Committee on Viral Hepatitis (1977) dan CDC Atlanta (1977) HBsAg stabil terhadap pelarut-pelarut organik dan reagen-reagen disosiasi, stabil terhadap suasana asam untuk beberapa jam. Aktivitas antigeniknya stabil terhadap senyawa-senyawa yang biasanya menyebabkan denaturasi seperti diethylaether, chloroform, urea, sodium dodecyl sul-

phate dan beberapa enzim proteolitik. Tetapi pemberian ethanol dan buthanol menyebabkan hilangnya aktivitas antigeniknya. Reaktivitas HBsAg stabil terhadap panas; pemanasan 60 derajat C selama beberapa jam tidak mempengaruhi reaktivitas antigeniknya, tetapi pemanasan 100 derajat C selama 5 menit menghilangkan seluruh afinitasnya terhadap antibodi. Aktivitas antigeniknya hilang seluruhnya dengan pemanasan 85 derajat C selama 60 menit. Determinan grup spesifik a stabil pada 60 derajat C selama 21 jam; sedang subdeterminan d/y reaktivitasnya akan sangat berkurang dengan pemanasan 60 derajat C selama 3 jam.

Stabilnya HBsAg terhadap panas dan tahannya terhadap digesti protease memberi petunjuk adanya komponen karbohidrat dalam HBsAg, sedang adanya presipitasi HBsAg oleh concanavalin A dan reaksi anthrone positif menunjukkan adanya karbohidrat, lipid dan protein. Diduga karbohidrat memegang peranan penting dalam mempertahankan aktivitas serologik HBsAg. Aktivitas HBsAg murni turun 90% dengan pemberian sodium periodate selama 4 jam pada 37 derajat C (WHO Expert Committee on Viral Hepatitis, 1977; CDC Atlanta, 1977). HBsAg dalam vaksin (yang menggunakan adjuvant alumunium hidroksida) stabil sampai 19 bulan bila disimpan pada 4 suhu derajat C. Selama waktu tersebut antigenisitasnya menurun 50% bila disimpan pada suhu 20 derajat C dan menurun 75% bila disimpan pada suhu 37 derajat C (Prince *et al.*, 1984).

3c. Subtipe HBsAg.

HBsAg mempunyai paling sedikit 5 *antigenic determinant* yaitu *group specific determinant a* yang terdapat pada semua HBsAg dan 2 pasang *subtype specific determinant* yaitu d,y dan w,r (Le Bouvier, 1971; Bancroft, 1972). Dengan demikian terdapat 4 subtipe utama HBsAg yaitu adw, ayw, adr dan ayr. Dengan diketemukannya beberapa *subtype subdeterminant* maka subtipe HBsAg pun bertambah yaitu: adw2, adw4; adr-q+, adr-q-; ayr; ayw1, ayw2, ayw3, ayw4; adyw, adyr, adwr, aywr (Tiollais *et al.*, 1984). Subtipe HBsAg adalah *virus-specific* dan di "turunkan" bila VHB ditularkan kepada individu yang rentan (Le Bouvier *et al.*, 1972; Shorey, 1976; Holland, 1985). Di dunia terdapat variasi geografik dari prevalensi berbagai subtipe HBsAg dan variasi ini lebih banyak berhubungan dengan daerah tempat asal individu dari pada daerah tempat tinggal individu, sehingga dapat membantu menelusuri migrasi penduduk pengidap VHB dimasa lampau (Mazzur *et al.*, 1974; Courouce-Pauty *et al.*, 1983). Subtipe adw, ayw dan adr terdapat luas di berbagai bagian dunia; sedang subtipe ayr sangat jarang didapatkan. Dilaporkan subtipe ayr sering didapatkan di daerah Oceania dan di Jepang (WHO, 1977; Courouce-Pauty *et al.*, 1983; Nishioka, 1984; Tachibana *et al.*, 1989). Selain aspek epidemiologik, subtipe juga berpengaruh terhadap perjalanan penyakit; subtipe ad cenderung lebih banyak menyebabkan infeksi yang mengakibatkan antigenemia yang menetap dan hepatitis kronik dibanding subtipe ay (Holland *et al.*, 1972; Gerety *et al.*, 1975).

4. Antigen Pre-s :

Rangkaian asam amino yang dianalisa dari berbagai sub-tipe HBsAg, menunjukkan bahwa protein pre-S mempunyai sifat-sifat yang berbeda dengan protein S. (Neurath *et al.*, 1986) yaitu (a) mempunyai sifat hidrofilik tinggi dan prosentase tinggi residu bermuatan listrik; (b) tidak mengandung residu sistein dan karena itu antigenisitas dan imunogenisitasnya tidak tergantung pada ikatan disulfida; (c) diantara semua protein VHB, merupakan polipeptida yang susunan asam aminonya paling tergantung pada sub-tipe HBsAg; (d) mempunyai sedikit persamaan dengan analog rangkaian DNA dari Hepadna viridae non manusia. Sifat-sifat ini memberi petunjuk bahwa protein pre-S merupakan bagian terluar virion, merupakan sasaran bagi respon imun host dan bertanggung jawab untuk spesifitas virus yang hanya menginfeksi manusia dan beberapa primata lain. Pre-S1 diduga berperan dalam mengatur keseimbangan sintesa partikel HBsAg bulat, HBsAg tubuler dan HBsAg selubung virion; sedang protein pre-S2 merupakan epitope yang imunodominan, meningkatkan imunogenisitas HBsAg. Selain itu protein pre-S1 diduga mempunyai reseptor yang merupakan tempat menempelnya VHB pada permukaan sel hati (Wong *et al.*, 1985; Neurath *et al.*, 1984, 1985, 1986, 1987; Ou & Rutter, 1987).

Berbeda dengan antigen S, antigen pre-S mudah rusak oleh perlakuan yang agresif seperti pemanasan dan digesti oleh enzim protease (Neurath *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1986). Proses inaktivasi selama pembuatan vaksin (yang berasal dari plasma) dapat mempengaruhi stabilitas antigen pre-S. Perlakuan dengan pepsin dapat mempercepat rusaknya antigen

pre-S; sebaliknya perlakuan dengan formaldehida akan menambah stabilnya antigen pre-S. Perlakuan dengan formaldehida selama tiga hari pada suhu 37 derajat C menunjukkan bahwa antigen pre-S2 stabil pada konsentrasi formaldehida 1:1.000 sampai 1:8.000. Sebaliknya antigen pre-S2 (GP33 dan GP36) cepat menghilang dalam larutan tanpa formaldehida. Pada konsentrasi formaldehida lebih dari 1:1.000 mulai terjadi polimerisasi protein menjadi molekul yang lebih besar. Aktifitas antigen pre-S2 dipertahankan lebih lama bila partikel disimpan dalam suhu 4 derajat C; hal ini memberi petunjuk bahwa hilangnya aktifitas pre-S2 pada suhu 37 derajat C mungkin disebabkan oleh adanya kontaminan protease serum yang masih tetap terikat setelah proses pemurnian HBsAg (Chen & Howard, 1988).

B. Biologi Molekuler VHB

Menjelang akhir tahun 1970, kemajuan dibidang biologi molekuler telah dimanfaatkan secara efektif untuk dapat memahami berbagai antigen serta mekanisme replikasi VHB. Antara lain telah dapat dibuat berbagai antibodi monoklonal dari protein sintetik yang dibuat berdasar pengetahuan tentang susunan asam amino protein VHB. Keberhasilan pembuatan vaksin hepatitis B yang berasal dari rekayasa genetik -yang sekarang telah beredar di pasaran- juga tidak terlepas dari kemajuan di bidang biologi molekuler VHB. Selain itu, pengetahuan tentang cara replikasi VHB akan dapat melengkapi informasi yang diperlukan yang dapat dipakai sebagai dasar dalam strategi pengobatan anti-viral (Summers, 1988).

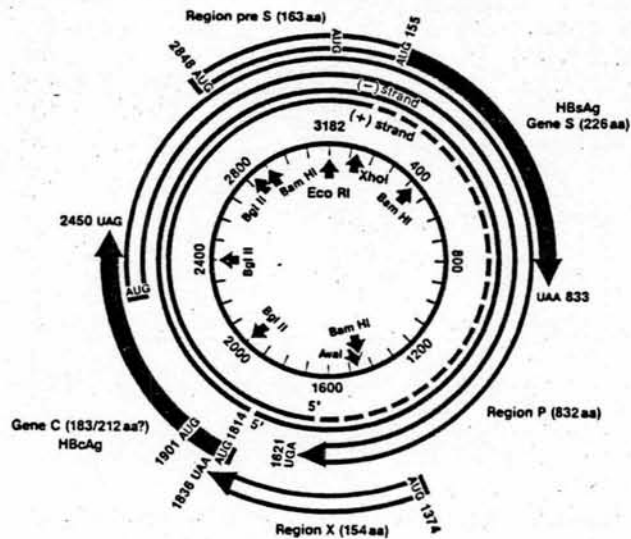
1. Struktur DNA Virion

Adanya DNA dalam partikel Dane pertama kali diumumkan oleh Robinson dkk. pada tahun 1974. Genome VHB mempunyai struktur yang khas dan tidak biasa; yaitu merupakan DNA yang sirkuler dan sebagian dalam keadaan berpasangan (partially double stranded DNA). Untaian yang panjang atau L disebut (-) *strand* dengan panjang tetap, sekitar 3.200 nukleotida. Untaian yang pendek disebut (+) *strand* mempunyai panjang yang bervariasi, sekitar 50%-75% panjang (-) *strand* (Tiollais *et al.*, 1984; Robinson, 1985). Posisi akhiran 5' dari (-) dan (+) *strand* serta akhiran 3' dari (-) *strand* adalah tetap, sedang posisi akhiran 3' dari (+) *strand* bervariasi. Struktur sirkuler genome dipertahankan oleh berpasangannya basa dari akhiran 5' kedua strand sepanjang kurang lebih 200 nukleotida.

Sampai sekarang telah dipublikasi 13 genome VHB lengkap; empat sub tipe adr, tiga sub tipe ayw, lima sub tipe adw dan satu sub tipe ayr (Okamoto *et al.*, 1988). Dari 13 genome tersebut diketahui panjangnya bervariasi antara 3182-3221 nukleotida. Variasi panjangnya polinukleotida ini terjadi karena ada nukleotida yang hilang ataupun yang bertambah. Analisa dari 13 genome tersebut menunjukkan adanya suatu tingkat perbedaan, yang ditandai oleh adanya mutasi titik. Perbedaan tersebut mencapai sekitar 10% untuk virus yang berbeda sub tipe, sedang untuk virus dari sub tipe sama variasinya hanya sekitar 2%; kecuali untuk sub tipe ayr yang hanya berbeda kurang lebih 2% dengan sub tipe adr (Tiollais *et al.*, 1984 dan 1988). Menurut Tiollais *et al.* (1984), jumlah nukleotida pada sub tipe ayw berkisar antara 3182-3188, sub tipe adw antara 3200-3221 dan sub tipe adr berkisar antara 3188-3214.

2. Organisasi Genetik VHB

Gambaran umum organisasi genetik VHB dapat diperoleh dari analisa komparatif rangkaian nukleotida dari genome yang di *clone*. Seluruh rangkaian 13 genome yang telah di *clone*, menunjukkan adanya empat open reading frame (ORF) besar pada salinan (-) strand. Selain itu peristiwa masuk ataupun hilangnya nukleotida (insertions/deletions) selalu merupakan kelipatan tiga, sehingga memungkinkan lestarnya ORF. Sebaliknya tidak ada ORF yang mantap pada salinan (+) strand; karena itu minus strand mengandung seluruh kapasitas virus untuk mengkode protein. Hal ini juga sesuai dengan mekanisme replikasi virus hepadna, yang menyangkut sintesa suatu RNA(+) yang sesuai dengan (-) strand. Keempat ORF tersebut adalah S, C, P dan X; antara regio S, C dan regio X saling tumpang tindih paling tidak antara satu regio dengan regio lain, sedang regio P overlapping dengan tiga regio yang lain (Gambar 2.). Dengan demikian seluruh genome VHB dapat dibaca sepanjang satu setengah kali lipat; ini sesuai dengan kenyataan bahwa VHB merupakan virus DNA mamalia yang terkecil (Tiollais *et al.*, 1984 dan 1988).



Gambar 3. Peta genome VHB

(Sumber : Tiollais et al., 1984)

2a. Regio S :

Regio S/pre-S mengkode sintesa protein HBsAg, yang dibagi menjadi gena S, regio pre-S1 dan regio pre-S2. Gena S dan regio pre-S2 mempunyai panjang yang konstan pada semua subti-pe VHB. Sebaliknya akhiran 5' regio pre-S1 dari subti-pe adw, adr dan ayr mempunyai 33 nukleotida lebih panjang dibanding subti-pe ayw (Tiollais et al., 1988).

Gena S mengkode sintesa *major protein* yang tersusun atas 226 asam amino, disebut juga protein S. *Major protein* terdiri atas dua bentuk yaitu bentuk glikosilat (GP27) dan bentuk nonglikosilat (P24). GP27 mengandung kompleks ikatan N-glycan pada posisi asam amino 146. Analisa teoritik dari produk translasi gena S menunjukkan bahwa peptida S mempunyai tiga rangkaian hidropobik yang dipisahkan oleh dua daerah hidropi-

lik (Tiollais *et al.*, 1984 dan 1988). Batas yang tegas kedua daerah itu belum diketahui dengan pasti; namun telah diketahui bahwa rangkaian hidropobik tersebut terletak pada asam amino 7-23, 80-98, dan 169-226. Sebagian besar variasi asam amino peptida S terletak pada kedua daerah hidropilik. Variasi yang berhubungan dengan determinan d/y terletak pada posisi asam amino nomor 68 dan 122; yaitu Ile dan Lys untuk determinan d menggantikan Thr dan Arg pada determinan y. Yang berhubungan dengan determinan w/r lebih banyak lagi, yaitu pada posisi asam amino 4, 47, 110, 113, 126, 160, dan 207; adalah Ile, Val, Ile, Ser, Thr, Ly dan Ser untuk determinan w menggantikan Thr, Thr, Leu, Thr, Ile, Arg, dan Asn pada r (Okamoto *et al.*, 1986). Dengan tersedianya lebih banyak rangkaian nukleotida DNA VHB, variasi ini mungkin akan berkurang menjadi pada beberapa asam amino saja.

Menurut Tiollais *et al.* (1984) dan Okamoto *et al.* (1987, 1989), gena yang menentukan sub tipe HBsAg terletak pada regio S. Determinan kelompok a, terutama terletak pada posisi asam amino nomor 110-137 dan 138-149. Determinan d/y terutama ditentukan oleh posisi asam amino nomor 122 (lisin/arginin) dan determinan w/r terutama ditentukan oleh posisi asam amino nomor 160 yaitu arginin untuk determinan r dan lisin untuk determinan w.

2b. Regio pre-S

Regio pre-S2 dan gena S mengkode sintesa *middle protein* dengan panjang 281 asam amino; merupakan glikoprotein yang terdapat dalam dua bentuk yaitu GP33 (satu glikan) dan GP36 (dua glikan). Diduga pelekatan VHB pada hepatosit diperanta-

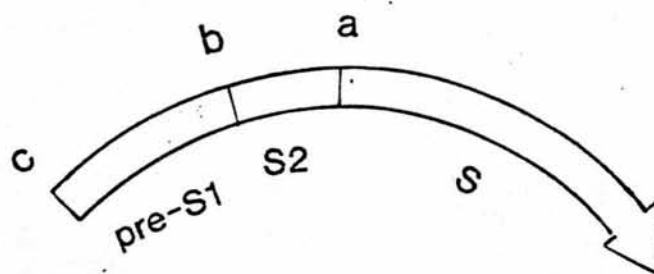
rai oleh reseptor polymerized human albumin (poly-HSA) yang terdapat pada produk translasi pre-S2 pada permukaan hepatosit (Thung, 1984). Residu terminal N nomor 1-26 dari 55 asam amino yang dikode oleh regio pre-S2 mempunyai epitope yang dominan pada permukaan HBsAg. Epitope ini tidak tergantung pada ikatan disulfida dan nampaknya lebih imunogenik dibanding epitope major protein serta dapat menghasilkan neutralizing antibody (Neurath *et al.*, 1985; Rutgers *et al.*, 1988)

Protein pre-S2 mempunyai 2 daerah hidropilik lokal, terletak antara asam amino nomor 15-20 dan antara nomor 50-55, yang merupakan determinan antigenik pre-S2. Pada rangkaian asam amino nomor 14-32, susunan asam amino untuk sub tipe adr, ayw dan sub tipe ayr adalah sama; tetapi pada sub tipe adw susunannya berbeda. Pada sub tipe adw asam amino nomor 22 adalah leusin, sedang pada sub tipe adr, ayw dan ayr adalah fenil alanin (Okamoto *et al.*, 1985; Millich *et al.*, 1986). Menurut Millich *et al.* (1986) epitope yang tersusun atas asam amino nomor 17-23 adalah merupakan *subtype dependent epitope*. Reagen Elisa/hemagglutinasasi untuk mendeteksi antigen pre-S2 yang dibuat dari antibodi monoklonal terhadap peptida sintetik (aa nomor 14-32) ternyata mempunyai sensitifitas yang tidak tergantung sub tipe HBsAg (Okamoto *et al.*, 1985; Machida *et al.*, 1987; Budkowska *et al.*, 1987; Neurath *et al.*, 1987).

2b.1. Regio pre-S1

Regio pre-S1, pre-S2 dan gena S mengkode sintesa *large protein*, yang terdapat dalam bentuk glikosilat (GP42) dan bentuk nonglikosilat (P39). Panjang polipeptida pre-S1 bervariasi tergantung sub tipe; 108 pada sub tipe ayw dan 119 pada

subtipe adw, adr dan ayr (Tiollais *et al.*, 1988). Rangkaian *large protein* sangat penting dalam mengenali reseptor pada permukaan hepatosit, terutama asam amino nomor 21-47 (Neurath *et al.*, 1986b). Pada cell line yang mengandung DNA VHB rekombinan, adanya rangkaian pre-S1 yang berlebihan akan menghambat sekresi partikel HBsAg (Ou & Rutter, 1987). Diduga *large protein* membantu memacu pembentukan HBsAg filamen dan partikel Dane (Persing *et al.*, 1986 cit. Tiollais *et al.*, 1988).



Gambar 4. Regio S dan pre-S genome VHB.

(Sumber : Neurath *et al.*, 1986)

Keterangan:

- Jika pembacaan mulai pada titik (a) sampai ujung panah, terbaca 226 codon dan akan disintesa protein S.
- Jika pembacaan mulai pada titik (b) sampai ujung panah, terbaca 226 + 55 codon dan akan disintesa protein pre-S2. Pembacaan pada titik b) jarang terjadi, sehingga HBsAg sedikit mengandung protein pre-S2.
- Jika pembacaan mulai pada titik (c) sampai ujung panah, terbaca 226 + 55 + 119 codon dan akan disintesa protein pre-S1 (Neurath *et al.*, 1986).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Pada fase replikasi virus, HBsAg virion dan partikel HBsAg tubuler mengandung sekitar 15% *large protein*; sedangkan partikel HBsAg bulat hanya mengandung sekitar 1-2% *large protein*. Sebaliknya komposisi *middle protein* pada ketiga partikel HBsAg tersebut sama yaitu sekitar 5-10% (Heerman *et al.*, 1984). Pada fase nonreplikatif, hanya terdapat sedikit sekali *middle protein* pada partikel HBsAg bulat dan praktis tidak terdapat *large protein* (Stibbe and Gerlich, 1982; Tiollais *et al.*, 1985). Ada tidaknya protein yang di kode oleh regio pre S, membawa pengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg. HBsAg yang mengandung protein yang dikode oleh region pre S ternyata lebih imunogenik dari pada HBsAg yang tidak mengandung protein yang dikode oleh regio pre S (Millich *et al.*, 1985a dan 1985b).

2c. Gena C

Gena C mengkode sintesa protein core (P22^C), dengan akhiran karboksil yang sangat kaya akan residu arginine, serine dan proline. Diduga rangkaian kaya arginine ini terlibat dalam interaksi antara genome VHB dengan nucleocapsid. Regio pre-C dan gena C mengatur sintesa protein core yang bisa disekresi yaitu HBeAg. Di dalam darah HBeAg terdapat sebagai protein dengan berat molekul (BM) 15.000 dalton, yang dihasilkan dari pemecahan P22^C. Regio pre-C tidak dibutuhkan untuk expressi HBcAg maupun HBeAg; tetapi adanya regio pre-C menyebabkan HBeAg berikatan dengan retikulum endoplasmik dan berakibat disekresinya HBeAg. Selain itu regio pre-C mungkin juga berperan dalam interaksi antara HBcAg dengan HBsAg untuk pembentukan partikel Dane (Ou *et al.*, 1986; McLachlan, 1987;

Rossinck *et al.*, 1986 cit. Tiollais *et al.*, 1988). Di negara-negara Mediterania dan Asia banyak terdapat penderita penyakit hati kronik dengan HBsAg positif, HBeAg(-) dan anti-HBe(+) tetapi dengan DNA VHB(+). Penderita-penderita seperti ini biasanya menunjukkan gejala klinik berat (Hadziyannis *et al.*, 1990). VHB pada penderita seperti ini terbukti telah mengalami mutasi sehingga tidak mempunyai regio pre-C; akibatnya tidak didapatkan HBeAg dalam serum. Anti-HBe bisa muncul dalam darah, karena yang merupakan epitope HBeAg adalah protein core. Bila binatang (kelinci, mencit, chimpanzee) disuntik dengan HBcAg yang sudah mengalami denaturasi, maka binatang tersebut akan membentuk anti-HBe. Jadi yang berlaku sebagai epitope untuk HBeAg adalah core yang mengalami denaturasi (Thomas, 1988).

2d. Regio P

Regio P mengkode sintesa suatu protein dasar yang kaya histidine, dengan BM 90.000 dalton; suatu BM yang mendekati DNA polymerase. Perbandingan rangkaian asam amino produk translasi regio P dengan reverse transcriptase retrovirus serta virus caoliflower mozaic menunjukkan adanya jejak homologi pada daerah yang tumpang tindih (overlap) dengan bagian akhir gena S. Hal ini mendukung ide bahwa regio P mengkode sintesa DNA polymerase yang mempunyai aktifitas reverse transcriptase (Toh *et al.*, 1983 cit. Tiollais, *et al.*, 1988).

2e. Regio X

Regio X dapat mengkode polipeptida dengan panjang 145-154 asam amino, tergantung sub tipe; antibodi terhadap polipeptida ini sering dijumpai pada berbagai penderita penyakit

hati (Levrero *et al.*, 1988; Moriarty *et al.*, 1988). Fungsi produk gena X belum jelas; diduga berperan dalam fungsi transaktifasi translasi (Wollersheim & Hofschneider, 1988; Mayumi, 1990; Seto *et al.*, 1990; Maguire *et al.*, 1991).

3. Heterogenitas Viral :

Menarik untuk diketahui bahwa pasangan asam amino yang berhubungan dengan sub tipe -baik determinan d/y maupun w/r- didapatkan juga pada regio lain; sehingga besar kemungkinan sub tipe HBsAg berhubungan juga dengan sub tipe HBcAg/HBeAg. Variasi susunan asam amino yang didapatkan pada protein S juga didapatkan pada protein VHB yang lain. Ada yang variasinya besar seperti pada protein pre-S dan ada juga yang variasinya kecil seperti pada HBcAg (Tiollais *et al.*, 1984; Neurath *et al.*, 1986b). Pada satu sub tipe, antigenisitasnya juga bervariasi (Courouce *et al.*, 1984). Misal antigenisitas sub tipe ayw3 pada pengidap VHB orang kulit putih di Amerika Serikat berbeda dengan orang-orang aborigin; demikian pula antara orang-orang Afrika dan Timur Jauh dengan orang Amerika dan Australia. Pada sub tipe ayw2, ayw3 dan sub tipe adw2, ternyata didapatkan pula perbedaan antigenisitas berdasarkan asal geografik.

Okamoto *et al.* (1988) dan Estacio *et al.* (1988) mengadakan penelitian genome VHB dari berbagai sub tipe yang berasal dari beberapa negara. Hasil penelitiannya menunjukkan adanya perbedaan susunan nukleotida genome VHB dari sub tipe yang sama, tetapi berasal dari daerah (negara) yang berbeda. Susunan nukleotida genome VHB sub tipe adw yang berasal dari

Amerika Serikat berbeda sampai lebih dari 8% dengan sub tipe yang sama yang berasal dari Asia (Jepang dan Indonesia). Ternyata perbedaan tersebut terutama disebabkan oleh perbedaan dalam region pre-S (12,4%) lebih dari pada perbedaan dalam region S yang hanya 8,9%. Besarnya perbedaan susunan nukleotida genome VHB dari sub tipe yang sama yang berasal dari daerah yang berbeda ini hampir sama dengan besarnya perbedaan susunan nukleotida antar sub tipe HBsAg.

4. DNA Virus Dalam Hepatosit

Didalam hati, DNA virus dapat berada baik dalam keadaan bebas maupun dalam bentuk terintegrasi dalam genome hepatosit. DNA bebas dan bentuk terintegrasi biasanya tidak terdapat bersamaan di dalam satu penderita. Kalau pun kedua bentuk tersebut terdapat di dalam satu penderita, masing-masing terdapat dalam sel hepatosit yang berbeda (Tiollais *et al.*, 1984).

Rangkaian DNA virus yang terintegrasi kedalam genome hepatosit dapat dijumpai pada penderita hepatitis kronik - dengan maupun tanpa sirosis-, penderita hepatoma dan juga pada beberapa penderita hepatitis akut. Sebagian besar DNA VHB yang terintegrasi terdapat pada pengidap dengan HBsAg-positif dengan HBeAg-negatif; namun demikian dijumpai juga pada beberapa kasus dengan HBsAg-negatif (Tiollais *et al.*, 1984)

Untuk ekspresi gena C dan gena P diperlukan adanya replikasi virus, hanya gena S yang dapat diekspresikan dari rangkaian DNA yang terintegrasi. Perbedaan ekspresi ini mem-

beri petunjuk bahwa mekanisme pengaturan gene S berbeda dengan gena yang lain. Integrasi kedalam genome hepatosit dapat berupa fragmen maupun rangkaian DNA VHB utuh dengan beberapa fragmen tambahan. Masih belum jelas apakah integrasi terjadi hanya pada satu tempat tertentu dari genome host atau pada beberapa tempat yang berbeda. Bukti-bukti yang ada menunjukkan bahwa tempat integrasi DNA VHB terjadi secara acak, tidak mempunyai lokasi tertentu pada genome hepatosit (Tiollais, et al., 1984). Menurut Robinson (1985), pada satu individu pengidap nampaknya integrasi DNA VHB kedalam genome hepatosit terjadi pada satu tempat tertentu.

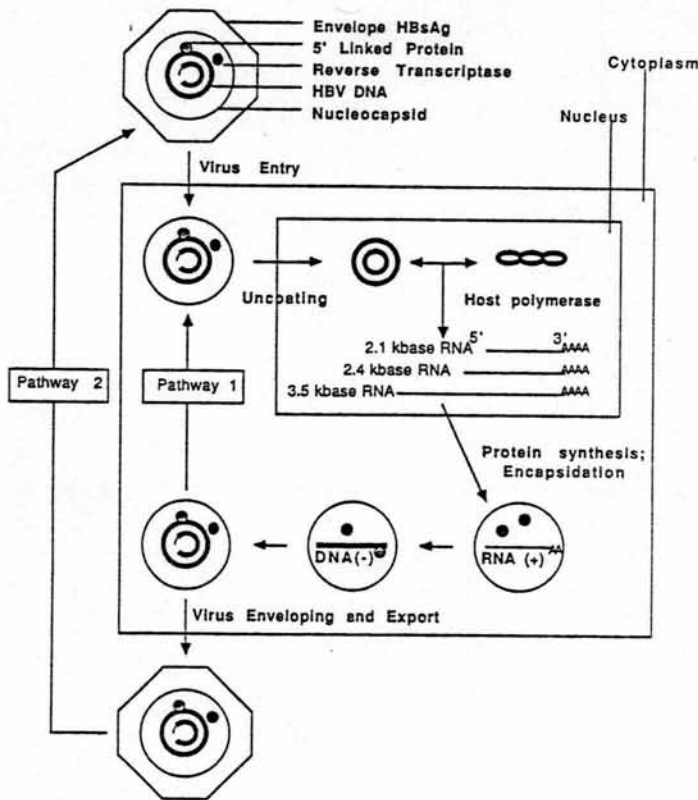
Bukti yang menunjukkan bahwa DNA VHB mungkin berintegrasi kedalam genome sel penderita hepatoma diperoleh dari kloning molekuler rangkaian genome penderita tersebut. Pada seorang penderita hepatoma dini ditemukan DNA bebas baik pada jaringan tumor maupun jaringan non-tumor, sedang DNA VHB yang terintegrasi kedalam genome host hanya terdapat pada jaringan tumor saja. Tetapi pada penderita hepatoma yang sudah lanjut tidak ditemukan DNA VHB bebas baik pada sel tumor maupun sel non-tumor; seluruhnya terdapat dalam bentuk terintegrasi. Pada penderita tersebut, panjang rangkaian DNA VHB yang terintegrasi sangat bervariasi dan praktis tidak dalam rangkaian asli (Rutter et al., 1984). Bisa hampir utuh seluruh rangkaian DNA VHB terintegrasi maupun hanya berupa fragmen-fragmen dan sering kali sudah mengalami penghilangan serta penyusunan kembali rangkaian genome virus (Tiollais et al., 1984; Robinson, 1985; Hino et al., 1989). Penelitian lain menunjukkan adanya DNA VHB yang terintegrasi di dalam hepatosit non-tumor

penderita hepatoma. Adanya DNA yang terintegrasi dalam sel non-tumor pada penderita hepatoma memberi petunjuk bahwa proses integrasi mendahului terjadinya keganasan (Zuckerman and Harrison, 1987).

5. Replikasi Virus

Replikasi menunjuk pada proses dimana virus menginfeksi sel yang rentan, mereproduksi bahan-bahan genome dan protein virus, kemudian merakit progeny virus yang infeksius serta mengeluarkannya dari sel. Penelitian menunjukkan bahwa genome Duck hepatitis virus melakukan replikasi melalui suatu intermediate RNA; model tersebut sekarang diterima oleh para ahli sebagai cara replikasi untuk seluruh famili hepadna virus (Summers & Mason, 1982).

Dalam proses sintesa protein virus, sintesa HBcAg terjadi mendahului sintesa HBsAg, untuk kemudia membungkus RNA(+) membentuk pregenome virus. Selanjutnya terjadi sintesa DNA virus dan pematangan nukleokapsid. Sementara itu terjadi sintesa HBsAg didalam membran dan sisterna retikulum endoplasmik, untuk kemudian menyelubungi partikel core membentuk virion utuh. Sintesa HBsAg biasanya terjadi berlebihan, sehingga terdapat sejumlah besar partikel HBsAg tanpa core. Virion dan partikel HBsAg (bulat dan tubuler) intrasisternal kemudian dikeluarkan dari hepatosit dengan jalan budding (Gudat & Bianchi, 1977 dan Kamimura *et al.*, 1981; cit. Gerber & Thung, 1985; Summers, 1984, 1988; Watson *et al.*, 1987). Mekanisme replikasi VHB terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Model Replikasi Hepadnavirus
(Sumber : Wu et al., 1991)

Keterangan :

Waktu terjadi infeksi, VHB masuk kedalam sel hati tanpa selubung HBsAg; nukleokapsid kemudian masuk kedalam nukleus didahului oleh lepasnya pembungkus DNA. Selama proses itu di dalam nukleus hepatosit, DNA virus akan diubah dari relaxed circular DNA (RC DNA) menjadi bentuk covalently closed circular DNA (CCC DNA). Perubahan dari RC DNA menjadi CCC DNA diduga menggunakan enzim-enzim seluler, tetapi bagaimana mekanismenya sampai sekarang belum diketahui. CCC DNA kemudian berlaku sebagai cetakan untuk transkrip utama mRNA virus (RNA 2,1 kbase, RNA 2,5 kbase dan RNA 3,5 kbase) termasuk transkrip pregenome virus. Di dalam sitoplasma, pregenome virus selanjutnya dibungkus kedalam core dan diubah menjadi DNA(-) oleh enzim reverse transkriptase; sintesa DNA(+) terjadi dengan menggunakan DNA(-) sebagai cetakan. Selanjutnya nukleokapsid yang telah terbentuk bisa kembali lagi masuk kedalam nukleus untuk melipat gandakan jumlah CCC DNA (jalur 1), atau disekresi sebagai partikel virus masak (virion). Secara teoritis virion yang telah disekresi tersebut dapat juga berpartisipasi dalam melipat gandakan CCC DNA (jalur 2), tetapi pad umumnya para ahli berpendapat bahwa jalur 2 tidak diperlukan untuk pelipat gandaan CCC DNA.

C. Petanda Infeksi Virus hepatitis B

Bila individu terinfeksi VHB, tanda-tanda infeksi dapat diketahui melalui pemeriksaan serologik baik pemeriksaan terhadap antigen virus maupun terhadap respon imun *host* (Tabel 1). Petanda serologik dari bagian core virion menunjukkan berlangsungnya replikasi virus; dengan demikian hepatitis B e antigen (HBeAg) berkorelasi dengan berlangsungnya replikasi virus (Miyakawa & Mayumi, 1985; Sherlock, 1987). HBeAg muncul selama serangan akut, kemudian menghilang bila penderita mengalami penyembuhan. HBeAg tetap bertahan pada individu yang menderita penyakit kronik. Antibodi terhadap HBeAg (anti-HBe), merupakan parameter kurang aktifnya virus dan petanda relatif rendahnya infektifitas (Miyakawa & Mayumi, 1985).

Hepatitis B core antigen (HBcAg) tidak dapat dideteksi dalam darah, berbeda dengan antibodinya (anti-HBc). Anti-HBc IgM titer tinggi dalam serum menunjukkan adanya infeksi akut dan infektifitas tinggi (CDC Atlanta, 1989). IgM anti-HBc juga berguna untuk menentukan apakah hepatitis tersebut karena VHB atau karena superinfeksi oleh virus lain; pada 5%-6% kasus hepatitis B fulminan, IgM anti-HBc merupakan satu-satunya petanda adanya infeksi VHB (Sherlock, 1987). Persistennya IgM anti-HBc dalam serum menunjukkan berlangsungnya penyakit menuju kronik. Sebaliknya titer rendah IgG anti-HBc dalam serum disertai dengan antibodi terhadap HBsAg (anti-HBs) menandai infeksi yang telah sembuh; tetapi titer tinggi IgG

anti-HBc dalam serum tanpa anti-HBs, menunjukkan tetap berlangsungnya replikasi virus. Petunjuk yang paling sensitif dari replikasi virus adalah adanya DNA VHB dalam serum (Sherlock & Thomas, 1983).

Tabel 1. Petanda Serologik Infeksi Virus Hepatitis B

Petanda	Makna
HBsAg	Pengidap akut atau kronik
IgM anti-HBc	Hepatitis B akut (titer tinggi) Hepatitis B kronik (titer rendah)
IgG anti-HBc	Pernah terpapar hepatitis B (HBsAg negatif) Hepatitis B kronik (HBsAg positif)
Anti-HBs	Imun terhadap hepatitis B
HBeAg	Salah satu petanda replikasi virus, Infeksi akut (IgM anti-HBc titer tinggi), Infeksi kronik (IgG anti-HBc titer tinggi)
Anti-HBe	Masa konvalesens (HBsAg negatif), atau Infeksi kronik (HBsAg positif)
Pre-S anti pre-S	Infeksi akut atau infeksi kronik replikatif Hepatitis akut menjurus sembuh (HBsAg+), Imun terhadap hepatitis B (HBsAg-).
DNA VHB	Infeksi akut atau infeksi kronik replikatif

Cara pemeriksaan peptida HBsAg.

Ada beberapa cara untuk memeriksa ketiga macam protein yang menyusun HBsAg (Okamoto *et al.*, 1985; Neurath *et al.*, 1987b; Budkowska *et al.*, 1987) yaitu:

a. Elektroforesis Gel:

Cara ini mendasarkan diri pada berat molekul ketiga macam peptida yang menyusun selubung VHB. Mula-mula dilakukan pemecahan HBsAg dengan menginkubasikan HBsAg dalam bufer Tris-HCl yang mengandung Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dan 2 mercaptoethanol. Kemudian bersama-sama standar berat molekul dilakukan elektroforesis dalam gradient polyacrylamide gel; setelah itu dicat dengan coomassie brilliant blue. Dengan cara ini akan terlihat 3 kelompok protein yang berbeda BM nya yaitu :

S protein : 24 - 27 K

pre-S2 protein : 33 - 36 K

pre-S1 protein : 39 - 42 K

b. ELISA, RIA dan hemagglutinasi pasif:

Disini digunakan antibodi monoklonal/poliklonal terhadap HBsAg dan terhadap peptida sintetik yang analog dengan antigen pre-S. Pemeriksaan dengan metoda Elisa atau RIA biasanya lebih sensitif dibanding SDS PAGE (Gerken *et al.*, 1987)

D. Epidemiologi Infeksi Virus Hepatitis B

Selain menyebabkan Hepatitis virus akut, infeksi Virus hepatitis B diketahui dapat menyebabkan akibat ikutan penyakit hati kronik seperti hepatitis kronik, sirosis hati dan Hepatoma. Di seluruh dunia diduga terdapat lebih dari 300 juta pengidap virus hepatitis B, dengan sekitar 250.000 kasus

baru hepatoma per tahun dan sekitar 40% dari penderita sirosis hati (dengan HBsAg positif) meninggal karena *hepatocellular carcinoma* (Anderson & Murray-Lyon, 1985; Purcell, 1985; Zuckerman and Harrison, 1987; WHO, 1988).

Di Indonesia prevalensi infeksi Virus Hepatitis B - seperti halnya negara-negara berkembang pada umumnya - adalah termasuk sedang atau tinggi (Soewignjo & Mulyanto, 1984). Dari banyak laporan, frekuensi HBs antigenemia (RPHA) pada kelompok individu dewasa sehat berkisar antara 3-17%, dengan *exposure rate* dapat mencapai sekitar 80%. Ini berarti pada beberapa tempat ada sekitar 80% dari penduduk yang telah pernah terinfeksi virus hepatitis B. Pada kelompok umur 1-10 tahun, *exposure rate* terhadap infeksi virus hepatitis B berkisar antara 14 % - 42 % (Mulyanto dkk, 1983; Soewignjo dkk, 1983, 1984; Soewignjo & Mulyanto, 1984; Mulyanto, 1985).

Peranan infeksi Virus hepatitis B terhadap terjadinya penyakit hati kronik tercermin dari banyaknya jumlah penderita dan tingginya HBs antigenemia pada penderita-penderita tersebut. Para peneliti melaporkan, sekitar 50% dari penderita penyakit hati kronik adalah disebabkan oleh infeksi virus hepatitis B dan dari seluruh penderita yang dirawat di Bagian Penyakit Dalam pada beberapa Rumah Sakit di Indonesia 3,5% adalah penderita sirosis hati dengan angka kematian mencapai 30,5% (Soewignjo dkk, 1981; Kusumobroto, 1983; Soewignjo & Mulyanto, 1984;).

1. Prevalensi subtipe HBsAg

Di dunia terdapat variasi geografik dari frekuensi berbagai subtipe HBsAg dan variasi ini lebih banyak berhubungan dengan daerah tempat asal individu dari pada daerah tempat tinggal individu, sehingga dapat membantu menelusuri migrasi penduduk pengidap VHB dimasa lampau (Mazzur *et al.*, 1974; Courouce-Pauty *et al.*, 1983). Subtipe adw, ayw dan adr terdapat luas di berbagai bagian dunia; sedang subtipe ayr sangat jarang didapatkan. Dilaporkan subtipe ayr sering didapatkan di daerah Oceania. Subtipe ayw tersebar luas mulai dari Afrika Utara, Tengah dan Afrika Barat melalui Mediterania sampai ke jazirah India. Di Afrika Timur, Eropa Utara, Amerika, Asia bagian Selatan dan Australia subtipe yang dominan adalah adw. Subtipe adr meluas dari Asia Timur Laut sampai Asia bagian Selatan. Nepal merupakan batas antara daerah adw dan ayw. Untuk Asia daerah subtipe adw terutama terdapat di Asia bagian selatan seperti Okinawa, Taiwan Filipina, Indonesia, China Selatan, India Barat-daya (WHO, 1977; Courouce-Pauty *et al.*, 1983; Nishioka, 1984). Subtipe HBsAg di Jepang menunjukkan distribusi geografik yang berbeda dari utara ke selatan. Subtipe adr dominan terutama di Jepang bagian selatan, dan cenderung makin jarang ke arah utara, sebaliknya subtipe adw makin ke utara cenderung makin dominan (Yamashita *et al.*, 1975). Tachibana (1989) melaporkan subtipe adr (79,6%), adw (17,6%), ayw (0,4%) dan subtipe ayr (0,9%) dari 5082 pengidap HBsAg asimtomatik di Jepang. Pada penderita hepatitis B akut, perbandingannya justru terbalik; subtipe adw justru lebih dominan dibanding subtipe adr (Mayumi, komunikasi pri-

badi). Laporan tentang distribusi sub tipe HBsAg di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2. Seperti tampak pada Tabel 2, di Indonesia sub tipe adw dominan di Jawa, Kalimantan, Lombok dan Sumbawa, sub tipe ayw dominan di Flores dan Maluku, sedang sub tipe adr dominan di Sumatera Barat dan Irian Jaya.

Tabel 2. Distribusi Sub tipe Utama HBsAg di Indonesia

Pulau/ Kota	Penulis	Jumlah sampel	Sub tipe HBsAg (%)		
			adw	adr	ayw
Sumatera, Padang	Sulaiman dkk. (1981)	12	25.0	58.3	16.7
Kalimantan, Pontianak	Sulaiman dkk. (1981)	11	90.9	9.1	0
Jawa :	Mulyanto et al (1990)	961	74.7	17.0	4.6
Jakarta		865	75.6	19.1	4.5
Surabaya		96	86.5	3.1	8.3
Surabaya	Mulyanto (1987)	372	88,2	4,5	7,3
Lombok, Mataram	Mulyanto et al (1990)	199	79.3	10.1	10.1
Sumbawa Sbw-Besar	Mulyanto dkk. (1983)	11	45,4	36,4	18,2
Flores Bajawa	Hartono dkk. (1990)	37	8.1	0	91.9
Sumba Waingapu	Mulyanto dkk. (1991)	49	8,2	12,2	79,6
Timor Kupang	Mulyanto dkk. (1991)	27	7,4	29,6	63,0
Ambon	Sanjaya dkk. (1990)	10	30.0	10.0	60.0
Irian	Mulyanto et al (1990)	80	13.8	85.0	1.2

Pemeriksaan sub tipe HBsAg bisa dilakukan dengan cara counter-electrophoresis, rheophoresis, RIA dan Elisa (Holland *et al.*, 1972; Hoofnagle *et al.*, 1984). Menurut Ben-Porath & Wands (1984) dengan pemeriksaan sub tipe HBsAg menggunakan antibodi monoklonal dapat diketahui adanya perbedaan konsentrasi epitope HBsAg. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa selain terdapat beberapa determinan antigenik pada epitope a, terdapat juga perbedaan densitas dan kualitas beberapa epitope pada HBsAg dari berbagai sub tipe. Hal ini memberi petunjuk bahwa partikel HBsAg lebih beragam dari apa yang selama ini diduga.

2. Frekuensi HBeAg

Frekuensi HBeAg sangat bervariasi antara satu daerah dengan daerah lainnya. Di Indonesia frekuensi HBeAg pada pengidap-HBsAg adalah sekitar 40%-60% (Soewignjo dan Mulyanto, 1984). Frekuensi HBeAg antar negara juga sangat bervariasi: di Amerika Serikat (7,4%); Perancis (10,6%); Belgia (23%); Jepang (14%) (Tachibana *et al.*, 1977 ; Nath *et al.*, 1978; Couroce-Pauty & Plancon, 1978). Menurut Szmunn *et al.* (1981) terdapat beberapa faktor yang berpengaruh terhadap besarnya variasi frekuensi HBeAg didalam populasi yang berbeda . Faktor-faktor tersebut mungkin route infeksi, besarnya dosis infeksi, predisposisi genetik, kemampuan imunologik, intensitas dan frekuensi terpapar virus serta lamanya mengidap VHB. Szmunn mengatakan bahwa faktor yang paling berpengaruh adalah lamanya mengidap virus VHB. Tsukuma *et al.* (1987) mendapatkan bahwa frekuensi HBeAg di Jepang makin

menurun dari tahun ke tahun, sejak tahun 1977 sampai tahun 1984. Penurunan tersebut diduga karena naiknya kemampuan imunologik akibat perbaikan gizi penduduk sesudah Perang Dunia II (Nishioka, 1985).

HBeAg merupakan parameter dari replikasi virus, karena itu prevalensinya dipengaruhi oleh konsentrasi HBsAg. Pada konsentrasi HBsAg tinggi (2 mg/cc atau lebih) didapatkan prevalensi HBeAg sebesar 80%; sedang pada konsentrasi HBsAg antara 0,05-1,5 mg/cc, lebih sering didapatkan anti-HBe (Vranckx *et al.*, 1980). Menurut Miyakawa & Mayumi (1985) status HBeAg pada pengidap kronik VHB dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk status imunologik, etnik, sosioekonomik/gizi, jenis kelamin dan umur host.

E. Mekanisme Terjadinya Kerusakan Sel Hati

Menurut Dudley *et al.* (1972) nekrosis sel hati merupakan akibat respon imun host terhadap sel hati yang terinfeksi VHB. Respon host ini terutama dikontrol oleh sel limfosit T, dan variasi fungsi sel T ini yang akan menentukan perjalanan klinik infeksi. Hal ini disokong oleh sejumlah laporan :

- a. Pasien-pasien dengan sistem imun seluler jelek yang terinfeksi VHB cenderung akan mendapat hepatitis subklinik dan infeksi persisten. Misalnya pada pasien hemodialisis, penderita lepra tipe L, beberapa penderita leukemia dan limfoma serta penderita Down's syndrom.

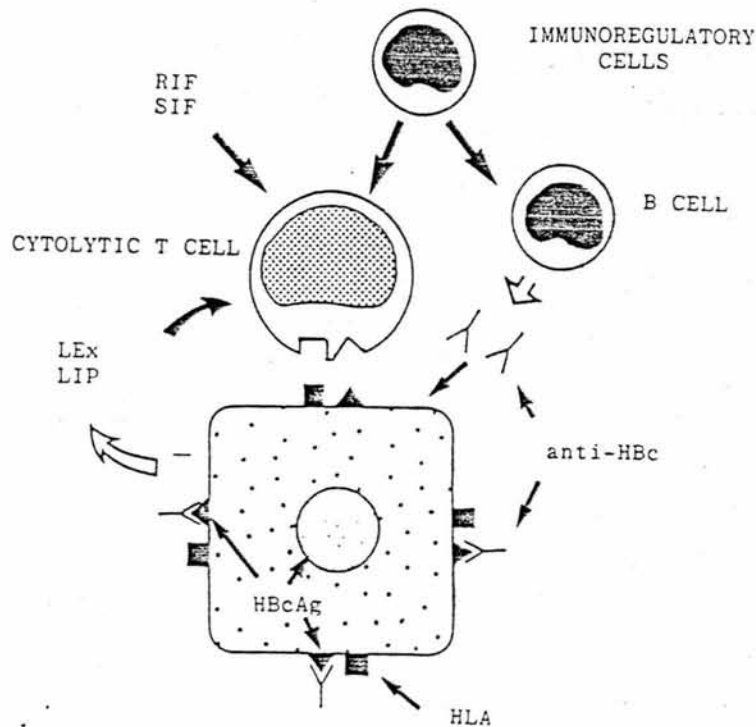
- b. Pemberian obat-obat immunosupresif pada fase akut penyakit cenderung menyebabkan terjadinya hepatitis B persisten. Sebaliknya bila obat-obat immunosupresif pada penderita pengidap HBsAg dihentikan, seperti pada penderita keganasan, maka akan terjadi nekrosis sel hati yang masif. Hal ini mungkin disebabkan oleh kembalinya kompetensi sistem imun.
- c. Hal yang sama terlihat pada penderita hepatitis kronik B, dimana akan terjadi kenaikan sementara transaminase serum setelah penghentian terapi immunosupresif (Dudley *et al.*, 1972; Klingenstein & Dienstag, 1985).

Walaupun banyak observasi klinik dan penelitian invitro yang mendukung hipotesis tersebut, tetapi peran imunologik langsung dalam patogenesis penyakit hati akibat infeksi VHB belum pernah terbukti. Penelitian-penelitian invitro tentang mekanisme imunologik hepatitis B menunjukkan hasil yang tidak seragam, meskipun dikerjakan dengan metoda yang sama. Lagi pula tidak ada model penelitian yang dilakukan dapat mencerminkan kondisi invivo yang cukup terpercaya. Observasi klinik selama ini mendukung teori tentang dasar imunologik untuk terjadinya kerusakan sel hati; meskipun terdapat juga observasi klinik yang bertentangan yang mengingatkan kemungkinan peran sitopatik virus langsung yaitu virion replikatif (Dienstag, 1984; Thomas *et al.*, 1984).

Hasil-hasil penelitian imunologik selama ini telah diinterpretasikan sebagai mendukung teori bahwa kerusakan sel hati terjadi akibat faktor imunologik; tetapi hasil-hasil penelitian tersebut tidak memberi keterangan yang mudah dan

seragam tentang terjadinya kerusakan sel hati pada semua pasien yang diteliti (Eddleston and Dixon, 1990). Hasil penelitian tersebut juga tidak memberikan keterangan perbedaan imunologik diantara berbagai katagori penderita hepatitis B untuk dapat menerangkan perbedaan antara mereka yang dapat mengakhiri infeksi dan mereka yang tetap terinfeksi dan menjadi kronik. Juga tidak dapat menerangkan perbedaan antara mereka yang terus mengalami kerusakan sel dan mereka yang tanpa kerusakan sel, pada penderita hepatitis kronik (Dienstag, 1984).

Yang sampai sekarang banyak dianut adalah hipotesis yang diajukan oleh Dudley *et al.* (1972); yang menyatakan bahwa kerusakan sel hati yang terjadi adalah akibat respon imunologik tubuh terhadap sel hati yang terinfeksi VHB. Manifestasi klinik yang terjadi sangat tergantung pada reaksi imunologik tersebut, terutama imunitas seluler. Pada hepatitis kronik, yang menjadi antigen sasaran adalah HBcAg dan mungkin juga HBeAg yang menempel pada permukaan membran sel hati. Sel T sitolitik dan HLA klas 1 host memegang peran utama untuk terjadinya lisis sel hati (Thomas *et al.*, 1984). Perbedaan dalam hasil sitolitik tersebut mungkin dipengaruhi oleh faktor modulatori seperti kompetisi antara sel T sitolitik dan anti-HBc dalam sirkulasi, dipengaruhi oleh imunoregulatori serum (rosette inhibitory factor, RIF dan serum inhibitory factor, SIF) dan molekul imunoregulatori yang berasal dari hati (seperti liver extract, LEx dan liver derived inhibitory protein, LIP) serta pengaruh imunoregulatori sel T; lihat Gambar 6.



Gambar 6. Immunopatogenesis kerusakan sel hati

(Sumber : Dienstag, 1984)

Untuk dapat mengenali HBeAg pada membran sel hati, sel T harus melihat antigen tersebut dalam hubungan fisik dengan glikoprotein HLA kelas 1 (HLA-A, -B, -C). Glikoprotein ini sangat jarang muncul pada permukaan membran sel hati dibanding pada saluran empedu, sel Kupffer dan sel endotel. Selama fase HBeAg positif dari hepatitis B kronik, penampakan HLA kelas 1 tersebut tidak berubah; tetapi pada fase anti-HBe yang telah berhasil mengeliminir hepatosit yang mengandung virus replikatif, densitas protein HLA kelas 1 tersebut naik secara nyata. Jika perubahan ini mendahului serokonversi HBeAg dan

jika hal ini terjadi pada sel yang mengandung virus replikatif, maka hal ini mungkin merupakan faktor yang mengakibatkan lebih efisiennya lisis hepatosit yang terinfeksi (Thomas *et al.*, 1984). Perubahan densitas HLA kelas 1 ini mungkin sangat penting bagi penderita-penderita dengan fenotipe HLA yang kurang berhubungan dengan antigen VHB. Observasi belakangan ini yang menunjukkan bahwa interferon dapat menaikkan penampakan HLA kelas 1 dan pada beberapa pasien mengakibatkan hilangnya hepatosit yang terinfeksi, memberi petunjuk bahwa perubahan penampakan protein HLA mungkin merupakan faktor penting dalam eliminasi secara imunologik hepatosit yang terinfeksi.

F. Perjalanan Penyakit

Penularan hepatitis B terjadi terutama karena terpapar oleh darah yang terkontaminasi virus. Setelah masa inkubasi yang panjang (6 minggu - 6 bulan), salah satu dari beberapa manifestasi klinik dapat terjadi (diagram 1) : hepatitis fulminan (<1%), hepatitis akut (20%), atau hepatitis subklinik yang tidak nampak (80%). Dari seluruh penderita yang infeksiya terjadi pada usia dewasa, kira-kira 10% akan menjadi pengidap kronik. Sebaliknya, 85%-95% bayi yang mendapat penularan vertikal dari ibu pengidap VHB akan menjadi pengidap kronik (Vyas & Blum, 1984; Ferrari, 1987). Sekitar 33% pengidap VHB kronik merupakan pengidap sehat dan mempunyai harapan hidup yang normal. Sebaliknya sekitar 67%

pengidap VHB kronik akan berkembang menjadi hepatitis kronik dengan berbagai tingkat kerusakan sel hati. Bentuk kelainan yang paling berat yaitu hepatitis kronik aktif berpeluang besar untuk menjadi sirosis hati dan setelah 30-40 th bisa berkembang menjadi kanker hati (Ferrari, 1987). Menurut Beasley (1981), pengidap VHB mempunyai resiko untuk mendapat kanker hati 223 kali lebih besar dari pada populasi normal.

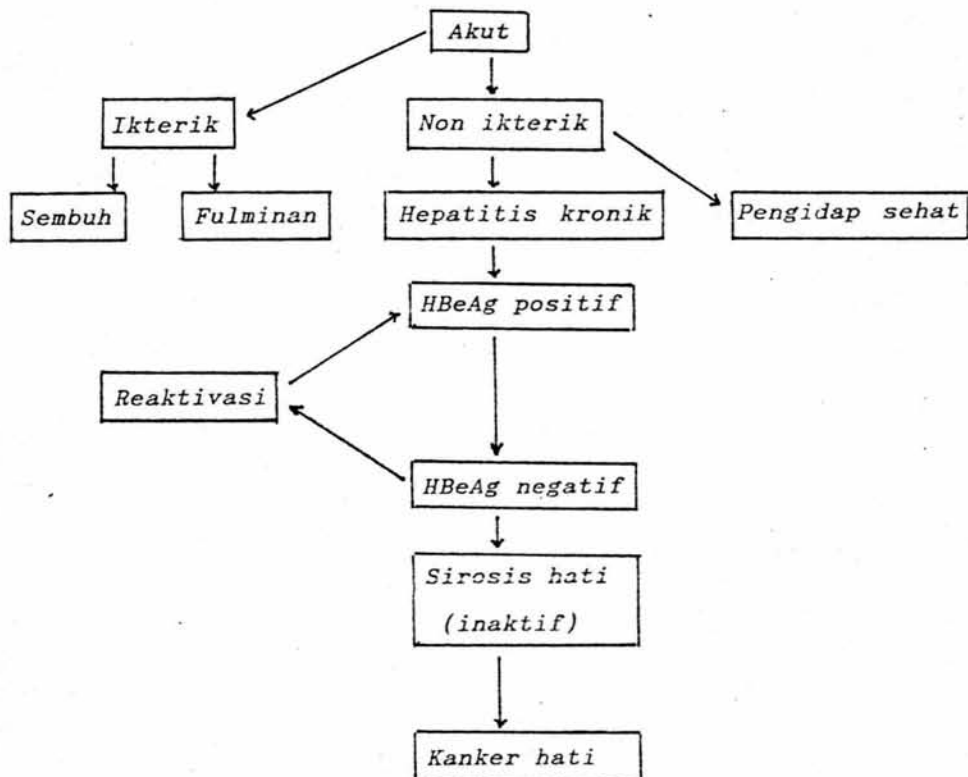


Diagram 1. Perjalanan alamiah infeksi VHB

(Sumber : Sherlock, 1987)

1. Subtipe HBsAg dan Perjalanan Penyakit

Penelitian yang telah dilakukan di Amerika menunjukkan bahwa subtipe HBsAg berpengaruh terhadap perjalanan penyakit. Hasil penelitian Holland *et al.* (1972) pada donor darah, penderita hepatitis akut dan hepatitis kronik menunjukkan bahwa subtipe ad dan ay menyebabkan hepatitis akut dengan frekuensi yang tidak berbeda; tetapi subtipe ad cenderung lebih banyak menyebabkan infeksi yang mengakibatkan antigenemia yang persisten atau mengakibatkan hepatitis kronik. Penelitian lain menunjukkan bahwa subtipe berpengaruh terhadap lamanya waktu inkubasi; hepatitis B akut subtipe adw masa inkubasinya lebih pendek dari pada subtipe ayw. Individu yang terinfeksi VHB dari subtipe adw cenderung lebih banyak yang menjadi kronik dari pada yang terinfeksi dengan subtipe ayw. Demikian juga gejala penyakit yang lain -seperti lamanya gejala klinik, tingginya puncak nilai bilirubin, lamanya hiperbilirubinemia, lamanya hepatitis B surface antigenemia- pada infeksi dengan subtipe adw lebih hebat/lama dari pada infeksi dengan subtipe ayw; walaupun perbedaan tersebut tidak bermakna secara statistik (Gerety *et al.*, 1975). Rioche (1986) meneliti perbedaan subtipe antara pengidap HBsAg asimtomatik dan penderita penyakit hati (hepatitis akut dan hepatitis kronik) di Maroko. Pada pengidap asimtomatik, prevalensi subtipe adr lebih tinggi dibanding subtipe ayr, tetapi pada penderita penyakit hati subtipe ayr lebih tinggi dibanding subtipe adr. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian lain yaitu subtipe ad lebih sering berhubungan dengan penyakit hati kronik dan subtipe ay cenderung lebih berhu-

bungan dengan infeksi sementara. Di Ethiopia, Gebreselassie (1986) mendapatkan hal yang serupa; prevalensi sub tipe ay pada donor darah hanya 11% tetapi pada hepatitis akut prevalensinya jauh lebih tinggi yaitu 43%.

2. HBeAg dan Perjalanan Penyakit

Pengaruh sub tipe terhadap prevalensi HBeAg pada pengidap HBsAg asimtomatik sangat bervariasi. Vranckx *et al.* (1980) melaporkan bahwa sub tipe tidak berpengaruh terhadap prevalensi HBeAg di Belgia, didaerah dengan distribusi sub tipe ad dan ay masing-masing 68% dan 32%. Di Jepang sub tipe HBsAg yang menonjol pada pengidap HBsAg sehat adalah sub tipe adr. Distribusi sub tipe HBsAg pada pengidap sehat adalah 80% adr dan 18% adw, tetapi pada penderita hepatitis B akut perbandingan terbalik. Pada hepatitis akut sub tipe adw lebih dominan dibanding sub tipe adr (Tachibana *et al.*, 1989; Mayumi, komunikasi pribadi). Sub tipe HBsAg yang dominan (adr) ternyata mempunyai prevalensi HBeAg yang lebih tinggi dibanding sub tipe adw yang kurang dominan (Mayumi, komunikasi pribadi). Mulyanto *et al* (1990) melaporkan bahwa sub tipe HBsAg berpengaruh terhadap prevalensi HBeAg pada pengidap HBsAg di DTD PMI DKI Jakarta, DTD PMI Surabaya dan Mataram. Dilaporkan bahwa prevalensi HBeAg pada serum-serum pengidap HBsAg sub tipe adw lebih tinggi dibanding sub tipe adr dan sub tipe ayw.

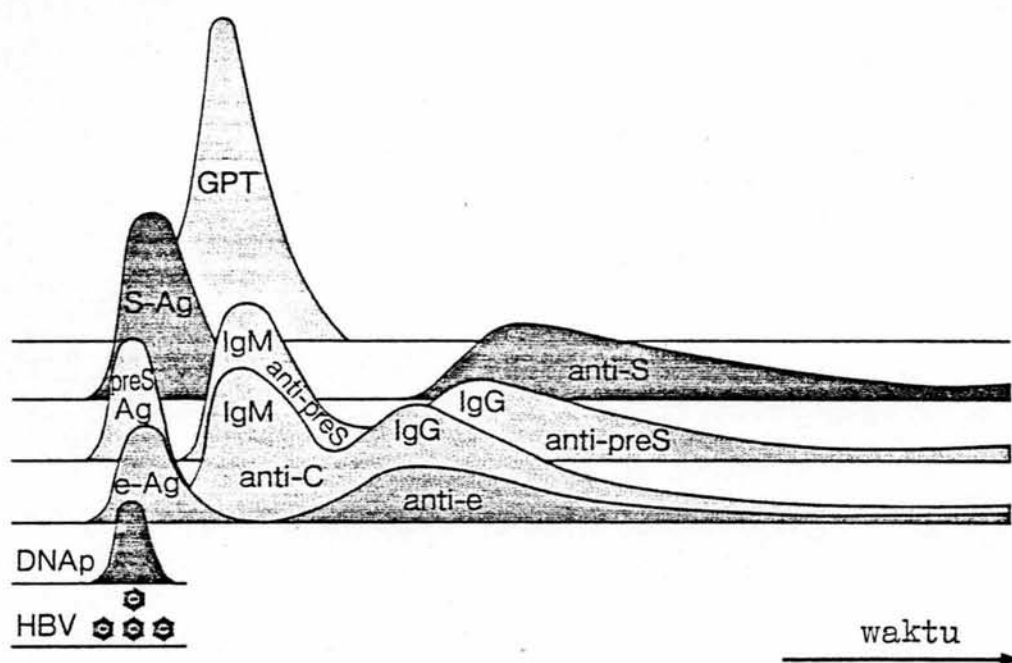
3. Antigen pre-S dan Subtipe HBsAg:

Petit *et al.* (1991) mengadakan penelitian untuk mengetahui kemungkinan perbedaan fungsi akibat perbedaan struktur dan antigenisitas HBsAg. Penelitiannya dilakukan dengan membandingkan perlekatan VHB pada sel hepatoma manusia (sel HepG2), dengan cara pemeriksaan invitro cell-binding assay. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa struktur HBsAg dengan banyak epitope pre-S1 merupakan faktor utama untuk efektifnya perlekatan pada sel HepG2. Selain itu terdapat bukti bahwa ekspresi regio pre-S1 dan pre-S2 (yang dipengaruhi subtipe HBsAg d/y) dapat mempengaruhi perlekatan virus. Mulyanto (1989) melaporkan bahwa subtipe berpengaruh terhadap titer relatif antigen pre-S2 pada donor darah pengidap HBsAg di DTD PMI DKI Jakarta. Dilaporkan bahwa titer relatif antigen pre-S2 pada subtipe adr lebih tinggi dibanding subtipe adw.

4. Antigen pre-S pada berbagai pengidap HBsAg

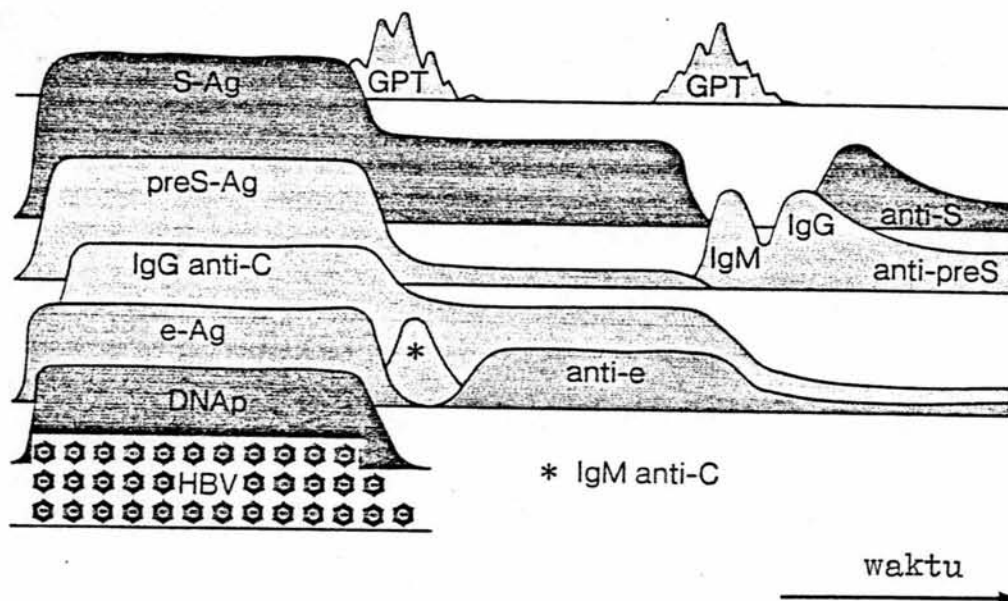
Adanya antigen pre-S dalam darah berbagai macam pengidap VHB sangat bervariasi. Secara umum adanya antigen pre-S dalam darah berhubungan erat dengan replikasi virus (Budkowska *et al.*, 1986b; Theilmann *et al.*, 1986; Hadziyannis *et al.*, 1987; Kurai *et al.*, 1987 & 1988; Ibara *et al.*, 1987 & 1989). Antigen pre-S2 merupakan petanda yang bisa memberi petunjuk prognosis penyakit serta beratnya aktivitas inflamasi; dan eliminasi imunologik antigen pre-S2 merupakan petanda menyurutnya penyakit (Budkowska *et al.*, 1987b).

Pada penderita hepatitis B akut, antigen pre-S biasanya ditemukan dalam serum pada fase awal infeksi, ditandai dengan positifnya HBeAg, DNA VHB dan titer HBsAg serta aktifitas pengikatan *polymerized human albumin receptor* yang tinggi. Pada penderita yang sembuh tanpa komplikasi, hilangnya antigen pre-S1 dan pre-S2 mendahului turunnya titer HBsAg dan titer poly-HSAR (Pontisso *et al.*, 1983; Neurath *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1987). Antigen pre-S merupakan antigen yang pertama kali menghilang pada penderita hepatitis akut yang menjurus sembuh; tetapi pada penderita yang menjurus kronik, antigen pre-S tetap bertahan dalam darah (Budkowska *et al.*, 1986b & 1986b; 1987; 1990; Gerken *et al.*, 1987).



Gambar 7. Petanda infeksi VHB pada Hepatitis akut
(Sumber : Anonim, 1988)

Pada hepatitis fulminan, ekspresi antigen pre-S dalam darah sangat bervariasi tergantung pada saat pengambilan darah dalam perjalanan penyakit (Brahm *et al.*, 1987). Pada penderita hepatitis B akut yang menuju sembuh, ternyata respon imun yang pertama kali terdeteksi adalah respon sel T terhadap antigen pre-S; yang mulai muncul 30 hari sebelum naiknya enzim transaminase, pada waktu DNA VHB pertama kali muncul dalam darah. Sepuluh hari kemudian disusul oleh respon imun seluler dan humoral terhadap HBcAg; dan terakhir baru muncul respon imun seluler terhadap HBsAg, 10 hari sebelum naiknya enzim transaminase (Eddleston, 1988).



Gambar 8. Petanda infeksi VHB pada infeksi persisten
(Sumber : Anonim, 1988)

Titer antigen pre-S1 dan antigen pre-S2 pada pengidap kronik berhubungan erat dengan replikasi virus (Hess *et al.*, 1986); tetapi hal ini masih belum ada kesepakatan pendapat. Hu *et al.* (1987) melaporkan bahwa titer antigen preS tidak erat berhubungan dengan status HBeAg, tetapi tergantung pada titer HBsAg. Antigen pre-S baru dapat dideteksi bila konsentrasi HBsAg mencapai 50 ng/cc-100 ng/cc atau lebih. Penelitian Hess *et al.* (1987) menunjukkan bahwa pada pengidap sehat ekspresi protein pre-S dalam darah tidak seragam, bisa positif atau negatif; tetapi pada penderita penyakit hati kronik ekspresi protein pre-S dalam darah seragam, semuanya positif. Hal ini menyokong pendapat Hu *et al.* (1987) bahwa adanya antigen pre-S dalam serum tidak selalu berhubungan dengan viremia ataupun dengan penyakit hati kronik. Menurut Hadziyannis *et al.* (1987) semua pengidap-HBsAg dengan protein pre-S positif mempunyai penyakit hati yang aktif. Pada penderita hepatitis kronik, adanya antigen pre-S1 dan pre-S2 biasanya berhubungan dengan petanda replikasi virus yang lain seperti DNA VHB dan HBeAg (Hu *et al.*, 1989). Bila antigen pre-S2 serum penderita hepatitis kronik dengan anti-HBe positif diikuti secara serial, tampak bahwa reaktivasi penyakit (naiknya serum trasaminase) selalu didahului dengan naiknya antigen pre-S2 (Kurai *et al.*, 1989). Petanda VHB pada infeksi persisten (*carrier*) terlihat pada gambar 8.

G. Imunisasi

Sebagian besar antibodi yang digunakan dalam *immunochemistry* diperoleh dari penyuntikan suspensi antigen pada kelinci. Bila diinginkan produksi antibodi dalam jumlah besar, imunisasi dilakukan pada domba, kambing atau kuda. Kemampuan suatu benda/senyawa untuk memacu produksi antibodi (imunogenisitas) biasanya ditentukan oleh beberapa faktor (Nowotny, 1979) yaitu : a) Senyawa tersebut harus mempunyai struktur khas dengan berat molekul tertentu sehingga merupakan benda asing bagi tuan rumah. b) Senyawa tersebut harus berada dalam tubuh organisme selama kurun waktu tertentu. c) Senyawa tersebut harus dapat mencapai sel-sel sistem imun.

1. Sifat-sifat Antigen.

Walaupun fungsi primer sistem imun adalah untuk menyelamatkan individu dari penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme, tetapi sistem imun itu sendiri tidak dapat membedakan apakah organisme itu patogen atau non patogen. Sistem imun hanya mengenali bahwa mikroorganisme tersebut merupakan benda asing (bukan merupakan jaringan tubuh sendiri) dan oleh karena itu maka mikroorganisme tersebut antigenik. Suatu benda adalah antigenik, jika benda/senyawa tersebut mempunyai susunan atom -pada permukaannya- yang berbeda dengan bentuk permukaan dari semua komponen tubuh normal (Tainer *et al.*, 1984 cit. Watson *et al.*, 1987; Roitt *et al.*, 1989).

Sebagai benda asing saja bukanlah satu-satunya sifat yang menyebabkan suatu substansi menjadi antigenik; syarat

utama lain adalah bahwa substansi tersebut merupakan *macromolecule* atau tersusun atas *macromolecule*. Sebagian besar protein, beberapa polisakarida dan asam nukleat adalah antigenik. Molekul-molekul kecil jarang bisa menyebabkan timbulnya antibodi spesifik. Hal ini bukan disebabkan oleh kurangnya spesifitas, karena banyak molekul-molekul kecil (yang tidak antigenik) dapat mengubah antigenisitas suatu molekul besar jika berikatan kovalen dengan molekul besar tersebut. Molekul-molekul kecil yang menjadi antigenik bila berikatan dengan *protein carriers* disebut haptan (Guyton, 1981; Roitt *et al.*, 1989).

Ternyata tidak seluruh permukaan sel diperlukan untuk menjadikan suatu *macromolecule* antigenik atau tidak. Sistem imun hanya bereaksi terhadap suatu grup atom spesifik yang disebut *antigenic determinant* atau *epitope*, yang terletak di beberapa tempat pada permukaan molekul. Pada suatu molekul protein, *epitope* bisa tersusun atas 5 - 8 asam amino; dengan demikian suatu molekul protein biasanya mempunyai banyak *epitope* dan dapat memacu pembentukan berbagai macam antibodi. Bakteri dan virus misalnya, mempunyai banyak *epitope* yang berbeda (Westhof *et al.*, 1984 cit. Watson *et al.*, 1987 ;Roitt *et al.*, 1989).

2. Imunisasi Pada Binatang Percobaan

Jika antigen yang dipakai merupakan antigen yang sangat kuat, maka kelinci yang di inokulasi satu kali dengan antigen tersebut (dalam larutan garam fisiologis) dapat memproduksi antibodi yang sudah dapat diukur kadarnya dalam serum, 10

hari setelah inokulasi. Kadarnya mencapai maksimum pada hari ke 15 - 20 dan kemudian menurun terus selama beberapa minggu. Respon imun ini merupakan respon imun humoral primer dan seluruhnya merupakan antibodi IgM. Respon imun sekunder dapat diperoleh dengan menyuntikkan antigen yang sama, beberapa waktu setelah respon imun primer. Respon imun sekunder ini terjadi lebih cepat. Kenaikkan titer antibodi sudah dapat diukur pada hari ketiga dan mencapai maksimum pada hari ke 10 setelah penyuntikkan yang kedua tersebut. Pada waktu itu dapat diperoleh antibodi IgM yang kadarnya hampir sama dengan respon primer dan juga antibodi IgG dengan kadar 3 - 10 kali kadar IgM. Penyuntikan selanjutnya dengan antigen yang sama - misalnya dengan interval tiap 2 minggu - akan menghasilkan kelinci hiperimun dengan titer antibodi IgG spesifik yang naik dengan cepat, bisa mencapai 1 - 5 mg/cc (Burin, 1986).

Bila antigen yang dipakai antigenisitasnya rendah, maka agar dapat dipakai untuk mendapatkan antibodi dengan titer yang memadai dapat dilakukan dua cara. Pertama, memperpanjang waktu perjumpaan antigen dengan sel sistem imun; baik dengan cara penyuntikkan berulang-ulang maupun dengan membuat depot antigen (dalam tubuh tuan rumah) yang dapat dilepaskan lambat selama beberapa minggu. Depot antigen tersebut dapat disuntikkan secara *subcutan*, *intradermal* maupun *intramuscular*. Kedua, antigenisitas dari antigen dinaikkan dengan menggunakan *adjuvants*. *Aluminium potassium sulphate* adalah merupakan adjuvant sederhana yang digunakan untuk mempresipitasikan antigen yang larut, sebelum diinokulasikan. Perlakuan ini menyebabkan terjadinya antigen yang lepas lambat, mirip suatu

seri penyuntikkan yang diperpanjang; dan juga menyebabkan antigen lebih cepat tertangkap oleh macrophage yang terlibat dalam respon imun (Burin, 1986). Adjuvant yang paling sering dipakai adalah *Freund's complete adjuvant* (FCA) yang mengandung minyak mineral putih seperti paraffin cair, mengandung emulsifier seperti *mannide mono-oleate* dan mengandung *Mycobacterium tuberculose* yang telah dimatikan dengan pemanasan. Biasanya 1 cc emulsi dari satu bagian FCA dan satu bagian suspensi antigen disuntikkan pada kelinci pada tiga tempat, masing-masing dengan volume yang sama. Misalnya, satu bagian emulsi disuntikkan *subcutan* dan dua bagian yang lain disuntikkan pada bagian belakang otot kaki, dalam upaya untuk memperbanyak jumlah kelenjar limfe yang dapat dicapai oleh antigen melalui saluran limfe. Antigen yang masuk ke dalam darah sebagai butiran emulsi akan mengaktifkan limfosit di dalam limpa dan sumsum tulang. Depot antigen dalam bentuk emulsi cenderung lama bertahan pada tempat inokulasi dan kuman tuberculose yang sudah dimatikan akan memacu sel retikulo endotelial ke tempat tersebut. Terbentuknya granuloma akibat inokulasi ini juga akan meningkatkan keseluruhan respon imun terhadap antigen. Jika antibodi yang diperoleh akan digunakan untuk penelitian imunokhemik, inokulasi akhir (sebelum pengambilan darah) biasanya menggunakan antigen dalam emulsi dengan *Freund's incomplete adjuvant* yang tidak mengandung kuman tuberculose; karena emulsi ini cenderung lebih memacu respon imun humoral (Burin, 1986). Anti-HBs dapat timbul dalam individu yang mendapat infeksi VHB atau dengan melakukan imunisasi menggunakan HBsAg sebagai imunogen.

H. Vaksin Hepatitis B

Sampai saat ini telah beredar di pasaran dua macam vaksin hepatitis B, vaksin yang berasal dari plasma yang dikenal juga sebagai vaksin generasi pertama dan vaksin generasi kedua yaitu vaksin hepatitis B hasil rekayasa genetik. Vaksin generasi pertama dihasilkan dari plasma pengidap HBsAg. Melalui serangkaian pemurnian HBsAg akhirnya diperoleh partikel HBsAg murni (bentuk bulat dan tubular) tanpa partikel Dane. Setelah melalui suatu proses inaktifasi, HBsAg murni tersebut siap dipakai sebagai imunogen. Vaksin generasi kedua dihasilkan melalui proses rekayasa genetik, disebut *DNA-Recombinant vaccines*. Prinsip pembuatannya adalah sebagai berikut. Pertama, dilakukan seleksi fraksi genome VHB yang mengkode sintesa HBsAg (gena S atau gena S + pre-S). Fraksi ini kemudian ditanam kedalam sel host, yang bisa berupa bakteri (*Escherichia coli*), virus (*Vaccinia virus*), sel ragi (*Sacharomyces cerevisiae*), sel mammalia (*Chinese hamster ovary cell*) dan lain sebagainya. Sel-sel host tersebut kemudian akan menghasilkan protein HBsAg spesifik sesuai dengan potongan genome VHB yang ditanamkan. Setelah itu dilakukan pemurnian HBsAg yang dihasilkan, untuk memisahkan protein HBsAg dari protein host.

Dilihat dari kandungan antigen pre-S, terdapat dua macam vaksin hepatitis B yaitu vaksin yang mengandung antigen pre-S dan vaksin tanpa antigen pre-S. Ada atau tidaknya antigen pre-S pada vaksin generasi pertama tergantung pada sumber HBsAg yang dipakai dan cara pemurnian serta cara inaktifasi.

Untuk vaksin generasi kedua adanya antigen pre-S tergantung dari potongan genome VHB yang ditanam dan cara pemurniannya. Agar supaya vaksin tetap mengandung antigen pre-S, perlu dihindari adanya perlakuan yang bisa merusak antigen tersebut seperti perlakuan enzimatik atau pemanasan yang berlebihan. Diduga liopilisasi, variasi pH yang besar dan denaturasi oleh kemikalia juga berpengaruh terhadap protein pre-S (Neurath *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 1986).

Vaksinasi hepatitis B biasanya diberikan tiga kali pada bulan 0, 1 dan 6 (MSD) atau 0, 1 dan 2 (Cheil Sugar & Co.); tergantung dari merk vaksin yang dipakai. Demikian juga dosis yang dipakai; biasanya untuk dewasa diberikan dosis 20 mcg (MSD), 5 mcg (Pasteur) dan 3 mcg (Cheil Sugar & Co.); untuk anak-anak diberikan setengah dosis dewasa. Vaksin asal plasma buatan Pasteur dan Cheil Sugar & Co. merupakan vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S (pre-S2 dan pre-S1). Saat ini Pasteur dan SKF juga sudah memproduksi vaksin rekayasa genetik yang mengandung antigen pre-S2. Dari penelitian para ahli terdapat petunjuk bahwa adanya antigen pre-S2 dapat meningkatkan imunogenisitas vaksin.

Peranan Antigen Pre-S Dalam Vaksin

Efek potensiasi respon imun oleh antigen pre-S2 dan dominannya antigen pre-S1 pada partikel VHB merupakan indikasi kuat bahwa vaksin hepatitis B harus mengandung antigen pre-S (Howard *et al.*, 1988). Menurut Neurath *et al.* (1985) dan Itoh *et al.* (1986) antibodi terhadap antigen pre-S2 merupakan antibodi yang dapat menetralsir VHB. Penelitian invi-

tro menunjukkan bahwa anti-pre-S1 dapat menghalangi menempelnya VHB pada sel hepatoma HepG2. Hasil penelitiannya juga menunjukkan bahwa chimpanzee yang disuntik dengan VHB dicampur dengan anti-pre-S2 ternyata terhindar dari infeksi, sedang yang disuntik VHB saja menderita infeksi. Pada percobaan dengan mencit, HBsAg yang mengandung antigen pre-S2 menimbulkan respon anti-HBs yang lebih tinggi dibanding HBsAg tanpa pre-S2. HBsAg dengan antigen pre-S2 juga dapat menimbulkan respon anti-HBs (anti-S) pada mencit yang tidak bereaksi terhadap HBsAg tanpa antigen pre-S (Millich *et al.*, 1985a & 1985b; Neurath *et al.*, 1986; Tiollais *et al.*, 1986).

Percobaan klinik telah dilakukan untuk membedakan imunogenisitas dan efektifitas vaksin hepatitis B dengan dan tanpa antigen pre-S. Hasil penelitian imunogenisitas menunjukkan bahwa anti-pre-S muncul lebih cepat dibanding anti-S; satu bulan setelah vaksinasi pertama anti-pre-S telah muncul pada 57% dari individu yang mendapat vaksinasi, sedang anti-S hanya terdapat pada 18% (Petre & Peetermans, 1990). Tidak semua individu yang mendapat vaksinasi hepatitis B akan menunjukkan respon anti-HBs. Pada individu dewasa di daerah pedesaan di Zambia terdapat 18% individu yang tidak memberi respon anti-HBs setelah 3 kali suntikan dengan vaksin hepatitis B asal plasma (Tabor *et al.*, 1990). Neurath *et al.* (1986) melaporkan adanya individu yang tidak menunjukkan respon anti-HBs tetapi bereaksi terhadap antigen pre-S. Penelitian tersebut menunjukkan, satu bulan setelah vaksinasi ketiga (Hevac B, Pasteur) terdapat 8,5% individu yang tidak menunjukkan respon anti-HBs, sedang anti-pre-S2 tidak muncul

hanya pada 1,7% dari seluruh individu yang mendapat vaksinasi. Menurut Stevens *et al.* (1984), efektifitas vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S juga lebih unggul dibanding vaksin hepatitis B tanpa antigen pre-S. Penelitian pada penderita hemodialisis menunjukkan bahwa vaksin hepatitis B dengan antigen pre-S mempunyai daya lindung yang jauh lebih besar dibanding vaksin tanpa antigen pre-S.

I. Antibodi Terhadap HBsAg (anti-HBs).

Anti-HBs adalah antibodi spesifik terhadap HBsAg, umumnya merupakan antibodi dari klas IgG; muncul beberapa waktu setelah kontak dengan HBsAg baik dalam bentuk vaksinasi maupun setelah infeksi dengan VHB (Lander *et al.*, 1972 cit. Holland, 1985). Pemeriksaan anti-HBs yang selama ini dilakukan adalah merupakan pemeriksaan antibodi terhadap determinan S dan determinan pre-S dari HBsAg (total anti-S). Anti-pre-S merupakan antibodi terhadap determinan pre-S dari HBsAg, terdiri atas anti-pre-S2 dan anti-pre-S1.

Anti-HBs biasanya muncul dalam beberapa minggu setelah HBsAg menghilang dari sirkulasi; jadi dalam awal fase rekonesen infeksi VHB akut. Namun pada beberapa kasus anti HBs mungkin tidak muncul walaupun telah beberapa bulan sembuh dari infeksi VHB. Jika anti-HBs tidak muncul setelah 1 tahun sembuh dari infeksi VHB atau 1 bulan setelah suntikan booster vaksin Hepatitis B, biasanya untuk seterusnya juga tidak akan muncul (Hoofnagle *et al.*, 1978 cit. Holland, 1985; McMahon,

1981). Anti-pre-S biasanya sudah muncul dalam darah pada fase awal hepatitis akut, sering kali masih dalam phase hepatitis B surface antigenemia (Eddleston, 1988).

Jika kadar anti-HBs yang timbul mencapai paling sedikit 10 mIU/cc maka individu akan imun terhadap infeksi VHB. Sekali telah diproduksi tubuh, biasanya anti-HBs akan menetap sampai bertahun-tahun (Holland, 1985). Menurut Milich (1985) dan Mayumi (1986), kualitas dan kuantitas anti-HBs antara lain juga tergantung pada kualitas HBsAg yang masuk kedalam tubuh. HBsAg yang mengandung protein yang dikode oleh region pre-S memberikan respon anti-HBs yang lebih baik dalam kualitas maupun kuantitasnya. Hal ini bisa terjadi karena sel T helper untuk protein HBsAg yang dikode oleh gene S dan regio pre -S adalah sama; sehingga adanya protein yang di kode oleh regio pre-S akan memperkuat respon sel T helper terhadap protein HBsAg yang dikode oleh gena S. Mayumi (1986) melaporkan bahwa antibodi terhadap protein HBsAg yang di kode oleh regio pre-S ternyata juga protektif terhadap reinfeksi VHB.

1. Respon Anti-HBs Pada Vaksinasi Hepatitis B

Selama ini telah ratusan ribu individu mendapat vaksinasi hepatitis B; hasilnya menunjukkan bahwa vaksinasi hepatitis B aman dan protektif. Penelitian di Amerika Serikat terhadap sekitar 500 sampel menunjukkan bahwa vaksinasi hepatitis B, imunogenik dan efektif. Dalam satu bulan setelah suntikan pertama, anti-HBs muncul pada 31,4%; dalam dua bulan angka tersebut naik menjadi 77%, dalam tiga bulan menjadi 87%, dan dalam 6 bulan (sebelum suntikan ketiga) naik menjadi

90%. Suntikan booster menaikkan angka respon anti-HBs menjadi 96%, setelah sembilan bulan titer anti-HBs mulai menurun. Terdapat 4% individu yang tidak memberi respon vaksinasi dan 5% yang responnya lemah. Kelompok yang mendapat vaksinasi dan kelompok kontrol dikuti selama 18 bulan untuk mengetahui *attack rate* infeksi VHB. Pada kelompok kontrol terdapat 35% individu yang terinfeksi VHB, sedang pada kelompok yang mendapat vaksin angka tersebut hanya 7,6% (Szmuness *et al.*, 1980). Penelitian serupa pada anak-anak di Senegal juga menunjukkan efektifitas vaksinasi hepatitis B di daerah endemis hepatitis B (Maupas *et al.*, 1981).

Penelitian klinik juga menunjukkan bahwa vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S lebih unggul dibanding vaksin yang tidak mengandung antigen pre-S. Stevens *et al.* (1984) membandingkan efektifitas vaksinasi hepatitis B pada penderita yang mendapat hemodialisis. Kelompok pertama mendapat dosis 40 mcg vaksin buatan MSD yang tidak mengandung antigen pre-S dan kelompok kedua mendapat 5 mcg vaksin buatan Pasteur yang mengandung antigen pre-S. Ternyata *HBV infection attack rate* pada kelompok yang mendapat vaksin MSD tidak berbeda dengan kelompok kontrol. Sebaliknya *attack rate* pada kelompok yang mendapat vaksin Pasteur jauh lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Penemuan klinis ini memperlihatkan adanya perbedaan kualitas antigenik antara kedua vaksin tersebut, akibat perbedaan kandungan antigen pre-S.

2. Respon Anti-HBs Pada Percobaan Binatang

Rutgers *et al.* (1988) mendapatkan adanya perbedaan respon anti-HBs pada mencit yang disuntik HBsAg (0,8 mcg/0,1 ml) tanpa antigen pre-S (major protein) dan HBsAg yang mengandung antigen pre-S (middle protein). Dalam penelitian tersebut Rutgers melakukan imunisasi satu kali pada dua kelompok mencit Balb/c menggunakan imunogen *major protein* dan *middle protein*, darah diambil 30 hari kemudian. Mencit yang disuntik *middle protein* menunjukkan titer anti-S yang lebih tinggi dibanding mencit yang disuntik *major protein*. Pada kelompok mencit yang disuntik *middle protein*, selain anti-S muncul pula anti-pre-S2. Heerman *et al.* (1987) melakukan penelitian serupa menggunakan virion, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat sebagai imunogen. Tiga kelompok mencit Balb/c masing-masing diimunisasi dengan salah satu antigen tersebut (0,8 mcg/0,1 ml) pada hari ke 1 dan hari ke 30; darah diambil pada hari ke 40. Tidak ada perbedaan respon anti-HBs pada ketiga kelompok mencit tersebut. Selanjutnya Gerlich *et al.* (1988) juga melakukan penelitian pada mencit menggunakan imunogen partikel Dane, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat. Mencit Balb/c disuntik dengan imunogen tersebut (1 mcg/0,1 ml) pada hari 1 dan 30 dan pengambilan darah dilakukan 10 hari setelah suntikan kedua. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata total anti-HBs antara mencit yang disuntik HBsAg virion, HBsAg tubuler maupun yang disuntik HBsAg bulat; tetapi titer anti-pre-S pada mencit yang disuntik virion dan HBsAg tubuler lebih tinggi dibanding mencit yang disuntik HBsAg bulat. Tidak adanya perbedaan titer anti-HBs tersebut

mungkin disebabkan karena dalam penelitian tersebut, Heerman dan Gerlich masing-masing menggunakan tiga macam antigen (HBsAg virion, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat) yang mengandung antigen pre-S2 yang tidak berbeda.

Coursaget *et al.* (1985) membandingkan imunogenisitas dua batch vaksin hepatitis B buatan Institute Pasteur pada mencit. Satu kelompok mencit disuntik 0,5 mcg vaksin (intraperitoneal) yang tidak mengandung antigen pre-S dan kelompok yang lain diberi vaksin yang mengandung antigen pre-S. Pengambilan darah dilakukan tiap dua minggu, sampai minggu ke delapan. Pemeriksaan respon anti-HBs (RIA) menunjukkan bahwa mencit yang disuntik dengan vaksin yang mengandung antigen pre-S mempunyai titer anti-HBs yang lebih tinggi dibanding mencit yang disuntik vaksin tanpa antigen pre-S. Perbedaan tersebut mulai tampak pada minggu ke 4, titernya mencapai maksimum pada minggu ke 6-8. Hasil penelitian tersebut memberi petunjuk bahwa vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S lebih unggul dibanding yang tidak mengandung antigen pre-S.

3. Heterogenitas Anti-HBs

HBsAg mempunyai determinan antigenik umum a dan determinan subtipik d/y dan w/r; ada tiga macam antibodi monoklonal untuk determinan a dan masing-masing satu antibodi monoklonal untuk determinan d dan y (Peterson *et al.*, 1984). Menurut Jilg *et al.* (1984), pada individu yang mendapat vaksinasi hepatitis B terutama akan muncul anti-HBs terhadap determinan umum a dan subdeterminan d/y. Satu bulan setelah suntikan ketiga dengan vaksin sub tipe adw atau ayw, sebagian

besar anti-HBs yang muncul adalah anti-HBs/a (50%) dan anti-HBs/d atau anti-HBs/y (49%); sedikit sekali didapatkan anti-HBs/w. Demikian juga pada percobaan dengan chimpanzee, anti-HBs yang muncul sebagian besar adalah anti-HBs/a. Titer anti-HBs/a didapatkan lebih tinggi dibanding anti-HBs/d atau anti-HBs/y, sangat sedikit dijumpai anti-HBs/w (Hoofnagle *et al.*, 1977). Millich *et al.* (1983) melaporkan bahwa ada tiga golongan mencit Balb/c ditinjau dari responnya terhadap suntikan HBsAg, yaitu respon kuat, sedang dan yang tidak menunjukkan respon. Mencit yang tidak bereaksi terhadap epitope a biasanya juga tidak bereaksi terhadap epitope d/y.

Menurut Millich *et al.* (1983), respon anti-HBs pada mencit dipengaruhi oleh sub tipe HBsAg, skedul imunisasi dan waktu pengambilan darah. Pada mencit yang disuntik HBsAg, respon terhadap epitope d/y biasanya muncul lebih dahulu 1-2 minggu sebelum respon terhadap epitope a. Sepuluh hari setelah vaksinasi pertama, titer anti-HBs/d atau anti-HBs/y sudah tinggi tetapi anti-HBs/a belum terdeteksi. Pada hari ke 24 setelah vaksinasi pertama, titer anti-HBs/a mencapai 75% dari titer anti-HBs/d atau anti-HBs/y dan pada hari ke 14 setelah vaksinasi kedua titernya sama dengan titer anti-HBs/d atau anti-HBs/y. Selain itu dilaporkan juga adanya heterogenitas anti-HBs/a, dijumpai ada tiga macam anti-HBs/a yaitu anti-HBs/a1, a2 dan a3.

J. Ultrasentrifugasi

Ada dua macam teknik sentrifugasi yaitu sentrifugasi analitik dan sentrifugasi preparatif. Sentrifugasi analitik ditujukan untuk mempelajari partikel/molekul yang sudah murni, terutama untuk mempelajari karakteristik-karakteristik sedimentasi dari molekul biologik dan struktur molekuler. Cara ini hanya membutuhkan sedikit bahan murni, menggunakan rotor dan sistem deteksi khusus untuk secara terus menerus memonitor proses sedimentasi bahan tersebut dalam gaya sentrifugal. Sebaliknya sentrifugasi preparatif merupakan pemisahan, isolasi serta pemurnian partikel/molekul yang belum murni (seperti sel utuh, organela seluler, ribosome dan virus) untuk diteliti atau digunakan lebih lanjut.

Prinsip dasar teori sedimentasi berasal dari Hukum Stokes (Griffit, 1983) yaitu :

$$v = \frac{d^2 (P_p - P_1)}{18 U} \times g$$

dimana :

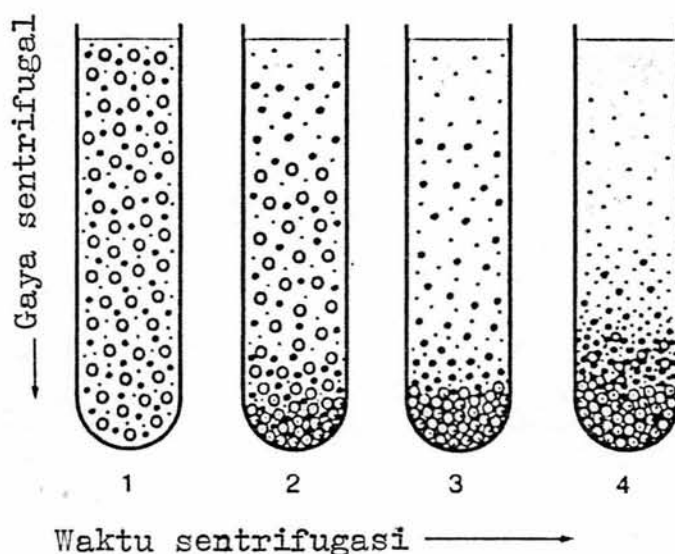
v = Kecepatan sedimentasi	P_1 = densitas cairan
d = diameter partikel	U = viskositas medium
P_p = densitas partikel	g = gaya gravitasi

Dari persamaan Stokes tersebut terlihat bahwa kecepatan sedimentasi adalah : sebanding dengan besarnya partikel, sebanding dengan perbedaan antara densitas partikel dengan densitas cairan (medium), nol jika densitas partikel sama dengan densitas medium.

Menurut Griffit (1983) ada dua cara pemisahan dalam ultrasentrifugasi preparatif yaitu :

1. Differential centrifugation/pelleting :

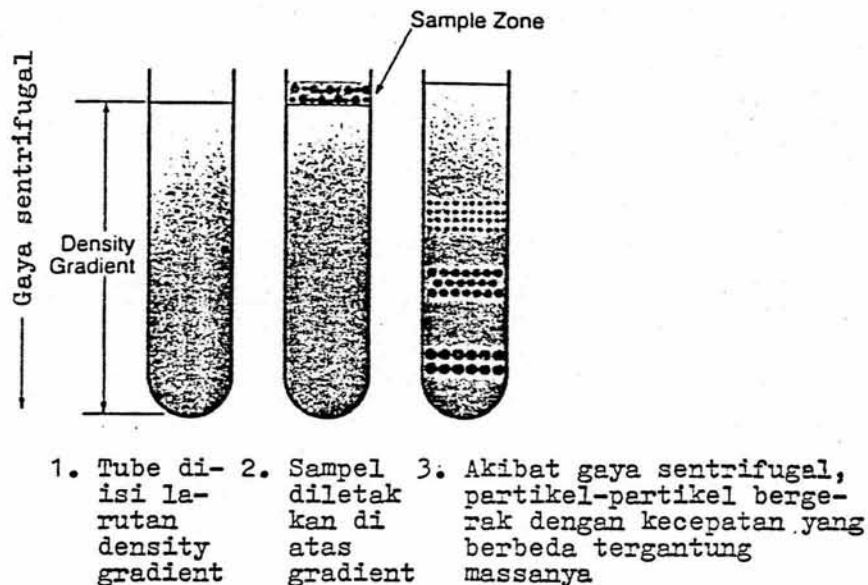
Disini mula-mula tube diisi larutan sampel yang merupakan campuran yang *uniform*. Dengan sentrifugasi akan didapatkan 2 fraksi yang terpisah yaitu pellet yang berisi bahan-bahan yang tersedimentasi dan larutan supernatan dari bahan-bahan yang tidak tersedimentasi. Komponen-komponen dalam larutan bisa mengendap dalam pellet atau dalam supernatan dan pellet; tergantung dari besarnya partikel dan atau kondisi sentrifugasi.



Gambar 9. Differential centrifugation
(Sumber : Griffit, 1983)

2. Density gradient centrifugation

Dengan cara ini dapat dipisahkan secara sempurna berbagai komponen dalam suatu larutan. Mula-mula tube diisi dengan sejumlah larutan yang sudah dipersiapkan yang mempunyai densitas yang berbeda-beda; dengan densitas yang makin tinggi kearah ujung tube. Cairan *density gradient* yang dipakai merupakan larutan dari zat terlarut dengan BM rendah, dimana partikel sampel dapat dilarutkan.



Gambar 10. Density gradient centrifugation

(Sumber : Griffit, 1988)

Ada dua cara pemisahan pada density gradient centrifugation yaitu :

2a. Teknik isopiknik :

Disini kolom *density gradient* meliputi seluruh kisaran densitas partikel sampel. Dengan ultrasentrifugasi masing-masing sampel akan mengendap hanya pada posisi dimana den-

sitas partikel sama dengan densitas gradien, dan akan tetap bertahan pada posisi tersebut tanpa tergantung waktu.

2b. Teknik rate zonal :

Disini larutan partikel sampel ditempatkan pada kolom gradien yang telah dibentuk terlebih dahulu, dimana larutan sampel menciptakan gradien negatif pada puncak kolom gradien. Dibawah tekanan sentrifugasi partikel partikel akan mulai mengendap menembus zona-zona kolom gradien yang terpisah tersebut. Masing-masing zona berisi partikel tertentu sesuai dengan kecepatan sedimentasinya.

K. Pemurnian HBsAg

Berdasarkan sifat-sifat fisik dan biokemik, HBsAg dapat dimurnikan dengan berbagai cara seperti presipitasi dengan *polyethylen glycol* (PEG), *density gradient centrifugation* dan dengan cara *affinity chromatography*. Dengan cara-cara tersebut dapat dihasilkan HBsAg murni dengan tingkat kemurnian tinggi. Menurut WHO (1985), tingkat kemurnian HBsAg untuk vaksin pada manusia paling rendah adalah 95%. Ini berarti HBsAg paling sedikit merupakan 95% dari total protein dalam vaksin.

1. Presipitasi HBsAg dengan *polyethylene glycol* (PEG)

Menurut Polson (1964), PEG dengan berat molekul 6000 merupakan presipitan yang paling memadai; karena penanganannya mudah serta tidak menyebabkan denaturasi protein. Pada pema-

kaiannya hanya perlu mengontrol pH, sedang temperatur dan konsentrasi ion larutan tidak perlu dikontrol. Selain itu presipitasi dengan PEG adalah *reversible* dan polimer PEG dapat dipisahkan dengan mudah dengan cara filtrasi gel. Menurut Laurent (1963, cit. Chesebro & Svehag, 1968), makin besar molekul protein makin sedikit PEG yang diperlukan untuk mengendapkannya.

Protein plasma terutama terdiri atas albumin, globulin dan fibrinogen. PEG akan mengendapkan globulin alfa bersama-sama HBsAg, pada konsentrasi PEG 6000 6%-8% (Polson, 1964). Menurut Vnek & Prince (1976) pada pH 4.5, fibrinogen dan globulin alfa 1 akan mengendap pada konsentrasi PEG 2%; globulin alfa 2, globulin beta dan HBsAg akan mengendap pada konsentrasi PEG 4,5%; sedang albumin tidak mengendap pada konsentrasi PEG sampai dengan 4,5%. Atas dasar sifat tersebut Iizuka (komunikasi pribadi) mengembangkan cara untuk mengendapkan HBsAg melalui 2 tahap. Pertama, plasma yang mengandung HBsAg diberi larutan 50% (w/v) PEG 6000 pada pH 4.5 sehingga konsentrasi akhir PEG menjadi 1,3%. Dibiarkan selama 3-6 jam pada temperatur 4 derajat C, sehingga terjadi endapan yang terutama terdiri atas fibrinogen. Supernatan diambil dan ditambahkan lagi larutan 50% (w/v) PEG 6000 sampai konsentrasi akhir PEG menjadi 4,5%. Dibiarkan semalam pada temperatur 4 derajat C, kemudian di sentrifus supaya endapan sempurna dan supernatan dibuang. Endapan yang terutama terdiri atas HBsAg, globulin alfa dan globulin beta, dilarutkan lagi dalam akuades pada pH 7.0. HBsAg dalam larutan ini kemudian siap untuk dimurnikan lebih lanjut dengan cara ultrasentrifugasi *density gradient*.

2. Pemurnian HBsAg Dengan Ultrasentrifugasi

Untuk keperluan pemurnian HBsAg skala besar dipakai rotor yang mempunyai volume besar yaitu zonal rotor; yang merupakan rotor berbentuk mangkuk dimana volumenya ditentukan oleh luas bagian rotor berdasarkan jauhnya jarak dari pusat rotasi. Volume zonal rotor ini dapat mencapai 1600 cc, sehingga cukup banyak sampel plasma yang dapat ditampung. Pemurnian HBsAg menggunakan *zonal ultracentrifugation* dilakukan dalam 2 fase yaitu *bouyant density zonal ultracentrifugation* dan *rate zonal ultracentrifugation* (Mishiro et al, 1980).

2a. *Bouyant density zonal ultracentrifugation* :

Bouyant density zonal ultracentrifugation adalah termasuk pemisahan isopiknik, merupakan teknik untuk memisahkan partikel-partikel berdasarkan pada baik koefisien floatasi maupun densitas partikel. Pada metode ini sampel diatur densitasnya (dengan menambah KBr) menjadi 1,3 g/ml; pemurnian tipe ini memungkinkan penggunaan sampel dengan volume besar (850 cc). Pada keadaan rotor berputar 3000 rpm larutan sampel dimasukkan kedalam rotor; demikian pula dengan larutan gradien lain yang diperlukan. Kemudian rotor diputar pada 28000 rpm selama 16 jam, setelah itu isi rotor dikeluarkan dalam fraksi-fraksi; dalam keadaan rotor berputar pada 3000 rpm. Fraksi-fraksi yang banyak mengandung HBsAg (densitas antara 1,7 g/ml - 1,22 g/ml) dikumpulkan dan didialisis untuk membersihkan KBr, selanjutnya dikonsentrasikan dengan menggunakan tekanan negatif supaya volumenya menjadi kecil, untuk kemudian dipakai sebagai sampel

dalam fase pemurnian berikutnya. Pada fase ini HBsAg dipisahkan dari protein plasma yang lain (Mulyanto, 1984; Prince *et al.*, 1984).

2b. Rate zonal ultracentrifugation :

Cara pemisahan ini termasuk teknik rate zonal yang merupakan teknik pemisahan komponen-komponen berdasarkan pada kecepatan sedimentasi; dengan demikian akan tergantung pada besar, bentuk dan densitas partikel. Pada metode ini sampel diletakkan diatas kolom *density gradient* antara 1,15 - 1,30 g/ml yang telah dipersiapkan sebelumnya. Sampel yang dipakai pada fase ini sangat sedikit yaitu antara 50 - 100 ml, merupakan hasil pemurnian fase sebelumnya. Karena *density gradientnya* landai maka daya pisahnya besar sehingga dapat memisahkan HBsAg dari komponen-komponen plasma lain yang densitasnya tidak begitu berbeda dengan HBsAg. Pada fase ini sampel dan *density gradient* juga dimasukkan dan dikeluarkan dari rotor dalam keadaan rotor berputar pada 3000 rpm; ultrasentrifugasi dilakukan selama 16 jam pada kecepatan 26000 rpm. Lipoprotein plasma akan dipisahkan dari HBsAg pada fase pemurnian ini, sehingga pada akhir pemurnian dapat diperoleh HBsAg murni; dengan tingkat kemurnian lebih dari 95% (Anonim, 1987). Untuk mengevaluasi hasil dari masing-masing langkah pemurnian, diperiksa titer HBsAg (R-PHA), densitas larutan, optical density pada daerah 280 nm, OD290 nm, scanning OD200-320 nm, serta morfologi HBsAg dengan mikroskop elektron.

Menurut Prince *et al.* (1984) HBsAg murni hasil pemurnian tersebut dinilai baik bila : 1. Pada *optical density scanning* (200 nm- 320 nm) terlihat adanya *characteristic shoulder* pada daerah 290 nm. 2. Tidak mengandung protein-protein lain seperti yang ditunjukkan melalui pemeriksaan *agar gel diffusion* dan *sodium dodecyl sulphate/ polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS/ PAGE). 3. Perbandingan total protein yang diukur dengan OD280 ($E_{280}^{0,1\%} = 3,73$) dan dengan antigenisitas 1 cm

HBsAg yang diukur dengan quantitative RIA terhadap standard HBsAg dari WHO adalah 1:1 \pm batas yang bisa diterima dari variabilitas tes. Cara penilaian tersebut ketelitiannya tinggi, tetapi membutuhkan alat-alat yang lengkap dan mahal serta memakan waktu lama. Menurut Mayumi (komunikasi pribadi) untuk menilai kemurnian relatif HBsAg dari berbagai hasil pemurnian dapat dipakai cara yang lebih praktis yaitu dengan menghitung aktivitas spesifik HBsAg. Aktivitas spesifik HBsAg dihitung dengan membagi titer (nilai pengenceran) HBsAg (RPHA) dengan nilai Optical density 280 nm. Dengan cara ini akan lebih mudah untuk membandingkan tingkat kemurnian HBsAg dari berbagai hasil pemurnian yang akan digunakan untuk pembuatan sel PHA untuk mendeteksi anti-HBs. Mulyanto (1984) mendapatkan HBsAg murni antara 30 - 49 mg/liter dari plasma HBsAg dan HBeAg positif dengan aktivitas spesifik berkisar antara 40.000 - 162.000. Oda (komunikasi pribadi) mendapatkan HBsAg murni dari plasma HBsAg dan HBeAg positif dengan aktivitas spesifik antara 58.000 - 372.000. Menurut Prince *et al* (1984) dan Gerety & Tabor (1983) selama proses pemurnian VHB dengan ultrasentrifugasi, VHB dan virus-virus lain yang mungkin ada akan mengalami inaktivasi. Menurut Prince *et al* (1984) inaktivasi selama proses pemurnian ini dapat mencapai 20% dari seluruh proses inaktivasi dalam pembuatan vaksin Hepatitis B.

III. MATERI DAN METODA

1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hepatitis Bumi Gora Nusa Tenggara Barat; waktu yang digunakan adalah 18 bulan mulai Februari 1990 s/d Juli 1991.

2. Materi Penelitian

a. Darah donor dengan HBsAg positif

Diperoleh dari Dinas Transfusi Darah PMI DKI Jakarta dan Dinas Transfusi Darah PMI Surabaya.

b. Eritrosit domba

Digunakan eritrosit domba yang telah diawetkan dengan glutaraldehyde menurut cara Hirata & Brandriss (1968).

c. Binatang percobaan

Digunakan mencit putih (Balb/c mice) betina, berumur 16 minggu, yang diperoleh dari Perum Bio Farma, Bandung.

3. Bahan dan Alat

Alat-alat:

a. Ultracentrifuge (HITACHI 70P) dengan zonal rotor RPZ 35 T.

b. UV Visible Spectrophotometer (Varian, DMF 100S).

c. Large capacity refrigerated centrifuge (HITACHI SCR7B).

d. Gamma counter (ANSR, Abbot) dengan Qwikwasher (Abbott).

e. Electron microscope (Akashi 002A).

f. Affinity column chromatography.

g. Microplate tipe V, microdiluter dan dropper 0,025 cc.

h. Botol gelas 200 cc, gelas ukur 50 cc, Beaker Glass 1 L, 2 L; pipet mikro 0,100 cc & 1 cc.

Bahan :

- a. Larutan PBS 0,15 M (pH 7,2)
- b. Larutan bufer Tris-HCl 0,01M (pH 7,5)
- c. Larutan Alsever pH 6,1
- d. Larutan Garam Fisiologis 0,85%
- e. Bufer PHA yaitu larutan PBS 0,15 M (pH 7,2) yang mengandung 1% protein serum kuda dan 0,5% protein serum kelinci.
- f. Larutan glutaraldehyde (Junsei Co.) 5%, dalam PBS.
- g. Reagen diagnostik : RPHA-HBsAg (Hepatika Lab.); HBeAg/Elisa, sub tipe HBsAg/Elisa dan RPHA-preS2 (Institute of Immunology Co., Tokyo); RIA-anti-HBs (Abbott Lab.)
- h. Kimikalia : Sucrose (Zigma); KBr, Al(OH)₃, Tris, HCl, Na₂HPO₄.12H₂O dan KH₂PO₄ (Merck); Tannic acid (Junsei Chem.,Co.), PEG 6000 (Wako Pure Chem. Industries Ltd., Japan).
- i. Serum kuda normal dan Serum kelinci normal (Zigma).

4. Metoda Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu Tahap I merupakan survei seroepidemiologik analitik yang bersifat penelitian *cross sectional* dan Penelitian Tahap II merupakan penelitian eksperimental.

Penelitian Tahap I

Survei seroepidemiologik ini mempelajari perbedaan frekuensi HBeAg, frekuensi antigen pre-S1 dan titer antigen pre-S2 pada darah donor pengidap HBsAg menurut sub tipe utama HBsAg (adw, adr, ayw), dengan model pendekatan atau observasi sekaligus pada satu saat. Merupakan penelitian untuk menguji hipotesis 1, dan 2.

Pengidap HBsAg dalam penelitian ini adalah donor darah tanpa keluhan penyakit hati yang pada pemeriksaan serologik menunjukkan HBsAg positif dengan titer HBsAg lebih dari 1:128 (2^7) dan memenuhi kriteria sebagai donor. Kriteria donor adalah individu berumur 17 - 65 tahun, berat badan \geq 45 Kg, HB \geq 12 g% dan tidak dalam keadaan sakit menurut pengamatan petugas. Dalam penelitian ini hanya digunakan darah donor pria.

Cara Penelitian

Darah donor HBsAg positif diperoleh dari DTD PMI DKI Jakarta dan DTD PMI Surabaya antara Juli 1988 sampai Juni 1990. Darah tersebut dipisahkan plasmanya dan diberi pengawet Sodium azide (konsentrasi akhir 0,2%). Masing-masing plasma donor diambil 6 cc dibagi dalam 2 tube dan disimpan pada -20 derajat C sebelum diperiksa. Setelah terkumpul cukup banyak, kemudian dilakukan pemeriksaan titer HBsAg dan titer antigen pre-S2, sub tipe HBsAg, HBeAg dan antigen pre-S1. Sebagian dari sampel tersebut (50%) dikirim ke Institute of Immunology di Tokyo untuk pemeriksaan silang. Plasma dengan titer HBsAg

$> 2^{10}$, HBeAg(+) pada pengenceran 100 kali dan titer antigen pre-S2 $> 2^6$ dikumpulkan menjadi satu menurut sub tipe HBsAg. Kumpulan plasma HBsAg positif yang terdiri dari sub tipe adw, adr dan ayw merupakan bahan untuk penelitian tahap II.

Cara pemeriksaan laboratorium (lihat lampiran 6) :

HBsAg : Reverse passive hemagglutination (RPHA)

Antigen pre-S2: RPHA

Antigen pre-S1: Enzyme-link immunosorbent assay (Elisa)

Sub tipe HBsAg : Elisa

HBeAg : Elisa

Pengamatan :

Perbedaan imunogenisitas serum pengidap HBsAg menurut sub tipe diukur dengan membandingkan kandungan antigen pre-S2 (titer S2/titer S) serta frekuensi antigen pre-S1 antara pengidap sub tipe adw, adr dan ayw. Pengidap HBsAg yang dibandingkan adalah pengidap HBsAg dengan HBeAg titer tinggi (sebagai parameter replikasi aktif VHB) serta tidak ada kerusakan antigen pre-S2 selama penyimpanan serum. Kriteria sampel yang dipakai adalah serum dengan titer HBsAg $> 2^{10}$, HBeAg(+) pada pengenceran 100 kali dan titer antigen pre-S2 $> 2^6$.

Perbedaan infektifitas serum pengidap HBsAg menurut sub tipe diukur dengan membandingkan frekuensi HBeAg antara pengidap sub tipe adw, adr dan ayw, pada titer HBsAg yang sama.

Analisa Statistik

Perbedaan kandungan antigen pre-S2 antara sub tipe adw, adr dan ayw diuji dengan uji t; sedang perbedaan frekuensi antigen pre-S1 dan perbedaan frekuensi HBeAg diuji dengan uji Kai kuadrat.

Penelitian Tahap II

Penelitian Tahap II terdiri atas Pengukuran Antigenisitas dan Imunogenisitas HBsAg murni menurut sub tipe, untuk menguji hipotesis 3.

Bila terdapat perbedaan antigenisitas (kandungan antigen pre-S2) antara pengidap HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw, perbedaan tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan kandungan antigen pre-S2 pada partikel Dane, partikel HBsAg (partikel bulat dan partikel tubuler). Untuk mengetahui apakah memang terdapat perbedaan antigenisitas antara partikel HBsAg murni dari berbagai sub tipe, maka partikel HBsAg harus dipisahkan dari partikel Dane dan komponen serum yang lain.

Cara Pemurnian HBsAg

HBsAg murni yang dipakai dalam penelitian ini merupakan HBsAg (sub tipe adw, adr dan ayw) hasil pemurnian dengan cara *sucrose rate zonal ultracentrifugation*. Bahannya berasal dari 6 liter plasma HBsAg-positif titer tinggi pada Penelitian Tahap I, setelah melalui presipitasi bertahap dengan PEG serta serangkaian ultrasentrifugasi meliputi 2 kali *KBr buoyant density* dan *KBr rate zonal ultracentrifugation*.

Presipitasi HBsAg dengan PEG dilakukan menurut cara yang lazim, dengan modifikasi Iizuka; sedang pemurnian HBsAg dengan cara ultrasentrifugasi zonal dilakukan menurut cara yang dimodifikasi Mishiro *et al* (1980). Terhadap plasma dari tiap sub tipe HBsAg dilakukan 6 kali *sucrose rate zonal ultracentrifugation*, sehingga diperoleh 6 lot HBsAg murni untuk tiap sub tipe (lihat lampiran 1).

Evaluasi Kemurnian HBsAg.

Untuk mengevaluasi kemurnian HBsAg hasil pemurnian dengan ultrasentrifugasi dilakukan pemeriksaan *optical density scanning* hasil pemurnian tiap tahap, pengukuran aktivitas spesifik HBsAg, pemeriksaan elektroforesis gel (SDS PAGE) dan pemeriksaan elektronmikroskopik.

Pemeriksaan optical density scanning

Pemeriksaan ini dilakukan dengan membandingkan *optical density scanning* (200-320 nm) hasil pemurnian HBsAg tiap tahap terhadap materi awal (plasma awal). Bila pemurnian berhasil baik maka akan muncul *characteristic shoulder* pada daerah 290 nm.

Pengukuran aktivitas spesifik HBsAg

Aktivitas spesifik HBsAg, adalah angka yang menunjukkan antigenisitas HBsAg per satuan berat protein. Aktivitas spesifik HBsAg dihitung dengan membagi titer hemaglutinasi HBsAg dengan kadar protein total. Kadar protein total ditentukan secara spektrofotometrik, dengan pedoman : absorben (pada gelombang 280 nm) = 3,73 mengandung 1 mg protein HBsAg (Vyas *et al*, 1972).

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{titer HBsAg}}{\text{OD 280 nm}}$$

Pemeriksaan SDS PAGE

Pemeriksaan sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis (SDS PAGE) dilakukan di Institute of Immunology, Tokyo. Pada prinsipnya cara pemeriksaan adalah sebagai berikut.

Sepuluh mikrogram HBsAg di inkubasikan pada 100 derajat C selama 5 menit dalam bufer yang mengandung 1% (v/v) sodium dodecyl sulfat (SDS) dan 1% (v/v) 2 mercaptoethanol. Kemudian bersama-sama standard berat molekul dilakukan elektroforesis dalam *gradient (10%-20%) polyacrylamide gel* dengan kondisi aliran listrik 60mA selama 45 menit, menggunakan alat (Hoeffer Scientific Instrument, San Francisco) dan cara yang lazim. Setelah elektroforesis, gel dicat dengan *Coomassie Brilliant Blue*.

Pemeriksaan Elektronmikroskopik Partikel HBsAg

Pemeriksaan elektron mikroskopik partikel HBsAg dilakukan di Institute of Immunology, Tokyo; menggunakan elektron mikroskop merk Akashi 002A buatan Jepang, dengan pengecatan *uranyl acetate 2%*. Pemeriksaan dilakukan pada perbesaran akhir 100.000 kali.

Pemeriksaan Antigen pre-S

HBsAg murni dari tiap-tiap sub tipe (adw, adr dan ayw) diperiksa secara kualitatif adanya antigen pre-S1 dan titer antigen pre-S2, sehingga dapat dihitung perbedaan kandungan antigen pre-S antara ketiga sub tipe.

Pengukuran Antigenisitas HBsAg

Antigenisitas HBsAg diukur dengan membandingkan kemampuan HBsAg untuk mengikat anti-HBs. Penilaian dilakukan dengan cara mengukur sensitivitas sel *passive hemagglutination* (PHA) yang dibuat dari HBsAg murni masing-masing sub tipe, untuk mendeteksi anti-HBs standar.

Cara Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 perlakuan dan 18 ulangan. Sel PHA dibuat dengan jalan menempelkan HBsAg murni pada eritrosit domba. Sebanyak 350 cc satu lot eritrosit domba (5%) yang telah diawetkan dengan glutaraldehyde (lihat lampiran 2) dibagi menjadi 54 botol masing-masing 25 cc dan dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara simple randomization. Kemudian masing-masing kelompok diberi perlakuan HBsAg murni dari satu macam sub tipe (adw/adr/ ayw) dengan cara sensitisasi seperti yang ditunjukkan Boyden (1951; lihat lampiran 3). Setelah didiamkan 4 minggu, sel PHA tersebut diperiksa sensitifitasnya untuk mendeteksi anti-HBs standar; pemeriksaan dilakukan secara duplo.

Pengamatan

Pengamatan sensitifitas (cara kerja, lihat lampiran 5) dilakukan terhadap 3 macam standar anti-HBs yaitu :

- a. Anti-HBs/a; standar ini diperoleh dari pemurnian anti-HBs/ayw dengan cara affinity chromatography, menggunakan Sepharose 4B yang ditempel dengan HBsAg/adr (lihat lampiran 4).

b. Anti-HBs/d monoklonal (Hyb. no. 423); diperoleh dari Institute of Immunology Co., Tokyo.

c. Anti-HBs/w monoklonal (Hyb. no. 4111); diperoleh dari Institute of Immunology Co., Tokyo.

Pengenceran larutan standar anti-HBs dilakukan secara serial 2 kali dalam bufer PHA dari kit. Sensitivitas diamati sebagai titer PHA, yang ditentukan oleh nilai pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan hemaglutinasi (2^n).

Pengukuran Imunogenisitas HBsAg

Imunogenisitas HBsAg dinilai dari kemampuannya untuk menimbulkan respon antibodi (anti-HBs) pada binatang percobaan (Balb/c mice) yang mendapat imunisasi HBsAg.

Cara membuat imunogen (vaksin) :

HBsAg murni sub tipe adw, adr dan ayw (6 lot untuk tiap sub tipe) hasil pemurnian dengan ultrasentrifugasi didialisis dalam larutan garam fisiologis (pro infus) untuk menghilangkan Sodium azide yang ada dalam bufer pelarut. Setelah didialisis, dilakukan sterilisasi menggunakan filter disposable berdiameter 0,45 mikron. Suspensi HBsAg tersebut dilarutkan lagi dalam larutan garam fisiologis (pro infus) sedemikian rupa sehingga kadar HBsAg menjadi 100 mcg per mililiter. Setelah itu ditambahkan Al(OH₃) sebagai adjuvant (konsentrasi akhir 1%).

Cara Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 perlakuan dan 24 ulangan. Sebanyak 96 ekor mencit (*Balb/c mice*) betina berumur 16 minggu dibagi dalam 4 kelompok secara simple randomization. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, Kelompok II diberi perlakuan suntikan HBsAg sub tipe adw, Kelompok III diberi suntikan HBsAg sub tipe adr dan Kelompok IV diberi suntikan HBsAg sub tipe ayw. Penyuntikan dilakukan pada hari ke 1 dan hari ke 30, secara intraperitoneal dengan dosis 10 mcg/0,1 cc. Pengambilan darah dilakukan 10 hari setelah suntikan kedua, secara intracardial.

Pengamatan Respon Anti-HBs

Anti-HBs diperiksa dengan metoda radio immuno assay (RIA) menggunakan kit (Ausab, Abbott) dan gamma counter merk ANSR buatan Abbott Laboratory. Pemeriksaan dilakukan pada serum yang telah diencerkan dalam *fetal calf serum*, sedemikian rupa sehingga hitungan per menit (cpm) dari sampel mendekati 10 kali rata-rata cpm Kelompok kontrol. Titer anti-HBs dinyatakan dalam RIA Unit, yang dihitung menurut cara seperti yang tertulis dalam buku petunjuk.

Analisa Statistik

Perbedaan titer relatif antigen pre-S2 antara HBsAg murni sub tipe adw, adr dan ayw diuji dengan uji t. Data yang terkumpul pada penelitian tahap II merupakan data dengan skala ratio, yaitu sensitivitas sel PHA-antiHBs dan titer anti-HBs mencit. Data yang diperoleh dianalisa dengan analisa

keragaman dan diuji dengan uji F. Uji statistik pembeda antar perlakuan digunakan uji jarak ganda Duncan (Snedecor, 1964).

Sensitivitas Sel PHA-antiHBs dinyatakan dalam Nilai pengenceran (T) yang ditentukan oleh Angka pengenceran (c), Pengenceran awal (a = 2) dan Faktor pengenceran (b = 2) melalui persamaan :

$$T = a \cdot b^{(c-1)} \quad (\text{Lutz, 1978}).$$

Karena faktor pengenceran disini tetap yaitu = 2, maka sebaran data tidak normal; sehingga sebelum dianalisa data diubah dulu kedalam log (Lutz, 1978), persamaan menjadi :

$$\log T = \log (a) + (c-1) \log (b)$$

Jadual Kerja :

```

=====
!                               Bulan ke
Kegiatan !-----
! 1  3  4  6  8  10  11  12  13  14  15  16  17  18
-----
Persiapan: !
!
Tinjauan !-----
pustaka !
Pengadaan !----
bahan !
kimia !
Pengum- !-----
pulan !
sampel !
!
Pelaksa- !
naan: !
!
Pemurnian !-----
HBsAg !
Peneliti- !-----
an II !
Analisa !-----
data !
Penulisan !-----
laporan !
=====

```

IV. HASIL DAN BAHASAN

HASIL

Survei Seroepidemiologik

Telah dilakukan 2.193 pemeriksaan sub tipe pada darah donor pria dari DTD PMI DKI Jakarta dan DTD PMI Surabaya; umur donor darah menurut sub tipe HBsAg ditampilkan pada Tabel 1. Tampak bahwa umur rata-rata donor darah pengidap HBsAg sub tipe adw tidak berbeda nyata dengan pengidap sub tipe adr maupun sub tipe ayw.

Tabel 1. Umur donor darah menurut sub tipe HBsAg

Sub tipe HBsAg	Umur (tahun)	
	Kisaran	Rata-rata \pm SD
adw	17-62	30,0 \pm 8,7 ^a
adr	19-56	31,2 \pm 8,7 ^a
ayw	20-50	29,6 \pm 7,1 ^a

Keterangan :

a-a : tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Hasil pemeriksaan sub tipe menunjukkan bahwa sub tipe adw dominan baik di Jakarta maupun Surabaya, tidak didapatkan sub tipe ayr (Tabel 2).

Tabel 2. Prevalensi relatif subtipe HBsAg pada donor darah di Jakarta dan Surabaya

Subtipe HBsAg	Jakarta		Surabaya		Total	
	Jml	%	Jml	%	Jml	%
adw	1357	75,9	349	85,9	1706	77,8
adr	327	18,3	17	4,2	344	15,7
ayw	70	3,9	38	9,4	108	4,9
atipik	33	1,9	2	0,5	35	1,6
Total	1787	100,0	406	100,0	2193	100,0

Keterangan : Subtipe atipik = adyw, adrw dan adyr

Dalam penelitian ini sebagian besar sampel yang diperiksa menunjukkan antigen pre-S2 positif. Kandungan antigen pre-S2 pada pengidap HBsAg menurut subtipe virus mencerminkan konsentrasi antigen pre-S2 (S2) per satuan konsentrasi HBsAg (S). Tabel 3 menyajikan perbandingan titer relatif antigen pre-S2 (S2/S) antara pengidap HBsAg subtipe adw, adr dan subtipe ayw. Pengidap HBsAg yang dibandingkan adalah pengidap yang mempunyai titer HBsAg $> 2^{10}$, titer antigen pre-S2 $> 2^6$ dan HBeAg(+) pada pengenceran 100 kali, dengan jumlah sampel untuk subtipe adw, adr dan ayw masing-masing adalah 637, 118 dan 49 donor. Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa subtipe virus sangat berpengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2; pengidap HBsAg subtipe adr mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding subtipe adw dan ayw.

Tabel 3. Perbandingan kandungan antigen pre-S2
(titer S2/titer S) pada donor darah
pengidap HBsAg menurut sub tipe HBsAg

Subtipe HBsAg	Jumlah sampel	Titer rata-rata (2^n)		S2/S
		S	S2	
adw	637	12,4	9,1	0,132 ^a
adr	118	13,2	10,9	0,293 ^b
ayw	49	11,8	9,2	0,215 ^c

Keterangan :

- a-b : berbeda nyata ($p < 0,001$)
- b-c : berbeda nyata ($p < 0,01$)
- a-c : berbeda nyata ($p < 0,01$)

Frequensi antigen pre-S2 menurut status HBeAg terlihat pada Tabel 4 dan Tabel 5; terdapat 86% atau lebih sampel antigen pre-S2 positif baik pada pengidap HBsAg dengan HBeAg(+) maupun pengidap dengan HBeAg negatif.

Untuk mengetahui frekuensi antigen pre-S2 pada sampel dengan HBeAg titer tinggi, maka HBeAg diperiksa pada serum yang telah diencerkan 100 kali dalam 25% calf serum. Dari Tabel 4 dan Tabel 5 tampak tidak ada perbedaan frekuensi antigen pre-S2 antara pengidap HBsAg dengan HBeAg(+) titer tinggi dan HBeAg(+) tanpa pengenceran ($p > 0,05$).

Tabel 4. Frekuensi antigen pre-S2 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg

Subtipe HBsAg	HBeAg positif		HBeAg negatif	
	n	S2(+)	n	S2(+)
adw	739	727 (98,4%)	99	84 (84,8%)
adr	136	131 (97,0%)	81	69 (85,2%)
ayw	53	53 (100,0%)	18	18 (100,0%)
Total	928	911 (98,2%) ^a	198	171 (86,4%) ^b

Keterangan :

a-b : berbeda nyata ($p < 0,0001$)

Tabel 5. Frekuensi antigen pre-S2 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeag(1:100)

Subtipe HBsAg	HBeAg(+) 1:100		HBeAg(-) 1:100*	
	n	S2(+)	n	S2(+)
adw	682	671 (98,4%)	156	134 (85,9%)
adr	123	121 (98,4%)	94	79 (84,0%)
ayw	52	52 (100,0%)	19	18 (94,7%)
Total	857	844 (98,5%) ^a	269	231 (85,9%) ^b

Keterangan :

a-b : berbeda nyata ($p < 0,0001$)

* : termasuk HBeAg(-) 1:1

Frekuensi antigen pre-S1 dibandingkan secara kualitatif pada 745 pengidap HBsAg dari ketiga sub tipe yang mempunyai titer HBsAg (RPHA) $\geq 2^{10,5}$ dan HBeAg(+) pada pengenceran 100 kali. Tabel 6 menunjukkan bahwa frekuensi antigen pre-S1 pada pengidap HBsAg sub tipe adr lebih tinggi dibanding pengidap sub tipe adw dan ayw.

Tabel 6. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg titer tinggi menurut sub tipe HBsAg

Sub tipe HBsAg	N	Antigen pre-S1(+)	
		jumlah	%
adw	604	46	7,6 ^a
adr	102	100	98,0 ^b
ayw	39	3	7,7 ^a
Total	745	149	20,0

Keterangan :

a-b : berbeda nyata ($p < 0,001$)

Frekuensi antigen pre-S1 menurut status HBeAg terlihat pada Tabel 7 dan Tabel 8. Tampak bahwa frekuensi antigen pre-S1 pada serum HBsAg(+)/HBeAg(+) lebih rendah dibanding serum dengan HBsAg(+)/HBeAg(-).

Tabel 7. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg

Subtipe HBsAg	HBeAg positif		HBeAg negatif	
	n	S1(+)	n	S1(+)
adw	631	61 (9,7%)	174	13 (7,5%)
adr	124	120 (96,8%)	77	67 (87,0%)
ayw	40	3 (7,5%)	20	11 (55,0%)
Total	795	184 (23,1%) ^a	271	91 (35,6%) ^b

Keterangan : a-b = berbeda nyata (p<0,001)

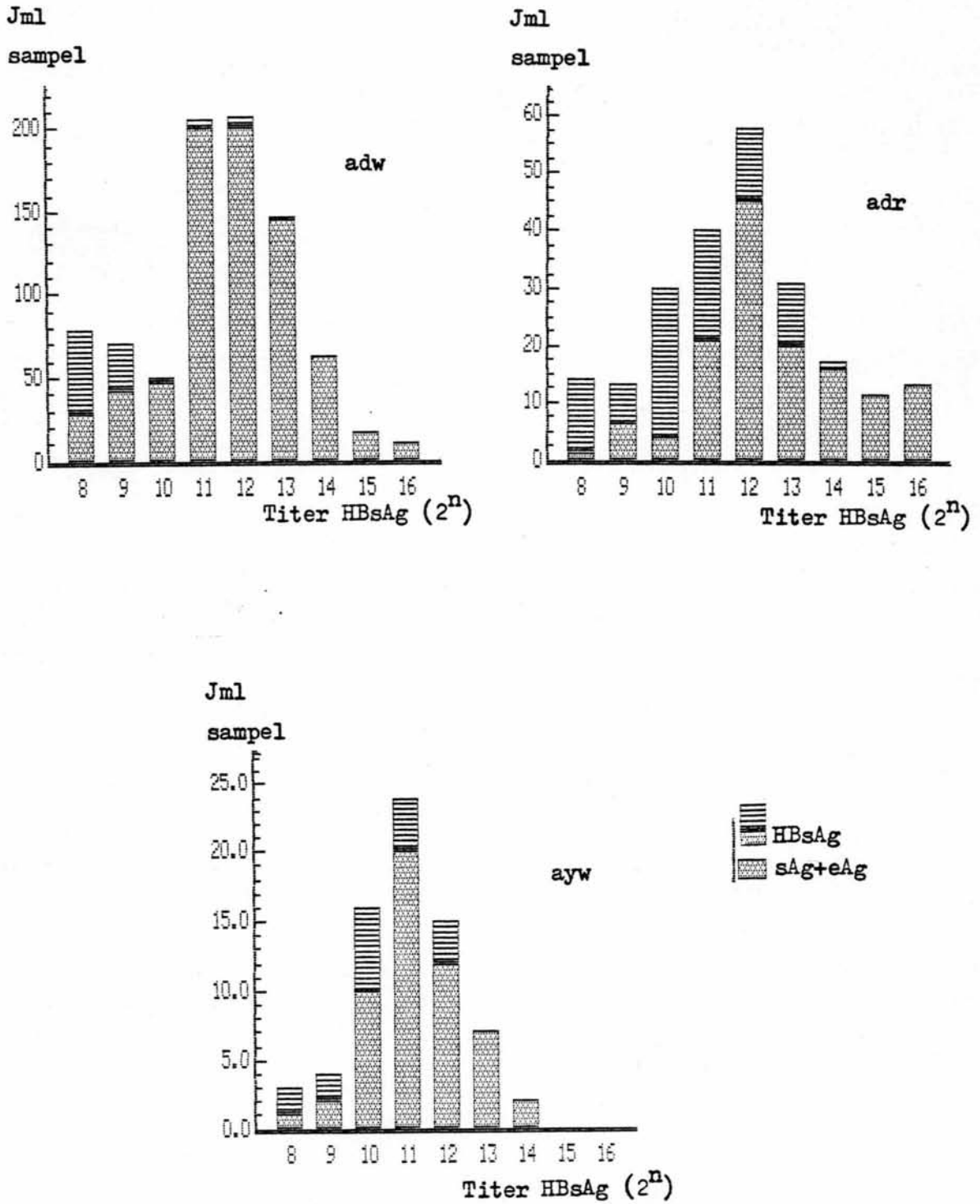
Tabel 8. Frekuensi antigen pre-S1 pada donor darah pengidap HBsAg menurut status HBeAg(1:100)

Subtipe HBsAg	HBeAg(+) 1:100		HBeAg(-) 1:100*	
	n	S1(+)	n	S1(+)
adw	624	54 (8,6%)	181	20 (11,0%)
adr	111	107 (96,4%)	90	80 (88,9%)
ayw	39	2 (5,1%)	21	12 (57,1%)
Total	774	163 (21,1%) ^a	292	112 (38,4%) ^b

Keterangan : a-b = berbeda nyata (p<0,0001)

* : termasuk HBeAg(-) 1:1

Gambar 1 (A, B, C) memperlihatkan frekuensi HBeAg pada 1.168 pengidap HBsAg dengan titer HBsAg $\geq 2^8$. Tampak bahwa pada titer HBsAg yang sama, frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg subtipe adw lebih tinggi dibanding subtipe adr dan ayw.



Gambar 1. Frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw

Pada 944 pengidap dengan HBsAg titer tinggi ($>2^{10}$), dibandingkan frekuensi HBeAg pada sampel yang diencerkan 100 kali dalam 25% calf serum. Dari Tabel 9 nampak bahwa frekuensi HBeAg (titer tinggi) pada pengidap HBsAg sub tipe adw jauh lebih tinggi dibanding pengidap sub tipe adr dan ayw.

Tabel 9. Frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg titer tinggi menurut sub tipe HBsAg

Sub tipe HBsAg	Jumlah sampel	HBeAg(+) 1:100	
		jumlah	%
adw	693	648	93,5 ^a
adr	190	121	63,7 ^b
ayw	61	49	80,3 ^c
Total	944	818	86,6

Keterangan :

a-b : berbeda nyata ($p < 0,0001$)

a-c : berbeda nyata ($p < 0,001$)

b-c : berbeda nyata ($p < 0,025$)

BAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan kandungan antigen pre-S2 pada pengidap HBsAg dari berbagai sub-tipe HBsAg. Kandungan rata-rata antigen pre-S2 dan frekuensi antigen pre-S1 pada serum-serum pengidap VHB sub-tipe adr lebih tinggi dibanding sub-tipe adw.

Regio S genome VHB dibagi menjadi gena S yang mengkode sintesa *major protein* (protein S) dan regio pre S (pre-S1 dan pre-S2) yang mengkode sintese protein pre-S. Menurut Tiollais *et al.* (1984; 1988) DNA VHB terdiri atas sekitar 3200 pasangan basa; jumlahnya berbeda untuk tiap sub-tipe. Jumlah pasangan basa pada sub-tipe ayw berkisar antara 3182-3188, sub-tipe adw antara 3200-3221 dan pada sub-tipe adr berkisar antara 3188-3214. Perbedaan molekul DNA VHB dari sub-tipe yang berbeda adalah sebesar 8%-10%, kecuali pada sub-tipe ayr yang hanya berbeda sekitar 2% dari sub-tipe adr; sedang pada sub-tipe yang sama perbedaan tersebut hanya 1,5%-2%. Protein pre-S2 (*middle protein*) merupakan produk regio pre-S2 dan gena S; tersusun atas 281 asam amino dan terdiri atas glikoprotein yang terdapat dalam dua bentuk yaitu GP33 (satu glikan) dan GP36 (dua glikan). Regio pre-S1, pre-S2 dan gena S mengkode sintesa protein pre-S1 (*large protein*), yang terdapat dalam bentuk glikosilat (GP42) dan bentuk nonglikosilat (P39). Panjang polipeptida pre-S1 bervariasi tergantung sub-tipe; 108 pada sub-tipe ayw dan 119 pada sub-tipe adw, adr dan ayr (Tiollais *et al.*, 1988).

Signal-signal untuk memulai proses sintesa protein S lebih kuat dibanding untuk protein pre-S. Dengan mekanisme ini dimungkinkan untuk terjadinya sintesa berbagai protein HBsAg (dengan perbedaan akhiran N) dari satu *open reading frame* yang kontinyu. Perbedaan kecepatan sintesa protein S, pre-S2 dan pre-S1 terlihat pada komposisi ketiga macam partikel virus dalam darah individu yang terinfeksi VHB. Partikel HBsAg bulat dan partikel tubuler terutama terdiri atas protein S (*major protein*); sedang proporsi protein pre-S2 pada ketiga partikel HBsAg adalah sama yaitu antara 5-10%, tetapi partikel HBsAg bulat pada serum penderita dengan HBeAg positif mengandung lebih banyak protein pre-S2 dibanding penderita dengan anti-HBe positif. Sebaliknya protein pre-S1 merupakan 15% dari protein HBsAg partikel Dane dan partikel HBsAg tubuler, tetapi hanya merupakan 1-2% dari protein partikel HBsAg bulat (Tiollais et al., 1985; Stibbe & Gerlich., 1982).

Adanya perbedaan genome antar subtype VHB memberi petunjuk bahwa pada suatu daerah/populasi genetik yang sama, ekspresi genome VHB pada individu yang terinfeksi dapat dipengaruhi oleh subtype virus; terutama ekspresi regio pre-S. Sampai saat ini telah banyak penelitian mengenai antigen pre-S, tetapi penelitian seroepidemiologik tentang hubungan antigen pre-S dengan subtype HBsAg belum pernah dilakukan. Hasil penelitian ini konsisten dengan landasan teori tersebut; pada pengidap HBsAg pria dewasa di Jakarta dan Surabaya terdapat perbedaan kandungan antigen pre-S2 yang tergantung subtype virus. Serum pengidap VHB subtype adr rata-rata mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding pengidap VHB subtype adw dan subtype ayw.

Lalu mengapa bisa terjadi perbedaan kandungan antigen pre-S2 diantara berbagai sub tipe HBsAg? Telah diketahui ada dua transkrip utama yang mengatur sintesa protein HBsAg yaitu RNA 2,5 kb yang mempunyai *initiation site* sebelum regio pre-S1 dan berfungsi mengatur sintesa protein pre-S1 (*large protein*) serta RNA 2,1 kb yang dibagi dua yaitu rantai panjang dan rantai pendek. RNA 2,1 kb panjang mempunyai *initiation site* pada regio pre-S1 dan berfungsi mengatur sintesa protein pre-S2 (*middle protein*), sedang RNA 2,1 kb pendek mempunyai *initiation site* pada regio pre-S2 dan berfungsi mengatur sintesa protein S atau *major protein* (Mayumi, 1990). Belum diketahui mengapa suatu transkrip relatif terdapat lebih banyak pada suatu sub tipe virus dibanding sub tipe yang lain. Terdapat kemungkinan bahwa lebih banyaknya transkrip 2,1 kb panjang pada VHB sub tipe adr dibanding VHB sub tipe adw dan ayw adalah disebabkan oleh adanya perbedaan rangkaian (akibat perbedaan sub tipe HBsAg) dalam regio yang bertanggung jawab untuk memacu transkripsi gena pre-S2. Apakah memang demikian mekanismenya, belum ada yang tahu. Penelitian lebih lanjut oleh para ahli biologi molekuler diharapkan akan dapat menjawab pertanyaan ini.

Kandungan antigen pre-S pada serum pengidap HBsAg dipengaruhi oleh aktifitas virus; yaitu apakah virus masih dalam fase replikatif atau nonreplikatif. Baik HBsAg selubung partikel Dane dan partikel HBsAg tubuler mengandung protein yang di kode oleh gena S maupun regio pre-S. Sebaliknya partikel HBsAg bulat susunan proteinnya tergantung pada fase ada tidaknya replikasi virus. Pada fase replikasi aktif, partikel HBsAg bulat mempunyai susunan protein yang sama dengan protein HBsAg selubung partikel Dane; tetapi pada fase non repli-

katif, partikel HBsAg bulat praktis tidak mengandung protein yang dikode oleh regio pre-S (Stibbe and Gerlich, 1982; Heermann *et al.*, 1984; Tiollais *et al.*, 1985). Fase replikasi aktif virus dapat diketahui antara lain dengan pemeriksaan HBeAg serum; pada fase ini didapatkan titer HBeAg tinggi (Baraldini *et al.*, 1981; Miyakawa and Mayumi, 1985). Dalam penelitian ini telah dibandingkan kandungan antigen pre-S pada serum HBeAg titer tinggi dari pengidap HBsAg berbagai subtipe. Dengan demikian semua serum yang dibandingkan berasal dari pengidap VHB dalam fase replikatif. Oleh karena itu, dapat disingkirkan adanya kemungkinan bahwa perbedaan kandungan antigen pre-S tersebut akibat adanya perbedaan aktifitas replikasi virus (replikatif/non-replikatif) dalam tubuh.

Antigen pre-S merupakan *immunodominant epitope*, dengan demikian adanya antigen pre-S akan meningkatkan imunogenisitas HBsAg. Para ahli melaporkan bahwa antigen pre-S mempunyai imunogenisitas yang kuat baik pada binatang percobaan maupun pada manusia (Stevens *et al.*, 1984; Neurath *et al.*, 1984; 1985; 1986; 1987a; Tabor *et al.*, 1990; Petre and Peetermans, 1990). Atas dasar pedoman kandungan antigen pre-S sebagai parameter imunogenisitas, maka hasil penelitian ini menunjukkan bahwa subtipe HBsAg berpengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg pada serum pengidap HBsAg pria dewasa di Jakarta dan Surabaya; HBsAg pada serum pengidap VHB subtipe adr lebih imunogenik dibanding pengidap subtipe adw dan ayw.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antigen pre-S2 positif pada sebagian besar pengidap HBsAg, baik pengidap dengan HBeAg positif maupun pengidap dengan HBeAg negatif; dengan demikian status antigen pre-S serum bukan merupakan parameter yang baik untuk menunjukkan ada tidaknya aktifitas replikasi VHB.

Hadziyannis *et al.* (1987), Kurai *et al.* (1987 & 1989), dan para ahli lain melaporkan hubungan antigen pre-S dengan adanya replikasi aktif VHB pada penderita penyakit hati. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa antigen pre-S berhubungan erat dengan parameter replikasi virus seperti DNA VHB dan HBeAg. Pada penderita hepatitis akut, antigen pre-S biasanya ditemukan dalam serum pada fase awal penyakit bersama parameter virus lain seperti HBeAg, DNA VHB dan HBsAg. Pada penderita yang sembuh, hilangnya antigen pre-S mendahului turunnya titer HBsAg (Pontisso *et al.*, 1983; Neurath *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 1987). Berbeda dengan pada penderita penyakit hati, pada pengidap HBsAg asimtomatik adanya antigen pre-S2 tidak erat berhubungan dengan replikasi virus (Hess *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1987). Hess *et al.*, (1987) melaporkan bahwa adanya perbedaan ekspresi antigen pre-S pada pengidap HBsAg adalah disebabkan oleh perbedaan titer HBsAg; menurut Hu *et al.* (1987) dalam semua sampel yang mengandung HBsAg lebih dari 50-100 ng/ml diharapkan dapat dideteksi adanya antigen pre-S. Dalam laporannya disimpulkan bahwa adanya antigen pre-S (S1 dan S2) tidak berhubungan dengan replikasi virus, dilihat dari adanya DNA VHB. Hal ini berbeda dengan pendapat Theilman *et al.* (1986), Hadziyannis *et al.* (1987), Kurai *et al.* (1987 & 1989), yang menyatakan bahwa antigen pre-S berhubungan erat dengan viremia (replikasi aktif). Menurut Hess dkk., perbedaan temuan ini mungkin disebabkan oleh karena pada penelitiannya digunakan reagen yang sangat sensitif untuk mendeteksi antigen pre-S1 dan pre-S2, sehingga masih terdeteksi adanya antigen pre-S walaupun parameter replikasi yang lain sudah tidak terdeteksi. Kesimpulan Hess dkk. (1987) disokong oleh Hu dkk. (1987) yang melaporkan

bahwa adanya antigen pre-S serum pada pengidap HBsAg asimtomatik bukan merupakan petanda yang baik untuk menunjukkan replikasi virus. Dalam penelitiannya Hu dkk. mendapatkan tidak adanya hubungan antara adanya antigen pre-S (S1 dan S2) dengan status HBeAg; adanya antigen pre-S tergantung dari titer HBsAg serum.

Dalam penelitian ini sebagian besar serum HBsAg positif yang diperiksa menunjukkan antigen pre-S2 positif, baik pada serum HBeAg(+) maupun serum HBeAg(-). Demikian pula dengan frekuensi antigen pre-S1; frekuensi antigen pre-S1 pada pengidap HBsAg dengan HBeAg positif bahkan lebih rendah dibanding pengidap dengan HBeAg negatif. Dalam penelitian ini digunakan reagen (Elisa) yang kurang sensitif untuk mendeteksi adanya antigen pre-S1 serum, sehingga positifnya antigen pre-S1 menunjukkan bahwa serum mengandung antigen pre-S1 titer tinggi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya antigen pre-S1, ternyata tidak tergantung status HBeAg. Dengan demikian hasil penelitian ini menyokong pendapat Hess dkk. (1987) serta Hu dkk. (1987) bahwa status antigen pre-S serum bukan merupakan petanda yang baik untuk menunjukkan adanya replikasi virus; tetapi lebih tepat untuk menunjukkan tingkat aktifitas replikasi virus, seperti pendapat yang diajukan para ahli lain (Kurai *et al.*, 1987 & 1989; Ibarra *et al.*, 1987; Hadziyannis *et al.*, 1987).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada pengidap HBsAg di Jakarta dan Surabaya didapatkan sub tipe adw lebih menonjol dibanding sub tipe adr dan ayw; tidak ditemukan adanya sub tipe ayr.

Subtipe HBsAg adalah *virus-specific* dan bila seseorang tertular oleh VHB dari salah satu subtipe maka ia akan menderita infeksi VHB dengan subtipe yang sama. Karena itu subtipe HBsAg merupakan petanda epidemiologik penting yang dipakai untuk mengidentifikasi sumber infeksi (Shorey, 1976; Le Bouvier *et al.*, 1972). Di dunia terdapat variasi geografik dari frekuensi berbagai subtipe HBsAg dan variasi ini lebih banyak berhubungan dengan daerah tempat asal individu dari pada daerah tempat tinggal individu, sehingga dapat membantu menelusuri migrasi penduduk pengidap VHB dimasa lampau (Mazur *et al.*, 1974; Courouce-Pauty *et al.*, 1983). Subtipe adw, ayw dan adr terdapat luas di berbagai bagian dunia; sedang subtipe ayr sangat jarang didapatkan. Dilaporkan subtipe ayr antara lain didapatkan di daerah Oceania dan Jepang. Satu-satunya laporan yang menunjukkan adanya subtipe ayr di Indonesia adalah laporan Gunawan dkk (1985). Dalam penelitiannya pada penduduk di daerah Lombok bagian utara, Gunawan dkk. mendapatkan 3 (18%) subtipe ayr dari 16 pengidap HBsAg yang diperiksa.

Dalam penelitian ini pemeriksaan subtipe HBsAg dilakukan pada sampel yang cukup besar (2.193 donor) dan penentuan subtipe HBsAg dilakukan sampai determinan subtipik w/r. Di Jakarta dan Surabaya didapatkan tiga subtipe utama HBsAg yaitu subtipe adw, adr dan ayw, dengan subtipe adw yang paling menonjol; tidak ditemukan adanya subtipe ayr. Hasil penelitian ini memperkuat laporan para peneliti lain yang juga mendapatkan bahwa di P. Jawa subtipe HBsAg yang paling dominan adalah subtipe adw (Sulaiman *et al.*, 1981; Mulyanto, 1987; Mulyanto *et al.*, 1990).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg dari berbagai subtipe. Pada titer HBsAg yang sama frekuensi HBeAg pada serum-serum pengidap subtipe adw lebih tinggi dibanding subtipe adr dan ayw; frekuensi HBeAg pada serum-serum pengidap HBsAg subtipe ayw juga lebih tinggi dibanding subtipe adr.

Telah banyak laporan mengenai hubungan aspek geografik dan etnik dengan subtipe HBsAg, tetapi sangat jarang dilaporkan hubungan antara subtipe HBsAg dengan frekuensi HBeAg. Laporan-laporan dari Belgia, Perancis dan Amerika Serikat menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Vranckx et al (1980) melaporkan bahwa tidak ada hubungan antara subtipe HBsAg dengan adanya HBeAg dan anti-HBe pada pengidap HBsAg asimtomatik di Belgia. Dalam penelitiannya Vranckx et al. hanya membedakan subtipe ad dan subtipe ay; di Belgia didapatkan prevalensi relatif subtipe ad dan ay masing-masing sebesar 68% dan 32%; dengan frekuensi HBeAg (RIA) pada subtipe ad dan ay masing-masing sebesar 71% dan 72%. Selanjutnya dilaporkan bahwa yang mempengaruhi frekuensi HBeAg adalah titer HBsAg serum; makin tinggi titer HBsAg akan makin sering didapatkan HBeAg. Laporan dari Amerika Serikat dan Perancis menunjukkan bahwa subtipe HBsAg berpengaruh terhadap frekuensi HBeAg. Di Amerika Serikat didapatkan frekuensi HBeAg sebesar 12% pada pengidap HBsAg subtipe ad dan 34% pada subtipe ay; sedang di Perancis didapatkan frekuensi HBeAg sebesar 17,5% pada pengidap HBsAg subtipe ad dan 8% pada subtipe ay (Nath et al., 1978 dan Courouce-Pauty et al., 1978).

Menurut Szmuness et al.(1981) terdapat beberapa faktor yang berpengaruh terhadap besarnya variasi frekuensi HBeAg dalam suatu populasi. Faktor-faktor tersebut adalah rute

infeksi (cara penularan), besarnya dosis infeksius predisposisi genetik, kemampuan sistem imun tubuh, intensitas dan frekuensi terpapar virus serta lamanya mengidap VHB. Szmuness mengatakan bahwa faktor yang paling berpengaruh adalah lamanya mengidap infeksi VHB, makin lama telah mengidap VHB akan makin rendah frekuensi HBeAg. Menurut Miyakawa dan Mayumi (1985) status HBeAg pada pengidap VHB kronik dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk status imunologik, etnik, sosio-ekonomik/gizi, jenis kelamin dan umur host. Bila gizi individu baik maka kemungkinan untuk terjadi serokonversi menjadi anti-HBe(+) akan makin besar, hal ini diduga berhubungan dengan status imunologik tubuh yang makin baik dengan membaiknya gizi (Nishioka, 1985).

Berbeda dengan hasil penelitian dari Belgia, Perancis dan Amerika Serikat tersebut, hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg sub tipe ad (adw dan adr) ; frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg sub tipe adw lebih tinggi dibanding pengidap HBsAg sub tipe adr. Rupanya perbedaan determinan subtipik w/r berpengaruh penting terhadap ekspresi genome virus; seperti juga terbukti pada penelitian tahap II, determinan d dari sub tipe adr ternyata lebih antigenik dibanding determinan d dari sub tipe adw. Temuan ini memperjelas apa yang selama ini masih menjadi perdebatan para ahli; ternyata sub tipe HBsAg berpengaruh terhadap frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg. Mengapa demikian, sampai sekarang belum diketahui jawabannya. Terdapat kemungkinan bahwa persistennya HBeAg pada suatu sub tipe HBsAg tersebut berhubungan dengan kelainan genome virus yaitu adanya *defect* pada regio pre-C.

Kerusakan (*defect*) pada regio pre-C genome virus hepatitis B sekarang sedang menjadi topik penelitian yang hangat. VHB dengan *defect* regio pre-C ini banyak terdapat pada penderita penyakit hati kronik di negara-negara Mediterania serta Asia dan biasanya penderita menunjukkan gejala klinis yang berat (Hadziyannis *et al.*, 1990). Ternyata adanya *defect* pada regio pre-C tersebut dapat menyebabkan serokonversi dari HBeAg positif menjadi HBeAg negatif. Hal ini disebabkan oleh karena sintesa dan sekresi HBeAg diatur bersama oleh regio pre-C dan regio C dari genome VHB; bila terjadi *defect* pada regio pre-C maka HBeAg tidak dapat disekresi kedalam sirkulasi darah, akibatnya HBeAg serum menjadi negatif (Ou *et al.*, 1986; McLachlan, 1987; Rossinck *et al.* cit. Tiollais *et al.*, 1988). Hasil penelitian ini memancing dugaan bahwa VHB sub tipe adw -pada pengidap HBsAg di Jakarta dan Surabaya- mempunyai suatu mekanisme genetik yang dapat menghambat terjadinya *defect* pada regio pre-C, sehingga status HBeAg positif pada pengidap HBsAg sub tipe adw akan lebih lama bertahan. Akibatnya frekuensi HBeAg pada serum pengidap HBsAg sub tipe adw lebih tinggi dibanding pengidap HBsAg sub tipe adr dan ayw. Kemungkinan lain adalah adanya suatu heterogenitas faktor-faktor virus dan atau faktor host yang dapat memperpanjang serokonversi dari HBeAg positif menjadi HBeAg negatif pada pengidap HBsAg di Jakarta dan Surabaya.

Dalam penelitian ini pengaruh faktor umur pengidap HBsAg terhadap status HBeAg dapat dikesampingkan, karena rata-rata umur donor darah antara pengidap HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw tidak berbeda nyata. Demikian pula dengan pengaruh jenis kelamin, karena sampel dalam penelitian ini hanya terdiri atas donor darah pria; hal ini disebabkan oleh sangat sedi-

kitnya donor darah wanita yang mengidap HBsAg (kurang dari 3%). Pengaruh faktor gizi dan predisposisi genetik juga bisa diabaikan dengan asumsi bahwa faktor-faktor tersebut tersebar secara acak diantara sub tipe adw, adr dan ayw. Menurut Vranckx *et al.* (1980) yang berpengaruh terhadap frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg adalah titer HBsAg. Titer HBsAg serum ini secara tidak langsung juga menunjukkan aktifitas VHB dalam tubuh, kemampuan sistem imun tubuh untuk menghilangkan virus dan lamanya mengidap VHB. Pada infeksi akut biasanya didapatkan titer HBsAg yang rendah dan makin tinggi titer HBsAg akan makin sering dijumpai HBeAg dalam serum (Villarejos *et al.*, 1980; Vyas and Blum, 1984). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada titer HBsAg yang sama, HBeAg lebih sering didapatkan pada pengidap HBsAg sub tipe adw dibanding sub tipe adr dan ayw; frekuensi HBeAg pada pengidap HBsAg sub tipe ayw juga lebih tinggi dibanding pengidap sub tipe adr. Jadi cukup beralasan bila diambil kesimpulan bahwa sub tipe HBsAg berpengaruh terhadap adanya HBeAg dalam serum, dengan demikian juga berpengaruh terhadap infektifitas serum pengidap VHB.

Menjadi pertanyaan apakah adanya perbedaan kandungan antigen pre-S dan frekuensi HBeAg pada serum-serum pengidap HBsAg tersebut dapat mempengaruhi perjalanan infeksi VHB pada individu yang terinfeksi.

Telah diketahui bahwa VHB sebetulnya bukan virus yang sitopatik, terjadinya kerusakan sel hati pada penyakit hepatitis B adalah akibat reaksi imunologis tubuh penderita terhadap sel-sel hati yang terinfeksi VHB. Dengan demikian hepatitis yang terjadi tergantung pada interaksi yang kompleks antara *agent* yang menginfeksi dan respon imun host (Dudley *et*

al., 1972; Dienstag, 1984; Klingenstein & Dienstag, 1985). Dudley *et al.* (1972) mengajukan hipotesis bahwa kemampuan *cell mediated* dari sistem imun tubuh menentukan apakah infeksi itu akan hilang atau terus bertahan dengan berbagai tingkat kerusakan sel hati. Bila reaksi imunologik tersebut tidak ada atau sangat sedikit maka akan terjadi pengidap sehat. Hepatitis akut terjadi bila reaksi imunologik cukup memadai sehingga menimbulkan nekrosis sel yang diikuti oleh hilangnya VHB dari sel hati; sedang bila reaksi imunologik tersebut tidak memadai untuk dapat menghilangkan seluruh VHB dari sel hati, akan terjadi hepatitis kronik.

Respon imun host antara lain dipengaruhi oleh imunogenisitas *agent* yang menginfeksi. VHB dengan imunogenisitas tinggi akan lebih mudah dikenali oleh sistem imunitas tubuh. Karena protein pre-S imunogenisitasnya tinggi, maka VHB dari subtype yang mengandung banyak antigen pre-S akan lebih mudah memacu respon imun tubuh yang adekuat. Akibatnya individu yang terinfeksi akan lebih banyak menderita hepatitis akut yang diikuti hilangnya VHB. Sebaliknya infeksi VHB dari subtype yang sedikit mengandung antigen pre-S akan lebih banyak menimbulkan respon imun yang tidak adekuat; sehingga mengakibatkan pengidap VHB kronik. Dengan demikian, distribusi subtype tersebut pada populasi akan lebih banyak dibanding subtype VHB yang banyak mengandung antigen pre-S.

Prevalensi relatif subtype VHB pada pengidap HBsAg kronik di Amerika Serikat mirip dengan di Jakarta dan Surabaya, prevalensi subtype adw di Amerika Serikat lebih banyak dibanding subtype adr dan ayw. Holland *et al.* (1972) dan Gerety *et al.* (1975) melaporkan bahwa subtype VHB berpengaruh terhadap perjalanan klinik penyakit; individu yang terinfeksi VHB

subtipe adw cenderung lebih banyak yang menjadi kronik dibanding individu yang terinfeksi VHB subtipe ayw . Di Jepang, distribusi subtipe VHB pada pengidap kronik berlawanan dengan pada penderita hepatitis B akut. Pada pengidap kronik didapatkan subtipe adr lebih banyak dari pada subtipe adw; sedang pada penderita hepatitis B akut distribusinya terbalik, subtipe adw lebih banyak dibanding subtipe adr (Tachibana *et al.*, 1989; Mayumi, komunikasi pribadi). Dari hipotesis Dudley serta laporan-laporan dari Amerika dan Jepang tersebut tampak suatu pola, yaitu bahwa individu yang terinfeksi VHB dengan subtipe yang menonjol (adw di Amerika dan adr di Jepang) cenderung menjadi kronik bila dibanding individu yang terinfeksi VHB dengan subtipe yang tidak menonjol (ayw di Amerika dan adw di Jepang). Pola tersebut diperkirakan juga berlaku di Jakarta dan Surabaya, daerah dengan prevalensi subtipe adw yang menonjol. Disini VHB subtipe adw mengandung sedikit antigen pre-S tetapi mempunyai infektifitas yang lebih tinggi (frekuensi HBeAg tinggi) dibanding VHB subtipe adr, sehingga individu-individu yang terinfeksi subtipe adw akan lebih banyak menderita antigenemia yang persisten dan hepatitis kronik dibanding bila terinfeksi VHB subtipe adr. Karena itu prevalensi pengidap VHB subtipe adw di Jakarta dan Surabaya lebih tinggi dibanding subtipe adr. Menjadi pertanyaan apakah demikian mekanisme yang sesungguhnya; diperlukan banyak bukti untuk menyokong pendapat ini. Penelitian klinik pada penderita hepatitis B akut diberbagai daerah dengan distribusi subtipe VHB yang berbeda, diharapkan dapat memberikan bukti-bukti untuk menjawab pertanyaan ini.

PENELITIAN TAHAP II

Pemurnian HBsAg

Pemurnian HBsAg tahap akhir (sucrose rate) dilakukan 6 kali untuk tiap-tiap sub tipe, sehingga untuk sub tipe adw, adr dan ayw masing-masing diperoleh 6 lot HBsAg murni. Hasil HBsAg murni dari 1 liter plasma untuk tiap sub tipe ditampilkan pada Tabel 10A, 10B dan 10C. Tampak bahwa dari 1 liter plasma dengan HBsAg positif titer tinggi dapat diperoleh sekitar 24-76 mg HBsAg murni.

Tabel 10A. Hasil pemurnian HBsAg sub tipe adw

No. lot	Vol. (cc)	Titer HBsAg (2^n)		Hasil HBsAg	
		awal	murni	mg/l	recovery (%)
1.	24	13,5	17,0	33,62	27,15
2.	23	13,5	17,5	41,54	36,80
3.	23	13,5	17,5	41,05	36,80
4.	23	13,5	17,5	38,94	36,80
5.	23	13,5	17,5	37,77	36,80
6.	23	13,5	17,5	38,71	36,80
Rata-rata				38,60	35,19

Tabel 10B. Hasil pemurnian HBsAg sub tipe adr

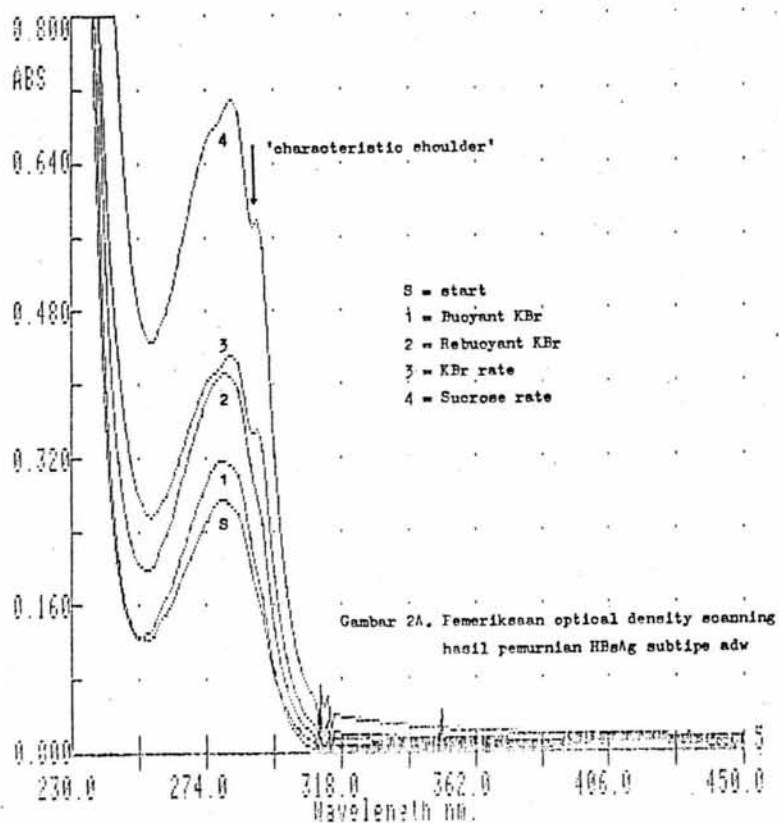
No. lot	Vol. (cc)	Titer HBsAg (2 ⁿ)		Hasil HBsAg	
		awal	murni	mg/l	recovery (%)
1.	20	14,5	19,0	81,26	45,25
2.	20	14,5	18,5	75,84	32,00
3.	20	14,5	18,5	70,04	32,00
4.	20	14,5	19,0	81,00	45,25
5.	20	14,5	19,0	74,34	45,25
6.	20	14,5	18,5	77,78	32,00
Rata-rata				76,79	38,62

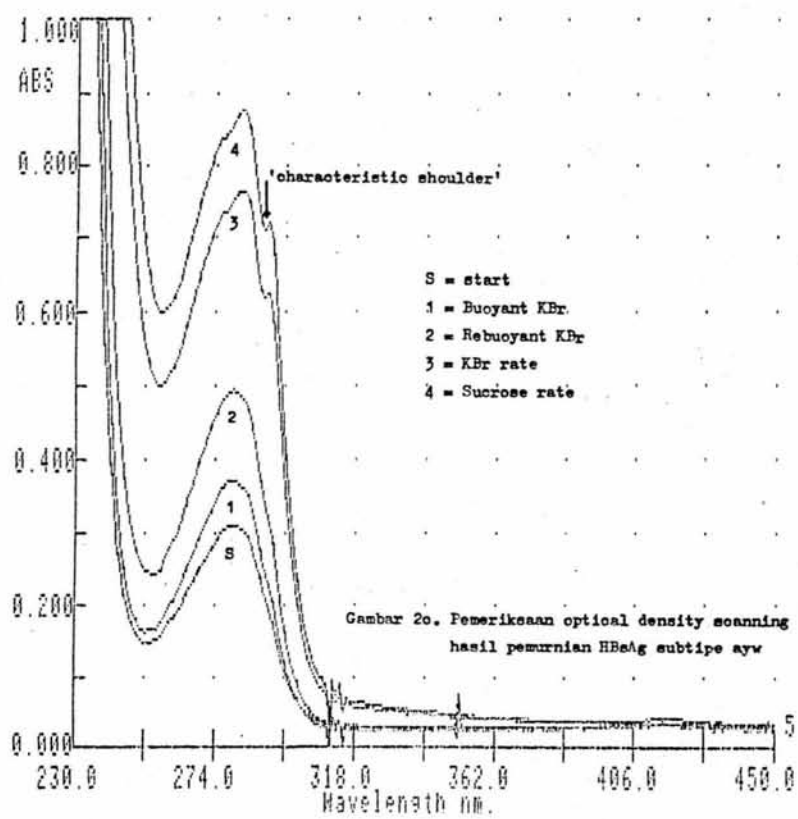
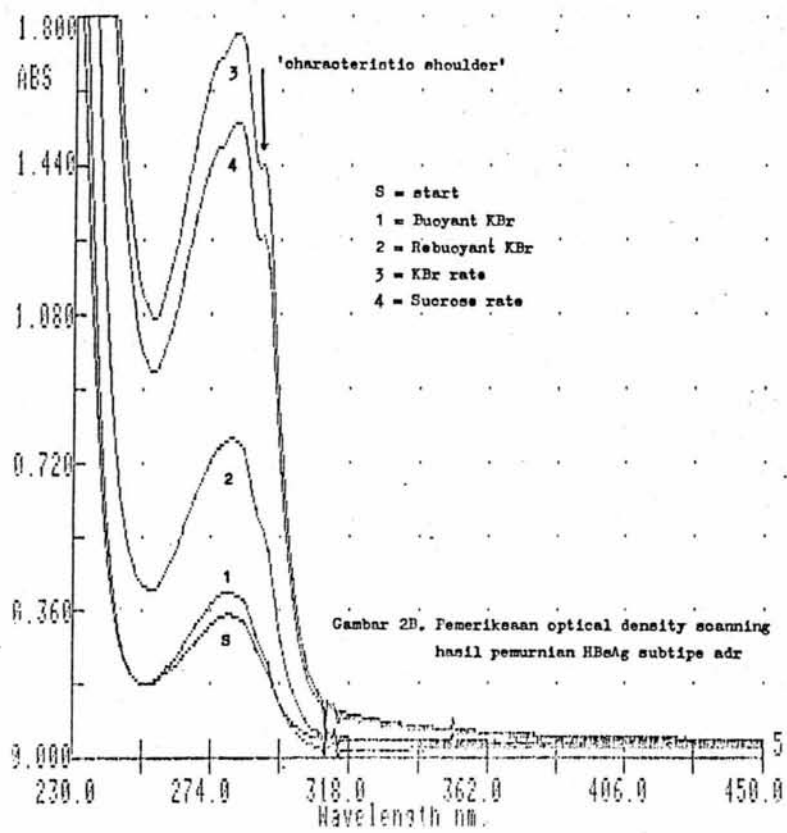
Tabel 10C. Hasil pemurnian HBsAg sub tipe ayw

No. lot	Vol. (cc)	Titer HBsAg (2 ⁿ)		Hasil HBsAg	
		awal	murni	mg/l	recovery (%)
1.	21	13,0	16,5	23,23	23,76
2.	21	13,0	17,5	24,67	47,52
3.	21	13,0	17,0	24,17	33,60
4.	21	13,0	17,0	23,89	33,60
5.	21	13,0	17,0	23,89	33,60
6.	21	13,0	17,0	24,86	33,60
Rata-rata				24,12	34,28

Hasil pemurnian HBsAg dievaluasi dengan memeriksa *optical density scanning* (200-360 nm), aktifitas spesifik HBsAg, SDS PAGE dan pemeriksaan elektronmikroskopik.

Gambar 2 (A, B, C) menampilkan pemeriksaan *optical density scanning* hasil pemurnian HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw. Tampak adanya *characteristic shoulder* di daerah gelombang 290 nm dari hasil pemurnian tahap KBr rate dan Sucrose rate; hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa HBsAg yang diperoleh cukup murni.





Tabel 11 menampilkan aktifitas spesifik HBsAg murni menurut sub tipe. Secara tidak langsung aktifitas spesifik dapat mencerminkan kemurnian relatif HBsAg antara HBsAg murni dari ketiga sub tipe. Dari tabel tersebut tampak tidak ada perbedaan bermakna antara aktifitas spesifik HBsAg murni sub tipe adw, adr dan ayw.

Tabel 11. Perbandingan aktifitas spesifik
HBsAg murni menurut sub tipe

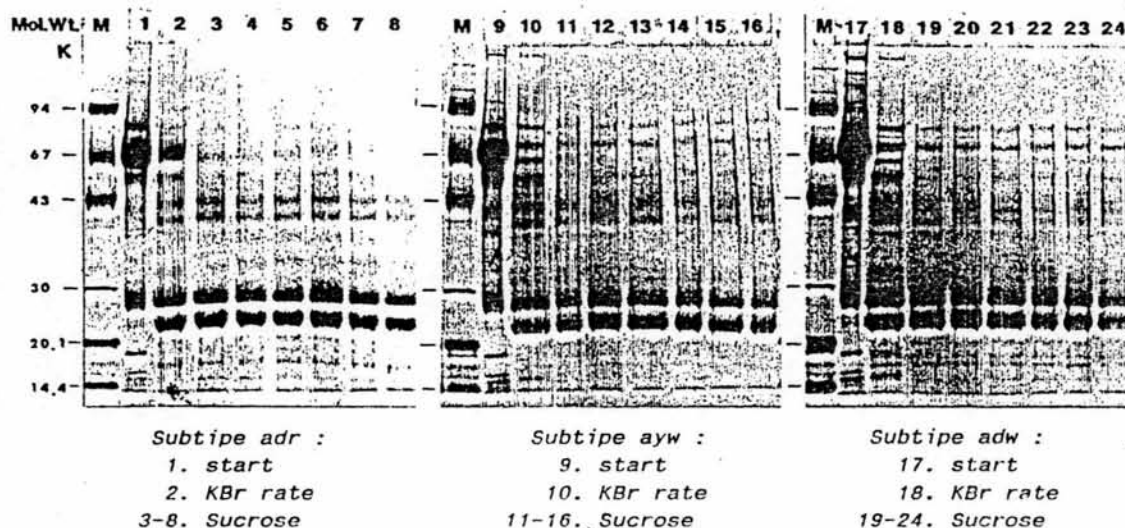
No. Lot	Aktifitas spesifik HBsAg		
	adw	adr	ayw
1.	24.521	33.817	21.968
2.	26.897	25.621	41.328
3.	27.220	27.742	29.836
4.	28.687	33.929	30.188
5.	29.578	36.967	30.188
5.	28.870	24.985	29.024
Rata- rata	27.628 ^a	30.510 ^a	30.422 ^a

Keterangan :

a-a : tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Pemeriksaan SDS PAGE dan pemeriksaan elektronmikroskopik dilakukan di Institute of Immunology, Tokyo, Jepang. Gambar 3 dibawah ini menampilkan hasil pemeriksaan SDS PAGE.

SDS PAGE 10-20%



Gambar 3. Pemeriksaan SDS PAGE hasil pemurnian HBsAg

Pada pemeriksaan SDS PAGE tampak jelas adanya pita pada daerah dengan BM antara 20-30 KD yang mencerminkan peptida S; samar-samar terlihat pita pada daerah dengan BM sekitar 35 KD yang mencerminkan peptida pre-S2 serta pita pada daerah dengan BM sekitar 43 KD yang mencerminkan peptida pre-S1. Bayangan pita pada sekitar daerah 35 KD dan 43 KD terutama terlihat pada HBsAg subtype adr. Adanya peptida pre-S2 dikonfirmasi dengan hasil pemeriksaan Elisa; tetapi pemeriksaan Elisa untuk mendeteksi peptida pre-S1 pada subtype adw dan subtype ayw menunjukkan hasil negatif. Hal ini memberi petunjuk bahwa reagen Elisa yang dipakai untuk mendeteksi antigen pre-S1 sangat rendah sensitifitasnya, masih kurang sensitif dibanding metoda SDS PAGE. Hasil pemeriksaan SDS PAGE juga memperlihatkan bahwa masih terdapat kontaminan protein dalam hasil akhir pemurnian HBsAg (sucrose rate); ini terlihat dengan adanya bayangan pita pada daerah dengan BM sekitar 67 KD yang jelas makin kabur bila dibandingkan dengan plasma awal. Kemungkinan besar kontaminan tersebut adalah albumin, yang biasanya memang tidak bisa 100% dipisahkan dari HBsAg pada pemurnian dengan cara ultrasentrifugasi. Bayang-bayang kontaminan tersebut tampak hampir sama jelas baik pada subtype adw, adr maupun subtype ayw.

Hasil pemeriksaan antigen pre-S2 (RPHA), menunjukkan bahwa subtype HBsAg berpengaruh terhadap banyaknya kandungan antigen pre-S2 HBsAg. Dari Tabel 12 tampak bahwa HBsAg murni subtype adr mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding HBsAg murni subtype adw dan ayw.

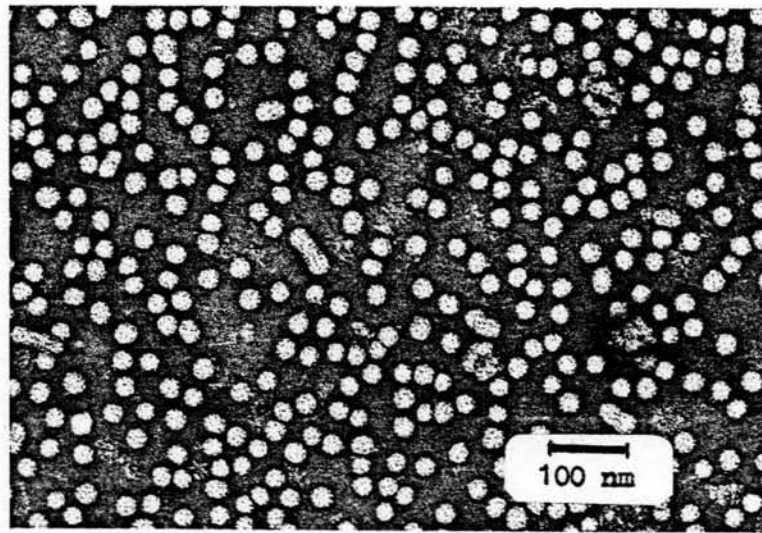
Tabel 12. Perbandingan kandungan antigen pre-S2
(titer S2/titer S) HBsAg murni menurut
subtipe HBsAg

No. lot	Subtipe HBsAg		
	adw	adr	ayw
1.	0,0055	0,0313	0,0028
2.	0,0028	0,0884	0,0010
3.	0,0039	0,3535	0,0010
4.	0,0055	0,0625	0,0039
5.	0,0028	0,1250	0,0039
6.	0,0055	0,3535	0,0019
Rata-rata	0,0043 ^a	0,1690 ^b	0,0024 ^c

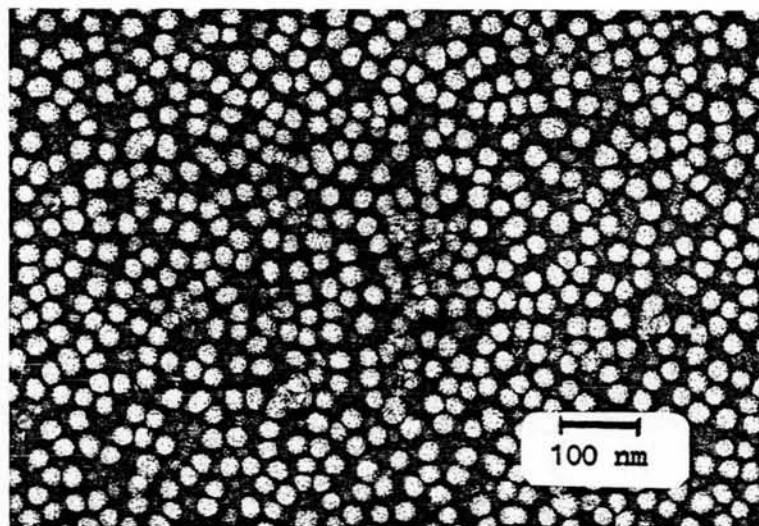
Keterangan :

- a-b : berbeda nyata ($p < 0,0001$)
- a-c : berbeda nyata ($p < 0,01$)
- b-c : berbeda nyata ($p < 0,0001$)

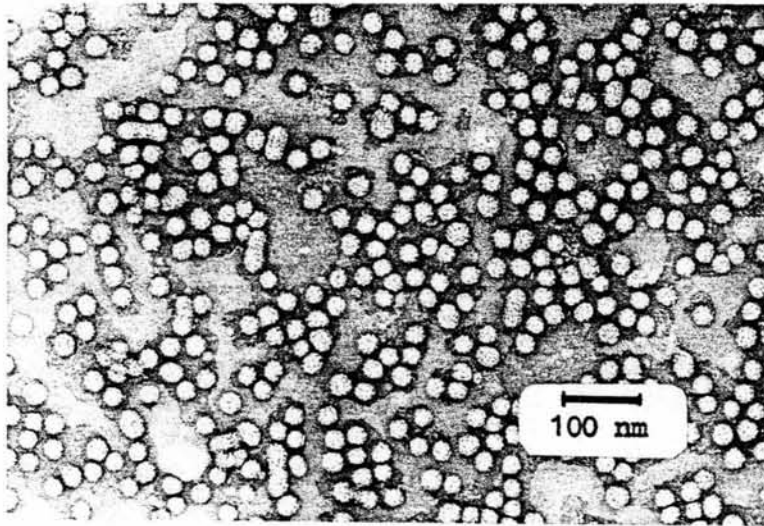
Pemeriksaan elektronmikroskopik dilakukan dengan perbesaran akhir 100.000 kali, dengan pengecatan *uranyl acetate* 2%. Pada Gambar 4A, 4B dan 4C tampak beberapa partikel HBsAg tubuler diantara banyak sekali partikel HBsAg bulat; tidak tampak adanya partikel Dane.



*Gambar 4A. Pemeriksaan elektronmikroskopik
HBsAg murni sub tipe adw*



*Gambar 4B. Pemeriksaan elektronmikroskopik
HBsAg murni sub tipe adr*



*Gambar 4C. Pemeriksaan elektronmikroskopik
HBsAg murni sub tipe ayw*

Hasil pemurnian HBsAg dalam penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan kemurnian yang bermakna antara HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw. Menurut Mayumi (komunikasi pribadi) kemurnian relatif HBsAg antar lot dapat dinilai dengan cara membandingkan aktifitas spesifiknya. Cara penilaian ini merupakan cara yang sederhana tetapi dapat diandalkan. Dengan demikian, perbandingan aktifitas spesifik antara ketiga sub tipe HBsAg dapat mencerminkan perbandingan aktifitas HBsAg per satuan berat protein.

Dalam penelitian ini, rata-rata HBsAg murni yang diperoleh cukup baik yaitu sekitar 46,696 mg/l plasma. Menurut Mayumi (komunikasi pribadi) jumlah HBsAg murni yang diperoleh dengan cara pemurnian ultrasentrifugasi dikatakan cukup banyak bila merupakan 35% atau lebih dari HBsAg yang terdapat dalam plasma sumber HBsAg (mempunyai recovery $\geq 35\%$). HBsAg murni berguna antara lain dalam pembuatan reagen untuk mendeteksi anti-HBs dan dalam rangka pembuatan vaksin. Prinsip pembuatan vaksin hepatitis B asal plasma meliputi dua cara yaitu pemurnian HBsAg dan inaktivasi hasil pemurnian.

Bila hasil pemurnian HBsAg ini dipakai sebagai sumber vaksin, maka dari darah donor di DTD PMI DKI Jakarta dan Surabaya selama setahun akan dapat diperoleh HBsAg murni ekuivalen dengan 2.181.000 dosis vaksin. Penghitungan ini didasarkan pada kondisi prevalensi HBsAg 5% (20% diantaranya dengan HBsAg titer tinggi) dan 1 dosis vaksin berisi 5 mcg HBsAg murni. Penghitungan tersebut terlihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Perkiraan dosis vaksin yang dapat diperoleh dari DTD PMI DKI Jakarta dan Surabaya

jumlah donor	HBsAg(+) %	tinggi kantong	HBsAg murni (mg/l)	HBsAg murni (mg)	Ekivalen vaksin (dosis)
200.000	1	2.000 liter	250	43,62	10.905
					2.181.000

Jumlah darah donor di seluruh Indonesia adalah sekitar 600.000 kantong dalam setahun. Ini berarti dari seluruh darah donor di Indonesia dapat diperoleh HBsAg murni ekuivalen dengan sekitar 6.500.000 dosis vaksin. Jumlah ini masih bisa ditingkatkan menjadi 2-3 kali lipat bila donor darah pengidap HBsAg 2-3 kali lebih sering diambil darahnya. Angka kelahiran di Indonesia adalah sekitar 2,7% per tahun, ini berarti dalam setahun akan lahir sekitar 5.000.000 bayi. Dengan jumlah vaksin sekitar 15.000.000 dosis per tahun berarti bisa mencukupi kebutuhan vaksin untuk vaksinasi hepatitis B bagi seluruh bayi di Indonesia.

Pengukuran Antigenitas HBsAg murni

Pengukuran antigenitas HBsAg dilakukan dengan cara membuat sel PHA dari ketiga sub tipe HBsAg menggunakan eritrosit domba, kemudian dibandingkan sensitifitasnya untuk mendeteksi anti-HBs standar. Dari 6 lot HBsAg murni tiap sub tipe, dibuat 18 lot sel PHA yang disimpan pada 4 derajat C sebelum diperiksa. Pemeriksaan sensitifitas dilakukan 1 bulan setelah pembuatan sel PHA. Hasil pemeriksaan sensitifitas ditampilkan pada Tabel 14; tampak bahwa sub tipe HBsAg berpengaruh nyata terhadap sensitifitas sel PHA yang dihasilkannya.

Tabel 14. Perbandingan sensitivitas sel PHA/adw, PHA/adr dan PHA/ayw untuk mendeteksi anti-HBs

Standard anti-HBs	Titer hemaglutinasi rata-rata (2^n)		
	PHA/adw	PHA/adr	PHA/ayw
anti-HBs/a	4,07 ^a	4,09 ^a	4,04 ^a
anti-HBs/d*	1,62 ^a	3,97 ^b	0,00
anti-HBs/w	3,65 ^a	0,00	3,77 ^a

Keterangan :

* a-b : berbeda nyata ($p < 0,0001$)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sub tipe berpengaruh terhadap antigenitas HBsAg; epitope d HBsAg sub tipe adr lebih antigenik dibanding HBsAg sub tipe adw.

HBsAg mempunyai determinan antigenik umum a dan determinan subtipe d/y dan w/r; ada tiga macam antibodi monoklonal untuk determinan a dan masing-masing satu antibodi monoklonal untuk determinan d dan y (Peterson *et al.*, 1984). Dalam penelitian ini digunakan anti-HBs/d monoklonal sebagai standar untuk mengukur sensitifitas sel PHA yang dibuat dari HBsAg sub tipe adr dan sub tipe adw. Dari Tabel 14 terlihat bahwa sensitifitas sel PHA yang dibuat dari HBsAg sub tipe adr lebih tinggi dibanding sel PHA yang dibuat dari HBsAg sub tipe adw. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan HBsAg adr untuk mengikat anti-HBs/d lebih kuat dibanding HBsAg sub tipe adw; dengan demikian epitope d HBsAg adr lebih antigenik dibanding HBsAg adw. Hasil pengukuran antigenisitas epitope d ini menyokong temuan pada survei seroepidemiologik, yaitu bahwa epitope d yang berasal dari sub tipe berbeda (adw dan adr) ternyata mempunyai antigenisitas yang berbeda.

Tidak ada perbedaan antigenisitas yang bermakna antara epitope a pada HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw; demikian juga antara epitope w pada HBsAg sub tipe adw dan ayw.

Baik PHA/adw, PHA/adr maupun PHA/ayw tidak berbeda sensitifitasnya untuk mendeteksi anti-HBs/a, yaitu antibodi terhadap determinan kelompok a yang diperoleh dari pemurnian anti-HBs kelinci yang mendapat imunisasi HBsAg murni sub tipe ayw. Telah diketahui, dalam determinan kelompok a dari satu sub tipe HBsAg bisa terdapat 3 macam epitope yaitu determinan a^1 , a^2 dan a^3 ; oleh karena itu anti-HBs/a standar yang dipakai dalam penelitian ini menggunakan anti-HBs/a yang diperoleh dari pemurnian anti-HBs/ayw poliklonal. Dengan demikian hasil penelitian ini memberi petunjuk bahwa tidak terdapat

perbedaan antigenisitas epitope *a* antara HBsAg sub tipe adw, adr maupun sub tipe ayw. Anti-HBs/w standar yang dipakai untuk mengukur antigenisitas epitope *w* adalah juga antibodi monoklonal. Hasil pengukuran menunjukkan tidak ada perbedaan sensitifitas antara sel PHA/adw dan sel PHA/ayw dalam mendeteksi anti-HBs/w, berarti tidak ada perbedaan antigenisitas epitope *w* antara HBsAg sub tipe adw dan sub tipe ayw.

Selama ini reagensia (Elisa atau RIA) untuk mendeteksi anti-HBs biasanya menggunakan campuran HBsAg sub tipe ad/ay, karena dianggap bahwa campuran sub tipe ad dan ay cukup sensitif untuk mendeteksi anti-HBs total dari semua sub tipe. Biasanya bila reagensia tersebut dibuat oleh pabrik di Amerika atau Eropa maka HBsAg yang digunakan adalah sub tipe adw dan ayw. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa epitope *d* dari sub tipe adw dan adr ternyata berbeda antigenisitasnya. Oleh karena itu pandangan bahwa epitope *d* yang berasal dari HBsAg sub tipe adw akan sama sensitif didalam mendeteksi anti-HBs/d yang berasal dari sub tipe adr nampaknya perlu ditinjau lagi.

Pengukuran Imunogenisitas HBsAg

Pengukuran respon anti-HBs pada mencit Balb/c dilakukan 10 hari setelah suntikan II. Pemeriksaan anti-HBs dilakukan terhadap serum yang di kumpulkan dari masing-masing lot tiap sub tipe. Hasil pemeriksaan anti-HBs (RIA) dari tiap kelompok mencit yang masing-masing disuntik dengan HBsAg/adw, HBsAg/adr dan HBsAg/ayw terlihat pada Tabel 15.

Table 15. Respon anti-HBs pada mencit Balb/c yang mendapat imunisasi HBsAg dari berbagai sub tipe, 10 hari setelah suntikan II

No. lot.	Respon anti-HBs (RIA Unit)		
	adw	adr	ayw
1.	200.000	2.320.000	280.000
2.	2.880.000	2.560.000	640.000
3.	320.000	4.480.000	400.000
4.	160.000	640.000	224.000
5.	1.600.000	1.380.000	1.040.000
6.	880.000	1.760.000	200.000
Rata- rata*	1.006.667 ^a	2.190.000 ^b	464.000 ^{ac}

Keterangan :

* a- b : berbeda nyata ($p < 0,05$)

b-ac : berbeda nyata ($p < 0,001$)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sub tipe berpengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg; pada mencit Balb/c HBsAg sub tipe adr lebih imunogenik dibanding HBsAg sub tipe adw dan sub tipe ayw.

Menurut Millich *et al.* (1983), respon anti-HBs pada mencit dipengaruhi oleh sub tipe HBsAg, skedul imunisasi dan waktu pengambilan darah. Biasanya titer anti-HBs mencapai puncak pada minggu ke 5-8 setelah suntikan ke 1 atau 1-3 minggu setelah suntikan ke 2 (Rutgers *et al.*, 1988; Gerlich *et al.*, 1988; Millich *et al.*, 1983; Coursaget *et al.*, 1985). Menurut Millich *et al.* (1983), anti-HBs yang muncul dipengaruhi oleh sub tipe HBsAg, dalam arti macam antibodi poliklonal yang muncul akan sesuai dengan sub tipe HBsAg yang disuntikan; yaitu anti-HBs/a, anti-HBs/d, anti-HBs/y, anti-HBs/w atau anti-HBs/r tergantung pada sub tipe HBsAg yang disuntikan. Sangat jarang dilakukan penelitian mengenai pengaruh sub tipe HBsAg (dalam hubungannya dengan kandungan antigen pre-S) terhadap respon anti-HBs total. Sebagian besar penelitian yang telah dilakukan adalah tentang pengaruh perbedaan kandungan antigen pre-S2 terhadap respon anti-HBs.

Rutgers *et al.* (1988) melaporkan bahwa 30 hari setelah satu kali suntikan HBsAg, mencit yang disuntik *middle protein* (protein pre-S2) menunjukkan titer anti-HBs (anti-S) yang lebih tinggi dibanding yang mendapat suntikan *major protein*. Demikian juga Coursaget *et al.* (1985) melaporkan bahwa mencit yang disuntik dengan vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S2 mempunyai titer anti-HBs yang lebih tinggi dibanding mencit yang disuntik vaksin hepatitis B tanpa antigen pre-S2. Dalam penelitian tersebut Coursaget *et al.* mendapatkan perbedaan titer anti-HBs mulai minggu ke 4 setelah suntikan ke 2 dan mencapai maksimum pada minggu ke 6. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa vaksin yang me-

ngandung antigen pre-S2 lebih unggul dibanding vaksin hepatitis B tanpa antigen pre-S2. Para ahli lain meneliti perbedaan respon anti-HBs pada mencit yang disuntik dengan partikel HBsAg yang berbeda yaitu HBsAg selubung partikel Dane, partikel HBsAg tubuler dan partikel HBsAg bulat. Heerman *et al.* (1987) dan Gerlich *et al.* (1988) melakukan penelitian menggunakan partikel Dane, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat sebagai imunogen. Tiga kelompok mencit Balb/c masing-masing diimunisasi dengan salah satu antigen tersebut (0,8-1,0 mcg/0,1 ml) pada hari ke 1 dan hari ke 30; darah diambil pada hari ke 40. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan nyata total anti-HBs pada ketiga kelompok mencit tersebut; tetapi Gerlich mendapatkan bahwa titer anti-pre-S pada mencit yang disuntik virion dan HBsAg tubuler lebih tinggi dibanding mencit yang disuntik HBsAg bulat. Dalam penelitian tersebut, Heerman dan Gerlich masing-masing menggunakan tiga macam antigen (HBsAg virion, HBsAg tubuler dan HBsAg bulat) yang mengandung antigen pre-S2 yang tidak berbeda.

Dalam penelitian ini skedul vaksinasi dan waktu pengambilan darah antar 3 kelompok mencit percobaan adalah sama. Vaksinasi diberikan pada hari ke 1 dan hari ke 30 dengan dosis 10 mcg/0,1 ml, intraperitoneal; sedang pengambilan darah dilakukan 10 hari setelah vaksinasi ke 2. Subtipe HBsAg yang dipakai adalah subtipe adw, adr dan ayw, yang mengandung antigen pre-S2 berbeda; kandungan antigen pre-S2 HBsAg subtipe adr lebih tinggi dibanding HBsAg subtipe adw dan ayw dan kandungan antigen pre-S2 HBsAg subtipe adw lebih tinggi dibanding HBsAg ayw. Pengukuran anti-HBs dengan metoda RIA (Abbott) menunjukkan bahwa total anti-HBs pada mencit yang disuntik HBsAg subtipe adr lebih tinggi dibanding yang disuntik HBsAg subtipe adw dan ayw ($p < 0,05$). Mencit yang mendapat suntikan HBsAg subtipe adw cenderung mempunyai titer anti-HBs

yang lebih tinggi dibanding yang disuntik HBsAg sub tipe ayw; tetapi perbedaan tersebut tidak bermakna ($p > 0,05$). Kit Ausab RIA (Abbott) yang dipakai dalam penelitian ini menggunakan campuran HBsAg sub tipe adw dan ayw, sehingga anti-HBs/r pada mencit yang mendapat suntikan HBsAg sub tipe adr tidak dapat terdeteksi dengan pemeriksaan tersebut. Oleh karena itu jika pemeriksaan anti-HBs dilakukan dengan kit Ausab RIA yang menggunakan campuran HBsAg sub tipe adw, ayw dan sub tipe adr maka pasti titer anti-HBs pada mencit yang mendapat suntikan HBsAg sub tipe adr akan terdeteksi lebih tinggi lagi. Bukti-bukti pada binatang percobaan maupun pada manusia menunjukkan bahwa vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S2 lebih imunogenik dibanding vaksin tanpa antigen pre-S2. Pada percobaan dengan mencit, HBsAg yang mengandung antigen pre-S2 menimbulkan respon anti-HBs yang lebih tinggi dibanding HBsAg tanpa pre-S2. HBsAg dengan antigen pre-S2 juga dapat menimbulkan respon anti-HBs (anti-S) pada mencit yang tidak bereaksi terhadap HBsAg tanpa antigen pre-S (Neurath et al., 1986; Millich et al., 1985a & 1985b; Tiollais et al., 1986).

Percobaan klinik telah dilakukan untuk membedakan imunogenisitas dan efektifitas vaksin hepatitis B dengan dan tanpa antigen pre-S. Para ahli melaporkan bahwa vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S2 lebih imunogenik dibanding vaksin tanpa antigen pre-S2. Penelitian pada individu dewasa yang mendapat vaksinasi hepatitis B menunjukkan terdapat sekitar 8,5-15% individu yang tidak menunjukkan respon anti-HBs, tetapi hanya 1,7% yang tidak menunjukkan respon anti-preS2 (Neurath et al., 1986; Tabor et al., 1990). Menurut Stevens et al. (1984), efektifitas vaksin hepatitis B yang mengandung antigen pre-S lebih unggul dibanding vaksin hepatitis B tanpa antigen pre-S. Penelitian pada penderita hemodialisis menun-

juukkan bahwa vaksin hepatitis B dengan antigen pre-S mempunyai daya lindung yang jauh lebih besar dibanding vaksin tanpa antigen pre-S. Para ahli juga menunjukkan bahwa anti-pre-S2 merupakan antibodi yang protektif (Itoh *et al.*, 1986; Neurath *et al.*, 1986) dan muncul lebih cepat dibanding anti-S (Petre & Peetermans, 1990); sehingga vaksin yang mengandung antigen pre-S2 sangat menguntungkan jika dipakai untuk melindungi individu yang terpapar bahan yang telah tercemar VHB seperti misalnya pada bayi yang lahir dari Ibu pengidap HBsAg.

Efek potensiasi respon imun oleh antigen pre-S2 dan dominannya antigen pre-S1 pada partikel VHB merupakan indikasi kuat bahwa vaksin hepatitis B harus mengandung antigen pre-S (Howard *et al.*, 1988). Pada umumnya vaksin hepatitis B asal plasma dibuat dari HBsAg sub tipe adw dan ayw; demikian pula vaksin hepatitis B generasi ke 2, dibuat dari hasil rekayasa genetik HBsAg sub tipe adw. Hasil penelitian ini memberi petunjuk bahwa sub tipe HBsAg berpengaruh terhadap ekspresi regio pre-S genome VHB. Oleh karena itu untuk membuat vaksin hepatitis B yang banyak mengandung antigen pre-S perlu diteliti sub tipe HBsAg apa yang lebih banyak mengandung antigen tersebut di suatu daerah, sehingga bisa dimanfaatkan dengan sebaik mungkin sebagai sumber vaksin hepatitis B asal plasma. Demikian pula dalam pembuatan vaksin hepatitis B generasi ke 2, perlu diteliti apakah terdapat perbedaan komposisi protein HBsAg hasil rekayasa genetik gena S dan regio pre-S dari berbagai sub tipe HBsAg.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa :

1. Terdapat perbedaan kandungan antigen pre-S₂ pada serum-serum pengidap HBsAg dari berbagai sub tipe. Kandungan antigen pre-S₂ rata-rata pada serum pengidap VHB sub tipe adr lebih tinggi dibanding sub tipe adw dan sub tipe ayw ($p < 0,01$); frekuensi antigen pre-S₁ pada serum-serum pengidap HBsAg sub tipe adr lebih tinggi dibanding pengidap HBsAg sub tipe ayw dan adw ($p < 0,001$). Atas dasar kandungan antigen pre-S sebagai parameter imunogenisitas dapat diambil kesimpulan bahwa di Jakarta dan Surabaya, VHB dari darah pengidap HBsAg sub tipe adr lebih imunogenik dibanding sub tipe adw dan sub tipe ayw.
2. Antigen pre-S positif pada sebagian besar darah donor pengidap HBsAg, baik dengan HBeAg(+) maupun HBeAh(-); dengan demikian status antigen pre-S serum bukan merupakan parameter yang baik untuk menunjukkan ada atau tidaknya aktifitas replikasi VHB pada pengidap HBsAg.
3. Terdapat perbedaan frekuensi HBeAg pada serum-serum pengidap HBsAg dari berbagai sub tipe. Pada titer HBsAg yang sama frekuensi HBeAg pada serum-serum pengidap HBsAg sub tipe adw lebih tinggi dibanding pengidap HBsAg sub tipe adr dan ayw ($p < 0,001$); frekuensi HBeAg pada sub tipe ayw lebih tinggi dibanding sub tipe adr ($p < 0,05$). Dengan menggunakan HBeAg sebagai parameter infektifitas dapat diambil kesimpulan bahwa di Jakarta dan Surabaya, darah donor pengidap HBsAg sub tipe adw lebih infeksius dibanding darah donor pengidap HBsAg sub tipe ayw dan sub tipe adr.

4. HBsAg murni subtype adr mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding HBsAg murni subtype adw dan ayw ($p < 0,001$); demikian juga kandungan antigen pre-S2 HBsAg murni subtype adw lebih tinggi dibanding HBsAg subtype ayw ($p < 0,05$).
5. Subtipe berpengaruh terhadap antigensitas HBsAg; epitope d HBsAg subtype adr lebih antigenik dibanding epitope d HBsAg subtype adw ($p < 0,05$).
6. Pada imunisasi binatang percobaan (mencit Balb/c) ternyata subtype berpengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg; HBsAg subtype adr lebih imunogenik dibanding HBsAg subtype adw dan subtype ayw; perbedaan ini disebabkan oleh karena perbedaan kandungan antigen pre-S.

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa subtype berpengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2 sehingga menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBsAg; juga perbedaan subtype HBsAg membawa perbedaan frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg.

B. Saran

1. *Pembuatan vaksin yang lebih imunogenik dan efektif :*

Dalam penelitian ini imunogenisitas HBsAg diperiksa pada binatang coba mencit Balb/c, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah pada manusia HBsAg subtype adr juga lebih imunogenik dibanding HBsAg subtype adw dan ayw. Hasil penelitian tersebut akan dapat membantu menentukan komposisi subtype HBsAg yang tepat untuk dipakai sebagai vaksin hepatitis B, sehingga vaksin yang dihasilkan akan lebih imunogenik dan mempunyai efektifitas tinggi.

2. Meningkatkan sensitivitas diagnostik :

Selama ini kit diagnostik (import) untuk mendeteksi anti-HBs menggunakan HBsAg subtype ad dan ay (adw dan ayw) sebagai antigen; sedang hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan antigenisitas determinan antigenik d. Epitope d pada HBsAg subtype adr lebih antigenik dibanding epitope d pada HBsAg subtype adw. Oleh karena itu perlu dilakukan penentuan komposisi subtype HBsAg yang tepat untuk meningkatkan sensitivitas reagen diagnostik (Elisa/-RIA/PHA) yang akan dihasilkan.

3. Follow up penderita hepatitis B akut :

Hasil penelitian ini memberi petunjuk bahwa subtype HBsAg berpengaruh terhadap imunogenisitas dan infektifitas (kandungan antigen pre-S) darah donor pengidap HBsAg. Darah pengidap HBsAg Subtype adw lebih infeksius tetapi kurang imunogenik dibanding darah pengidap HBsAg subtype adr dan ayw. Oleh karena itu bila seorang individu tertular VHB yang berasal dari pengidap HBsAg subtype adw maka diduga akan lebih banyak yang menderita infeksi dengan antigenemia persisten dan hepatitis kronik dibanding bila terinfeksi VHB yang berasal dari pengidap HBsAg subtype adr atau ayw. Dugaan ini perlu dibuktikan dengan melakukan penelitian pengaruh subtype HBsAg terhadap perjalanan penyakit hepatitis B akut. Pemeriksaan subtype HBsAg pada penderita hepatitis akut diharapkan akan dapat membantu menentukan prognosa penyakit apakah akan menjurus ke hepatitis kronik atau akan sembuh. Bila penelitian klinik yang dilakukan nanti mendukung dugaan tersebut, maka akan dapat dilakukan usaha-usaha yang lebih terarah untuk mencegah terjadinya kronisitas pada penderita hepatitis B akut, misalnya dengan pemberian terapi interferon secara dini.

RINGKASAN

Terdapat petunjuk bahwa ekspresi genome virus hepatitis B (yaitu protein pre-S dan HBeAg) dapat dipengaruhi oleh sub tipe HBsAg. Berdasarkan fenomena itu, penelitian ini dilakukan dengan hipotesis bahwa sub tipe HBsAg berpengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2 sehingga menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBsAg dan perbedaan sub tipe HBsAg membawa perbedaan frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg.

Penelitian dilakukan dalam dua tahap; tahap pertama merupakan survei seroepidemiologik untuk mempelajari perbedaan kandungan antigen pre-S2 dan frekuensi HBeAg pada donor darah pengidap HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw. Tahap kedua merupakan penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh sub tipe terhadap imunogenisitas HBsAg murni.

Materi penelitian ini adalah darah donor pria pengidap HBsAg dengan titer HBsAg tinggi, di DTD PMI DKI Jakarta dan Surabaya. Tiap darah donor diperiksa titer HBsAg (RPHA, Hepatika Lab) dan sub tipe HBsAg (Elisa), titer antigen pre-S2 (RPHA), antigen pre-S1 (Elisa) serta HBeAg (Elisa) menggunakan kit buatan Institute of Immunology Co., Tokyo. Sampel dengan HBsAg dan HBeAg titer tinggi, yaitu plasma dengan titer HBsAg $> 2^{10}$, HBeAg(+) pada pengenceran plasma 100 kali dan titer antigen pre-S2 $> 2^5$ dikumpulkan menurut sub tipe HBsAg untuk kemudian dilakukan pemurnian HBsAg. Pemurnian HBsAg dilakukan dengan cara presipitasi HBsAg menggunakan PEG 6000 dan serangkaian ultrasentrifugasi meliputi 2 kali buoyant density dalam KBr, KBr rate zonal dan Sucrose rate zonal menurut cara yang lazim. Pengukuran antigenisitas HBsAg dilakukan dengan memeriksa sensitivitas sel PHA (hasil coating eritrosit domba dengan HBsAg sub tipe adw/adr/ayw) untuk mendeteksi anti-HBs standar. Anti-HBs standar yang digunakan

adalah antibodi monoklonal anti-HBs/d dan anti-HBs/w, serta anti-HBs/a yang diperoleh dari pemurnian anti-HBs/ayw dengan *affinity chromatography* menggunakan Sepharose 4B yang ditempel HBsAg/adr. Imunogenisitas HBsAg diukur dari respon anti-HBs (RIA, Abbott) pada mencit Balb/c yang diimunisasi HBsAg [10 mcg/0,1 ml, 1% Al(OH₃)] intraperitoneal. Penyuntikan dilakukan pada hari ke 1 dan hari ke 30, darah diambil pada hari ke 41.

Dari 2193 sampel yang diperiksa didapatkan sub tipe adw, adr, ayw dan sub tipe atipik (adyw, adrw, adyr) masing-masing sebesar 77,8%, 15,7%, 4,9% dan 1,6%. Dari 804 sampel dengan HBsAg dan HBeAg positif titer tinggi didapatkan kandungan antigen pre-S₂ (titer S₂/titer S) rata-rata pada pengidap HBsAg sub tipe adw (n=637), sub tipe adr (n=118) dan sub tipe ayw (n=49) masing-masing adalah 0,132, 0,293 dan 0,215. Pada sampel dengan titer HBsAg >2¹⁰ didapatkan frekuensi HBeAg titer tinggi untuk sub tipe adw, ayw dan sub tipe adr masing-masing sebesar 93,5%, 80,3% dan 63,7%. Hasil pemurnian HBsAg menunjukkan kandungan antigen pre-S₂ HBsAg murni sub tipe adr, adw dan ayw masing-masing adalah 0,166, 0,004 dan 0,002. Pemeriksaan sensitifitas sel PHA/adw, PHA/adr dan PHA/ayw (18 lot/sub tipe HBsAg) menunjukkan bahwa sel PHA/adr lebih sensitif dibanding sel PHA/adw dalam mendeteksi antibodi monoklonal anti-HBs/d (p<0,001). Tidak terdapat perbedaan sensitifitas yang bermakna antara sel PHA/adr, PHA/adw dan PHA/ayw dalam mendeteksi anti-HBs/a; demikian juga tidak terdapat perbedaan sensitifitas yang bermakna antara sel PHA/adw dan PHA/ayw dalam mendeteksi antibodi monoklonal anti-HBs/w. Titer anti-HBs rata-rata dari 24 ekor mencit Balb/c yang masing-masing mendapat imunisasi HBsAg sub tipe adr, adw dan ayw adalah 2.190.000, 1.006.667 dan 464.000 RIA Unit.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa :

1. Terdapat perbedaan kandungan antigen pre-S2 pada darah donor pengidap HBsAg dari berbagai subtipe. Kandungan antigen pre-S2 rata-rata pada pengidap HBsAg subtipe adr lebih tinggi dibanding subtipe adw dan subtipe ayw ($p < 0,01$).
2. Terdapat perbedaan frekuensi HBeAg pada darah donor pengidap HBsAg dari berbagai subtipe. Pada titer HBsAg yang sama frekuensi HBeAg pada darah donor pengidap HBsAg subtipe adw lebih tinggi dibanding pengidap HBsAg subtipe adr dan ayw ($p < 0,001$); frekuensi HBeAg pada subtipe ayw lebih tinggi dibanding subtipe adr ($p < 0,05$).
3. HBsAg murni subtipe adr mengandung lebih banyak antigen pre-S2 dibanding HBsAg murni subtipe adw dan ayw ($p < 0,001$); kandungan antigen pre-S2 HBsAg murni subtipe adw lebih tinggi dibanding HBsAg subtipe ayw ($p < 0,01$).
4. Subtipe berpengaruh terhadap antigensitas HBsAg; epitope d HBsAg subtipe adr lebih antigenik dibanding epitope d HBsAg subtipe adw ($p < 0,001$).
5. Subtipe berpengaruh terhadap imunogenisitas HBsAg; pada mencit Balb/c, HBsAg subtipe adr lebih imunogenik dibanding HBsAg subtipe adw dan subtipe ayw ($p < 0,05$).

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa subtipe HBsAg berpengaruh terhadap kandungan antigen pre-S2 sehingga menyebabkan perbedaan imunogenisitas HBsAg dan perbedaan subtipe HBsAg membawa perbedaan frekuensi HBeAg serum pengidap HBsAg.

SUMMARY

There has been an indication that the expression of pre-S and C region of HBV genome is determined by the subtype of HBsAg. Based on this phenomenon, this study was performed with a hypothesis that the subtype of HBsAg would affect the HBsAg immunogenicity through its specific influence to the content of pre-S antigen, and that the HBsAg subtype would determine the HBeAg frequency among the HBsAg carriers.

The study was carried out in two steps. The first step was an epidemiological survey to study the difference in the pre-S antigen content among blood donors who were HBsAg carriers of subtypes adw, adr and ayw. The second step was an experimental study to investigate the difference of immunogenicity of purified HBsAg of subtypes adw, adr and ayw.

Blood units from male donors having high-titer HBsAg were recruited from the Blood Transfusion Service of the Indonesian Red Cross in Jakarta and Surabaya. Each unit was tested for HBsAg titer (RPHA, Hepatika Lab.), antigen pre-S2 titer (RPHA, Institute of Immunology Co., Tokyo); HBsAg subtype, HBeAg and antigen pre-S1 (Elisa, Institute of Immunology Co., Tokyo). Specimens with high-titer HBsAg and HBeAg were selected using the following criterias : HBsAg titer $>2^{10}$, HBeAg positive at 1:100 dilution and pre-S2 antigen titer $>2^6$. Further they were pooled according to the HBsAg subtypes and were purified. In this study, the presence of HBeAg was used as an indicator of hepatitis B virus (HBV) replication. Purification of HBsAg was performed by a combination of precipitation using PEG-6000 and a series of ultracentrifugation : two-step KBr buoyant density, KBr-rate zonal and Sucrose-rate zonal ultracentrifugations as usual. HBsAg antigenicity was measured by determining the sensitivity of

PHA cells, i.e. sheep erythrocytes coated with purified HBsAg (adw, adr or ayw), to detect standard anti-HBs. Standard anti-HBs were monoclonal anti-HBs/d and anti-HBs/w antibodies (Institute of Immunology Co.), and anti-HBs/a obtained from rabbit sera containing anti-HBs/ayw purified by affinity chromatography using Sepharose 4B (Pharmacia) coupled with HBsAg/adr. Immunogenicity of HBsAg was measured by anti-HBs response (RIA, Abbott) generated by Balb/c mice which were immunized with the HBsAg [10 mcg/0.1 ml, 1% Al(OH)₃] intraperitoneally. The inoculations of HBsAg were given on day 1 and day 30, and blood specimens were collected on day 41.

Of 2,193 specimens investigated, adw, adr, ayw and atypical subtypes (adyw, adrw, adyr) were detected in 77.8%, 15.7%, 4.9% and 1.6% respectively. Among 804 specimens having high titer HBsAg and HBeAg, the mean pre-S2 antigen content (pre-S2 titer/S titer) in adw subtype (n=637), adr (n=118) and ayw (n=49) were 0.132, 0.293, and 0.215 respectively. Pre-S1 antigen was positive in 21.1% (163/774) in the highly HBeAg positive group and 38.4% (112/292) in the HBeAg negative group. Among the specimens with HBsAg titer $>2^{10}$, the frequency of high-titer HBeAg in adw, adr, and ayw subtypes were 93.5%, 63.7% and 80.3%. Results from purification of HBsAg showed the pre-S2 antigen content in adr subtype, adw, and ayw were 0.166, 0.004, and 0.002. The sensitivity tested using PHA/adr, PHA/adw and PHA/ayw cells (n=18/subtype) demonstrated that PHA/adr was more sensitive than PHA/adw in the detection of monoclonal anti-HBs/d antibody ($p < 0.001$). No significant differences in the sensitivity were found among PHA/adr, PHA/adw and PHA/ayw cells in determining anti-HBs/a; similarly, no differences were seen between PHA/adw and PHA/ayw cells in determining anti-HBs/w. The mean titer of anti-HBs generated by Balb/c mice (n=24/subtype) after

immunization using HBsAg of adr, adw, and ayw subtypes were 2,190,000; 1,006,667 and 464,000 RIA Units.

The results obtained in this study show :

1. There are differences in pre-S2 antigen content among sera of HBsAg carriers of various subtypes. The mean content of pre-S2 antigen in carriers of adr subtype is higher than in those of adw and ayw subtypes ($p < 0.01$). Also the frequency of pre-S1 antigen in carriers of adr subtype is higher than in those of ayw and adw subtypes ($p < 0.01$).
2. There are differences in the frequency of HBeAg among sera of HBsAg carriers (with HBsAg titer $< 2^{14}$) of various subtypes. At a similar HBsAg titer, HBeAg is found to be higher in adw subtype than in adr and ayw subtypes; of the latter, HBeAg in ayw subtype is higher than in adr subtype.
3. Purified HBsAg of adr subtype contains pre-S2 antigen more abundantly than that of adw and ayw subtypes ($p < 0.001$); of the latter, pre-S2 antigen content is higher in adw subtype than in ayw subtype ($p < 0.01$).
4. HBsAg subtype is found to be related with the antigenicity of HBsAg; d determinant of adr subtype is more antigenic than that of adw subtype ($p < 0.001$).
5. HBsAg subtype is found to be related with the immunogenicity of HBsAg; in Balb/c mice, adr subtype is more immunogenic than both adw and ayw subtypes ($p < 0.05$).

It is concluded from this study that the subtype of HBsAg has a specific influence to the content of pre-S2 antigen which subsequently affects its immunogenicity. It is also indicated that the HBsAg subtype determines the frequency of HBeAg among HBsAg-carrier sera.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adamowicz P, Coursaget P, Mazert MC, Goudeau A, Lagarde D, and Girard M. Pre-S antigenicity and pre-S immunogenicity of a hepatitis B vaccine. In Nora el Goulli (Ed). Asian Symposium on Strategies for large scale Hepatitis B Immunization. Science Press, Hongkong, 1986.pp.113-117.
2. Almeida JD, Rubenstein D and Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis. Lancet ii:1225-1227, 1971.
3. Anderson and Murray-Lyon. Natural History of the HBsAg Carrier. Gut 26:848-860, 1985.
4. Anonim. Hepaccine B injection, Cheil Sugar Co., Ltd. Unpublished data.
5. Anonim. HBV marker in acute and persistent infection. Institute of Immunology Co., Ltd., Japan, 1988.
6. Arkin H and Colton RA. Tables for Statisticians. 2nd edn, Barnes & Noble Books, New York, 1963.pp.22 & 148.
7. Arnon B & Geiger B. Molecular basis of immunogenicity and antigenicity. in Glynn LE & Steward MW (Eds). Immunochemistry, an advanced textbook. John Wiley & Sons, London, 1977. pp.307-364.
8. Bancroft WH, Mundon FK, and Russell PK. Detection of additional antigenic determinant of hepatitis B antigen. J Immunol 109:842-848, 1972.
9. Baraldini M, Faccini A, Miglio F, Ramadori G, Alberti A, and Realdi G. Radioimmunoassay for hepatitis B e antigen and antibody:correlation with viral replication and prognostic value. Vox Sang 41:139-145, 1981.

10. Beasley RP, Hwang L-Y, Lin C-C, and Chen C-S. Hepatocellulare carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet* ii:1129-1133, 1981.
11. Ben-Porath E, and Wands JR. Monoclonal antibodies as diagnostic probes in the ethiology of hepatitis. *Seminars in Liver Disease* 4(1):76-88, 1984.
12. Blumberg BS, Alter HJ and Visnich S. A New antigen in leukemia sera. *J Med Association* 191:541-546, 1965.
13. Boyden, S.V.. The Adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid, and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med* 93: 107-120, 1951.
14. Brahm J, Fagan EA, Budkowska A, Rolando N, O'Gredy J, Pillot J, Williams R, and Eddleston A. Pre-S2 and anti pre-S2 detection in fulminant hepatitis (Abst). *J Med Virol* 2(4):A58, 1987.
15. Budkowska A, Dubreuil P, Capel F, and Pillot J. Hepatitis B virus pre-S gene-encoded antigenic specificity and anti-pre-S antibody:relationship between anti-preS response and recovery. *Hepatology* 6(3):360-8, 1986a.
16. Budkowska A, Riottot MM, Dubreuil P, Lazizi Y, Brechot C, Sobczak E, Petit MA, and Pillot J. Monoclonal antibody recognizing pre-S(2) epitope of hepatitis B virus: characterization of pre-S(2) epitope and anti-pre-S(2) antibody. *J Virol* 20(2): 111-25, 1986b.
17. Budkowska A, Dubreuil P, and Pillot J. Prognostic value of pre-S2 epitope of HBV and anti-pre-S2 response evaluated by monoclonal assay (abstr). *J Med Virol* 21(4):A58, 1987.

18. Budkowska A, Dubreuil P, Gerlich WH, Lazizi Y, and Pillot J. Occurrence of pre-S1 antigen in viremic and nonviremic carriers of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol* 26:217-225, 1988.
19. Budkowska A, Dubreuil P, Maillard P, Poynard T and Pillot J. A biphasic pattern of anti-pre-S responses in acute hepatitis B infection. *Hepatology* 12(6):1271-1277, 1990.
20. Burrin DH. Production of antibodies. In Wilson K; Gouling KH (Eds). *A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. 3rd edn, Edward Arnold Pty Ltd. Baltimore, 1986. pp. 121-123.
21. Center for Disease Control. Laboratory Techniques For The Detection of Hepatitis B Surface Antigen. HEW Publication No.(CDC) 78-8353. Atlanta 1987,pp.1-47.
22. Chen SH and Howard CR. Properties and stability of the pre-S region of hepatitis B virus. In Zuckerman AJ (Ed). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988,pp.622-626.
23. Chesebro B and Svehag SE. Precipitation of human serum proteins by polyethylene glycol. *Clin Chim Acta* 20:527-529, 1968.
24. Courouce AM, Lee H, Canavaggio M, Drouet J, Girault A, and Soulier JP. Monoclonal anti-HBs antibodies with restricted reactivity (Abstract). in Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle JH (eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. San Francisco, Grune & Stratton Inc., 1984. p.685.

25. Courouce-Pauty AM, Plancon A. e antigen and anti-e in two categories of chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Vox Sang* 34:231-238, 1978.
26. Courouce-Pauty AM, Plancon A, and Soulier JP. Distribution of HBsAg subtype in the world. *Vox Sang* 44:197-221, 1983.
27. Coursaget P, Barres JP, Chiron JP, and Adamowicz P. Hepatitis B vaccine with and without polymerized albumin receptor. *Lancet* i:1152-1153, 1985.
28. Dane DS, Cameron CH and Briggs M. Virus-like particles in serum patient with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* i:695-698, 1970.
29. Dienstag JL. Immunologic mechanism in chronic viral hepatitis. In Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle JH (Eds). *Viral hepatitis and liver diseases*. Grune & Stratton Inc., New York, 1984. pp.135-164.
30. Dreesman GR, Hollinger FB, Suriano JR, Fujioka RS, Brunscwig JP, and Melnick JL. Biophysical and biochemical heterogeneity of purified hepatitis B antigen. *J. Virol.* 10:469-476, 1972.
31. Dudley FJ, Fox RA, and Sherlock S. Cellular immunity and hepatitis-associated Australia antigen liver disease. *Lancet*, ii:1388-1393, 1972.
32. Eddleston ALWF. Immunological aspect of hepatitis B virus infection. In Zuckerman (Ed). *Viral hepatitis and liver diseases*. Allan R Liss Inc., New York, 1988. pp.603-605.

33. Eddleston ALWF and Dixon B. Interferon in the treatment of chronic virus infection of the liver. Pennine Press, Cheshire, 1990.pp.47-57.
34. Estacio RC, Chavez CC, Okamoto H, Lingao AL, Reyes MT, Domingo E, and Mayumi M. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome of subtype adw isolated from a Philipino:comparison with reported three genomes of the same subtype. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 3:215-222, 1988.
35. Ferrari C, Fiaccadori F, and Chisarri FV. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis B. *Italian J Gastroenterol* 19:224-230, 1987.
36. Gebreselassie L. The distribution of the subtypes of HBsAg in Ethiopia. *International Journal of Epidemiology* 15(3):392-394, 1986.
37. Gerber MA and Thung SN. Viral hepatitis:pathology. In Haubrich WS, Kalser MH, Roth JLA, and Schaffner F (Eds). *Bockus Gastroenterology Volume 5. IVth Edn*, WB Saunders Company, Philadelphia, 1985.pp.2825-2855.
38. Gerety RJ, and Tabor, E.. Newly licensed hepatitis B vaccine known safety and unknown risks (editorial). *J.Am Med A.* 249(6):745-746, 1983.
39. Gerin JL, Holland PV, and Purcell RH. Australia antigen: large-scale purification from human serum and biochemical studies of its protein. *J Virol* 7:569-576, 1971.
40. Gerken G, Manns M, Gerlich WH, Hess G, and Meyer zum Buschenfelde KH. Pre-S encoded surface protein in relation to the major viral surface antigen in acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 92(6):1864-1868, 1987a.

41. Gerety RJ, Hoofnagle JH, Norkman DF, and Barker LF. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) subtypes and indices of clinical disease. *Gastroenterology* 68:1253-1260, 1975.
42. Gerlich WH, Heermann KH, Kruse F, Marquardt O, and Seifer M. Immunogenicity of gene S and pre-S domains in hepatitis virions and in recombinant hepatitis B surface antigen filament. In Zuckerman (Ed). *Viral hepatitis and liver disease*. Alan R. Liss, Inc., 1988. pp.1091-1093.
43. Griffitt OM. *Techniques of preparative, zonal, and continuous flow ultracentrifugation*. Beckman Instrument Inc., 1983.
44. Gunawan S, Mulyanto, David HM, D. Sumarsidi, Sulastini, Herry Purbayu, Karyono W, dan Soewignjo. Infeksi VHB hiperendemik dengan sub tipe langka di Lombok Utara. *Pertemuan Ilmiah III PPHI, Palembang, 1985*.
45. Hadziyannis S, Raimondo G, Papaioannou C, Anastassakos C, Wong D, Sinsky J, and Shafritz D. Expression of pre-S gene-encoded protein in liver and serum during chronic hepatitis B virus infection in comparison to other markers of active virus replication. *Other Journal* 5(3):253-9, 1987.
46. Hadziyannis S, Bramou T, Makris A, Moussoulis G, Zignego L, and Papaioannou C. Interferon alfa-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic active hepatitis type B. *J Hepatology* 11:S133-S136, 1990.

47. Hartono, Soewignjo, Mulyanto, S Gunawan dan Nurayandari. Infeksi hepatitis B di Bajawa, Flores. Pertemuan Ilmiah V PPHI, Jkarta, 1990.
48. Heermann KH, Goldmann U, Scwartz W, Seyffarth T, Baumger-ten H, and Gerlich WH. Large surface protein of hepatis-tis B virus containing the Pre-S sequence. J Virol 52(2):396-402, 1984.
49. Heerman KH, Kruse F, Seifer M, Gerlich WH. Immunogenici-ty of the gene S and pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. Intervirology 28:14-25, 1987.
50. Helstrom UB and Sylvan SPE. The immune respon against pre-S2-encoded peptides and human serum albumin during hepatitis B virus infection. Postgraduate Medical Jour-nal 63(Suppl.2):165-168, 1987.
51. Hess G, Gerken G, Gerlich W, and Meyer zum Buschenfelde KH. Expression of hepatitis B virus markers in asympto-matic HBsAg carriers with special emphasis to pre-S expression. Other Journal 3(S1):S130, 1986.
52. Hess G, Gerken G, Weber C, Knolle J, Dormeyer HH, Arnold W, Manns M, and Meyer zum Buschen felde KH. Detection of hepatitis B virus marker in sera of asymptomatic hepatis-tis B surface antigen carriers with special emphasis to pre-S-encoded proteins. Digestion 38(2):90-5, 1987.
53. Hess G, Gerken G, Weber C, Manns M and Meyer zum Buschen-felde KH. Reactivation of chronic type B hepatitis:the the effect on expression of serum HBV-DNA and pre-S encoded protein. J Med Virol 25(2):197-204, 1988.

54. Hino O, Ohtake K, and Rogler CE. Feature of two hepatitis B virus DNA integrations suggest mechanisms of HBV integration. *J Virol* 29(6):403-415, 1989.
55. Hirata AA and Brandriss MW. Passive hemagglutination procedures for protein and polisacharide antigen using erythrocytes stabilized by aldehydes. *J Immunol* 100:641-646, 1968.
56. Holland PV, Purcell RH, Smith H, and Alter HJ. Subtyping of hepatitis associated antigen (HBsAg); simplified technique with counterelectrophoresis. *J Immunol* 109(3):420-425, 1972.
57. Holland PV. Hepatitis B surface antigen and antibody (HBsAg/Anti-HBs). In Gerety RJ. (Ed). *Hepatitis B*. Academic Prees Inc., New York, 1985.pp.5-25.
58. Hoofnagle JH. Type B hepatitis: virology, serology and clinical course. *Seminar in Liver Dis* 1(1):1-14, 1981.
59. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Smallwood LA, and Barker LF. Subtyping of hepatitis B virus antigen and antibody by radioimmunoassay. *Gastroenterology* 72:290-296, 1977.
60. Howard CR, Stirk HJ, Brown SE, and Steward MW. Toward the development of synthetic hepatitis B vaccines. In Zuckerman (Ed). *Viral hepatitis and liver disease*. Alan R. Liss, Inc., 1988.pp.1094-1101.
61. Hu PS, Carithers Jr RL, Firenza V, and Darrell L. Quantative studies of the hepatitis B viral pre-S proteins:lack of correlation with HBsAg status. *J Virol Methods* 16:97-114, 1987.

62. Hu KQ, Yu ZQ, Li FH, and Hao LJ. Expression and clinical significance of pre-S1 and pre-S2 proteins of HBV sera of patients with chronic liver disease. *Liver* 9:146-152, 1989.
63. Ibarra MZ, Mora I, Bartolome J, Banda FL, Porres JC, Hernandez-Guio C, Carreno V. Pre-S1 and pre-S2 antigens among HBsAg carrier:relation with viral replication and reactivation in anti-HBe patients (abstr). *Other Journal* 5(S1):S146, 1987.
64. Ibarra MZ, Mora I, Bartolome J, Porres JC, and Carreno V. Detection of proteins encoded by the pre-S region of hepatitis B virus in the sera of HBsAg carriers:relation to viral replication. *Liver* 9:153-158, 1989.
65. Iizuka H. HBsAg precipitation by PEG. Unpublish data.
66. Itoh Y, Takai E, Ohnuma H, Kitajima, Tsuda F, Machida A, Mishiro S, Nakamura T, Miyakawa, and Mayumi M. A synthetic peptide vaccine involving the product of the pre-S2 region of hepatitis B virus DNA:protective efficacy in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci* 83:9174-9178, 1986.
67. Jawetz E, Melnick JL and Aldelberg EA. Review of medical microbiology. 12th edn, Lange Medical Publication Maruzen Co., Ltd., 1976.pp.381-391.
68. Jilg W, Gelhoune C, Deinhardt F, Roumeliotou-Karayannis AJ, Papaevangelou GJ, Mushahwar IK, and Overby LR. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) subtype-specific antibodies in persons vaccinated against hepatitis B. *J Med Virol* 13:171-178, 1984.
69. Julius. Sutipe HBsAg di Sumatera Barat. *Pertemuan Ilmiah V PPHI, Jakarta, 1990.*

70. Klingenstein RJ and Dienstag JL. Immunopathogenesis of acute and chronic hepatitis B. In Gerety RJ (Ed). Hepatitis B. Academic Press, New York, 1985. pp.221-241.
71. Klinkert MQ, Theilmann L, Pfaff E and Schaller H. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 58(2):522-525, 1986.
72. Kurai K, Iino S, Koike K, Mitamura K, Endo Y, and Oka H. Pre-S2 antigen in chronic HBV infection: a new marker for HBV replication (Abstr). *J Med Virol* 21(4):A58-9, 1987.
73. Kurai K, Iino S, Koike K, Mitamura K, Endo Y and Oka H. Serum titers of pre-S2 antigen in patient with acute and chronic type B hepatitis: relation to serum amino transferase activity and other hepatitis B virus markers. *Hepatology* 9(2):175-179, 1989.
74. Kurai K, Iino S, Koike K, Mitamura K, Endo Y, and Oka H. Pre-S(2) antigen in chronic hepatitis B virus infection: A new marker for HBV replication. In Zuckerman (Ed). *Viral hepatitis and liver disease*. Alan R. Liss, Inc., 1988. pp.284-286.
75. Kusumobroto HO. Pengelolaan perdarahan masif varises esofagus pada sirosis hati (Disertasi). Airlangga University Press, Surabaya, 1983.
76. Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 123(6):671-675, 1971.
77. Le Bouvier GL, McCollum RW, Hierholzer WJ, Irwin GR, Krugman S, and Giles JP. Subtypes of Australia antigen and hepatitis B virus. *JAMA* 222(8):928-930, 1972.

78. Levrero M, Jean-Jean O, Franco A, Balsano F, Will H, and Ferricaudet M. Hepatitis B virus X gene expression in human cells and anti-X antibody detection in chronic hepatitis B virus infection. In Zuckerman AJ (Ed). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.pp.330-333.
79. Lofgren B and Nordenfelt E. Evaluation of new radioimmunoassay for detecting hepatitis B e antigen and its antibody. *J Med Virol* 5:323-330, 1980.
80. Lutz W. Statistical methods as applied to Immunological Data. In Weir DM (Ed). *Handbook of experimental Immunology Vol 3*. 3rd edn Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1978.pp.A2.17-A2.20.
81. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Oda K, Nakamura S, Miyakawa Y, and Mayumi M. A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human serum as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 85:268-274, 1983.
82. Machida A, Kishimoto S, Ohnuma H, Baba K, Ito Y, Miyamoto H, Funatsu G, Oda K, Usuda S, Togami S, Nakamura T, Miyakawa Y, and Mayumi M. A polypeptide containing 55 amino acid residues coded by the pre-S region of hepatitis B virus deoxyribonucleic acid bears the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology* 86:910-918, 1984.

83. Machida A, Ohnuma H, Takai E, Tanaka T, Itoh Y, Tsuda F, Akahane Y, Usuda S, Nakamura T, Miyakawa Y and Mayumi M. A synthetic peptide coded for by the pre-S2 region of hepatitis B virus for adding immunogenicity to small spherical particles made of the product of the S gene. *Mol Immunol* 24(5):523-9, 1987.
84. Magnus LO, and Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia* 80(Section B):335-337, 1972.
85. Maguire HT, Hoefler JP, Siddiqui A. HBV and protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATT-2 by protein-protein interaction. *Science* 252:824-842, 1991.
86. Maupas P, Barin F, Chiron JP, Coursaget P, Goudeau A, Perrin J, Denis F, and Diop Mar I. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention of early HBsAg carrier state in children: control trial in an endemic area (Senegal). *Lancet* i:289-292, 1981.
87. Mayumi M. Novel Hepatitis B Vaccines Involving the Translation Product of the pre-S2 region of Hepatitis B Virus DNA. *Simposium Hepato-Gastroenterologi Nasional*, Mataram, 1986.
88. Mayumi M. Recent advances in the molecular biology of hepatitis B virus: HBV mutants with precore region defects and immunopathological response of the host against them. VIIth Biennial Scientific Meeting of APASL, Jakarta, 1990.
89. Mazzur S, Burgert S, and Blumberg BS. Geographical distribution of Australia antigen determinants d/y and w. *Nature* 247:38-40, 1974.

90. Metselaar D, and Simpson DIH. Practical virology for medical student and practitioners in tropical countries. Oxford University Press, New York, 1982.
91. Millich DR, Leroux-Roels G, and Chisari FV. Genetic regulation of the immune response to hepatitis B surface antigen (HBsAg). II. Qualitative characteristics of the humoral immune response to the a, d, and y determinant of HBsAg. *J Immunol* 130(3):1395-1400, 1983.
92. Milich DR, Thornton GB, Neurath AR, Kent SB, Michell ML, Tiollais P, Chisari FV. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science* 228:1195-1199, 1985a.
93. Milich DR, McNamara M K, McLachlan A, Thornton GB, and Chisari FV. Distinct H-2-linked regulation T-cell responses to pre-S and S regions of the same hepatitis B surface antigen polypeptide allows circumvention of non responsiveness to the S region. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8168-8172, 1985b.
94. Millich DR, McLachlan A, Chisari FV, Nakamura T, and Thornton GB. Two distinct but nonoverlapping antibody binding sites in the pre-S2 region of HBsAg localized within 11 continuous residues. *J Immunol* 137(8):2703-2710, 1986.
95. Millman I, Loeb LA, Bayer ME, and Blumberg BS. Australia antigen (a hepatitis-associated antigen) purification and physical properties. *J Exp Med* 131:1190-1199, 1970.

96. Mishiro S, Imai M, Takahashi K, Machida A, Gotanda T, Miyakawa Y and Mayumi M. A 49,000 dalton polypeptide bearing all antigenic determinants and full immunogenicity of 22-nm hepatitis B surface antigen particles. *J Immunol* 124:1589-1593, 1980.
97. Miyakawa Y and Mayumi M. Hepatitis e antigen and antibody. In Gerety RJ (Ed). *Hepatitis B*. Academic Press Inc., New York, 1985.
98. Moriarty AM, Mitamura K, and Thorntnton GB. Detection of antibody to hepatitis viral X determinant in chronic hepatitis B viral infection. In Zuckerman AJ (Ed). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.pp.345-350.
99. Mulyanto, Soewignjo, Suharjono P, A Widjaya dan L Basuki. Hepatitis B antigen pada penderita penyakit hati di Bagian Penyakit Dalam RSUD Mataram. *KOPAPDI IV*, Medan, 1978.
100. Mulyanto, Soewignjo S, A Widjaya, D sumarsidi, Indradjidi, Nakamura T dan Mayumi M. Prevalensi petanda serologik infeksi VHB pada murid-murid STK-SLTA di Sumbawa Besar. *Pertemuan Ilmiah II PPHI*, Jakarta, 1983.
101. Mulyanto, Soewignjo S, Sulastini, P Hasan, D Sumarsidi dan Makoto Mayumi. Petanda serologik VHB pada penderita penyakit hati di Unit Penyakit Dalam RSUD Mataram. *KOPAPDI VI*, Jakarta, 1984.
102. Mulyanto. Purification of Hepatitis B Surface Antigen By Zonal Ultracentrifugation, a training Report. *Immunology Division, Jichi Medical School, Japan*, 1984.

103. Mulyanto, S Gunawan, Soewignjo S, Alfian S dan Lukman Ichsan. Beberapa aspek pemurnian partikel VHB dari sera HBsAg-positif. Pertemuan Ilmiah III PPHI, Palembang, 1985a.
104. Mulyanto. "Exposure Rate" terhadap infeksi Virus Hepatitis B pada penduduk P.Air (Selat Lombok). Pertemuan Ilmiah III Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia, Palembang, 1985b.
105. Mulyanto. Subtipe HBsAg dalam hubungannya dengan golongan darah ABO dari darah donor di DTD PMI Surabaya. Pertemuan Ilmiah IV PPHI, Surabaya, 1987.
106. Mulyanto. Protein pre-S2 dan subtipe HBsAg pada darah donor dengan HBsAg positif titer tinggi. Komunikasi Ilmiah antar Cabang, dalam rangka Konker PPHI, PEGI & PGI, Manado, 1989.
107. Mulyanto, Soewignjo S and FX Budhianto Suhadi. The role of subtype of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the infectivity of HBsAg-positive sera. VIIth Biennial Scientific Meeting APASL, Jakarta, 1990.
108. Mulyanto, B Sanjaya, Hartono, Soewignjo S, D Sumarsidi, S Gunawan, and SDA Soesbandoro. HBsAg subtype in some areas of the eastern part of Indonesia. VIIth Biennial Scientific Meeting APASL, Jakarta, 1990.
109. Mulyanto, S Gunawan, Soewignjo S dan D Sumarsidi. Prevalensi HBsAg dan subtipe HBsAg di NTT. Laporan Penelitian, 1991.

110. Nath N, Fang GT, Ledman R, Massur S, Dodd RY. Relationship of subtype of hepatitis B surface antigen with e antigen and its corresponding antibody. *J Infect Dis* 138:252-255, 1978.
111. Neurath AR, Kent SBH, Strick N. Location and chemical synthesis of a pre-S gene coded immunodominant epitope of hepatitis B Virus. *Science* 224:392-395, 1984.
112. Neurath AR, Kent SBH, Strick N, Taylor P, and Stevens CE. Hepatitis B virus contains pre-S gene-encoded domains. *Nature* 315:154-156, 1985.
113. Neurath, A.R., Adomawicz, P., Kent, S.B.H., Riottot, MM, Strick, N., Parker, K., Offensperger, W., Petit MA, Petit, M.A., Wahl, S., Budkowska, A., Girard, M. and Pillot, J.. Characterization of monoclonal antibodies specific for the pre-S2 region of the hepatitis B virus envelope protein. *Mol Immunol* 23(9):991-7, 1986.
114. Neurath AR, Kent SBH, Strick N, and Parker K. Biological role of pre-S sequences of the hepatitis B virus envelope protein: implication for vaccine design. IVth Asian symposium on strategy for large scale hepatitis B immunization, Hongkong, 1986.
115. Neurath AR, Kent SBH, Strick N, Parker K, Courource AM, Riottot MM, Petit MA, Budkowska, A, Girard M, and Pillot J. Antibodies to synthetic peptides from the pre-S1 and pre-S2 regions of one sub-type of the hepatitis B virus (HBV) envelope protein recognize all HBV subtypes. *Mol Immunol* 24(9):975-80, 1987.

116. Neurath AR, Cosio L, Price AM, and Lippin A. Purification of hepatitis B antigen associated particles, use of reorienting gradient rotor. *Proc Soc exp Bio Med.* 144:384-390, 1973.
117. Nishioka K. Predominant mode of transmission of hepatitis B virus perinatal transmission in Asia. In Vyas GN, Dienstag JL, & Hofnagle JH (Eds). *Viral Hepatitis B and Liver Disease: 1984 International Symposium.* San Francisco, Grune & Stratton Inc., 1984, pp.423-432.
118. Nishioka K. Hepatitis B virus and hepatocellulare carcinoma; postulates for an ethiological relationship. In Klein G (Ed). *Advances in viral oncology, Vol 5.* New York, Raven Press, 1985.pp.173-199.
119. Nowotny A. *Basic Exercises in Immunochemistry a Laboratory Manual.* 2nd, Springer-Verlag, New York, 1979. pp.211-212.
120. Okamoto H, Imai M, Usuda S, Tanaka E, Tachibana K, Mishiro S, Machida A, Nkamura T, Miyakaw W, and Mayumi M. Hemagglutination assay of polypeptide coded by the pre-S region of hepatitis B virus DNA with monoclonal antibody: correlation of pre-S polypeptide with the receptor for polymerized human serum albumin in serum containing hepatitis B antigen. *J immunol* 134(2):1212-1216, 1985.
121. Okamoto H, Imai M, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, and Mayumi M. Point mutation in the S gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtype change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *J Virol* 61(10):3030-3034, 1987.

122. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Retno-Sastrosoewignjo, Imai M, Miyakawa Y, and Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtype. *J Gen Virol* 69:2575-2583, 1988.
123. Okamoto H, Omi S, Wang Y, Itoh Y, Tsuda F, Tanaka T, Akahane Y, Miyakawa Y, and Mayumi M. The loss of subtypic determinants in alleles, d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen. *Molecular Immunology* 26(2):197-205, 1989.
124. Ou JH and Rutter WJ. Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the pre-S1 protein. *J Virol* 61(3):782-786, 1987.
125. Patzer EJ, Simonsen CC, Nakamura GR, Hershberg RD, Gregory TJ, and Levinson AD. Characterization of recombinant-derived hepatitis B surface antigen secreted by continuous cell line. In: Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle JH (Eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Grune & Stratton, Inc., New York, 1984. pp.477-485.
126. Peterson DL, Paul DA, Lam J, Tribby IIE, and Achord DT. Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 132(2):920-927, 1984.
127. Petit MA, Dubanchet S, Capel F, Voet P, Dauguet C, and Hauser P. HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-pre-S1(21-47) (absct). *Virology* 180(2):483-491, 1991.

128. Petre J and Peetermans J. Yeast derived hepatitis B vaccine. International Scientific Seminar:Recent advanced in the development of vaccine. Bio Farma, Bandung, 1990.
129. Polson A, Potgieter GM, Largier JF, Mears GEF, and Joubert FJ. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. Biochim Biophys Acta 82:463-475, 1964.
130. Pontisso P, Alberti A, Bortolotti F, and Realdi G. Polymerized human serum albumin in acute and in chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology 84(2):220-226, 1983.
131. Pontisso P, Bankowski M, and Peeples M. Evidence for hepatitis B virus middle S protein binding to human liver membranes (Abst). Other Journal S11D:15, 1987.
132. Prince AM, Vnek J, and Brotman B. An affordable multiterminant plasma derived hepatitis B virus vaccine. In Williams AO, O'Connor GT De-The GB, and Johnson CA (Eds). Virus associated cancers, 1984.pp.355-372.
133. Purcell RH. Hepatitis B: a scientific succes story (Almost). In Infection, Immunity, and blood Transfision. Alan R. Liss, Inc. 1985, pp.11-43.
134. Rioche M. Subtype of HBsAg in Marocco: general distribution in HBsAg carriers in Casablanca in term of their clinical state, relation withwith the markers of the HBe system (absct). Bull Soc Pathol Exot Filiales 79(2):191-198, 1986.

135. Robinson WS. The molecular biology of vepatitis B virus and related Viruses of animals. In Gerety (ed). Hepatitis B. Academic Press, Inc., New York, 1985. pp.319-347.
136. Roitt IM. Essential immunology. 6th edn, Blacwell Scientific Publication, Hongkong, 1988.pp.67-68.
137. Rutgers T, Cabezon T, Harford N, Vanderbrugge D, Descurieux M, Opstal OV, Wijnendaele FV, Hauser P, Voet P, and DeWilde M. Expression of different form of hepatitis B virus envelope protein in yeast. In Zuckerman AJ (Ed). Viral Hepatitis and Liver Disease. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.pp.304-308.
138. Rutter WJ, Ziemer M, Ou J, Shaul Y, Laub O, Garcia P. and Standring DN. Transcription unit of hepatitis B virus genes and structure and expression of integrated viral sequences. In In Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle JH (Eds). Viral hepatitis and liver diseases. Grune & Stratton Inc., New York, 1984. pp.67-86.
139. Sanjaya B, Mulyanto, D Sumarsidi, S Gunawan, Sulaiman Ama Ngongu D dan Soewignjo. Infeksi virus hepatitis A dan B pada murid-murid TK dan SD di Jayapura, Irian Jaya. Pertemuan lmiah V PPHI, Jkarta, 1990.
140. Seto E, Mitchell FJ, and Yen TSB. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depend on AP-2 and others transactivation factors. Nature 334:72-74, 1990.
141. Sherlock S. The natural history of hepatitis B. Post-graduate Medical Journal 63(2):7-11, 1987.
142. Sherlock S and Thomas HC. Hepatitis B virus infection:the impact of molecular biology. Hepatology 3:455-456, 1983.

143. Shorey J. A new hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 133(1):1-6, 1976.
144. SmithKline Biologicals. Prospek baru mengendalikan hepatitis B. SmithKline Beecham, 1989.p.15.
145. Snedecor GW. *Statistical Methods*. 5th Edition, Iowa State University Press, Ames Iowa, 1964.pp.251-300.
146. Soewignjo S, Mulyanto, D Sumarsidi, A Widjaya, L Primiharto, Santoso R, dan Mayumi M. Penelitian ekologi infeksi virus hepatitis B di Pulau Air (selat Lombok), laporan I. Naskah Lengkap Pertemuan Ilmiah PPHI II, Jakarta, 1983.pp. 427-468.
147. Soewignjo, S dan Mulyanto. Epidemiologi infeksi Virus Hepatitis B di Indonesia. *Acta Medica Indonesiana* 15:215-230, 1984.
148. Soewignjo S, Mulyanto, D Sumarsidi, Sulastini, P Hasan, L Primiharto, Karyono W dan Mayumi M. Penelitian ekologi infeksi VHB di Pulau Air (Selat Lombok), laporan II. Naskah lengkap KOPAPDI VI, Jakarta, 1984.pp.1372-1380.
149. Soewignjo S, Padmodiwryo S, A Widjaya, Mulyanto, Prawira RK, Dohoriah. Antigen dan antibodi hepatitis B (HBsAg dan anti-HBs) pada pelajar dan mahasiswa di Mataram. Naskah Lengkap KOPAPDI V, Semarang, 1981. pp.382-397.
150. Steel RGD and Torie JH. *Principles and procedures of statistic, a biometrical approach*. 2nd edn, McGraw-Hill International Book Company, London, 1984.pp.231-232.
151. Stevens C, Alter H, Taylor P, Zang E, Harley E, Szmuness W et al. Hepatitis B vaccine receiving hemodialysis: immunogenicity and efficacy. *N Eng J Med* Aug 23:496-501, 1984.
152. Sulaiman A, Nurul Akbar, Noer HMS and Roestam M. Subtype of HBsAg in blood donor in Indonesia. IInd ICMR Seminar on Viral Hepatitis and Related Diseases, Kobe, 1981.

153. Summers J and Mason WS. Replication of the genome of hepatitis B like virus by reverse ttrnascription of an RNA intermediate. *Cell* 29(6):403-415, 1982.
154. Summers J. Replication of hepatitis B viruses. In Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle JH (Eds). *Viral hepatitis and liver diseases*. Grune & Stratton Inc., New York, 1984. pp.87-96.
155. Summers J. The replication cycle of hepatitis B viruses. *Cancer* 61:1957-1962, 1988.
156. Szmuness W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, Sadovsky R, Morrison JM, and Kellner A. Hepatitis B vaccine:demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Eng J Med* 303:833-841, 1980.
157. Szmuness W, Neurath AR, Stevens CE, Strick N, and Harly EJ. Time trends of the prevalences of hepatitis B e antigen positives among hepatitis B carriers in Japan. *International Journal of Epidemiology* 16(4):579-83, 1981.
158. Tabor E, Gerety RJ, Cairns J, and Bayley AN. Antibody responses of adults, adolescents, and children to a plasma-derived hepatitis B vaccine in a rural African setting. *J Med Virol* 32:134-138, 1990.
159. Tachibana CF, Baba K, Zukuda M, Imai M, Miyakawa Y, and Mayumi M. High prevalence of e antigen among healthy blood donors carrying hepatitis B surface antigen in Japan. *Vox Sang* 32:296-2999, 1977.
160. Tachibana K, Tanaka T, Usuda S, Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Miyakawa Y, and Mayumi M. Hepatitis B surface antigen with an excess or deficiency in subtype determinant in sera from asymptomatic carriers in Japan. *Viral Immunology* 2(1):25-29, 1989.

161. Takahashi K, Kishimoto S, Ohnuma H, Machida A, Takai E, Tsuda F, Miyamoto H, Tanaka T, Matsushita K, Oda K, Miyakawa Y, and Mayumi M. Polypeptides coded for by the region pre-S and gene S of HBV DNA with the reseptor for polymerized human serum albumin:expression on hepatitis B particles produced in the HBeAg or anti-HBe phase of hepatitis B virus infection. *J Immunol* 136(9):3467-72, 1986.
162. Theilmann L, Klinkert MQ, Gmelin K, Salfeld J, Schaller H, and Pfaff E. Detection of pre-S1 proteins in serum and liver of HBsAg-positive patient: a new marker for hepatitis B virus infection. *Hepatology* 6(2):186-190, 1986.
163. Thomas HC, Pignatelli M, Goodall A, Waters J, Karayiannis P, and Brown D. Immunologic mechanism of cell lysis in hepatitis B virus infection. In Vyas GN, Dienstag JL and Hoofnagle JH (Eds). *Viral hepatitis and liver disease*. Grune & Stratton, Inc., New York, 1984.pp.167-177.
164. Thomas HC. The hepatitis B virus and host respon. *J Hepatology* 11:S83-S89, 1990.
165. Thung SN, and Gerber MA. Polyalbumin Receptors:their role in the attachment of hepatitis B virus to Hepatocytes. *Seminar in Liver Disease* 4(1):69-75, 1984.
166. Tiollais P, Dejean A, Brechot C, Michel, ML, Soningo P, Wain-Hobson S. Structure of Hepatitis B Virus DNA. In Vyas GN, Dienstag JL, and Hoofnagle, JH (Eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. International Symposium. San Francisco, Grune and Stratton Inc., 1984.pp.49-65.

167. Tiollais P, Purcell C, and Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495, 1985.
168. Tiollais P, Buendia MA, Brechot C, Dejean A, Michel ML, and Pourcel C. Structure, genetic organization, and transcription of Hepadana viruses. In Zuckerman AJ (Ed). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988. pp.295-300.
169. Tsukuma H, Oshima A, Hiyama T, Fujimoto I, Yamano H, and Tanaka M. Time trends of the prevalences of the hepatitis B e antigen positives among hepatitis B virus carriers in Japan. *International Journal of Epidemiology* 16(4):579-583, 1987.
170. Villarejos VM, Anderson-Visona K, Jaime-Serra et al. Anti-DNA, anti-HBc correlation with RIA detected HBeAg and anti-HBe in chronic HBsAg carriers. *J Med Virol* 5:265-271, 1980.
171. Vnek J, and Prince AM. Large scale purification of hepatitis B surface antigen. *J Clin Microbiol* 3(6): 626-661, 1976.
172. Vranckx R, Cole J, and Peetermans M. Correlation between concentration of HBsAg and the presence of HBeAg, ant-HBe and anti-HBc in chronic asymptomatic carriers of HBsAg. *Infection* 8:(6):279-282, 1980.
173. Vyas GN, and Blum HE. Hepatitis B Virus Infection. *West J Med* 140:757-762, 1984.
174. Vyas GN, and Shulman NR. Hemagglutination assay for antigen and antibody in viral hepatitis. *Science* 170:332-333, 1970.

175. Vyas GN, Williams EW, Klaus GGB, and Bond HE. Hepatitis-associated antigen. Protein, peptides and amino acid composition of purified antigen with its use in determining sensitivity of the hemagglutination test. *J Immunol* 108: 1114-1118, 1972.
176. Watson JD; Hopkins NH; Roberts JW; Steitz JA; Weiner AM. *Molecular Biology of the Gene*. 4th Edn, The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, 1987. pp.832-853;936-945.
177. WHO Expert Committee on Viral Hepatitis. *Advances in viral hepatitis*. Technical Report Series 602, 1977.
178. WHO. *Progress in the control of viral hepatitis:Memorandum from a WHO meeting*. Bulletin 66(4):443-455, 1988.
179. Wollersheim M and Hofschneider PH. Transactivation by a product of the X gene of hepatitis B virus. In Zuckerman AJ (Ed). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.pp.334-340.
180. Wong DT, Nath N, and Sninsky JJ. Identification of hepatitis B virus polypeptides encoded by entire pre-S open reading frame. *J. Virol* 55(1):223-231, 1985.
181. Wu T, Condreay LD, Liu C, Mason W, and Jilbert AR. Hepadnavirus DNA synthesis. In Hollinger FB, Lemon SM and Margolis H (Eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991.pp.114-121.
182. Yamashita Y, Kurashina S, Miyakawa Y, and Mayumi M. South to north gradient in distribution of the hepatitis B surface antigen in Japan. *J Infect Dis* 131:567-569, 1975.
183. Zuckerman AJ and Harrison TJ. Hepatitis B virus chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Post Graduate Medical Journal* 63(Sppl.2):13-19. 1987.

CARA PEMURNIAN HBsAg

Pemurnian HBsAg dilakukan 2 tahap; pertama HBsAg dikonsentrasikan dengan cara presipitasi bertahap PEG, kemudian disusul pemurnian dengan ultrasentrifugasi.

Presipitasi Bertahap Dengan PEG 6000 :

Presipitasi HBsAg bertahap dengan PEG dilakukan menurut cara yang dimodifikasi oleh Iizuka (1988). Pertama, 3 liter plasma yang mengandung HBsAg diberi larutan 50% (w/v) PEG 6000 pada pH 4,5 sehingga konsentrasi akhir PEG menjadi 1,3%. Dibiarkan selama 6 jam pada temperatur 4 derajat Celcius, sehingga terjadi endapan. Larutan tersebut kemudian di sentrifus pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan lagi larutan 50% PEG 6000 sampai konsentrasi akhir PEG menjadi 4,5%. Dibiarkan semalam pada temperatur 4 derajat Celcius, kemudian disentrifus supaya endapan sempurna. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan lagi dengan aquadest pada pH 7,5 sampai volume menjadi 850 cc dan siap untuk dimurnikan lebih lanjut dengan cara ultrasentrifugasi. Dengan demikian 6 liter plasma yang dipakai dalam penelitian ini membutuhkan 2 kali presipitasi bertahap dengan PEG. Endapan akhir yang diperoleh dari presipitasi yang kedua ini diencerkan menjadi 600 cc disatukan dengan hasil pemurnian KBr buoyant pertama dan selanjutnya dimurnikan dengan cara KBr buoyant ultracentrifugation tahap kedua.

Pemurnian HBsAg dengan ultrasentrifugasi zonal.

Pemurnian HBsAg dengan ultrasentrifugasi terdiri atas 4 tahap meliputi 2 kali *KBr buoyant density*, *KBr rate zonal* dan *sucrose rate zonal* (Mishiro et al, 1980). *Buoyant density ultracentrifugation* dilakukan dengan membuat densitas sampel menjadi 1,30 g/cc, dengan jalan menambahkan KBr pada 850 cc larutan HBsAg hasil presipitasi dengan PEG. Sampel dimasukkan kedalam rotor melalui lubang pinggir pada waktu rotor berputar 3.000 rpm, yang sebelumnya telah diisi lebih dahulu dengan 250 cc bufer Tris-HCl dan 400 cc larutan KBr densitas 1,27 g/cc. Setelah sampel dan larutan gradient selesai dimasukkan kedalam rotor, putaran diatur menjadi 30.000 rpm selama 16 jam, suhu 10 derajat Celcius. Setelah 16 jam, isi rotor dikeluarkan melalui lubang tengah dengan cara mendorongkan larutan KBr 1,34 g/cc melalui lubang pinggir. Fraksi yang terkumpul diperiksa titer HBsAg, densitas larutan dan optical density pada 280 nm (OD280). Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan densitas antara 1,17 g/cc - 1,24 g/cc dikumpulkan. Fraksi yang terkumpul ditambah larutan HBsAg hasil presipitasi PEG yang kedua, selanjutnya dilakukan pemurnian ulang KBr buoyant dengan cara yang sama. Hasil pemurnian buoyant kedua ini didialisis menggunakan tube selulose terhadap larutan 0,01 M bufer Tris-HCl (pH 7,5) dan dikonsentrasikan dengan tekanan negatif sehingga volume menjadi 75 cc dan siap untuk dimurnikan lebih lanjut dengan KBr rate zonal.

Lampiran 1 (lanjutan).

KBr rate zonal ultracentrifugation dilakukan dengan memasukkan *density gradient* larutan KBr densitas 1,15 g/cc, 1,20 g/cc, 1,25 g/cc dan 1,30 g/cc berturut-turut melalui lubang pinggir rotor, pada kecepatan rotor 3.000 rpm. Sampel (75 cc) dimasukkan kedalam rotor melalui lubang tengah; setelah itu ditambahkan *overlay* Tris-HCl sebanyak 75 cc. Kemudian diputar pada 28.000 rpm, pada 10 derajat Celcius, selama 16 jam. Setelah 16 jam isi rotor dikeluarkan dengan mendorong larutan KBr 1,34 g/cc melalui lubang pinggir rotor. Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan densitas 1,17 g/cc - 1,22 g/cc dikumpulkan dan didialisis serta dikonsentrasikan sehingga volume menjadi 123 cc. Kemudian sampel yang terkumpul dibagi menjadi 6 bagian masing-masing 20 cc dan siap untuk pemurnian tahap akhir (*sucrose rate*).

Sucrose rate zonal ultracentrifugation dilakukan dengan memasukkan larutan *sucrose* konsentrasi 15%, 30% dan 40% (w/v) melalui lubang pinggir rotor pada putaran rotor 3.000 rpm. Sampel (20 cc) diencerkan dengan bufer Tris-HCl menjadi 75 cc, dimasukkan kedalam rotor melalui lubang tengah dan didorong lagi dengan 75 cc bufer Tris-HCl (*overlay*). Diputar 26.000 rpm, pada 10 derajat Celcius, selama 16 jam. Setelah itu isi rotor dikeluarkan dengan mendorong bufer Tris-HCl melalui lubang tengah rotor. Fraksi yang terkumpul diperiksa titer HBsAg, OD280 dan konsentrasi *sucrose* dengan densitometer. Fraksi yang banyak mengandung HBsAg dan dengan larutan *sucrose* antara 30% - 20%, dikumpulkan kemudian didialisis dan dikonsentrasikan sehingga volume menjadi 25 cc. HBsAg hasil pemurnian ini selanjutnya siap untuk diteliti antigenisitas dan imunogenisitas serta diperiksa titer antigen pre-S2.

CARA PENGAWETAN ERITROSIT (Hirata & Brandriss, 1968).

Darah domba diambil dari tempat pemotongan hewan sebanyak 0,5 L langsung ditampung dalam beaker glas yang telah diisi larutan alsever 0,5 L. Kemudian disaring, dicuci dengan larutan garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (3000 rpm, 12 menit). Setelah dicuci, dibuat suspensi eritrosit 10%; kemudian ditambahkan larutan glutaraldehyde 5% sebanyak 1/4 volume darah. Diinkubasikan dalam temperatur kamar selama 2 jam. Diaduk dengan sendok pada menit ke 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, dan menit ke 105. Setelah itu dicuci dengan air garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (3000 rpm, 5 menit). Selesai dicuci, dilarutkan lagi dengan PBS, konsentrasi 5% dan siap untuk ditempli HBsAg.

CARA PEMBUATAN SEL PHA-antiHBs (Boyden, 1951).

Inkubasikan 25 cc suspensi eritrosit 5% (dalam botol gelas 200 cc) pada 37 derajat C, didalam waterbath. Inkubasikan larutan tannic acid (1 mg/100 cc) pada temperatur 37 derajat C, selama 10 menit; didalam water bath. Tambahkan 50 cc larutan tannic acid tadi kedalam botol yang berisi suspensi eritrosit yang telah diinkubasikan, kocok sampai rata dan dibiarkan selama 12,5 menit. Kemudian tambahkan larutan 65 mikrogram HBsAg/cc (dalam PBS) sebanyak 25 cc kedalam masing-masing campuran eritrosit-tannic acid tadi; kocok baik-baik. Inkubasikan selama 2jam pada temperatur 37 derajat C, kocok dengan baik pada menit ke 15, 30, 45, 60, 90 dan menit ke 120. Kemudian cuci dengan larutan garam fisiologis 2 kali dan dengan PBS 1 kali (1800 rpm, 5 menit); selanjutnya larutkan dalam buffer PHA menjadi 1,5 cc (larutan 10%). Simpan pada suhu 2-8 derajat C, selama seminggu; sebelum diperiksa.

Pemurnian Anti-HBs Dengan Affinity Column Chromatograph

Serum yang mengandung anti-HBs/ayw diperoleh dari kelinci yang disuntik dengan HBsAg subtype ayw yang dicampur Freund complete adjuvant (FCA).

Serum kelinci imun sebanyak 40 cc dilewatkan column yang berisi 100 cc sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) yang telah mengikat HBsAg subtype adr. Setelah dicuci dengan NaCl 0,85%, kemudian dilakukan elusi menggunakan larutan glycine 0,01M pH 2,0; ditampung dalam 10 botol masing-masing 10 cc. Fraksi yang banyak mengandung anti-HBs dikumpulkan menjadi satu dan didialisis dalam bufer fosfat 0,15 M, pH 7,2. Setelah dialisis, suspensi anti-HBs tersebut dilewatkan lagi dalam column yang sama, untuk dimurnikan dengan cara yang sama. Proses pemurnian tersebut diulang 2 kali, sehingga diperoleh anti-HBs/a murni.

CARA PEMERIKSAAN SENSITIFITAS SEL PHA-antiHBs.

Pemeriksaan ini dilakukan terhadap sel PHA-antiHBs yang dibuat dari HBsAg sub tipe adw, adr dan ayw dengan cara sebagai berikut. Suspensi PHA 10%, disentrifuse pada 1800 rpm selama 5 menit; buang supernatan dan encerkan kembali dengan buffer RPHA menjadi suspensi 1%. Buat standard anti-HBs dengan pengenceran $2^1 - 2^{12}$ dalam buffer PHA. Teteskan 0,025 cc larutan standard anti-HBs tersebut kedalam microplate pada sumur ke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan sumur ke 10, sesuai dengan pengenceran anti-HBs. Teteskan masing-masing sel PHA kedalam sumur microplate dan getarkan microplate tadi pada mesin getar selama 10 detik. Kemudian biarkan pada temperatur kamar selama 1 jam, pada dasar yang rata dan tidak terkena getaran. Setelah 1 jam baca hasilnya, sensitivitas ditentukan dari titer tertinggi yang masih menunjukkan hemaglutinasi. Aglutinasi sempurna (tanpa ada endapan eritrosit) dinilai 1; aglutinasi 50% (endapan eritrosit sebesar 50% endapan eritrosit pada kontrol negatif) dinilai 0,5; aglutinasi 75% (endapan eritrosit sebesar 25% endapan pada kontrol negatif) dinilai 0,8 dan aglutinasi 25% (endapan eritrosit sebesar 75% endapan eritrosit pada kontrol negatif) dinilai 0,3.

CARA PEMERIKSAAN LABORATORIUM :**1. Penentuan kadar protein HBsAg**

Kadar protein HBsAg diukur secara spektrofotometrik menggunakan panjang gelombang 280 nm (UV). Kadarnya ditentukan dengan pedoman bahwa nilai absorbance (1 cm) = 3,726 ekivalent dengan 1 mg protein HBsAg (Vyas et al, 1972).

2. HBsAg :

Diperiksa dengan metoda *reverse passive hemagglutination* (Hepatika Lab., Mataram) dengan cara pengenceran langsung di dalam microplate. Pertama serum diencerkan 64 kali dengan PBS dalam tabung. Teteskan 0,025 cc bufer RPHA kedalam sumur pertama microplate sampai sumur 10, menggunakan dropper. Kemudian ambil 0,025 cc sampel yang telah diencerkan tadi menggunakan microdiluter taruh di sumur 1 dan encerkan secara serial dalam sumur-sumur tadi menggunakan microdiluter. Kemudian teteskan 0,025 cc sel RPHA 1% kedalam sampel yang telah diencerkan dalam sumur-sumur tadi, menggunakan dropper. Diamkan pada tempat datar dan bebas dari getaran selama 1 jam, kemudian baca hasilnya. Titer HBsAg ditentukan oleh pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan aglutinasi. Pemeriksaan konfirmasi dilakukan dengan mengganti bufer RPHA dengan bufer inhibisi yang mengandung anti-HBs; sampel dinilai positif HBsAg bila selisih antara pengenceran HBsAg dalam bufer RPHA dengan pengenceran dalam bufer inhibisi $\geq 2^2$.

3. Antigen pre-S2:

Titer antigen pre-S2 diperiksa dengan metoda RPHA menggunakan kit buatan Institute of Immunology Co., Ltd. Sel RPHA tersebut dibuat dengan menempelkan antibodi monoklonal (Hyb. no. 5520) terhadap protein pre-S2 sintetik. Cara pemeriksaannya sama dengan pemeriksaan RPHA-HBsAg, juga menggunakan sampel yang telah diencerkan 64 kali dalam buffer pengencer dalam kit; tetapi bufer inhibisi disini mengandung antibodi terhadap antigen pre-S2.

4. HBeAg:

Diperiksa dengan metoda enzyme-linked immunosorbant assay (Elisa) menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.) anti-HBe Hyb 904 yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dan anti-HBe Hyb 905 yang ditempel horseradish peroxidase. Substrat yang digunakan adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Hasilnya dinilai positif bila absorbance pada 492 nm sama dengan atau lebih besar dari 2,5 kali absorbance kontrol negatif. Pemeriksaan dilakukan 2 kali yaitu pada serum yang tidak diencerkan dan serum yang diencerkan 100 kali dalam *bovine serum*

5. Antigen pre-S1

Diperiksa dengan metoda Elisa menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.) anti-preS1 Hyb T0606 yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dan anti-preS1 Hyb T0606 yang ditempel horseradish peroxidase. Substrat yang digunakan adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Hasilnya dinilai positif bila absorbance pada 492 nm sama dengan atau lebih besar dari 2,5 kali absorbance kontrol negatif.

6. Subtipe HBsAg:

Subtipe HBsAg diperiksa dengan metoda Elisa menggunakan antibodi monoklonal (Institute of Immunology Co., Ltd.). Prinsip kerjanya meliputi pembuatan *sandwich* partikel HBsAg (dari sampel) diantara anti-HBs poliklonal kuda (adr) yang ditempelkan pada dasar sumur microplate dengan salah satu atau lebih antibodi monoklonal terhadap determinan subtipe: anti-d (Hyb 3423), anti-y (Hyb 3427), anti-w (Hyb 4111) dan anti-r (Hyb 313), yang ditempelkan horseradish peroxidase. Substrat yang dipakai adalah H₂O₂ dengan indikator OPD. Antibodi yang terikat pada HBsAg kemudian diukur dengan spektrofotometer. Hasilnya dinilai positif bila absorbance sampel 2,5 kali atau lebih dari nilai absorbance kontrol negatif.

7. Pemeriksaan anti-HBs

Pemeriksaan anti-HBs dilakukan dengan metoda radioimmunoassay (RIA), menurut cara yang tertulis dalam buku petunjuk. Sistem kerjanya menggunakan prinsip *sandwich*. Bila pada *plastic beads* yang mengikat HBsAg (subtipe adw & ayw) ditambahkan anti-HBs dari sampel (bila ada) maka selama masa inkubasi akan terbentuk ikatan antigen-antibodi. Setelah dicuci kemudian ditambahkan HBsAg (subtipe adw & ayw) yang dilabel dengan isotop I¹²⁵, sehingga selama waktu inkubasi akan terbentuk *sandwich* antigen-antibodi-antigen radioaktif. Pengukuran radioaktifitas menggunakan gama counter ANSR buatan Abbott Laboratory, USA. Pemeriksaan dilakukan terhadap serum gabungan dari masing-masing lot tiap kelompok perlakuan (6 lot anti-HBs untuk tiap perlakuan). Sampel serum diencerkan sedemikian rupa sehingga hitungan per menit (cpm) sampel mendekati 10 kali cpm rata-rata kontrol negatif.

KURIKULUM VITE

Nama lengkap : Mulyanto
 Tempat dan tanggal lahir : Cilacap, 20 Mei 1948
 Agama : Islam
 Pangkat/Golongan/NIP : Pembina Tk. I/IVb/130534446.
 Jabatan Pokok : Lektor Kepala Madya pada Fakultas
 Peternakan Universitas Mataram
 Alamat Kantor : Fak. Peternakan Universitas
 Mataram, Jl. Pendidikan Mataram,
 Alamat : Komplek UNRAM, Jl. Pemuda 47B,
 Mataram.

RIWAYAT PENDIDIKAN

1. Pendidikan Dasar :

1955-1961 : Sekolah Dasar di Cilacap
 1961-1964 : Sekolah Menengah Pertama di Cilacap
 1964-1967 : Sekolah Menengah Atas di Cilacap

2. Pendidikan Sarjana :

1968-1974 : Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

3. Pendidikan Tambahan :

1981-1982 : Akta Mengajar V
 Training dalam bidang imunologi hepatitis B di Jichi
 Medical School/Institute of Immunology, Jepang :

1984 : Immunology and Purification of Hepatitis B
 Surface Antigen and Antibody : 1984.
 1985 : Quality Control of RPHA/PHA Cells, Produc-
 tion of Monoclonal Antibodies and Purifica-
 tion of anti-HBs.
 1988 : New Method of HBsAg and anti-HBs Purifica-
 tion by PEG and Affinity Chromatography.
 1989 : Epidemiological Study of HBV Antigen and
 antibodies (subtypes and pre-S2) and Basic
 Technique of Elisa System.

Lampiran 7.

RIWAYAT PEKERJAAN

- 1976 - sekarang : Memberi kuliah Fisiologi Hewan pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1982 - 1983 : Memberi kuliah Fisiologi Lingkungan pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1986 - 1988 : Memberi kuliah Biokimia Umum pada Fak. Peternakan Universitas Mataram.
- 1987 - 1989 : Memberi kuliah Biokimia Molekuler pada Fak. Pertanian Universitas Mataram.
- 1977 - 1989 : Bekerja part timer pada UPF Penyakit Dalam RSU Mataram.
- 1986 - sekarang : Bekerja part timer pada Laboratorium Hepatitis Bumi Gora Nusa Tenggara Barat

KEANGGOTAAN PROFESI

1. Ikatan Dokter Indonesia (IDI)
2. Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (PPHI)

KARYA ILMIAH

- I. Sebagai Penulis Utama :
 - A. Tingkat Nasional : 20 judul
 - B. Tingkat Internasional : 2 judul

- II. Sebagai Penulis Pembantu :
 - A. Tingkat Nasional : 35 judul
 - B. Tingkat Internasional : 2 judul

Karya Ilmiah Yang Terpenting (Penulis Utama) :**A. Tingkat Nasional :**

1. HBsAg pada penderita penyakit hati di Unit Penyakit Dalam RSUD Mataram. Dimuat dalam buku prosiding Konggres Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia (KOPAPDI) IV, Medan, 1978.
2. Pertanda serologik HBV pada penderita penyakit hati yang dirawat di Unit Penyakit Dalam RSUD Mataram. Dimuat dalam buku prosiding Konggres Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia VI, Jakarta, 1984.
3. Beberapa Aspek Pemurnian partikel VHB dari darah donor HBsAg positif. Dimuat dalam buku prosiding Pertemuan Ilmiah III Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (PPHI), Palembang, 1985.
4. Subtipe HBsAg dalam hubungannya dengan golongan darah ABO dari darah donor di DTD PMI Surabaya. Dimuat dalam buku prosiding Pertemuan Ilmiah IV PPHI, Surabaya 1987.
5. Pengaruh Jenis Eritrosit terhadap sensitivitas Sel RPHA untuk mendeteksi HBsAg. Di presentasikan pada Seminar Immunologi Nasional PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta, 1988.
6. Protein pre-S2 dan subtipe HBsAg pada darah donor pengidap HBsAg titer tinggi. Dipresentasikan pada Komunikasi Ilmiah antar Cabang PPHI dalam rangka Konker PPHI, Manado, 1989.