

GE. GENOTIPES
HEPATITIS

KK
KKA
TKT . 02/11
Hen
a

TESIS

**ANALISIS GENOTIPE, SUBGENOTIPE DAN SUBTIPE
VIRUS HEPATITIS B (VHB) PADA GENOM REGIO S (*Surface*)
DARI PASIEN DENGAN HBsAg POSITIF
DI KECAMATAN MENGWI, KABUPATEN BADUNG, BALI**



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**MADE AGUS HENDRAYANA
090810200 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**ANALISIS GENOTIPE, SUBGENOTIPE DAN SUBTIPE
VIRUS HEPATITIS B (VHB) PADA GENOM REGIO S (*Surface*)
DARI PASIEN DENGAN HBsAg POSITIF
DI KECAMATAN MENGWI, KABUPATEN BADUNG, BALI**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

MADE AGUS HENDRAYANA

090810200 M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 9 Maret 2010

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL :

Oleh :
Pembimbing Ketua



Prof. Retno Handajani, dr.,MS.,Ph.D.
NIP : 130 541 984

Pembimbing



Maria Inge Lusida, dr.,M.Kes.,Ph.D.,SpMK
NIP : 131 569 394

Mengetahui

**Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya**



Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr.,MS.,Sp.MK
NIP : 131 406 054

Telah diuji pada

Tanggal : 9 Maret 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof.Dr.Ni Made Mertaniasih, dr.,MS.,Sp.MK

Anggota : 1. Prof. Retno Handajani, dr.,MS.,Ph.D.

2. Maria Inge Lusida, dr.,M.Kes.,Ph.D.,SpMK

3. Abu Rohiman, dr.,MS.,Sp.MK

4. Djohar Nuswantoro, dr.,MPH.

5. Setio Harsono, dr.,MS.,Sp.MK(K)

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala Rahmat-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D selaku Pembimbing ketua sekaligus dosen Penasehat Akademik selama mengikuti Program Magister Ilmu Kedokteran Tropis yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan setingginya saya ucapkan kepada dr. Maria Inge Lusida, M.Kes., Ph.D., SpMK selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan serta saran selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan setingginya saya ucapkan kepada Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis Universitas Airlangga Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Kepada Tim Penguji Tesis, yang banyak memberikan masukan, saran serta penilaian dalam penyempurnaan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan Beasiswa Program Pasca Sarjana (BPPS), sehingga menunjang studi saya di program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Udayana, Bali atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta stafnya atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga beserta stafnya atas segala fasilitas dan bantuan kepada saya selama mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Udayana atas ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya.

Kepala Bagian/SMF.Mikrobiologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana atas dukungan, ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya

Kepala *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya Dr.Nasronudin,dr.,Sp.PD-KPTI beserta staf atas ijin, bantuan serta segala fasilitas kepada saya selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Ketua kelompok minat studi hepatitis *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D. atas ijin, bantuan serta segala fasilitas kepada saya selama penelitian dan penulisan tesis ini

Para analis di labolatorium hepatitis *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga Surabaya, Ibu Koen Pudjiati dan Mochamad Amin, S.Si atas bantuan, arahan serta kerjasamanya dengan saya selama penelitian dan penulisan tesis ini

Kolega peneliti CRC-ERID dari Jepang, Takako Utsumi PhD atas bantuan, arahan serta kerjasamanya dengan saya selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Para dosen program pasca sarjana Universitas Airlangga Surabaya atas ilmu, bimbingan, dorongan maupun saran yang diberikan kepada saya.

Kepada keluarga tercinta, kedua orang tua : ayahnda Wayan Sukanta dan Ibunda Luh Putu Suantari, Istri tercinta I Dewa Ayu Novia Saraswati,S.H dan anak yang sangat saya cintai Putu Prasista Ardyaswari Mahavira yang telah memberikan dorongan semangat serta pengertian yang sangat besar selama saya mengikuti pendidikan program magister di Universitas Airlangga Surabaya

Mereka yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, atas bantuan dan kerjasama yang telah diberikan selama penelitian dan penulisan tesis ini.

Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas semua kebaikan ini, serta selalu melimpahkan Rahmat-Nya kepada kita semua.

Surabaya, Maret 2010
Hormat kami,

Penulis

RINGKASAN

**ANALISIS GENOTIPE, SUBGENOTIPE DAN SUBTIPE
VIRUS HEPATITIS B (VHB) PADA GENOM REGIO S (*Surface*)
DARI PASIEN DENGAN HBsAg POSITIF
DI KECAMATAN MENGWI, KABUPATEN BADUNG, BALI**

Infeksi virus hepatitis B (VHB) merupakan masalah dunia dan juga di Indonesia. Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B yang tinggi. Masing-masing genotipe, subgenotipe maupun subtipe VHB dapat memperlihatkan perbedaan dalam distribusi geografis, karakteristik klinik dan virologik serta dapat memberikan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat.

Bali merupakan daerah tujuan pariwisata dunia sehingga penyakit infeksi menular menjadi perhatian yang serius. Dari beberapa penelitian sebelumnya, persentase infeksi VHB di Bali cukup tinggi. Sejak sepuluh tahun belakangan, Kecamatan Mengwi merupakan daerah berkembang sangat pesat dengan pertumbuhan demografi, sosial ekonomi maupun dinamika penduduknya. Keadaan ini dapat memberikan kontribusi terhadap kemungkinan beragamnya genotipe, subgenotipe dan atau subtipe VHB di wilayah tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB pada pasien dengan gejala penyakit hepatitis di Kecamatan Mengwi, Kabupaten Badung, Bali. Sangat diperlukan data-data dan analisis tentang genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB di Mengwi dan di Bali yang terbaru dan lebih representatif.

Subyek penelitian adalah 75 pasien yang datang berobat ke Puskesmas Mengwi I yang mempunyai gejala penyakit hepatitis selama periode pengambilan sampel yang bersedia ikut penelitian. Semua sampel serum diperiksa ALT/SGPT dan diuji saring untuk deteksi HBsAg dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Pada sampel serum dengan HBsAg positif ditentukan genotipe, subgenotipe dan subtype VHB. DNA VHB diekstraksi dari sampel serum yang HBsAg positif. Amplifikasi bagian dari gen regio S DNA VHB dari serum HBsAg positif dilakukan dengan *polymerase chain reaction (PCR) first-round* menggunakan primer P7 dan P8. Jika amplifikasi PCR *first-round* ini negatif, dilakukan PCR *second-round* menggunakan primer HBS1 dan HBS2. Kondisi siklus untuk kedua *round PCR* adalah 40 siklus pada 94°C selama 1 menit, 50°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit. Produk PCR divisualisasi pada gel agarose 2% dengan *ethidium bromide* dan diisolasi dengan *low melting agarose*, dipurifikasi, di-label dan disekuen. Sekuen nukleotida VHB dari sampel dibandingkan dengan sekuen nukleotida VHB dari bank data DNA internasional (DDBJ/GenBank). Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) clustering*. Sekuen nukleotida virus hepatitis B dikonversi menjadi sekuen asam amino dan dilakukan *multiple alignment*. Subtipe virus hepatitis B ditentukan dengan analisis substitusi asam amino pada posisi 122, 127, 134, 159, 160 dan 177 pada gen S dibantu dengan menggunakan program komputer *Genetyx for Windows Version 9.0*.

Penelitian ini telah memperoleh 75 sampel serum dari pasien dimana dari pemeriksaan ALT/SGPT ditemukan dua pasien dengan kadar diatas batas atas normal. Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar HBsAg didapatkan pasien dengan HBsAg positif sebanyak 11 dari 75 sampel (14,7%). Sampel yang positif HBsAg menunjukkan pasien telah terinfeksi virus hepatitis B.

Dari hasil identifikasi genotipe VHB ditemukan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) merupakan genotipe B, sedangkan satu sampel lainnya (9,1%) termasuk dalam genotipe C. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa VHB genotipe B predominan diikuti dengan genotipe C. Penelitian terbaru Mulyanto *et al*,

(2009) mengenai distribusi genotipe VHB di 28 kota di Indonesia juga melaporkan bahwa VHB genotipe B merupakan yang dominan diikuti genotipe C.

Hasil analisis subgenotipe VHB mendapatkan tujuh dari 11 sampel (63,6%) merupakan subgenotipe B3, tiga dari 11 sampel (27,3%) termasuk subgenotipe B7, dua dari 11 sampel (18,2%) belum dapat dipastikan dan satu dari 11 sampel (9,1%) merupakan subgenotipe C1. Dua sampel yang belum dapat dipastikan subgenotipenya telah masuk ke dalam genotipe B namun tidak satu cabang dengan subgenotipe VHB dari subgenotipe B1 sampai B8. Penelitian yang pernah dilakukan oleh Utama A *et al*,(2009) menunjukkan VHB subgenotipe B3 dan subgenotipe C1 merupakan subgenotipe VHB yang dominan ditemukan di Indonesia, hal yang sama juga ditemukan oleh Mulyanto *et al*, (2009). VHB subgenotipe B3 nampaknya merupakan subgenotipe khusus dari Indonesia .

Hasil analisis subtipe VHB didapatkan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) memiliki subtipe VHB *adw2*, sedangkan satu sampel (9,1%) memiliki subtipe VHB *adrq+*. Utama A *et al*, (2009) mendapatkan VHB subtipe *adw2* dan subtipe *adrq+* ditemukan dominan pada infeksi oleh VHB genotipe B dan C di Indonesia. Menariknya, pada penelitian ini semua sampel dengan genotipe B memiliki subtipe *adw2*, dan sampel genotipe C memiliki subtipe *adrq+*.

SUMMARY**THE ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) GENOTYPES,
SUBGENOTYPES, AND SUBTYPES ON S (Surface) REGION GENES FROM
PATIENT WITH HBsAg POSITIVE
IN MENGWI, BADUNG, BALI**

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major worldwide problem as well as in Indonesia. Indonesia has a high Endemic level of hepatitis B infection. The genotypes, subgenotypes and subtypes HBV can show some differences in the aspects of geographical distribution and clinical and virological characteristics and provide historical information on the migration pattern of local's ancestor.

Bali is a world tourism destination, so a contagious infectious disease has become a serious problem. It has been reported that the percentage of HBV infection was generally high in Bali. Since the last decade, Mengwi has become a developed region with the rapid growth of social economic, demographic and dynamic inhabitants. This condition can contribute the varieties of HBV genotype, subgenotype, and subtype.

The purpose of this research was to analyze the HBV genotype, subgenotype, and subtype on patients who possessed hepatitis signs and symptoms and came to Puskesmas Mengwi I, Badung, bali. The new representative and data about HBV genotype, subgenotype, and subtype in Mengwi and Bali were very required.

The research subject was taken from 75 patients who came to Puskesmas Mengwi I during collecting sample period. All serum samples were examined for ALT/SGPT level and detection for HBsAg by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Serum of HBsAg Positive samples were used to identify the HBV genotype, subgenotype, and subtype. We carried out DNA extraction from serum of HBsAg Positive samples. Some parts of the viral S gene were amplified by

polymerase chain reaction (PCR) first-round with primers P7 and P8. if the PCR Amplification had been negative, a second-round (nested) PCR would have been carried out by using primers HBS1 and HBS2. Both rounds performed for 40 cycles, each consisting of 1 minute at 94°C, 1 minute at 50°C and 2 minutes at 72°C. Amplification products were visualized on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and isolated by low melting agarose. Then, they were purified, labeled, and sequenced. The obtained nucleotide sequences were compared with HBV nucleotide sequences from international DNA data bank (DDBJ/GenBank) for HBV genotypes and subgenotypes determination. Phylogenetic trees were constructed by means of unweighted-pair group method using arithmetic averages (UPGMA). The obtained nucleotide sequences were converted into amino-acid sequences and we conducted multiple alignment. HBV subtype were determined by using the analysis of amino acid substitutions at positions 122, 127, 134, 159, 160, and 177 of S gene and done with computer program Genetyx for windows version 9.0.

This study used 75 serum samples taken from patients, two patients (2,7%) were found with high level of ALT. HBsAg Positive was found in 11 from 75 serum samples (14,7%). HBsAg positive indicated that the patient was already infected by HBV.

HBV genotype B was found predominantly, ten of eleven isolates (90,9%) belonged to genotype B and the other one (9,1%) to genotype C. the current study about distribution of HBV genotype from 28 cities in Indonesia were reported by Mulyanto et al., (2009) and found that HBV genotype B was predominantly, followed by genotype C.

The analysis of HBV subgenotype found that seven of eleven examined isolates belonged to subgenotype B3, three to subgenotype B7 and two were not

classified to any of subgenotype yet because they did not fit in any branch of subgenotype B on the phylogenetic tree. One of eleven examined isolates belonged to subgenotype C1. The previous study by Utama A. et al., (2009) found that HBV subgenotype B3 and C1 were found predominantly in Indonesia, as well as the study by Mulyanto et al, (2009) showed that subgenotype B3 was only found in Indonesia.

The analysis of HBV subtype showed that subtype *adw2* was found on ten of eleven isolates (90,9%), followed by subtype *adrq+* was found only on one sample (9,1%). The previous study by Utama A et al, (2009) found that HBV subtype *adw2* and *adrq+* were found predominantly on HBV genotype B and C infection in Indonesia. Interestingly, in this study we found all of genotypes B were subtype *adw2*, and genotype C sample was subtype *adrq+*.

ABSTRACT**THE ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) GENOTYPES, SUBGENOTYPES, AND SUBTYPES ON S (Surface) REGION GENES FROM PATIENT WITH HBsAg POSITIVE IN MENGWI, BADUNG, BALI**

Indonesia has a high Endemic level of hepatitis B infection. Since the last decade, Mengwi has become a developed region with the rapid growth of social economic, demographic and dynamic inhabitants. This condition can contribute the varieties of HBV genotype, subgenotype, and subtype. The purpose of this research was to analyze the HBV genotype, subgenotype, and subtype on patients who possessed hepatitis signs and symptoms and came to Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali.

All serum samples were examined for ALT/SGPT level and detection for HBsAg by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Serum of HBsAg Positive samples were used to identify the HBV genotype, subgenotype, and subtype. We carried out DNA extraction from serum of HBsAg Positive samples. HBV subtype were determined by using the analysis of amino acid substitutions at positions 122, 127, 134, 159, 160, and 177 of S gene.

This study used 75 serum samples taken from patients, two patients (2,7%) were found with high level of ALT. HBsAg Positive was found in 11 from 75 serum samples (14,7%). HBV genotype B was found predominantly, ten of eleven isolates (90,9%) belonged to genotype B and the other one (9,1%) to genotype C. Seven of eleven examined isolates belonged to subgenotype B3, three to subgenotype B7 and two were not classified to any of subgenotype yet because they did not fit in any

branch of subgenotype B on the phylogenetic tree. One of eleven examined isolates belonged to subgenotype C1.

Subtype *adw2* was found on ten of eleven isolates (90,9%), followed by subtype *adrq+* was found only on one sample (9,1%). Interestingly, in this study we found all of genotypes B were subtype *adw2*, and genotype C sample was subtype *adrq+*.

Keyword : genotypes, subgenotypes, subtypes, hepatitis B virus, Mengwi

DAFTAR ISI

	Hal.
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	ix
<i>Summary</i>	xii
<i>Abstract</i>	xv
DAFTAR ISI.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
DAFTAR SINGKATAN.....	xxii
1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Epidemiologi infeksi VHB.....	7
2.2 Karakteristik VHB.....	9
2.2.1 Struktur VHB.....	9
2.2.2 Hepatitis B <i>surface</i> Antigen (HBsAg).....	12
2.2.3 Genoma VHB.....	13
2.2.4 Replikasi VHB.....	15
2.3 Genotipe, subgenotipe dan subtype VHB.....	17
2.4 Infeksi VHB pada manusia.....	24
2.4.1 Manifestasi klinis penyakit hepatitis B.....	24
2.4.2 Gambaran patologi penyakit hepatitis B.....	27
2.4.3 Penularan VHB.....	28
2.4.4 Faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya penyakit hepatitis B.....	30
2.5 Respon imun terhadap infeksi VHB.....	32
2.6 Diagnosis dan evaluasi infeksi VHB.....	35
2.6.1 Pemeriksaan HBsAg.....	38
2.6.2 Pemeriksaan HBeAg.....	39
2.6.3 Pemeriksaan virologi VHB.....	40
2.6.4 Pemeriksaan kadar ALT/SGPT pada infeksi VHB.....	41
2.6.5 Pemeriksaan histologi.....	42
2.7 Pengobatan dan pencegahan infeksi VHB.....	42
2.7.1 Pengobatan infeksi VHB.....	42
2.7.2 Pencegahan infeksi VHB.....	46
2.7.3 Vaksinasi hepatitis B.....	47

3	KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN.....	50
4	MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	53
	4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	53
	4.2 Populasi dan sampel penelitian.....	53
	4.2.1 Populasi penelitian.....	53
	4.2.2 Sampel penelitian.....	53
	4.2.3 Besar sampel.....	54
	4.2.4 Teknik pengambilan sampel.....	55
	4.3 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel.....	55
	4.3.1 Variabel penelitian.....	55
	4.3.2 Definisi operasional variabel.....	55
	4.4 Bahan penelitian.....	57
	4.5 Instrumen penelitian.....	61
	4.6 Lokasi dan waktu penelitian.....	62
	4.6.1 Lokasi penelitian.....	62
	4.6.2 Waktu penelitian.....	62
	4.7 Prosedur penelitian.....	62
	4.8 Kerangka operasional penelitian.....	67
5	ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	68
	5.1 Distribusi sampel.....	68
	5.2 Hasil Pemeriksaan ALT/SGPT.....	69
	5.3 Hasil pemeriksaan VHB.....	70
	5.3.1 Hasil pemeriksaan HBsAg.....	70
	5.3.2 Hasil pemeriksaan PCR VHB.....	72
	5.3.3 Hasil <i>sequencing</i> dan analisis filogenetik VHB.....	74
	5.3.4 Hasil analisis subtype VHB dari sampel penelitian.....	80
6	PEMBAHASAN.....	84
	6.1 Pembahasan hasil pemeriksaan kadar ALT/SGPT.....	84
	6.2 Pembahasan hasil pemeriksaan HBsAg.....	85
	6.3 Pembahasan hasil pemeriksaan PCR.....	86
	6.4 Analisis genotipe VHB dari sampel penelitian.....	87
	6.5 Analisis subgenotipe VHB dari sampel penelitian.....	89
	6.6 Analisis subtype VHB dari sampel penelitian.....	90
7	PENUTUP	
	7.1 Kesimpulan.....	94
	7.2 Saran.....	95
	DAFTAR PUSTAKA.....	96
	LAMPIRAN.....	102

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 2.1 Hubungan antara antigenik utama subtipe VHB dan asam amino Lys dan Arg pada kodon posisi 120 dan 160 di protein regio S.....	20
Tabel 2.2 Definisi dan kriteria diagnostik pasien dengan infeksi hepatitis B.....	36
Tabel 2.3 Evaluasi pasien hepatitis B kronis.....	37
Tabel 2.4 Penilaian respon terapi hepatitis B kronis.....	46
Tabel 4.1 <i>Oligonucleotide primers</i> yang digunakan pada amplifikasi PCR <i>first round</i> dan <i>second round</i>	59
Tabel 5.1 Karakteristik sampel penelitian berdasarkan umur dan jenis Kelamin.....	68
Tabel 5.2 Frekuensi gejala-gejala hepatitis yang diderita pasien subyek Penelitian.....	69
Tabel 5.3 Hasil pemeriksaan ALT dari pasien.....	70
Tabel 5.4 Hasil pemeriksaan HBsAg berdasarkan jenis kelamin.....	70
Tabel 5.5 Karakteristik subyek penelitian berdasarkan suku bangsa dan hasil pemeriksaan HBsAg.....	71
Tabel 5.6 Hasil pemeriksaan HBsAg dan kadar ALT.....	71
Tabel 5.7 Nomor sampel yang menunjukkan hasil positif PCR sesuai dengan <i>primer</i> yang digunakan pada regio S.....	73
Tabel 5.8 Distribusi nomor sampel berdasarkan genotipe dan subgenotipenya dari sekuen 211 nukleotida posisi 494-704 sebagian gen regio S VHB..	76
Tabel 5.9 Distribusi nomor sampel berdasarkan genotipe dan subgenotipenya dari sekuen 433 nukleotida posisi 289-721 sebagian gen regio S VHB.....	79
Tabel 5.10 Pola genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB dari isolat sampel penelitian.....	82

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 2.1 Virus hepatitis B di bawah mikroskop elektron.....	10
Gambar 2.2 (a). Skematik struktur VHB (b). Partikel virus berbentuk sferis dan tubular.....	13
Gambar 2.3 Genoma VHB dengan 4 <i>open reading frame</i> (ORF).....	14
Gambar 2.4 Ilustrasi replikasi VHB di dalam sel hepar.....	16
Gambar 2.5 Peta kepulauan di Indonesia dengan gambaran distribusi geografis yang berbeda dari subgenotipe dan subtipe VHB dari tujuh zona utama dan 28 kota dimana sampel serum diambil.....	22
Gambar 2.6 Pada hepatitis akut respon imun secara efektif menghancurkan sel hepar yang terinfeksi.....	34
Gambar 2.7 Ilustrasi gambaran serologi pada keadaan infeksi akut VHB....	40
Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual penelitian.....	52
Gambar 4.1 Bagan kerangka operasional penelitian.....	67
Gambar 5.1 Contoh elektroforesis hasil PCR sampel.....	72
Gambar 5.2 Pohon filogenetik (dendrogram) genotipe dan subgenotipe VHB berdasarkan sekuen 211 nukleotida posisi 494-704 sebagian gen regio S.....	75
Gambar 5.3 Pohon filogenetik (dendrogram) genotipe dan subgenotipe VHB berdasarkan sekuen 433 nukleotida posisi 289-721 sebagian gen regio S.....	78
Gambar 5.4 <i>Multiple alignment</i> pada sekuen asam amino urutan nomor 116-183 pada gen regio S berbagai genotipe dan subtipe VHB dari isolat sampel dan isolat dari bank data DNA internasional (DDBJ/ <i>GenBank</i>).....	81

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1 Jadwal kegiatan.....	102
Lampiran 2 Rincian biaya.....	103
Lampiran 3 Ijin Penelitian.....	106
Lampiran 4 Identitas pasien, <i>information for consent, certificate of consent..</i>	107
Lampiran 5 Prosedur pemeriksaan sampel.....	110

DAFTAR SINGKATAN

ALT	: <i>Alanine Transaminase</i>
Anti-HBc	: <i>Anti Hepatitis B core</i>
Anti-HBe	: <i>Anti Hepatitis B e</i>
Anti-HBs	: <i>Anti Hepatitis B surface</i>
AST	: <i>Aspartate Transaminase</i>
BNA	: <i>Batas normal atas</i>
cccDNA	: <i>covalently closed circular DNA</i>
cDNA	: <i>complementary DNA</i>
dAMP	: <i>deoxyadenosine monophosphate</i>
DDBJ	: <i>DNA Data Bank of Japan</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DW	: <i>Distilled Water</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPI	: <i>Expanded Program Immunization</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
HBcAg	: <i>Hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	: <i>Hepatitis B e antigen</i>
HBIG	: <i>Hepatitis B Immunoglobulin</i>
HBsAg	: <i>Hepatitis B surface antigen</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	: <i>Open Reading Frame</i>

PCR	: <i>Polymerase Chain Reactions</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
Sel NK	: <i>sel Natural Killer</i>
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
UPGMA	: <i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
VHB	: <i>Virus hepatitis B</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
YMDD	: <i>tyrosine-methionine-aspartate-aspartate</i>

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi virus hepatitis B (VHB) merupakan masalah dunia. VHB menginfeksi sekitar 400 juta penduduk dunia. 5-20% penduduk Asia Tenggara, Afrika dan Cina mengidap VHB kronik dan sepertiganya menjadi sirosis hati atau karsinoma hepatoseluler dengan berbagai komplikasinya (Guan R *et al.*,2001).

Penyakit hepatitis oleh karena infeksi virus masih menjadi masalah di Indonesia dimana beberapa daerah di Indonesia mempunyai prevalensi yang cukup tinggi sehingga dapat dikatakan Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B yang tinggi dan dapat berkembang menjadi kronis (Achwan WA *et al.*,2007; Lusida MI *et al.*,2008).

Pengidap *carrier* VHB pada populasi yang tampak sehat di Indonesia dilaporkan berada pada kisaran 4-20,3%, sehingga Indonesia termasuk negara dengan prevalensi infeksi VHB yang tinggi. Laporan lainnya, *Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C* juga menyatakan bahwa Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B sedang sampai tinggi (Khan *et al.*, 2004; Achwan WA *et al.*,2007).

Seseorang penderita dapat dikatakan terinfeksi VHB ditandai dengan ditemukannya hepatitis B *surface* antigen (HBsAg) positif dalam serum, tingginya tingkat DNA VHB dan terdapat proses nekroinflamasi pada hati. Deteksi terhadap adanya infeksi VHB yang paling mudah adalah deteksi adanya antigen permukaan dari daerah genom S (*surface*) VHB yaitu HBsAg yang juga merupakan salah satu petanda serologis untuk infeksi VHB yang sedang aktif. Pemeriksaan kadar *Alanine*



transaminase (ALT)/Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) merupakan salah satu pemeriksaan biokimiawi yang penting untuk mengetahui adanya gangguan fungsi organ hati. Peningkatan kadar ALT menggambarkan adanya aktifitas nekroinflamasi di sel-sel hepar (Lok ASF, 2001; Suharjo JB, 2006; Handajani R *et al.*, 2006).

Sampai saat ini di dunia telah diidentifikasi sepuluh genotipe VHB yaitu dari A sampai dengan J (Tatematsu K *et al.*, 2009; Arankalle VA *et al.*, 2010). Genotipe B dan C secara berurutan merupakan predominan di Asia (Lusida MI *et al.*, 2008). Beberapa genotipe VHB telah dibagi menjadi subgenotipe (subgroup) VHB tertentu. VHB Subgenotipe A (VHB/A) dibagi menjadi VHB/A1 sampai VHB/A4. VHB Subgenotipe B (VHB/B) dibagi menjadi VHB/B1 sampai VHB/B8 dimana VHB/B8 merupakan subgenotipe baru. VHB Subgenotipe C (VHB/C) dibagi menjadi VHB/C1 sampai VHB/C7 dimana VHB/C7 merupakan subgenotipe baru. VHB Subgenotipe D (VHB/D) dibagi menjadi VHB/D1 sampai VHB/D6. Sistem pengklasifikasian yang lebih dahulu dikenal membagi virus hepatitis B ke dalam sembilan subtipe, yaitu *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adrq+*, *adrq-* dan *ayr* (Magnius *et al.*, 1995).

Klasifikasi genetik VHB berdasarkan komparasi sekuen-sekuen nukleotida genom lengkap telah dapat membagi VHB ke dalam kelompok-kelompok genomik yang kemudian dikenal dengan genotipe (Magnius *et al.*, 1995). Penentuan genotipe VHB dari sekuen gen regio S secara umum konsisten dengan penentuan dari sekuen genom lengkap, karena itu genotipe VHB dapat ditentukan berdasarkan sekuen gen regio S (Utsumi T *et al.*, 2009). Suatu genotipe VHB dapat ditentukan berdasarkan perbedaan > 8 % sekuen nukleotida intergenotipe sedangkan suatu subgenotipe VHB berdasarkan perbedaan > 4% sekuen nukleotida intragenotipe (Norder H *et al.*, 2004).

Gen VHB pada regio S (*surface*) mengkode *envelope* VHB yang mengandung HBsAg. Berdasarkan urutan sekuen nukleotida pada gen regio S yang mengkode asam amino dapat menunjukkan sub tipe VHB melalui variasi determinan subtipe HBsAg yang berpasangan secara eksklusif (Okamoto H *et al.*, 1986; Norder H *et al.*, 1992).

Masing-masing genotipe, subgenotipe maupun sub tipe VHB dapat memperlihatkan perbedaan dalam distribusi geografis (Norder *et al.*,1994; Huy *et al.*,2004; Kramvis *et al.*, 2005), karakteristik klinik dan virologik (Kao, 2002). Genotipe dan sub tipe VHB juga dapat memberikan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat (Okamoto *et al.*, 1988; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Bali merupakan daerah tujuan pariwisata dunia sehingga apabila terjadi masalah kesehatan di Bali terutama penyakit infeksi menular menjadi perhatian yang serius terutama oleh negara-negara yang warganya banyak berkunjung ke Bali. Dari beberapa penelitian dalam 20 tahun terakhir, persentase infeksi VHB di Bali cukup tinggi, walaupun penelitian mengenai VHB di Bali tidak banyak.

Sejak sepuluh tahun belakangan telah terjadi perkembangan pembangunan dan transportasi dan juga industri pariwisata di Bali terutama di Kabupaten Badung. Pusat pemerintahan Kabupaten Badung telah dipindahkan ke Kecamatan Mengwi sehingga Kecamatan Mengwi saat ini berkembang sangat pesat dengan pertumbuhan demografi, sosial ekonomi maupun dinamika penduduknya. Keadaan ini dapat memberikan kontribusi terhadap kemungkinan beragamnya genotipe, subgenotipe dan atau sub tipe VHB di wilayah tersebut. Penelitian ini diharapkan dapat diketahui genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB di Mengwi dan di Bali. Dengan demikian

sangat diperlukan data-data dan analisis tentang subgenotipe dan subtipe VHB di Mengwi dan di Bali yang terbaru dan lebih representatif.

1.2 Rumusan masalah

- 1 Berapa banyak HBsAg positif pada pasien dengan gejala hepatitis di Puskesmas Mengwi I selama periode pengambilan sampel?
- 2 Bagaimanakah genotipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali ?
- 3 Bagaimanakah subgenotipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali ?
- 4 Bagaimanakah subtipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum :

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis genotipe, subgenotipe dan subtipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali.

Tujuan khusus :

- 1). Menentukan persentase HBsAg positif pada pasien dengan gejala penyakit hepatitis di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali.
- 2). Mengetahui genotipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali.
- 3). Mengetahui subgenotipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali.

- 4). Mengetahui sub tipe virus hepatitis B pada pasien dengan HBsAg positif di Mengwi, Badung, Bali.

1.4 Manfaat Penelitian :

1.4.1 Manfaat akademis

- 1). Penelitian ini dapat memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang genotipe, subgenotipe dan sub tipe virus hepatitis B serta aspek klinisnya.
- 2). Penelitian ini dapat melatih kemampuan dalam ketrampilan peneliti dalam pemeriksaan dan analisis biologi molekuler.

1.4.2 Manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan

- 1). Hasil penelitian ini akan memberikan informasi tentang macam-macam genotipe, subgenotipe dan sub tipe virus hepatitis B yang menginfeksi pasien dengan gejala penyakit hepatitis di Mengwi, sehingga dapat melengkapi data tentang peta penyebarannya di Bali dan di Indonesia serta di dunia umumnya.
- 2). Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi kepada para peneliti lain maupun klinisi mengenai aspek biologi molekuler dan aspek klinis infeksi virus hepatitis B di Bali sehingga dapat dimanfaatkan untuk penelitian selanjutnya dalam perkembangan ilmu pengetahuan.

1.4.3 Manfaat klinis bagi pasien, puskesmas serta klinisi

- 1). Hasil penelitian ini akan memberikan informasi kepada peneliti, Puskesmas sebagai pemberi pelayanan kesehatan serta kepada klinisi tentang persentase infeksi VHB pada pasien dengan gejala hepatitis di Puskesmas Mengwi I sebagai data dasar dalam upaya penanggulangan infeksi VHB di masyarakat.

- 2). Penelitian ini dapat memberikan informasi kepada pasien yang datang ke Puskesmas Mengwi I dengan gejala penyakit hepatitis apakah pasien terinfeksi VHB atau tidak serta aspek klinisnya dalam upaya penanganan infeksi VHB.
- 3). Dengan diketahuinya genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB yang menginfeksi pasien maka dapat digunakan sebagai pedoman bagi para klinisi dalam penanganan infeksi VHB pada pasien.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi infeksi VHB

Hepatitis B merupakan penyakit yang banyak ditemukan di dunia dan dianggap sebagai persoalan kesehatan masyarakat yang serius, karena manifestasinya sebagai penyakit VHB akut beserta komplikasi kronisnya mulai dari hepatitis akut, hepatitis fulminan sampai dengan berbagai variasi penyakit kronis, yang meliputi hepatitis kronis, sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler. Infeksi VHB tersebar di seluruh dunia dan menyebar dari individu yang mengidap infeksi kepada individu lain (Lee C,1992).

VHB menginfeksi sekitar 400 juta penduduk dunia. 5-20% penduduk di Asia Tenggara, Afrika dan Cina mengidap VHB kronis dan sepertiganya menjadi sirosis hepatis atau karsinoma hepatoseluler dengan berbagai komplikasinya (Guan R *et al.*,2001).

Komisi Hepatitis WHO membagi prevalensi infeksi VHB menjadi tiga kelompok yaitu prevalensi rendah, sedang dan tinggi. Persentase *carrier* dengan HBsAg positif pada populasi mulai dari kurang dari 2% di area dengan tingkat endemisitas rendah hingga lebih dari 8% sampai 20% merupakan area dengan tingkat endemisitas tinggi (Guan R *et al.*,2001).

Prevalensi infeksi VHB berbeda-beda dari satu tempat dengan tempat yang lain. Prevalensi terendah didapatkan di Amerika Utara dan Eropa Barat dimana infeksi tersebut didapatkan pada 0,1-0,5 % penduduk. Negara-negara di dunia yang endemisitasnya tinggi adalah terutama Asia yaitu Cina, Vietnam, Korea, dimana 50–70 % dari penduduk berusia antara 30 – 40 tahun pernah kontak dengan VHB, dan

sekitar 10–15% menjadi pengidap HBsAg positif. Di Asia Tenggara dan Afrika Sub Sahara 5-20% penduduk mengidap infeksi virus ini. Prevalensi infeksi VHB tertinggi terdapat di Pulau Rapa di Samudera Atlantik dimana 50% dari penduduknya terinfeksi VHB. Pada area-area dengan tingkat endemisitas tinggi termasuk Asia Tenggara, Cina dan Afrika yang lebih dari separuh populasinya terinfeksi dengan VHB dan lebih dari 8% populasinya adalah *carrier* kronis, baik sebagai akibat transmisi vertikal maupun transmisi horisontal (Guan R *et al.*,2001; Rasmilah, 2001).

Menurut WHO, Indonesia termasuk kelompok daerah dengan endemisitas sedang dan tinggi (3,5 – 20 %). Laporan lainnya, *Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C* menyatakan bahwa Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B sedang sampai tinggi (Khan *et al.*, 2004, Achwan WA *et al.*,2007, Mulyanto *et al.*,2009). Hasil beberapa penelitian di Indonesia bahwa angka prevalensi VHB tertinggi pada usia menanjak remaja (12–17 tahun) yaitu sebesar 75%. Di Indonesia kejadian hepatitis B satu diantara 12-14 orang, yang berlanjut menjadi hepatitis kronis, sirosis hepatis dan hepatoma. Satu atau dua kasus meninggal akibat hepatoma. Berdasarkan pemeriksaan HBsAg pada kelompok donor darah di Indonesia prevalensi penyakit hepatitis B berkisar antara 2,50 - 36,17% (Siregar FA, 2004).

Pengidap *carrier* VHB pada populasi yang tampak sehat di Indonesia dilaporkan berada pada kisaran 4-20,3% (Khan M *et al.*,2004). Prevalensi ini bervariasi dari berbagai pulau, secara umum area di luar Pulau Jawa mempunyai prevalensi pengidap HBsAg positif yang tinggi yaitu 9,2% dibandingkan di Pulau Jawa yaitu 5% (Mulyanto *et al.*, 2009). Infeksi VHB di Indonesia juga terjadi pada bayi dan anak-anak, dimana diperkirakan 25-45% disebabkan oleh infeksi perinatal (Siregar FA, 2004). Berdasarkan data-data di atas, Indonesia termasuk daerah

endemis penyakit hepatitis B dan termasuk negara yang dihimbau oleh WHO untuk melaksanakan upaya pencegahan seperti imunisasi (Siregar FA, 2004).

Menurut Surya GP *et al*, (2005) selama lima bulan sejak April sampai Agustus 2003, dari serum 2.450 wanita hamil yang diperiksa petanda virus hepatitis B dan C pada delapan kabupaten di Bali, HBsAg terdeteksi pada 1,9% dimana secara signifikan prevalensi ini lebih rendah dari penelitian 10 tahun sebelumnya dimana sebanyak 2,6% wanita hamil di Bali ditemukan HBsAg positif.

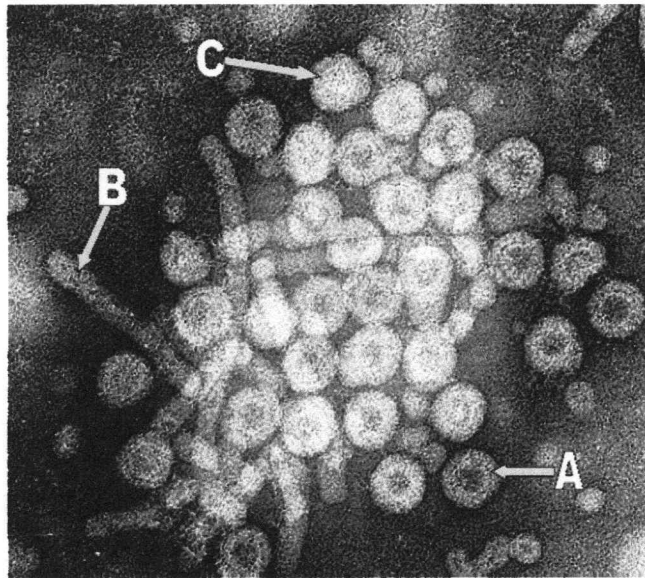
Masalah lain yang lebih penting ialah pengidap HBsAg kronis dapat sebagai sumber penularan bagi orang di sekitarnya. Setiap tahun jumlah pengidap semakin bertambah, karena *reservoir* pengidap VHB yang cukup besar merupakan sumber penularan yang terus-menerus bagi orang di sekitarnya. Dalam populasi manusia banyak terdapat *carrier* hepatitis B, diperkirakan melebihi 200 juta di seluruh dunia. Angka *carrier* dan distribusi usia dari HBsAg berbeda di berbagai daerah. Hepatitis B terjadi endemik di tempat penampungan seperti asrama, rumah sakit jiwa dan sebagainya. Infeksi VHB lebih sering terjadi pada orang dewasa dalam masyarakat perkotaan dan sosio-ekonomi yang kurang. Semakin majunya komunikasi dan peningkatan migrasi penduduk, maka perpindahan penduduk meningkat dan kemungkinan terdapatnya fokus penularan infeksi di daerah-daerah dengan prevalensi rendah juga meningkat (Siregar FA, 2004).

2.2 Karakteristik VHB

2.2.1 Struktur VHB

Penyakit hepatitis B disebabkan oleh adanya infeksi virus hepatitis B. Virus ini pertama kali ditemukan oleh Blumberg pada tahun 1965 dan dikenal dengan nama antigen Australia (Gambar 2.1). VHB termasuk dalam genus hepadnavirus yaitu

virus DNA yang replikasi genomnya melalui RNA *intermediate*. VHB diklasifikasikan sebagai virus hepadna tipe 1 yang mempunyai sifat adanya antigen virus, mengalami replikasi di dalam nukleus sel hepar (virus DNA hepatotropik). VHB mempunyai morfologi dan struktur antigen yang kompleks. Setiap partikel virus terdiri dari satu atau beberapa molekul asam nukleat yang terikat erat menjadi suatu masa kompak yang dikelilingi oleh selubung protein. Partikel virus tidak memiliki sitoplasma dan juga tidak mempunyai sebagian besar molekul yang diperlukan untuk aktivitas kehidupan ketika berada di luar sel. Ketika masuk ke sel inang, virus memproduksi berjuta-juta partikel virus baru (Mandel *et al.*, 2000).



Gambar 2.1 Foto VHB dibawah mikroskop elektron memperlihatkan tiga bentuk VHB yang berbeda yaitu bentuk partikel *Dane* (A), bentuk tubular atau filamen (B) dan bentuk partikel bulat (C) (Baron S, 1996)

Struktur morfologik dari VHB ini ada tiga bentuk : (1) partikel *double stranded* yang berukuran 42 nm (partikel *Dane*), (2) partikel bulat (partikel *spherical*) berdiameter 22 nm, dan (3) bentuk tubular atau filamen dengan diameter 22 nm dan

panjangnya berkisar antara 50 – 250 nm bahkan bisa sampai dengan 1 μm (Gambar 2.2). Partikel *Dane* (sesuai nama penemu virus ini) merupakan virus utuh yang terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan luar (*envelope*) yang terdiri dari protein, lipid, dan karbohidrat. Lapisan luar menyelubungi lapisan dalam yaitu kapsid (*core* atau nukleokapsid) berbentuk heksagonal berukuran 28 nm (Crawford JM, 2005).

Envelope VHB merupakan lapisan luar partikel *Dane* berupa selubung glikoprotein. *Envelope* VHB terdiri dari tiga macam protein yaitu :

- 1). *Major protein* yang terdiri dari 226 asam amino dan terdapat dalam dua bentuk yaitu bentuk glikoprotein, berat molekul 27KD (Kilo Dalton) (P27) dan bentuk nonglikosilat, berat molekul 24KD (P24).
- 2). *Middle protein* yang merupakan rangkaian dari 281 asam amino dan terdapat dalam dua bentuk yaitu glikoprotein dengan dua kompleks glikan, berat molekul 36KD (P36) dan glikoprotein dengan satu kompleks glikan, berat molekul 33KD (P33).
- 3). *Large protein* merupakan rangkaian 389-400 asam amino yang terdiri dari dua bentuk yaitu bentuk glikoprotein, berat molekul 42KD (P42) dan bentuk nonglikosilat, berat molekul 39KD (P39) (Mandel *et al*, 2000).

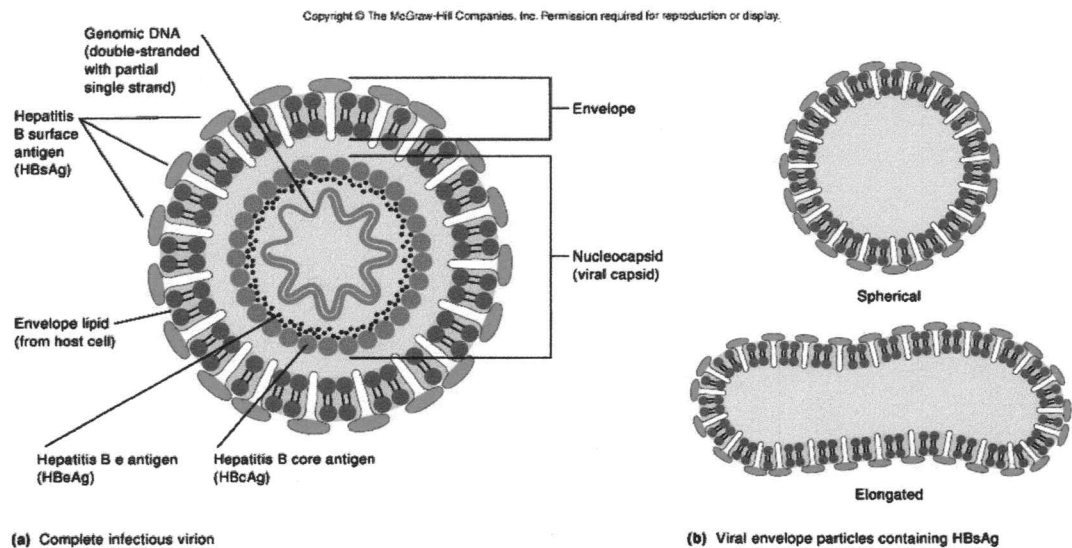
VHB bukan termasuk virus yang bersifat sitopatik. Kerusakan sel yang terjadi pada penderita hepatitis B adalah sebagai akibat respon imunologis tubuh inang terhadap antigen virus yang menempel pada permukaan membran sel hepar. Komposisi antigenik VHB mempunyai tiga determinan utama yaitu Hepatitis B *surface* Antigen (HBsAg), Hepatitis B *core* Antigen (HBcAg), dan Hepatitis B *e* Antigen (HBeAg). Partikel inti VHB berukuran 27 nm dan di dalam darah selalu terbungkus oleh antigen permukaan. Pada partikel inti terdapat HBcAg dan HBeAg.

HBeAg dianggap sebagai suatu komponen antigenik tersembunyi dari partikel inti VHB (Howard, 1994; Jawetz, 1996).

2.2.2 Hepatitis B *surface* Antigen (HBsAg)

Pada *envelope* VHB terdapat antigen permukaan yang disebut HBsAg yang membungkus partikel inti (*core*). HBsAg selain merupakan pembungkus partikel inti, juga terdapat dalam bentuk lepas berupa partikel bulat dan partikel tubular. Partikel bulat dan tubular terdiri dari HBsAg. HBsAg mempunyai beberapa sub tipe yang dapat digunakan sebagai petunjuk (*marker*) penyebaran VHB pada populasi dan individu tertentu. Hal ini dikarenakan determinan HBsAg ini bersifat spesifik dan tetap sama, walaupun VHB ditularkan kepada individu yang berbeda (Lok ASF, 2001; Suharjo JB, 2006; Handajani R *et al.*, 2006).

Stabilitas HBsAg tidak selalu sama dengan stabilitas penyebab infeksi, tetapi keduanya stabil pada suhu -20°C selama lebih dari 20 tahun dan tahan terhadap pembekuan serta pencairan berulang-ulang. Virus juga tahan terhadap pemanasan 37°C selama 60 menit dan tetap hidup setelah dikeringkan dan disimpan pada suhu 25°C selama paling sedikit satu minggu. VHB (bukan HBsAg) peka terhadap suhu tinggi (100°C selama satu menit) atau terhadap masa inkubasi yang lebih lama (60°C selama 10 jam) bergantung pada jumlah virus. HBsAg stabil pada pH 2,4 selama 6 jam, tetapi infektivitas VHB akan menghilang. Natrium hipoklorit 0,5% dapat merusak antigenisitas dalam waktu 3 menit pada konsentrasi protein yang rendah, tetapi bahan serum yang tidak diencerkan membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi (5%). HBsAg di dalam plasma atau produk darah lainnya tidak dapat dirusak oleh penyinaran ultra ungu, dan infektivitas virus juga tahan terhadap penyinaran tersebut (Jawetz, 1996).



Gambar 2.2: (a). Skematik struktur virus Hepatitis B (partikel *Dane*)

Komponen struktur VHB dari lapisan luar terdiri dari antigen permukaan HBsAg, *envelope*, *nucleocapsid*. Pada partikel inti terdapat antigen HBcAg, HBeAg, DNA *double-stranded* dengan *partial single strand* dan enzim DNA *polymerase*

(b). Partikel Virus berbentuk sferis dan tubular tanpa adanya partikel inti (Parlow TG *et al.*, 2001)

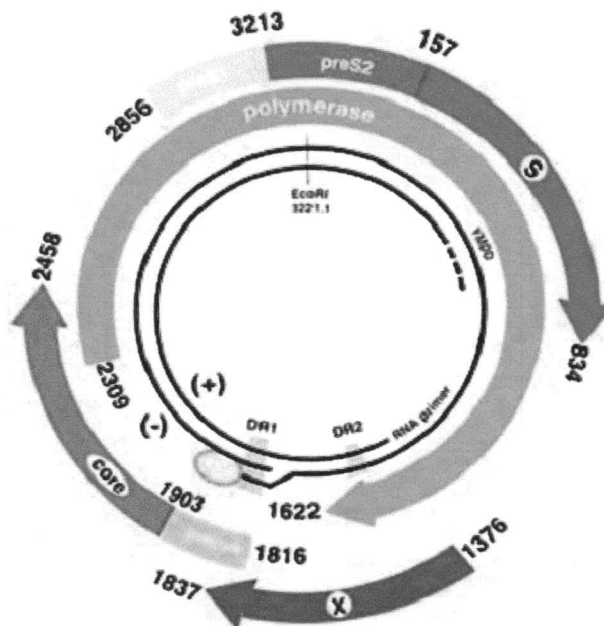
2.2.3 Genoma VHB

VHB termasuk virus DNA dimana DNA VHB terdiri dari *long circular strand* [L(-)] yang berhubungan dengan *short strand* [S(+)] secara berpasangan dengan panjang yang berbeda. Panjang L(-) inilah sekitar 3200 *basepair* (bp) sedangkan panjang S(+) sekitar 50-70% dari panjang L(-). Pada inti juga terdapat DNA VHB Polimerase. VHB dapat melakukan suatu reaksi *Reverse Transcription* dari suatu molekul RNA yang disebut dengan pregenom dalam pembawa hepatitis B (Jawetz, 1996; Lee WM, 1997).

VHB mempunyai genoma rantai ganda parsial dan rantai tunggal parsial. Genom virus sebagian terdiri dari DNA sirkuler untai ganda dengan berat molekul kurang lebih 2×10^6 , panjangnya sekitar 3200 bp. Isolat VHB yang berbeda memiliki 90-98% homologi urutan nukleotida yang sama. Panjang DNA seluruhnya



dikurangi untai merupakan pelengkap untuk semua VHB mRNAs, untai positif bermacam-macam dan panjangnya antara 50% sampai 80% unit. Panjang daerah untai tunggal genom DNA sirkuler yang bermacam-macam menghasilkan partikel yang heterogen secara genetik dengan kisaran berat jenis yang besar (Jawetz, 1996).



Gambar 2.3 Genoma VHB dengan empat *open reading frame* (ORF) yaitu regio S (*surface*) yang mempunyai tiga kodon inisiasi gen S, preS1, dan preS2. Regio C (*core*) yang mempunyai dua kodon inisiasi gen C dan preC, regio P (*polymerase*), dan regio X yang saling *overlapping* dan semuanya mengkode protein VHB (Crawford, *et al.*, 2005).

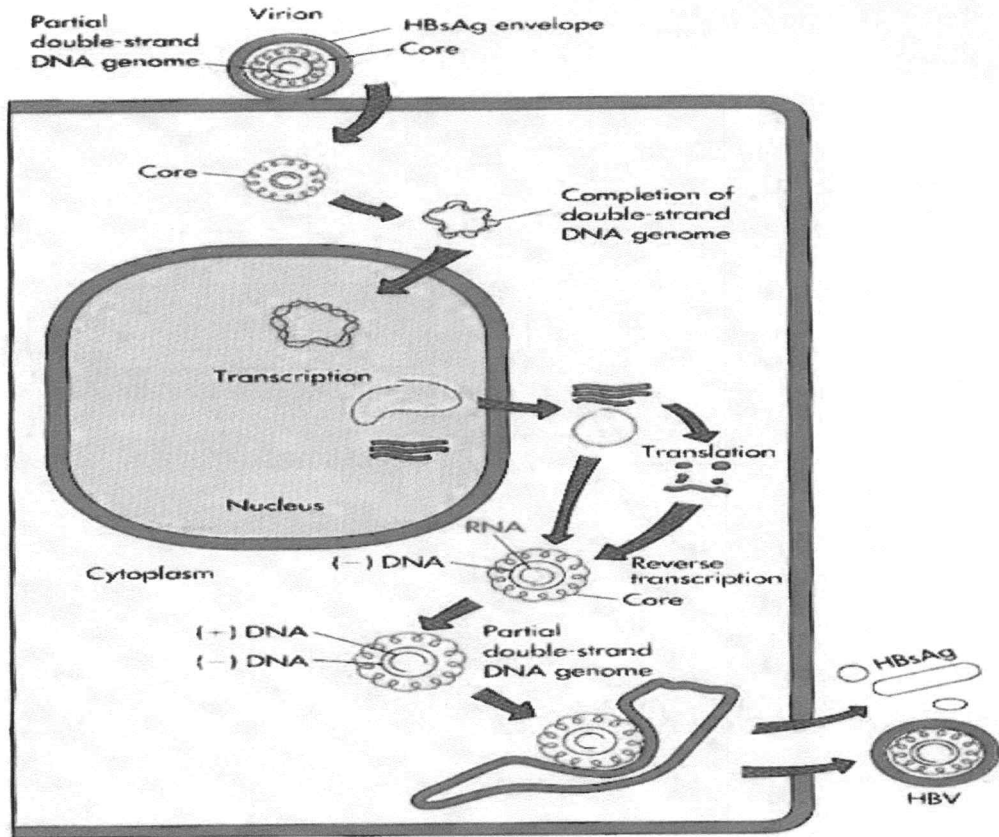
VHB mempunyai empat *open reading frame* (ORF) yaitu regio S (*surface*), regio C (*core*), regio P (*polymerase*), dan regio X yang saling *overlapping* dan semuanya mengkode semua protein VHB. Regio S mengkode *envelope* yang mengandung HBsAg. Regio S mempunyai tiga kodon inisiasi yang dibagi menjadi gen S, preS1, dan preS2. Gen S mengkode *major protein*; preS2 dan gen S mengkode *middle protein*; serta preS1, preS2, dan gen S mengkode *large protein*. Regio C mempunyai dua kodon inisiasi yang mengkode protein nukleokapsid. Regio ini dibagi menjadi gen C dan preC. Gen C mengkode pembentukan HBcAg,

regio preC mengatur sintesis *peptide hidrofobic* yang berperan dalam penyatuan partikel virus, dan regio preC bersama dengan gen C mengatur program sintesis protein *core* yaitu HBeAg. Regio P mengkode DNA *polymerase* yang mempunyai aktivitas *reverse transcriptase* untuk kepentingan replikasi VHB. Regio X mengkode suatu transaktivator transkripsional protein X (HBx) yang terdiri dari 152-154 asam amino (Jawetz, 1996; Chan *et al.*, 2003).

2.2.4 Replikasi VHB

Langkah awal virus masuk ke dalam sel dibagi menjadi tiga bagian yaitu *attachment*, *fusion*, dan *entry*. *Attachment* yaitu terjadi penempelan VHB dengan sel inang yaitu terjadi interaksi antara protein permukaan virus yang terdapat pada *envelope* dengan reseptor spesifik yang ada pada sel inang. Reseptor tersebut yaitu glikoprotein 180 (gp180). *Fusion* yaitu terjadi fusi antara protein virus dengan membran sel inang yang disertai proteolisis *envelope* sehingga terjadi pengeluaran genom virus masuk (*entry*) ke dalam sitoplasma sel inang (Lu X *et al.*, 2004). Proses genom DNA keluar dari kapsid masih belum jelas. DNA virus kemudian masuk ke dalam nukleus, membentuk cccDNA (*covalently closed circular DNA*). Untai (-) cccDNA dijadikan sebagai *template* untuk transkripsi oleh RNA *polymerase II* sel inang. Terbentuk mRNA X, preS1, preS2 dan preC/pgRNA. mRNA X, preS1, dan preS2 ditranslasikan menjadi protein X, protein permukaan hepatitis B (HBs) pada *envelope*. pgRNA (*pregenome RNA*) ditranslasikan untuk memproduksi protein *polymerase (P)* yang kemudian terikat pada ujung 3' dari RNA itu sendiri dimana terjadi sintesis DNA virus. Kapsid dibentuk pada waktu yang sama dari hasil translasi preC. Komplek protein P-RNA menyatu dengan

kapsid kemudian terjadi transkripsi balik RNA menjadi cDNA dan digunakan sebagai cetakan untuk membentuk untai ganda.



Gambar 2.4 Ilustrasi replikasi VHB di dalam sel hepar. Pada awalnya VHB melekat pada reseptor permukaan sel hepar melalui bagian regio pre-S HBsAg. Di dalam sitoplasma sel terjadi pelepasan *envelope* virus (*uncoating*). Setelah *uncoating*, DNA virus masuk ke dalam inti sel hepar. Di dalam inti sel, enzim seluler sebagian merubah DNA untai ganda menjadi cccDNA yg terdapat di dalam inti sel hepar. cccDNA bertindak sebagai *template* untuk pembentukan mRNAs VHB dan pregenom RNA *reverse transcriptase* VHB. Di dalam inti sel terjadi proses transkripsi. Translasi dan proses replikasi virus selanjutnya terjadi di sitoplasma. Setelah perakitan komponen virus, terjadi pembentukan virus berupa VHB partikel *Dane*, HBsAg bentuk sferis dan tubular, kemudian keluar dari sel inang untuk menginfeksi sel hepar lain (Hollinger, 1991).

Saat awal infeksi, terjadi resirkulasi DNA virus ke nukleus dan kejadian tersebut berulang pada satu sel sehingga menghasilkan akumulasi 10-30 molekul

cccDNA dan meningkatkan konsentrasi mRNA virus (Gambar 2.4). Apabila DNA virus telah mendapatkan selubungnya akan keluar dari sel inang untuk menginfeksi sel lain (Hollinger, 1991; Jawetz, 1996; Lu X *et al.*, 2004).

2.3 Genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB

Klasifikasi genetik VHB berdasarkan komparasi sekuen-sekuen nukleotida genom lengkap telah dapat membagi VHB ke dalam kelompok-kelompok genomik yang kemudian dikenal dengan genotipe (Magnius *et al.*, 1995). Pada saat ini sepuluh genotipe VHB yang diberi tanda A hingga J telah teridentifikasi (Tatematsu K *et al.*, 2008; Arankalle VA *et al.*, 2010). VHB Genotipe J merupakan genotipe baru yang ditemukan dari seorang pasien Jepang berumur 88 tahun dengan karsinoma hepatoseluler dimana pasien ini mempunyai riwayat pernah berkunjung ke Pulau Kalimantan pada jaman perang dunia kedua (Tatematsu K *et al.*, 2009).

Masing-masing genotipe VHB dapat memperlihatkan perbedaan yang nyata dalam karakteristik virologik dan karakteristik klinik. Sebagai contoh, mutasi *precore stop codon* lebih sering terjadi pada VHB genotipe B daripada genotipe C. *Outcome* klinis dan respon terhadap terapi antivirus lebih buruk pada penderita yang terinfeksi VHB genotipe C daripada genotipe B (Kao JH, 2002). Genotipe VHB ini saat ini menjadi penting karena ada indikasi bahwa genotipe ini berpengaruh terhadap berbagai bentuk hepatitis B kronis dan respon VHB terhadap terapi interferon (Lindh *et al.*, 1997). Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan antara beberapa penyakit liver dengan VHB genotipe B. Penelitian yang dilakukan di Taiwan oleh Kao JH, (2002) menunjukkan ternyata penderita hepatitis B paling banyak terinfeksi oleh VHB genotipe B dan C. Dari penderita hepatitis akut (*liver injury*) penduduk Taiwan banyak dijumpai terinfeksi oleh VHB genotipe C, sedangkan pada penderita

karsinoma hepatoseluler banyak ditemukan VHB genotipe B. Penelitian oleh Sastrosoewignjo *et al.*, (1991) telah mengisolasi VHB genotipe B, C dan D dari beberapa kota di Indonesia, termasuk Jakarta (Jawa), Padang (Sumatera), Manado (Sulawesi), Bajawa (Flores), Balikpapan (Kalimantan) dan Jayapura (Irian Jaya).

Kombinasi antara beberapa genotipe VHB adalah biasa terjadi pada suatu negara atau wilayah yang memiliki beberapa genotipe VHB yang berbeda. Kombinasi adanya VHB genotipe B dan genotipe C pada suatu wilayah di Asia Tenggara memang sering ditemukan. Kombinasi genotipe VHB secara genetik relatif sering terjadi pada evolusi VHB (Utsumi T *et al.*, 2009).

Genotipe B dan C secara berurutan merupakan predominan di Asia (Lusida MI *et al.*, 2008). Lusida *et al.*, pada tahun 2003 melaporkan bahwa semua dari 54 isolat VHB dari Surabaya, Provinsi Jawa Timur, termasuk dalam genotipe B. Pada penelitian Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991, tidak teridentifikasi adanya virus hepatitis B genotipe A atau E. Penelitian terbaru mengenai distribusi genotipe VHB di 28 kota di Indonesia juga melaporkan bahwa VHB genotipe B merupakan yang dominan (66%), diikuti genotipe C (24%), genotipe D (7%) dan genotipe A (0,4%) dan ditemukan juga infeksi campuran dari genotipe VHB. VHB genotipe D ditemukan dominan di Maluku selatan, sedangkan genotipe A ditemukan di Kalimantan Timur dan di Kupang (Mulyanto *et al.*, 2009).

VHB genotipe B dan C telah diperbandingkan untuk berbagai karakteristik klinik dan virologik. VHB genotipe C dikaitkan dengan tingkat positivitas HBeAg yang lebih tinggi, frekuensi mutasi *precore stop codon* yang lebih jarang (Kao JH, 2002) dan perjalanan penyakit yang lebih progresif daripada genotipe B (Chan *et al.*, 2003).

Manifestasi klinis, baik sirosis hepatitis maupun karsinoma hepatoseluler, lebih buruk pada penderita yang terinfeksi dengan VHB genotipe C daripada genotipe B, demikian pula VHB genotipe C dikaitkan dengan respon yang lebih buruk terhadap terapi antivirus daripada genotipe B (Kao JH, 2002).

Subgenotipe (subgroup) VHB telah diidentifikasi dari genotipe tertentu VHB. VHB Subgenotipe A (VHB/A) telah dibagi menjadi empat subgenotipe yaitu VHB/A1 sampai VHB/A4. Virus hepatitis B genotipe B (VHB/B) dahulu diklasifikasikan ke dalam dua subgroup yaitu Bj dan Ba. Subgroup Bj ditemukan terutama di Asia Timur, termasuk Jepang, sedangkan subgroup Ba ditemukan di seluruh Asia non-Jepang dan telah berekombinasi dengan VHB/C dalam gen C (Sugauchi *et al.*,2002). Pada penelitian lain, subgroup Ba telah dibagi kedalam empat subgenotipe yaitu VHB/B2 sampai VHB/B5, dimana subgroup Bj telah diberi nama subgenotipe VHB/B1 (Nagasaki *et al.*,2006). Penelitian lain mempublikasikan empat subgenotipe B dari VHB, yaitu VHB/Bj (diberi nama ulang dengan VHB/B1), VHB/Ba (diberi nama ulang VHB/B2), VHB/B3 yang berasal dari isolat Indonesia dan VHB/B4 berasal dari isolat Vietnam. Subgenotipe lain, VHB/B5 telah dilaporkan dari Filipina, dan kemudian ditemukan subgenotipe VHB/B6 yang telah ditemukan di wilayah Artic (Sakamoto T *et al.*, 2007; Nurainy N *et al.*,2008). Sebuah penelitian yang baru melaporkan VHB Subgenotipe B (VHB/B) telah dibagi menjadi delapan subgenotipe yaitu VHB/B1 sampai VHB/B8 dimana telah ditemukan subgenotipe baru dari genotipe VHB/B yaitu VHB/B8 (Mulyanto *et al.*,2009).

VHB Subgenotipe C (VHB/C) telah dibagi menjadi enam subgenotipe yaitu VHB/C1 sampai VHB/C6 (Mulyanto *et al.*,2009). Lima subgenotipe VHB/C (VHB/C1 sampai VHB/C5) sampai saat ini telah diidentifikasi, masing-masing menunjukkan dengan jelas kelompok-kelompok secara geografi seperti: C1

(Vietnam/Myanmar/Thailand), C2 (Jepang/Korea/Cina), C3 (New Caledonia/Polynesia), C4 (Australia) dan C5 (Filiphina) (Huy *et al.*,2004; Norder *et al.*,1994). Penelitian lain oleh Lusida MI *et al*, (2008) di Papua, Indonesia telah menemukan subgenotipe baru yaitu VHB/C6. Penelitian terbaru di Indonesia telah ditemukan subgenotipe baru dari VHB/C yaitu VHB/C7 (Mulyanto *et al.*, 2009). VHB Subgenotipe D (VHB/D) telah dibagi menjadi enam subgenotipe yaitu VHB/D1 sampai VHB/D6. VHB/D6 merupakan subgenotipe baru yang ditemukan di Papua, Indonesia (Lusida MI *et al.*,2008; Mulyanto *et al.*, 2009).

Subtipe VHB merupakan identifikasi determinan *a* dan dua pasang variasi alela *d/y* dan *w/r*, yang dapat membagi HBsAg menurut sifat imunologik proteinnya ke dalam empat subtipe utama (mayor) yaitu : *adw*, *adr*, *ayw*, dan *ayr*. Sistem pengklasifikasian lainnya telah membagi VHB ke dalam sembilan subtipe, yaitu *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adrq+*, *adrq-* dan *ayr* (Magnius *et al.*, 1995).

Sekuen-sekuen pada gen regio S yang mengkode asam amino dapat menunjukkan subtipe VHB melalui variasi secara eksklusif determinan subtipik HBsAg. Pada produk gen regio S, variasi dari asam amino pada posisi tertentu berhubungan dengan determinan subtipik HBsAg yang berpasangan secara eksklusif. Dasar molekular dari variasi *d/y* dan *w/r* keduanya tergantung pada substitusi Lys/Arg pada kodon nomor 122 dan 160 urutan asam amino regio S seperti terlihat pada tabel di bawah.

Tabel 2.1 Hubungan antara antigenik utama subtipe VHB dan asam amino Lys dan Arg pada kodon posisi 120 dan 160 di protein regio S.

Asam amino pada kodon 122	Asam amino pada kodon 160	
	Lys	Arg
Lys	<i>dw</i>	<i>dr</i>
Arg	<i>yw</i>	<i>yr</i>

(Kidd-Ljunggren K *et al.*, 2002).

Dari sekuen kodon nomor 101 sampai 180 dari 44 gen kecil regio S VHB, kodon nomor 127 merupakan kodon yang berperan pada variasi *w1-w4*, dimana *w1/w2*, *w3* dan *w4* masing-masing dikode oleh Pro, Thr dan Leu pada posisi tersebut. Ekspresi *w1* juga tergantung dari Arg pada posisi 122, Phe pada 134 dan atau Ala pada 159. Determinan lainnya yang dikenal dengan *q* diekspresikan berasal dari sebagian besar strain *adw4* dan beberapa dari *adr*. Kodon yang berperan dalam ekspresi determinan *q* merupakan kodon no 177 dan 178 (Okamoto H *et al.*, 1986; Kidd-Ljunggren K *et al.*, 2002).

Subtipe *adw* terdapat di daerah yang luas mulai dari Afrika Utara dan Afrika Barat serta Afrika Tengah, daerah Mediterania Timur. Asia Barat sampai India Utara. Subtipe *adw* terutama didapat di Afrika Timur, Eropa Barat, Amerika Utara dan Selatan. Di Asia dan Oceania subtipe *adr* banyak didapatkan di Tiongkok Utara, Korea, pulau-pulau besar di Jepang, Malaysia, Birma dan Muangthai. Sedangkan subtipe *adw* terutama terdapat di bagian selatan yaitu Tiongkok Selatan, Taiwan, Okinawa dan Amami, Filipina dan Indonesia. Subtipe *ayw* didapatkan di Malaysia, penduduk pribumi Australia, Vietnam dan Papua Nugini. Subtipe *ayr* sangat jarang ditemui dan dilaporkan dalam persentase rendah di Muangthai Utara, Kepulauan Solomon, Kepulauan New Hebrides dan Papua Nugini (Rasmilah, 2001).

Indonesia adalah negara dengan multi-etnis dengan wilayah teritori yang sangat luas, sehingga diperkirakan prevalensi masing-masing subtipe VHB sangat bervariasi di daerah yang berbeda. Semua subtipe utama VHB ditemukan di Indonesia. Subtipe *adw*, *ayw* dan *adr* dominan di kawasan barat Indonesia, Maluku dan Papua. Subtipe *adr* sangat dominan di daerah Papua dan sebagian Sumatera sedangkan subtipe *ayw* (*ayw1* sampai *ayw4*) paling sering ditemukan di Sulawesi bagian selatan, Lombok, Nusa Tenggara Timur (Flores, Sumba, Sumbawa, Timor)

dan Maluku. Subtipe *ayr* sangat jarang ditemukan di Indonesia (Mulyanto *et al.*, 2009). Dilaporkan juga di Yogyakarta, *adw* merupakan subtipe VHB yang paling sering ditemukan (74%), diikuti subtipe *adr* (11%) dan subtipe-subtipe lainnya. (Hadiwandowo *et al.*, 1994). Penelitian lain melaporkan bahwa subtipe *adw* (*adw2* dan *adw4*) paling sering dijumpai di Sumatera, Jawa, Kalimantan bagian selatan, Bali, Lombok, Ternate dan Morotai (Lusida MI, *et al.*, 2003).

Pada suatu penelitian yang dilakukan oleh Mulyanto *et al.*, (2009) di Bali yaitu di kota Denpasar, didapatkan VHB yang ditemukan di Bali dominan oleh VHB genotipe B (76%), diikuti oleh genotipe C (22%) dan ditemukan juga infeksi VHB dengan genotipe campuran. Infeksi VHB oleh genotipe B dominan ditemukan VHB subgenotipe B3 (86%) diikuti oleh subgenotipe baru yaitu VHB/B8 (10%). Sedangkan dari VHB genotipe C dominan ditemukan VHB subgenotipe baru C7 (56%) diikuti oleh subgenotipe VHB/C1 (44%). Sedangkan subtipe VHB yang dominan menginfeksi penderita adalah subtipe *adw* (63%), kemudian diikuti oleh subtipe *adr* (24%), *ayw* (13%) dan *ayr* (0%).



Gambar 2.5 Peta kepulauan di Indonesia dengan gambaran distribusi geografis yang berbeda dari subgenotipe dan subtipe VHB dari tujuh zona utama dan 28 kota dimana sampel serum diambil pada penelitian yang dilakukan oleh Mulyanto *et al* (2009).

Subtipe VHB ini secara epidemiologis penting, karena dapat menunjukkan perbedaan geografi dan etnis dalam penyebarannya. Dengan mempelajari pola penyebaran subtipe dapat diperoleh gambaran pola migrasi penduduk di masa yang lalu, sebab infeksi VHB dari suatu subtipe yang menular kepada individu yang lain akan menunjukkan subtipe yang sama. Subtipe ternyata ada hubungan dengan faktor etnik serta genetik, hal ini terutama berlaku untuk pengidap kronis (Mulyanto *et al.*, 2009).

Baik genotipe, subgenotipe maupun subtipe VHB memperlihatkan perbedaan dalam distribusi geografis, karakteristik klinik dan virologik (Magnius *et al.*, 1995; Kramvis *et al.*, 2005; Kao, 2002). Ketiganya juga dapat memberikan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat (Okamoto H *et al.*, 1988; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Di Kabupaten Badung khususnya di Mengwi, dari penelusuran penulis belum pernah dilakukan identifikasi genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB, oleh karena itu dipandang perlu untuk menganalisis genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB yang predominan pada pasien yang menunjukkan gejala hepatitis di Mengwi, Badung, Bali.

2.4 Infeksi VHB pada manusia

VHB merupakan penyebab penyakit yang dikenal dengan hepatitis serum atau *homologous serum jaundice (Long incubating hepatitis)*. Dahulu infeksi VHB diduga hanya dapat ditularkan dengan pemindahan serum yang infeksius, dan karena itu penyakit ini pernah dinamakan hepatitis serum. Seseorang sebagai pengidap VHB adalah individu yang terkena infeksi VHB, tetapi belum tentu menderita penyakit hati akibat infeksi tersebut, walaupun itu dapat menjadi sumber penularan. Pengertian ini sulit diterapkan untuk infeksi VHB, karena sulit untuk memastikan ada atau tidaknya

kelainan hati pada seorang pengidap, tanpa melakukan suatu pemeriksaan invasif (biopsi hati). Karena itu dibuat suatu definisi operasional yang praktis pengidap VHB yaitu adanya HBsAg yang positif, tanpa melihat ada atau tidaknya kelainan hati (Suharjo JB, 2006).

2.4.1 Manifestasi klinis penyakit hepatitis B

Infeksi VHB tersebut dapat menyebabkan berbagai macam manifestasi klinik, mulai hepatitis B akut, hepatitis B kronis, sirosis hepatis, dan kanker hati primer. Sebagian besar penderita hepatitis B (sekitar 80%) bisa sembuh, namun tetap sebagai *carrier*. Sedangkan sisanya sekitar 20% akan berkembang menjadi penyakit hati kronis antara lain hepatitis kronis, sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler. VHB mempunyai masa inkubasi 45-120 hari, rata-rata 80-90 hari. Berdasarkan gejala klinis dan petunjuk serologis, manifestasi klinis hepatitis B dapat dibagi dua yaitu :

1. Hepatitis B akut

Hepatitis B akut merupakan manifestasi infeksi VHB terhadap individu yang sistem imunologinya matur sehingga berakhir dengan hilangnya VHB dari tubuh hospes. Hepatitis B akut terdiri atas tiga yaitu : hepatitis B akut yang khas, hepatitis fulminan dan hepatitis subklinik.

1.1. Hepatitis B akut yang khas

Bentuk hepatitis ini meliputi 95 % penderita dengan gambaran ikterus yang jelas. Gejala klinis terdiri atas tiga fase yaitu :

1.1.a. Fase praikterik (prodromal)

Gejalanya non spesifik dan permulaan penyakit tidak jelas. Secara umum gejala akut penyakit Hepatitis B ringan. Gejala ringan dapat

berupa lemah, hilangnya nafsu makan, rasa tidak enak di perut, nyeri di daerah hati, mual dan muntah-muntah, demam ringan, kadang-kadang disertai nyeri sendi dan bengkak di bagian kanan atas perut. Pemeriksaan laboratorium mulai tampak kelainan hati (kadar bilirubin serum, SGOT dan SGPT, Fosfatase alkali menjadi meningkat).

1.1.b.Fase ikterik

Gejala demam dan gastrointestinal tambah hebat disertai hepatomegali dan splenomegali. Setelah satu minggu akan muncul sebagai gejala utama pada sklera mata tampak kuning, kulit seluruh tubuh tampak kuning dan air seni berwarna seperti teh. Timbulnya ikterus makin hebat dengan puncak pada minggu kedua. Setelah timbulnya ikterus, gejala menurun dan pemeriksaan laboratorium tes fungsi hati abnormal.

1.1.c.Fase Penyembuhan

Fase ini ditandai dengan menurunnya kadar enzim aminotransferase. Pembesaran hati masih ada tetapi tidak terasa nyeri dan pemeriksaan laboratorium menjadi normal.

1.2 Hepatitis Fulminan

Bentuk ini sekitar 1 % dengan gambaran sakit berat dan sebagian besar mempunyai prognosa buruk dalam 7-10 hari, 50% akan berakhir dengan kematian. Adakalanya penderita belum menunjukkan gejala ikterus yang berat, tetapi pemeriksaan SGOT memberikan hasil yang tinggi. Pada pemeriksaan fisik, hati menjadi lebih kecil, kesadaran cepat menurun

hingga koma, mual dan muntah yang hebat disertai gelisah, dapat terjadi gagal ginjal akut dengan anuria dan uremia.

2. Hepatitis B kronis

Hepatitis B kronis yaitu manifestasi infeksi VHB terhadap individu dengan sistem imunologi kurang sempurna sehingga mekanisme untuk menghilangkan VHB tidak efektif dan terjadi koeksistensi dengan VHB. 5-10% penderita hepatitis B akut akan mengalami hepatitis B kronis. Hepatitis ini terjadi jika setelah enam bulan tidak menunjukkan perbaikan yang mantap. 10% infeksi VHB akan menjadi kronis dan 20% penderita hepatitis kronis ini dalam waktu 25 tahun sejak tertular akan mengalami sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler (hepatoma). Kemungkinan akan menjadi kronis lebih tinggi bila infeksi terjadi pada usia balita dimana respon imun belum berkembang secara sempurna. VHB pada penderita hepatitis B kronis, secara umum terdapat replikasi virus aktif, sedangkan pada pengidap VHB sehat, virus ditemukan dalam keadaan replikasi tidak aktif. Replikasi aktif VHB dihubungkan dengan HBeAg dalam serum, sedangkan serokonversi menjadi anti-HBe dihubungkan dengan tidak ada replikasi virus. Namun pada beberapa penderita infeksi VHB yang sehat didapatkan DNA VHB dalam serum, tetapi terjadi serokonversi dari HBeAg menjadi anti-HBe. Hal tersebut terjadi karena defek pada regio preC (Jawetz,1996; Siregar FA,2004; Suharjo JB,2006).

2.4.2 Gambaran patologi penyakit hepatitis B

Pada manusia, hati merupakan target organ bagi VHB tetapi penelitian menunjukkan bahwa VHB bukanlah suatu virus yang sitopatik untuk sel-sel hepar.

Hal ini dapat dilihat pada *carrier* sehat, dimana pada jaringan hati praktis tidak ada kelainan patologis, walaupun di dalam sel-sel hepar didapatkan partikel VHB dalam jumlah yang sangat besar. Kelainan sel hepar yang terjadi akibat infeksi VHB disebabkan karena reaksi imun tubuh terhadap sel hepatosit yang terinfeksi VHB dengan tujuan akhir mengeliminasi VHB tersebut. Manifestasi klinik infeksi tersebut sangat tergantung dari sifat reaksi imunologis tersebut, terutama reaksi imunologis seluler. Pada kasus-kasus hepatitis B akut respon imun tersebut berhasil mengeliminasi sel-sel hepar yang terkena infeksi VHB sehingga terjadi nekrosis sel-sel yang mengandung VHB dan terjadi gejala klinis yang diikuti dengan kesembuhan (Jawetz, 1996; Siregar FA, 2004).

VHB mula-mula melekat pada reseptor spesifik di membran sel hepar kemudian mengalami penetrasi ke dalam sitoplasma sel hepar. Dalam sitoplasma VHB melepaskan mantelnya, sehingga melepaskan nukleokapsid. Selanjutnya nukleokapsid akan menembus dinding sel hepar. Di dalam inti sel hepar, asam nukleat VHB akan keluar dari nukleokapsid dan akan menempel pada DNA hospes dan berintegrasi pada DNA tersebut. Selanjutnya DNA VHB memerintahkan sel hepar untuk membentuk protein bagi virus baru dan kemudian terjadi pembentukan virus baru. Virus ini dilepaskan ke peredaran darah, mekanisme terjadinya kerusakan hati yang kronis disebabkan karena respon imunologik penderita terhadap infeksi. Apabila reaksi imunologik tidak ada atau minimal maka terjadi keadaan *carrier* sehat. Gambaran patologis hepatitis akut tipe A, B dan non-A dan non-B adalah sama yaitu adanya peradangan akut diseluruh bagian hati dengan nekrosis sel hepar disertai infiltrasi sel-sel hepar dengan histiosit. Bila nekrosis meluas (masif) terjadi hepatitis akut fulminan. Apabila penyakit menjadi kronik dengan peradangan dan fibrosis meluas di daerah portal dan batas antara lobulus masih utuh, maka akan

terjadi hepatitis kronis persisten. Sedangkan bila daerah portal melebar, tidak teratur dengan nekrosis diantara daerah portal yang berdekatan dan pembentukan septa fibrosis yang meluas maka terjadi hepatitis kronis aktif (Jawetz, 1996; Siregar FA, 2004).

2.4.3. Penularan VHB.

VHB biasanya ditularkan dari orang ke orang melalui sumber penularan seperti darah atau produk darah, cairan tubuh seperti semen, saliva, feses, urin yang mempunyai konsentrasi VHB yang tinggi. Penularan infeksi virus hepatitis B melalui berbagai cara yaitu :

1. Parenteral

Dimana terjadi penembusan kulit atau mukosa melalui alat-alat yang telah tercemar VHB seperti misalnya melalui tusuk jarum, sisir, pisau cukur, alat makan, sikat gigi, alat kedokteran dan lain-lain benda yang sudah tercemar VHB. Cara penularan parenteral VHB di daerah tropis sama dengan cara penularan yang terjadi di bagian dunia lainnya, tetapi faktor-faktor tambahan mempunyai arti penting. Faktor tambahan tersebut termasuk tatto tradisional dan perlukaan kulit, pengaliran darah, sirkulasi ritual dengan alat yang tidak steril dan gigitan berulang oleh vektor arthropoda pengisap darah. Hasil penelitian mengenai peranan serangga penggigit dalam penyebaran VHB masih merupakan pertentangan. HBsAg dapat dideteksi pada beberapa spesies nyamuk dan kutu yang ditangkap di daerah liar atau yang secara eksperimen di beri makan darah yang terinfeksi, tetapi tidak terdapat bukti yang menyakinkan mengenai replikasi virus dalam serangga.

2. Non-parenteral :

Dimana terjadi karena persentuhan yang erat dengan benda yang tercemar VHB. Cara penularan non-parenteral VHB dapat melalui kontak personal yang erat dan dengan jalan seksual. Hubungan seksual yang mempunyai resiko tinggi khususnya pria homoseksual. HBsAg ditemukan secara berulang-ulang dalam darah dan berbagai cairan tubuh lainnya. Adanya antigen dalam urin, empedu, feses, keringat dan air mata juga telah dilaporkan tetapi belum dipastikan.

Secara epidemiologik pola penularan infeksi VHB dibagi dua cara penting yaitu:

- a. Penularan vertikal, yaitu penularan infeksi VHB dari ibu yang HBsAg positif kepada anak yang dilahirkan yang dapat terjadi pada saat di dalam rahim (intrauterin), pada saat persalinan (intrapartum) dan pasca persalinan (pospartum). Penularan infeksi VHB terjadi saat proses persalinan oleh karena adanya kontak atau paparan dengan sekret yang mengandung VHB (cairan amnion, darah ibu, sekret vagina) pada kulit bayi dengan lesi (abrasi) dan pada mukosa (konjungtiva). Bayi yang dilahirkan dari ibu yang HBsAg(+) akan menderita VHB. Resiko terinfeksi pada bayi mencapai 50-60 %.
- b. Penularan horizontal, yaitu penularan infeksi VHB dari seorang pengidap VHB kepada orang lain disekitarnya. Pola penularan horizontal dapat melalui dua jalur, yaitu :

1). Penularan melalui kulit.

VHB tidak dapat menembus kulit yang utuh, maka infeksi VHB melalui kulit dapat terjadi melalui dua cara, yaitu dengan ditembusnya kulit oleh tusukan

jarum atau alat lain yang tercemar bahan infeksi, atau melalui kontak antara bahan yang infeksi dengan kulit yang sudah mengalami perubahan(lesi).

2). Penularan melalui mukosa.

Mukosa dapat menjadi *port d'entry* infeksi VHB yaitu melalui mulut, mata, hidung, saluran makan bagian bawah dan alat kelamin (Rasmilah,2001; Siregar FA,2004).

2.4.4. Faktor -faktor yang mempengaruhi terjadinya penyakit hepatitis B

2.4.4.1. Faktor hospes (penjamu)

Faktor hospes adalah semua faktor yang terdapat pada diri manusia yang dapat mempengaruhi timbul serta perjalanan penyakit hepatitis B. Faktor penjamu meliputi:

a. Umur

VHB dapat menyerang semua golongan umur. Paling sering pada bayi dan anak-anak (25-45,9%) beresiko untuk menjadi kronis, menurun dengan bertambahnya umur dimana pada anak bayi 90% akan menjadi kronis, pada anak usia sekolah 23-46 % dan pada orang dewasa 3-10%. Hal ini berkaitan dengan terbentuk antibodi dalam jumlah cukup untuk menjamin terhindar dari hepatitis kronis.

b. Jenis kelamin

c. Mekanisme pertahanan tubuh

Individu dengan kelainan sistem kekebalan selular, misalnya penderita hemofilia, hemodialisa, penderita yang sering mendapat transfusi darah leukemia limfositik, penderita *Syndrome Down* dan penderita yang mendapat terapi immunosupresif. Bayi baru lahir atau bayi 2 bulan

pertama setelah lahir lebih sering terinfeksi hepatitis B, terutama pada bayi yang belum mendapat imunisasi hepatitis B. Hal ini karena sistem imun belum berkembang sempurna.

d. Kebiasaan hidup

Sebagian besar penularan pada masa remaja disebabkan karena aktivitas seksual dan gaya hidup seperti homoseksual, pecandu obat narkotika suntikan, pemakaian tatto, pemakaian akupunktur.

e. Pekerjaan

Kelompok resiko tinggi untuk mendapat infeksi hepatitis B adalah dokter, dokter bedah, dokter gigi, perawat, bidan, petugas kamar operasi, petugas laboratorium dimana mereka dalam pekerjaan sehari-hari kontak dengan penderita dan material manusia (darah, tinja, air kemih). Profesi lainnya atau lingkungannya yang juga relatif sering ketularan, misal : pengguna jarum suntik, wanita tuna susila, pria homoseksual, suami/istri atau anggota keluarga penderita infeksi VHB kronis, dukun bayi, bayi yang dilahirkan dari ibu yang terinfeksi hepatitis B.

2.4.4.2. Faktor Agen

Penyebab hepatitis B adalah virus hepatitis B termasuk DNA virus. Faktor-faktor agen yang dapat mempengaruhi efektivitas penularan yaitu: virulensi virus, konsentrasi virus, volume inokulum dan cara masuk virus ke dalam tubuh.

2.4.4.3. Faktor Lingkungan

Merupakan keseluruhan kondisi dan pengaruh luar yang mempengaruhi perkembangan hepatitis B. Yang termasuk faktor lingkungan seperti:

lingkungan dengan sanitasi buruk, daerah dengan angka prevalensi VHB nya tinggi, unit pembedahan, laboratorium, unit bank darah, hemodialisa dan tempat lainnya yang berisiko (Rasmilah, 2001; Siregar FA, 2004).

2.5 Respon imun terhadap infeksi VHB

Seseorang yang terinfeksi VHB akut maka tubuh akan memberikan tanggapan kekebalan (*immune response*). Ada tiga kemungkinan tanggapan kekebalan yang diberikan oleh tubuh terhadap VHB pasca periode akut. Kemungkinan pertama, jika tanggapan kekebalan tubuh adekuat maka akan terjadi pembersihan virus, pasien sembuh. Kedua, jika tanggapan kekebalan tubuh lemah maka pasien tersebut akan menjadi *carrier* inaktif. Ketiga, jika tanggapan tubuh bersifat *intermediate* (antara dua hal di atas) maka penyakit terus berkembang menjadi hepatitis B kronis. Pada kemungkinan pertama, tubuh mampu memberikan tanggapan adekuat terhadap virus hepatitis B, akan terjadi empat stadium siklus VHB, yaitu fase replikasi (stadium 1 dan 2) dan fase integratif (stadium 3 dan 4) (Lee WM, 1997; Soewignjo, 1999).

Pada infeksi VHB akut, setelah virus masuk ke dalam tubuh maka akan segera muncul alfa interferon yang mengaktifkan peran sel *natural killer* (NK). Kenaikan kadar interferon ini menyebabkan keluhan panas badan serta malaise. Reaksi sel radang yang muncul limfosit T *helper* CD4 yang telah mengalami sensitisasi terhadap peptida nukleokapsid (Abbas AK *et al.*, 2000).

Respon imun yang pertama terjadi adalah terhadap antigen pre-S yang terjadi sekitar 30 hari sebelum terjadinya kerusakan sel hepar. Pada fase replikasi kadar HBsAg, DNA VHB, HBeAg, AST dan ALT serum akan meningkat, sedangkan kadar anti-HBs dan anti-HBe masih negatif. Respon imun yang muncul kemudian adalah HBeAg yang muncul 10 hari kemudian. Respon imun yang paling kuat yaitu respon

imun terhadap antigen S yang terjadi 10 hari sebelum kerusakan sel hepar. Dalam hal ini jelas adanya perbedaan antara antigen viral yang diekspresikan pada sel hepar yang terinfeksi yang terdiri dari baik antigen selubung (pre-S dan S) maupun antigen nukleokapsid (HBcAg) (Lee WM., 1997; Soewignjo., 1999).

Pada fase integratif (khususnya stadium 4) keadaan sebaliknya terjadi, HBsAg, DNA VHB, HBeAg ALT dan AST menjadi negatif (normal), sedangkan antibodi terhadap antigen yaitu: anti-HBs dan anti-HBe menjadi positif (serokonversi). Keadaan demikian banyak ditemukan pada penderita hepatitis B yang terinfeksi pada usia dewasa di mana sekitar 95-97% infeksi hepatitis B akut akan sembuh karena imunitas tubuh dapat memberikan tanggapan yang adekuat (Lee WM., 1997).

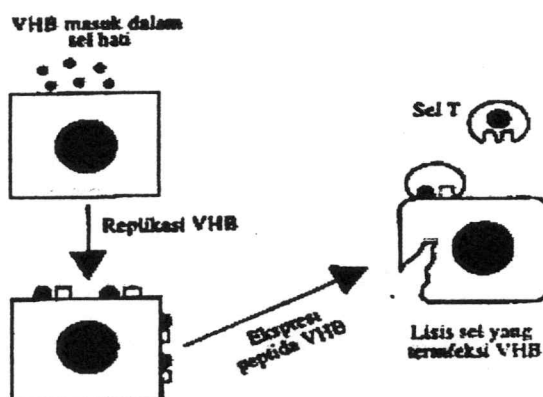
Pada sebagian penderita respon imun tersebut tidak berhasil menghancurkan sel-sel hepar yang terinfeksi sehingga VHB tersebut tetap mengalami replikasi seperti pada neonatus sehingga terjadi infeksi hepatitis B persisten, dapat bersifat *carrier* inaktif atau menjadi hepatitis B kronis dan masuk ke kemungkinan ke dua dan ke tiga. Pada kasus-kasus dengan hepatitis B kronis respon imun tersebut ada tetapi tidak sempurna sehingga hanya terjadi nekrosis pada sebagian sel hepar yang mengandung VHB dan masih tetap ada sel hepar yang terinfeksi tidak mengalami nekrosis, sehingga dengan demikian infeksi VHB dapat menjalar ke sel lainnya. Pada *carrier* HBsAg sehat respon imun tersebut sama sekali tidak efektif sehingga tidak ada nekrosis sel hepar yang terinfeksi dan virus tetap mengadakan replikasi tanpa adanya gejala klinik (Jawetz, 1996; Crawford *et al.*, 2005).

Sel yang terinfeksi tidak berhasil dihilangkan seluruhnya bila proses yang terjadi pada hepatitis akut tidak efektif. Pada infeksi VHB kronik viral antigen yang diekspresikan pada membran sel hepar adalah HBcAg dan HBeAg. Antara HBcAg

dan HBeAg terdapat reaksi imunologis silang pada tingkat sel T. Bila pada seorang individu didapatkan HBsAg positif selama enam bulan maka individu tersebut menderita infeksi VHB kronik, ini berdasarkan fakta bahwa pada infeksi VHB akut HBsAg paling lama positif selama enam bulan (Jawetz, 1996; Lee WM, 1997).

Tanggapan imun yang tidak atau kurang adekuat mengakibatkan terjadinya proses inflamasi jejas (*injury*), fibrosis akibat peningkatan *turnover* sel dan stres oksidatif. Efek virus secara langsung, seperti mutagenesis dan *inserts* suatu protein X dari VHB menyebabkan hilangnya kendali pertumbuhan sel hepar dan memicu transformasi malignitas, sehingga berakhir sebagai karsinoma hepatoseluler (Lee WM, 1997).

Kerusakan sel hepar yang terinfeksi oleh VHB disebabkan karena adanya ekspresi antigen viral pada membran hepatosit yang disertai oleh ekspresi molekul MHC kelas 1 yang kemudian dikenali oleh sel T sitotoksik sehingga akhirnya terjadi lisis dari hepatosit tersebut seperti tampak pada gambar dibawah ini (Soewignjo, 1999).



Gambar 2.6 Pada hepatitis akut respon imun secara efektif menghancurkan sel hepar yang terinfeksi. VHB setelah menginfeksi sel hepar terjadi ekspresi antigen viral pada membran sel hepar yang disertai oleh ekspresi molekul MHC kelas 1 yang kemudian dikenali oleh sel T sitotoksik sehingga akhirnya terjadi lisis dan kerusakan sel hepar. (Soewignjo, 1999).

Kegagalan respon imun yang terjadi pada infeksi VHB akut untuk membersihkan semua sel-sel hepar yang terinfeksi VHB akan menyebabkan persistensi infeksi. Kegagalan respon imun tersebut dapat disebabkan oleh:

1. Gagalnya sensitisasi atau kegagalan fungsi sel T sitotoksik
2. Kegagalan sel NK
3. Kegagalan produksi interferon
4. Kegagalan sel hepar untuk memberikan respon terhadap interferon alfa
5. Kegagalan pembentukan antibodi oleh sel limfosit B sehingga sel VHB tidak dapat dinetralisir (Hollinger,1991).

2.6 Diagnosis dan evaluasi infeksi VHB

Infeksi hepatitis B persisten secara serologis dapat dibagi menjadi hepatitis B kronis dan keadaan *carrier* HBsAg inaktif. Hepatitis B kronis ditandai dengan HBsAg positif (lebih dari 6 bulan) dalam serum, tingginya tingkat DNA VHB dan selama proses kronis hati nekroinflamasi. *Carrier* HBsAg inaktif diartikan sebagai infeksi VHB persisten hati tanpa nekroinflamasi (Tabel 2.2). Sedangkan hepatitis B kronis eksaserbasi adalah keadaan klinis yang ditandai dengan peningkatan intermiten ALT >10 kali batas atas nilai normal (Lok ASF, 2001; Suharjo JB,2006).

Tabel 2.2 Definisi dan kriteria diagnostik pasien dengan infeksi hepatitis B

Keadaan	Definisi	Kriteria diagnostik
Hepatitis B kronis	Proses nekroinflamasi kronis hati disebabkan oleh infeksi persisten VHB. Dapat dibagi menjadi hepatitis B kronis dengan HBeAg + dan HBeAg -	<ol style="list-style-type: none"> 1. HBsAg + > 6 bulan 2. HBV DNA serum > 10⁵ copies/ml 3. Peningkatan kadar ALT/AST secara berkala/persisten 4. Biopsi hati menunjukkan hepatitis kronis (skor nekroinflamasi > 4)
<i>Carrier</i> HBsAg inaktif	Infeksi virus hepatitis B persisten tanpa disertai proses nekroinflamasi yang signifikan	<ol style="list-style-type: none"> 1. HBsAg + > 6 bulan 2. HBeAg -, anti HBe + 3. DNA VHB serum < 10⁵ copies/ml 4. Kadar ALT/AST normal 5. Biopsi hati menunjukkan tidak adanya hepatitis yang signifikan (skor nekroinflamasi < 4)

(Lok ASF, 2001; Suharjo JB,2006)

Diagnosis infeksi Hepatitis B kronis didasarkan pada pemeriksaan serologi, petanda virologi, biokimiawi dan histologi. Secara serologi pemeriksaan yang dapat dilakukan untuk diagnosis dan evaluasi infeksi VHB kronis adalah: HBsAg, HBeAg, anti-HBe, IgM anti-HBc, IgG anti-HBs, DNA VHB dan DNA *polymerase*, (Lok ASF, 2001; Keeffe EB *et al.*, 2004)

Tabel 2.3 Evaluasi pasien hepatitis B kronis

Parameter	Keterangan
Evaluasi awal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anamnesis dan pemeriksaan fisik 2. Pemeriksaan laboratorium untuk menilai penyakit hati : darah rutin dan fungsi hati 3. Pemeriksaan replikasi virus : HBeAg, Anti-HBe dan DNA VHB 4. Pemeriksaan untuk menyisihkan penyakit hati lainnya : anti-HCV, anti-HDV (khususnya pengguna narkoba injeksi, atau daerah endemis) 5. Skrining karsinoma hepatoselular : kadar alfa fetoprotein dan ultrasonografi 6. Biopsi hati pada pasien yang memenuhi kriteria hepatitis B kronis
Follow up pasien yang belum diterapi	<p>Pasien HBeAg positif dan DNA VHB > 10⁵ copies/ml dan kadar ALT normal :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pemeriksaan ALT setiap 3-6 bulan 2. Bila ALT > 1-2 x BNA, periksa ulang setiap 1-3 bulan 3. Bila ALT > 2 x BNA selama 3-6 bulan, pertimbangkan biopsi dan terapi 4. Pertimbangkan untuk skrining karsinoma hepatoselular <p>Pasien <i>carrier</i> HBsAg inaktif :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pemeriksaan ALT setiap 6-12 bulan 2. Bila ALT > 1-2 x BNA, periksa DNA VHB dan singkirkan penyebab penyakit hati lainnya 3. Pertimbangkan untuk skrining karsinoma hepatoselular

(Lok ASF, 2001; Suharjo JB, 2006)

Pada setiap pasien dengan infeksi HBV perlu dilakukan evaluasi awal (Tabel 2.3). Pada pasien dengan HBeAg positif dan DNA VHB > 10⁵ copies/ml dan kadar ALT normal yang belum mendapatkan terapi antiviral perlu dilakukan pemeriksaan ALT berkala dan skrining terhadap resiko karsinoma hepatoseluler, jika perlu

dilakukan biopsi hati. Pasien dengan keadaan *carrier* HBsAg inaktif perlu dilakukan pemantauan kadar ALT dan DNA VHB (Lok ASF,2001; Suharjo JB,2006).

2.6.1 Pemeriksaan HBsAg

Deteksi terhadap adanya infeksi VHB yang paling mudah adalah deteksi adanya antigen permukaan VHB yaitu HBsAg. Salah satu petanda serologis untuk infeksi VHB yang sedang aktif adalah adanya antigen dari daerah genom S VHB yaitu HBsAg. Pasien yang ditemukan HBsAg dalam darahnya menunjukkan bahwa terdapat infeksi VHB dalam darah pasien yang dibuktikan dengan ditemukannya antigen S VHB pada darah pasien. Titer HBsAg yang masih positif lebih dari 6 bulan menunjukkan infeksi hepatitis kronis. Munculnya antibodi terhadap HBsAg (anti-HBs) menunjukkan imunitas dan atau penyembuhan proses infeksi (Handajani R *et al.*,2006).

Di dalam darah seorang penderita dengan HBsAg positif bisa saja yang terdeteksi oleh pemeriksaan HBsAg dengan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah partikel-partikel bebas yang hanya mengandung protein HBsAg. Partikel *Dane* merupakan merupakan virus utuh yang lengkap dengan DNA, tetapi di samping itu didapatkan partikel-partikel bebas yang hanya mengandung protein HBsAg dalam bentuk bulat maupun filamen (Kann M *et al.*,1997). HBsAg *carrier* dapat beredar dalam darah penderita hanya dalam bentuk partikel HBsAg yang tidak komplit dan bukan merupakan virus utuh (virion) yang infeksius (Mandel *et al.*, 2000).

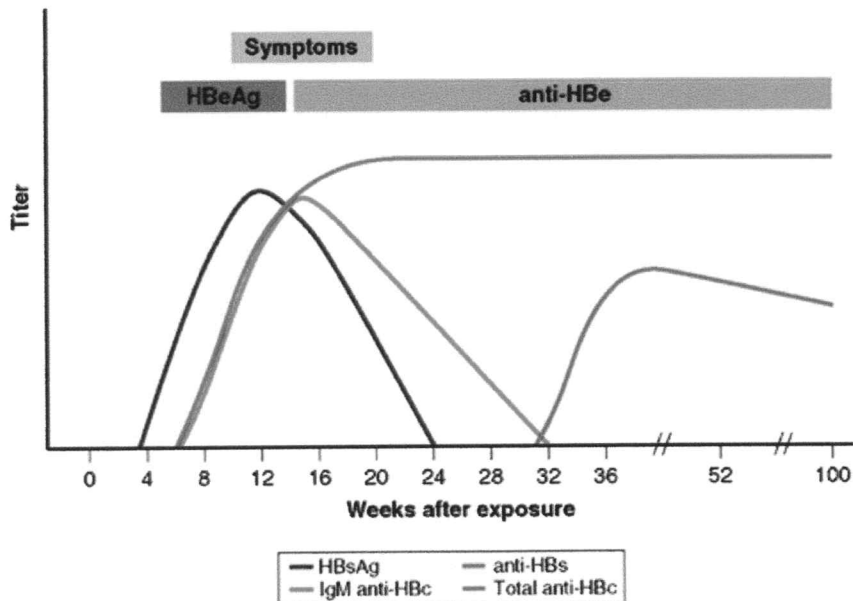
HBsAg mulai terdeteksi di darah penderita sebelum tampak gejala klinis, saat puncak infeksi dan kemudian tidak terdeteksi 3-6 bulan kemudian. HBeAg, DNA VHB dan DNA *polymerase* terdeteksi di serum segera setelah HBsAg. Pemeriksaan

ini signifikan dengan kejadian replikasi virus aktif. IgM anti-HBc terdeteksi di serum dalam waktu yang singkat sebelum onset gejala klinis. Setelah lebih dari satu bulan, IgM anti-HBc digantikan oleh IgG anti-HBc. Anti-HBe terdeteksi segera setelah HBeAg menghilang, menandakan bahwa infeksi telah mencapai puncaknya dan penderita segera menjadi baik. IgG anti-HBs terdeteksi setelah keadaan akut selesai. IgG anti-HBs ada dalam serum selama hidup untuk memberikan perlindungan terhadap infeksi ulangan (Gambar 2.7). Keadaan *carrier* ditentukan oleh keberadaan HBsAg dalam serum selama enam bulan atau lebih lama sejak terdeteksi awal. Keberadaan HBs itu sendiri tidak cukup untuk mengindikasikan replikasi kompleks virion, pasien mungkin asimtomatik dan tanpa mengalami kerusakan hati. Replikasi kronis virion VHB ditandai dengan keberadaan HBsAg, HBeAg, dan DNA VHB di sirkulasi, biasanya dengan anti-HBc dan kadang-kadang dengan anti-HBs. Penderita ini mungkin mengalami progresifitas kerusakan hati (Crawford *et al.*, 2005).

2.6.2 Pemeriksaan HBeAg

Adanya HBeAg dalam serum mengindikasikan adanya replikasi aktif virus di dalam sel hepar. Titer HBeAg berkorelasi dengan kadar DNA VHB. Namun tidak adanya HBeAg (negatif) bukan berarti tidak adanya replikasi virus keadaan ini dapat dijumpai pada penderita terinfeksi VHB yang mengalami mutasi (*precore* atau *core mutant*). Penelitian menunjukkan bahwa pada seseorang HBeAg negatif ternyata memiliki DNA VHB $> 10^5$ copies/ml. Pasien hepatitis kronis B dengan HBeAg negatif yang banyak terjadi di Asia dan Mediterania umumnya mempunyai kadar DNA VHB lebih rendah (berkisar 10^4 - 10^8 copies/ml) dibandingkan dengan

tipe HBeAg positif. Pada jenis ini meskipun HBeAg negatif, remisi dan prognosis relatif jelek, sehingga perlu diterapi (Dufour DR, 2000; Suharjo JB, 2006).



Gambar 2.7 Ilustrasi gambaran serologi pada keadaan infeksi akut VHB. HBsAg mulai terdeteksi di darah penderita mulai sebelum tampak gejala klinis, mencapai puncaknya pada minggu ke-12 sampai kemudian mulai tidak terdeteksi 24 minggu kemudian. HBeAg terdeteksi di serum segera setelah HBsAg. IgM anti-HBc terdeteksi di serum dalam waktu yang singkat sebelum onset gejala klinis, sedangkan total anti-HBc akan terus ada di dalam serum. Anti-HBe terdeteksi segera setelah HBeAg menghilang. Anti-HBs mulai terdeteksi setelah keadaan akut selesai yaitu sekitar minggu ke-32 (Crawford *et al.*, 2005).

2.6.3 Pemeriksaan virologi VHB

Pemeriksaan virologi dilakukan untuk mengukur jumlah DNA VHB serum sangat penting karena dapat menggambarkan tingkat replikasi virus. Ada beberapa persoalan berkaitan dengan pemeriksaan kadar DNA VHB. Pertama, metode yang digunakan untuk mengukur kadar DNA VHB. Saat ini ada beberapa jenis pemeriksaan DNA VHB, yaitu : *branched DNA*, *hybrid capture*, *liquid hybridization* dan PCR. Dalam penelitian, umumnya titer DNA VHB diukur

menggunakan amplifikasi, seperti misalnya PCR, karena dapat mengukur sampai 100-1000 *copies/ml*. Kedua, beberapa pasien dengan hepatitis B kronis memiliki kadar DNA VHB fluktuatif. Ketiga, penentuan ambang batas kadar DNA VHB yang mencerminkan tingkat progresifitas penyakit hati. Salah satu kepentingan lain penentuan kadar DNA VHB adalah untuk membedakan antara *carrier* hepatitis inaktif dengan hepatitis B kronis dengan HBeAg negatif : kadar $<10^5$ *copies/ml* lebih menunjukkan *carrier* hepatitis inaktif. Saat ini telah disepakati bahwa kadar DNA VHB $>10^5$ *copies/ml* merupakan batas penentuan untuk hepatitis B kronis (Seo YA, 2005; Suharjo JB,2006).

2.6.4 Pemeriksaan Kadar ALT pada infeksi VHB

Pemeriksaan ALT merupakan salah satu pemeriksaan biokimiawi yang penting untuk mengetahui adanya gangguan dalam organ hati. Peningkatan kadar ALT menggambarkan adanya aktifitas nekroinflamasi di sel-sel hepar. Peningkatan kadar ALT akan terjadi jika adanya pelepasan enzim secara intaraseluler oleh sel-sel hepar ke dalam darah yang disebabkan adanya kerusakan hati misalnya nekrosis hepatoselular. Pemeriksaan ini dipertimbangkan sebagai prediksi gambaran histologi. Pasien dengan kadar ALT yang meningkat menunjukkan proses nekroinflamasi lebih berat dibandingkan pada ALT yang normal. Pemeriksaan ALT juga penting untuk menentukan keputusan terapi (Tabel 2.3). Pasien dengan kadar ALT normal memiliki respon serologi yang kurang baik pada terapi antiviral. Pasien dengan kadar ALT normal dipertimbangkan untuk tidak diterapi, kecuali bila hasil pemeriksaan histologi menunjukkan proses nekroinflamasi aktif (Lok ASF,2001; Suharjo JB,2006).

2.6.5 Pemeriksaan histologi

Pemeriksaan histologi pada penyakit hepatitis B adalah untuk menilai tingkat kerusakan hati, menyisihkan diagnosis penyakit hati lain, prognosis dan menentukan manajemen anti viral. Ukuran spesimen biopsi yang representatif adalah 1 - 3 cm (ukuran panjang) dan 1,2 - 2 mm (ukuran diameter) baik menggunakan jarum Menghini atau *Tru-cut*. Salah satu metode penilaian biopsi yang sering digunakan adalah dengan *Histologic Activity Index score* (Bravo AA, 2001; Suharjo JB, 2006).

2.7 Pengobatan dan Pencegahan infeksi VHB

2.7.1 Pengobatan infeksi VHB

Tujuan terapi hepatitis B kronis adalah untuk mengeliminasi secara bermakna replikasi VHB dan mencegah progresi penyakit hati menjadi sirosis yang berpotensi menuju gagal hati, dan mencegah karsinoma hepatoselular. Sasaran pengobatan adalah menurunkan kadar DNA VHB serendah mungkin, serokonversi HBeAg dan normalisasi kadar ALT. Sasaran sebenarnya adalah menghilangnya HBsAg, tetapi sampai saat ini keberhasilannya hanya berkisar 1-5% sehingga sasaran tersebut tidak digunakan. Sesuai dengan rekomendasi *The American Association for the Study of Liver Disease* terapi diberikan pada penderita hepatitis B kronis, dengan syarat :

- 1). HBeAg positif dan DNA VHB $>10^5$ copies/ml dan kadar ALT >2 batas atas angka normal.
- 2). HBeAg positif dan DNA VHB $>10^5$ copies/ml dan kadar ALT < 2 batas atas angka normal tidak perlu terapi, hanya perlu dievaluasi setiap 6-12 bulan, kecuali bila pemeriksaan histologi menunjukkan adanya nekroinflamasi tingkat sedang sampai berat.

3). HBeAg negatif dan DNA VHB $>10^5$ copies/ml dan kadar ALT >2 batas atas angka normal.

4). Penderita sirosis hepatis dengan DNA VHB $>10^5$ copies/ml

Saat ini ada lima jenis obat yang direkomendasikan untuk terapi hepatitis B kronis di Amerika Serikat, yaitu : interferon alfa-2b, lamivudin, adefovir dipivoxil, entecavir dan peginterferon alfa-2a.

a. Interferon

Interferon tidak memiliki efikasi antivirus langsung tetapi merangsang terbentuknya berbagai macam protein efektor yang mempunyai efek antivirus. Berdasarkan suatu studi yang melibatkan 875 pasien hepatitis B kronis dengan HBeAg positif: serokonversi HBeAg terjadi pada 18%, penurunan DNA VHB terjadi pada 37% dan normalisasi ALT terjadi pada 23%. Salah satu kekurangan interferon adalah efek samping dan pemberian yang secara injeksi. Dosis interferon 5-10 juta MU 3 kali /minggu selama 16 minggu.

b. Lamivudin

Lamivudin merupakan antivirus melalui efek penghambatan transkripsi selama siklus replikasi virus hepatitis B. Pemberian lamivudin 100 mg/hari selama satu tahun dapat menekan DNA VHB, normalisasi ALT, serokonversi HBeAg dan mengurangi progresi fibrosis secara bermakna dibandingkan plasebo, akan tetapi lamivudin dapat memicu resistensi. Dilaporkan bahwa resistensi terhadap lamivudin sebesar lebih dari 32% setelah terapi selama satu tahun dan menjadi 57% setelah terapi selama tiga tahun. Risiko resistensi terhadap lamivudin meningkat dengan makin lamanya pemberian. Dalam suatu studi di Asia, resistensi genotipe

meningkat dari 14% pada tahun pertama pemberian lamivudin, menjadi 38%, 49%, 66% dan 69% masing masing pada tahun ke 2,3,4 dan 5 terapi.

c. Adefovir

Adefovir merupakan analog asiklik dari *deoxyadenosine monophosphate* (dAMP), yang sudah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat untuk digunakan sebagai antivirus terhadap hepatitis B kronis. Cara kerjanya adalah dengan menghambat amplifikasi dari cccDNA virus. Dosis yang direkomendasikan untuk dewasa adalah 10 mg/hari oral paling tidak selama satu tahun. Suatu penelitian pada 515 pasien hepatitis B kronis dengan HBeAg positif yang diterapi dengan adefovir 10 mg dan 30 mg selama 48 minggu dibandingkan plasebo. Disimpulkan bahwa adefovir memberikan hasil lebih baik secara signifikan ($p < 0,001$) dalam hal : respon histologi, normalisasi ALT, serokonversi HBeAg dan penurunan kadar DNA VHB. Keamanan adefovir 10 mg sama dengan plasebo. Suatu penelitian dimana dilakukan pemberian adefovir pada penderita hepatitis B kronis dengan HBeAg negatif. Pada pasien yang mendapatkan 10 mg adefovir terjadi penurunan DNA VHB secara bermakna dibandingkan plasebo, tetapi efikasinya menghilang pada evaluasi minggu ke 48. Pada kelompok yang medapatkan adefovir selama 144 minggu efikasinya dapat dipertahankan dengan resistensi sebesar 5,9%. Kelebihan adefovir dibandingkan lamivudin, di samping risiko resistennya lebih kecil juga adefovir dapat menekan YMDD *mutant* yang resisten terhadap lamivudin.

d. Peginterferon

Lau GK *et al*,(2005) melakukan penelitian terapi peginterferon tunggal dibandingkan kombinasi pada 841 penderita hepatitis B kronis. Kelompok

pertama mendapatkan peginterferon alfa 2a (Pegasys) 180 µg/minggu + plasebo setiap hari, kelompok ke dua mendapatkan peginterferon alfa 2a (Pegasys) 180 µg/minggu + lamivudin 100 mg/hari dan kelompok ke tiga memperoleh lamivudin 100 mg/hari, selama 48 minggu. Hasilnya pada akhir minggu ke 48, yaitu:

- 1). Serokonversi HBeAg tertinggi pada peginterferon tanpa kombinasi, yaitu 27%, dibandingkan kombinasi (24%) dan lamivudin tunggal (20%).
- 2). Respon virologi tertinggi pada peginterferon + lamivudin (86%).
- 3). Normalisasi ALT tertinggi pada lamivudin (62%).
- 4). Respon HBsAg pada minggu ke 72 : peginterferon tunggal delapan pasien, terapi kombinasi delapan pasien dan lamivudin tidak ada serokonversi.
- 5). Resistensi (mutasi YMDD) pada minggu ke 48 didapatkan pada: 69 (27%) pasien dengan lamivudin, sembilan pasien (4%) pada kelompok kombinasi.
- 6). Efek samping relatif minimal pada ketiga kelompok. Disimpulkan bahwa berdasarkan hasil kombinasi (serokonversi HBeAg, normalisasi ALT, penurunan DNA VHB dan supresi HBsAg), peginterferon memberikan hasil lebih baik dibandingkan lamivudin.

e. Analog Nukleotida Lainnya

Di samping entecavir, saat ini beberapa obat antivirus sedang dalam tahap penelitian, seperti: telbivudine, emtricitabine, clevudine dan LB 80380 (ANA 380). Berdasarkan studi *blind-random*, telbivudine 400-800 mg

selama 52 minggu dapat menurunkan DNA VHB sampai 6 log, dan risiko timbulnya mutasi YMDD turun sebesar 4,9%. Emtricitabine yang merupakan derivat lamivudin, mempunyai potensi dan peluang yang hampir sama dengan lamivudin dalam memicu terjadinya mutasi YMDD. Clevudine yang merupakan analog pirimidin, sedang dalam studi fase II. Pemberian clevudine 100-200 mg/hari selama 28 hari dapat menurunkan 3 log DNA VHB. Pertimbangan sebelum memutuskan pilihan obat adalah keamanan jangka panjang, efikasi dan biaya. Sampai saat ini pilihan terapi hepatitis B kronis semakin banyak, namun persoalan yang masih belum terpecahkan adalah problem resistensi obat dan tingginya angka relaps saat terapi dihentikan (Lau GK, 2005; Yuen MF, 2005; Suharjo JB, 2006).

Tabel 2.4 Penilaian respon terapi hepatitis B kronis

Respon terapi	Keterangan
1. Biokimiawi	Penurunan kadar ALT menjadi normal
2. Virologi	Kadar DNA VHB menurun / tidak terdeteksi ($<10^5$ copies/ml). HbeAg + menjadi HBeAg -
3. Histologi	Pada pemeriksaan biopsi hati, indeks aktifitas histologi menurun paling tidak 2 angka dibandingkan sebelum terapi
4. Respon komplit	Terpenuhinya kriteria : biokimiawi, virologi dan menghilangnya HBsAg

(Lok ASF, 2001; Suharjo JB, 2006)

2.7.2 Pencegahan infeksi VHB

Ada lima usaha pokok pencegahan yaitu :

1. Promosi kesehatan, usaha peningkatan mutu kesehatan
2. Proteksi spesifik, perlindungan secara khusus
3. Diagnosis dini dan pengobatan tepat,

4. Usaha membatasi cacat

5. Usaha rehabilitasi

Dalam upaya pencegahan infeksi VHB, dapat dilakukan dengan menggabungkan antara pencegahan penularan dan pencegahan penyakit. Pencegahan infeksi VHB dapat dilakukan dengan melalui tindakan promosi kesehatan baik pada hospes maupun lingkungan sekitarnya berupa pendidikan kesehatan, peningkatan higiene perorangan, perbaikan gizi, perbaikan sistem transfusi darah dan mengurangi kontak erat dengan bahan-bahan yang berpotensi menularkan VHB. Pencegahan VHB melalui lingkungan, dilakukan melalui upaya: meningkatkan perhatian terhadap kemungkinan penyebaran infeksi VHB melalui tindakan melukai seperti tindik, akupuntur, perbaikan sarana kehidupan di kota dan di desa serta pengawasan kesehatan makanan yang meliputi tempat penjualan makanan dan juru masak serta pelayan rumah makan.

Perlindungan khusus dapat dilakukan melalui sterilisasi benda-benda yang tercemar dengan pemanasan dan tindakan khusus seperti penggunaan sarung tangan bagi petugas kesehatan, petugas laboratorium yang langsung bersinggungan dengan darah, serum, cairan tubuh dari penderita hepatitis, juga pada petugas kebersihan, penggunaan pakaian khusus sewaktu kontak dengan darah dan cairan tubuh, cuci tangan sebelum dan sesudah kontak dengan penderita pada tempat khusus selain itu perlu dilakukan pemeriksaan HBsAg petugas kesehatan untuk menghindari kontak antara petugas kesehatan dengan penderita (Siregar FA, 2004).

2.7.3 Vaksinasi hepatitis B

Perlindungan khusus terhadap penularan VHB dapat melalui pemberian vaksinasi. WHO menyatakan bahwa pemberian vaksin hepatitis B tidak akan



menyembuhkan *carrier* yang kronis, tetapi diyakini 95% efektif mencegah berkembangnya penyakit menjadi *carrier*. Pada saat ini telah tersedia vaksin Hepatitis B yang imunogenik baik yang berasal dari plasma maupun yang dibuat dengan rekayasa genetika. Vaksin ini ternyata efektif untuk menimbulkan kekebalan aktif pada individu yang belum kena infeksi (*preexposure immunization*). Di negara-negara dengan prevalensi infeksi VHB sedang sampai tinggi sasaran utama imunisasi hepatitis B adalah bayi dan anak-anak kecil, sedangkan di daerah prevalensi rendah sasaran utama adalah kelompok risiko tinggi. Usaha mencegah terjadinya infeksi pada individu setelah terjadi kontak dengan VHB dengan diberikan gabungan imunisasi aktif menggunakan vaksin dan imunisasi pasif menggunakan *Hepatitis B Immunoglobulin* (HBIG) sebagai *postexposure immunization* (Jawetz,1996; Siregar FA,2004).

Secara umum program imunisasi hepatitis B bertujuan menurunkan angka kematian yang disebabkan oleh infeksi hepatitis B dan akibat lanjut darinya, dengan memberi kekebalan kepada bayi sedini mungkin. Secara khusus program imunisasi hepatitis B bertujuan :

- a. Mencegah infeksi hepatitis pada bayi, penularan vertikal akan melahirkan bayi yang menjadi pengidap dan merupakan sumber penularan, bayi-bayi tersebut akan menderita sirosis dan hepatoma di kemudian hari.
- b. Mencegah penyakit hepatitis B, apabila sudah tertular dan menjadi pengidap hepatitis B maka upaya pencegahan akan sia-sia, sehingga pencegahan harus diarahkan terhadap bayi yang baru lahir.

WHO menargetkan bahwa pada tahun 2000, masalah hepatitis B di dunia sudah dapat diatasi. Program imunisasi dasar hepatitis, adalah untuk proteksi, membentuk anti-HBs untuk mencegah penularan infeksi hepatitis B. Program

pencegahan infeksi VHB perinatal sangat sulit dilaksanakan di negara-negara sedang berkembang karena hanya sebagian kecil ibu-ibu yang memeriksakan diri serta melahirkan di rumah sakit. Terdapat kecenderungan untuk melakukan imunisasi VHB pada semua bayi baru lahir sebagai bagian dari imunisasi EPI (*Expanded Program Immunization*). Perbaikan higiene dan sanitasi akan mengurangi penularan infeksi VHB horizontal (Siregar FA,2004).

Pencegahan penyakit dapat dilakukan melalui imunisasi baik aktif maupun pasif :

1. Imunisasi Aktif

Pada negara dengan prevalensi tinggi, imunisasi diberikan pada bayi yang lahir dari ibu HBsAg positif, sedang pada negara yang prevalensi rendah imunisasi diberikan pada orang yang mempunyai resiko besar tertular. Vaksin hepatitis diberikan secara intramuskular sebanyak tiga kali dan memberikan perlindungan selama dua tahun.

2. Imunisasi Pasif

Pemberian HBIG merupakan imunisasi pasif dimana daya lindung HBIG diperkirakan dapat menetralkan virus yang infeksius dengan menggumpalkannya. HBIG dapat memberikan perlindungan terhadap *post-exposure* maupun *pre-exposure*(Jawetz,1996; Siregar FA,2004).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

VHB secara geografis mempunyai distribusi genotipe, subgenotipe dan subtipe yang berbeda. Genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB mencerminkan asal-usul migrasi nenek moyang penduduk setempat (Magnius *et al.*, 1995; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002). Genotipe maupun subtipe VHB dapat menunjukkan perbedaan dalam distribusi geografis (Kramvis *et al.*, 2005). Subtipe tersebut sepertinya selalu ada di masing-masing area geografi. Perubahan subtipe di suatu area geografi tertentu dapat terjadi sebagai suatu akibat adanya mutasi pada sekuen nukleotida tertentu pada genom VHB. Faktor mobilisasi penduduk dapat mempengaruhi perubahan subtipe dan atau genotipe VHB pada area geografi tertentu (Inoue Y *et al.*, 2000; Lusida MI *et al.*, 2001).

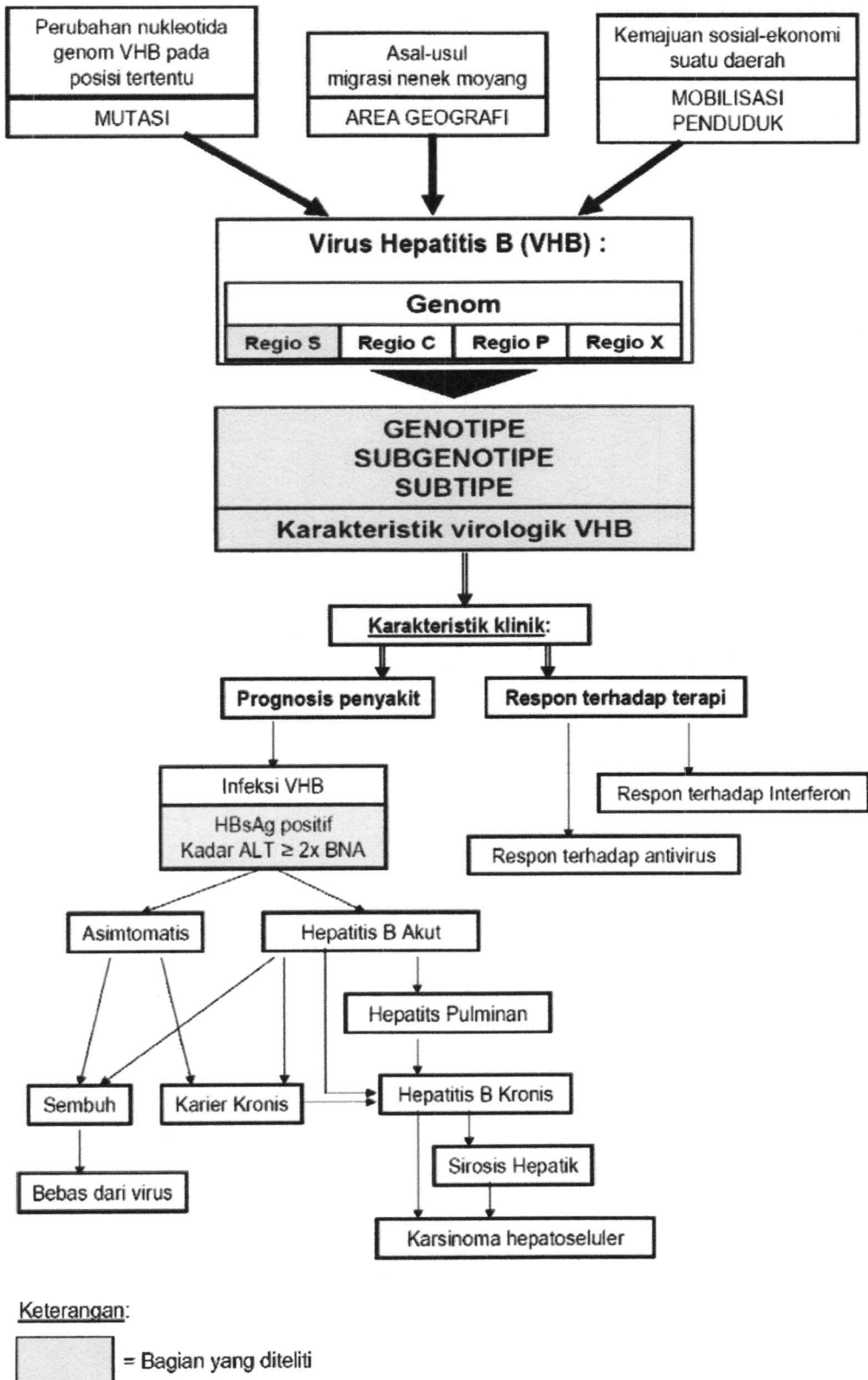
Genom VHB mempunyai empat *open reading frame* (ORF) yaitu regio S (*surface*), regio C (*core*), regio P (*polymerase*), dan regio X yang saling *overlapping* dan semuanya mengkode semua protein VHB. Klasifikasi genetik VHB berdasarkan komparasi sekuen-sekuen nukleotida genom lengkap telah dapat membagi VHB ke dalam kelompok-kelompok genomik yang kemudian dikenal dengan genotipe (Magnius *et al.*, 1995). Genotipe dan subgenotipe VHB dibedakan berdasarkan homologi pada gen regio S atau preS. Suatu Genotipe VHB dapat ditentukan berdasarkan adanya perbedaan >8 % sekuen nukleotida intergenotipe sedangkan suatu subgenotipe VHB berdasarkan perbedaan > 4% sekuen nukleotida intragenotipe (Norder H *et al.*, 2004). Gen VHB pada regio S (*surface*) mengkode *envelope* VHB yang mengandung HBsAg. Berdasarkan urutan sekuen nukleotida pada gen regio S yang mengkode asam amino dapat menunjukkan subtipe VHB melalui variasi

determinan subtipik HBsAg yang berpasangan secara eksklusif (Okamoto H *et al.*, 1986; Norder H *et al.*, 1992).

Genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB dapat memperlihatkan beberapa karakteristik virologik tertentu termasuk frekuensi terjadinya mutasi tertentu dan juga memperlihatkan karakteristik klinik tertentu, termasuk *outcome* klinis dan respon terhadap terapi. Kedua karakteristik tersebut mempengaruhi perjalanan klinis dan prognosis penyakit. Hal ini menjadi penting karena ada indikasi bahwa genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB ini berpengaruh terhadap berbagai bentuk hepatitis B kronis dan respon VHB terhadap terapi interferon (Lindh *et al.*,1997, Kao,*et al.* .2002).

Penderita yang terinfeksi VHB dapat menderita hepatitis B akut dengan menunjukkan gejala-gejala hepatitis dan sebagian lagi dapat tidak menunjukkan gejala atau asimtomatis. Penderita dengan gejala hepatitis akut dapat berkembang ke arah hepatitis B kronis, karier kronis, hepatitis fulminan maupun penderita menjadi sembuh. Penderita dengan infeksi VHB kronis dan karier kronis dapat berkembang ke arah sirosis hepatis maupun karsinoma hepatoseluler (Guan R *et al.*,2001).

Data-data mengenai genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB yang ada di Mengwi, Bali sampai saat ini belum ada sehingga diperlukan dilakukan penelitian ini untuk mendapatkan data tersebut.



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual Penelitian

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional deskriptif dengan rancangan penelitian studi eksploratif.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Target populasi penelitian adalah pasien dengan gejala penyakit hepatitis di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali

4.2.2 Subyek dan Sampel Penelitian

Subyek penelitian adalah pasien yang datang berobat ke Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali dan ditemukan mempunyai gejala penyakit hepatitis selama periode pengambilan sampel, berdomisili di sekitar wilayah Kecamatan Mengwi, serta bersedia ikut penelitian dengan menandatangani lembar persetujuan mengikuti penelitian (*inform consent*) dan lembar persetujuan tindakan medik. Sampel penelitian adalah serum yang diperoleh dari subyek penelitian

Kriteria eksklusi subyek penelitian adalah pasien yang datang berobat ke Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali dan ditemukan mempunyai gejala penyakit hepatitis selama periode pengambilan sampel, namun menolak bersedia ikut penelitian dan menolak menandatangani lembar persetujuan

mengikuti penelitian serta berdomisili tidak di wilayah Kecamatan Mengwi.

Sampel penelitian adalah serum yang diperoleh dari subyek penelitian.

4.2.3 Besar Sampel

Besar sampel ditentukan dengan cara perkiraan besar sampel menggunakan rumus sampel tunggal untuk uji hipotesis proporsi suatu populasi (Madiyono B, 1995) sebagai berikut:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} \sqrt{P_0 Q_0} + Z_{\beta} \sqrt{P_a Q_a})^2}{(P_a - P_0)^2}$$

Keterangan :

n	=	Besar sampel yang diperlukan	
P ₀	=	Proporsi pada penelitian pendahuluan	(0,147)
P _a	=	Proporsi sekarang yang diharapkan	(0,300)
Q ₀	=	1-P ₀	(0,853)
Q _a	=	1-P _a	(0,700)
Z _{α/2}	=	1,96 (α = 0,05)	
Z _β	=	1,28 (β = 0,10)	

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah sampel yang diperlukan sebanyak paling sedikit 70 sampel serum dari pasien dengan gejala penyakit hepatitis yang memenuhi kriteria inklusi subyek penelitian selama periode pengambilan sampel.

4.2.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel menggunakan salah satu teknik *non-random sampling* yaitu *quota sampling*. Pengambilan sampel akan dihentikan bila telah melewati periode pengumpulan sampel dan jumlah sampel sudah mencapai paling sedikit 70 sampel.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah: pasien dengan gejala penyakit hepatitis, prosedur penelitian meliputi pemeriksaan kadar ALT, pemeriksaan titer HBsAg, hasil PCR positif VHB, serta karakteristik virologik VHB yaitu genom regio S, genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB.

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

1. Pasien dengan gejala penyakit hepatitis adalah orang yang datang memeriksakan diri ke Puskesmas Mengwi I dan setelah diperiksa oleh dokter puskesmas didapatkan dengan dua gejala atau lebih keluhan dan atau tanda berupa :
 - a) Penderita dengan gejala *icterus jaundice*, yaitu : warna kuning pada sklera, konjungtiva mata atau pada kulit tubuh dan bukan bayi baru lahir
 - b) Penderita dengan demam (suhu tubuh $> 37^{\circ}\text{C}$) tanpa penyebab yang jelas, dan tidak disertai gejala ikutan lain.
 - c) Penderita dengan keluhan sering merasa lemah, letih, lesu dan tidak memiliki selera makan tanpa penyebab yang jelas
 - d) Penderita dengan keluhan sering mual-muntah tanpa penyebab yang jelas.

- e) Penderita sering mengeluh nyeri dan rasa tidak enak di perut kanan atas (regio hepar/hati) tanpa riwayat trauma sebelumnya.
 - f) Penderita mengeluh terjadi pembesaran di daerah perut kanan atas (regio hepar/hati) tanpa riwayat trauma, tumor, kanker sebelumnya.
 - g) Penderita dengan riwayat pernah atau sedang menderita penyakit hepatitis B dan atau penyakit hati kronis sebelumnya.
2. Kadar ALT/SGPT adalah hasil pemeriksaan penentuan kadar enzim *Alanine transaminase (ALT)/Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT)* pada serum dengan menggunakan kit komersial ALT (IFCC mod, Diasys, Germany, Cat.no.2 5010 99 10 030) sesuai dengan prosedur dalam kit tersebut dimana kadar normal ALT adalah <41 U/liter untuk laki-laki dan < 31 U/liter untuk perempuan pada suhu ruang.
 3. HBsAg Positif adalah hasil pemeriksaan *surface* antigen VHB pada serum dengan menggunakan metode pemeriksaan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* secara kuantitatif dengan menggunakan kit komersial dari *Axiom Diagnostic (Cat.no.88 03 18)* dengan pembacaan dan perhitungan *cut-off* sesuai dengan prosedur dalam kit, dimana sampel positif jika hasil bacaan lebih besar dari pada nilai *cut-off*.
 4. Pasien dengan infeksi VHB adalah pasien yang setelah diperiksa HBsAg pada serumnya menunjukkan hasil yang positif.
 5. Hasil *polymerase chain reactions (PCR)* positif VHB adalah apabila dari hasil ekstraksi DNA VHB yang di amplifikasi pada regio S menggunakan set *primer* spesifik untuk menentukan subgenotipe dan subtype VHB dengan menggunakan metode PCR dapat dihasilkan DNA yang diharapkan (541 bp), dimana pada visualisasi dengan proses elektroporesis dan pada ultra

violet (UV) transiluminator tampak pita berwarna putih pada ukuran *base pair* yang diharapkan.

6. Genotipe VHB adalah pengklasifikasian terhadap VHB berdasarkan hasil analisis nukleotida VHB dengan standar VHB yang telah diketahui genotipenya yang diperoleh dari *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* dan *NCBI GenBank Database* berdasarkan sebagian gen S VHB, menggunakan program komputer *Genetyx for Windows version 9.0*.
7. Subgenotipe VHB adalah pengklasifikasian terhadap VHB berdasarkan hasil analisis nukleotida VHB dengan standar VHB yang telah diketahui subgenotipenya yang diperoleh dari *DNA Data Bank of Japan (DDBJ)* dan *NCBI GenBank Database* berdasarkan sebagian gen S VHB, menggunakan program komputer *Genetyx for Windows version 9.0*.
8. Subtipe VHB adalah pengklasifikasian VHB berdasarkan hasil analisis asam amino pada posisi 122, 127, 134, 159, 160 dan 177 pada gen S VHB, menggunakan program komputer.

4.4. Bahan penelitian

4.4.1 Pengambilan spesimen darah

1. *Disposable syringe 5 ml steril*
2. *Alkohol swab*
3. *Latex Handschoen*
4. *Masker*
5. Lembar informasi penelitian
6. Pernyataan persetujuan dari pasien
7. Lembar identitas pasien

4.4.2 Pengambilan serum

1. Tabung *centrifuge* 15 ml steril
2. *Yellow tips* steril
3. Tabung *ependorf* 1,5 ml steril

4.4.3 Pengiriman serum

Dry ice dan *Ice pack* secukupnya

4.4.4 Pemeriksaan ALT

Kit komersial ALT(SGPT)

(IFCC mod, Diasys, Germany, Cat.no.2 5010 99 10 030)

4.4.5 Pengukuran titer HBsAg dengan ELISA

Kit komersial HBsAg metode ELISA, *Axiom Diagnostic*, Cat.no.88 03 18

4.4.6 Ekstraksi DNA VHB

Kit komersial QIAamp DNA Mini kit (*Qiagen, Inc.* Cat.no.51304)

4.4.7. Amplifikasi DNA dengan PCR

1. *Master mix* reagen : 12,5 µl (Fermentas)
2. *Primer (first-round)*
 - a. P7 (5'-GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC-3')
25 pmol/µl 1 µl dari gen S pada posisi 256-278
 - b. P8 (5'-CGG TAW^[A/T] AAA GGG ACT CAM^[A/C] GAT-3')

25 pmol/µl 1 µl dari gen S pada posisi 796-776
3. *Primer (second-round)*, bila *first round* negatif
 - a. HBS1 (5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3')

25 pmol/µl 1 µl dari gen S pada posisi 455-474

 - b. HBS2 (5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACTG A-3')

25 pmol/µl 1 µl dari gen S pada posisi 713-694

4. Sampel DNA 9,5 μ l
5. *Distilled water* (DW) sampai campuran 25 μ l
6. *Yellow tips* steril

Tabel 4.1 *Oligonucleotide primers* yang digunakan pada amplifikasi PCR *first round* dan *second round*

<i>Primer</i>	<i>Regio (posisi)</i>	<i>Polaritas</i>	<i>Sekuen nukleotida</i>
P7	S (256 to 278)	Sense	5'-GTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC-3'
P8	S (796 to 776)	Antisense	5'-CGGTAWAAAGGGACTCAMGAT-3'
HBS1	S (455 to 474)	Sense	5'-CAAGGTATGTTGCCCGTTTG-3'
HBS2	S (713 to 694)	Antisense	5'-AAAGCCCTGCGAACCCTGA-3'

(Lindh M *et al.*,1997; Lusida MI *et al.*,2008)

4.4.8 Deteksi produk PCR dengan elektroforesis

1. Tabung *ependorf* 1,5 ml steril
2. Produk PCR 7 μ l
3. Gel agarose 2% (agarose S) dengan etidium bromide (EB)
4. TBE *buffer* 1x
5. 10x *Loading buffer* 2 μ l
6. *Marker* 100bp DNA *Leader* (Fermentas) 10 μ l
7. Parafilm
8. *Yellow tips* steril

4.4.9 Isolasi DNA dengan *low melting agarose*

1. Produk PCR 18 μ l
2. *Low melting agarose* (agarose L) dengan etidium bromide (EB)
3. TBE *buffer* 1x
4. 10x *Loading buffer* 2 μ l
5. *Marker* 100bp DNA *Leader* (Fermentas) 10 μ l

6. Parafilm
7. *Yellow tips* steril
8. Kit komersial QIAGEN *Gel extraction (Qiagen, Inc. Cat.no.28704)*

4.4.10 Labeling sequencing DNA

1. DNA 5 μ l
2. *Primer sense* atau *antisense* 4 pmol/ μ l 1,5 μ l dengan 1 *primer* yang telah memberikan hasil PCR positif
3. *Ready reaction mixture (Big Dye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle sequencing Kit, Applied Biosystems, USA)* 2 μ l
4. *Buffer Big Dye 5x* 7 μ l
5. *Distilled water* 4,5 μ l
6. *Yellow tips* steril
7. Tabung *ependorf* 1,5 ml
8. Tabung *ependorf* 0,5 ml

4.4.11 Purifikasi sequencing DNA dengan etanol presipitasi

1. Etanol absolut 50 μ l
2. Etanol 70% 100 μ l
3. *Yellow tips* steril
4. Tabung *ependorf* 1,5 ml steril
5. *Warp* plastik
6. Sodium asetat # M (pH 5,2) 2,5 μ l
7. HiDi Formaldehyde 25 μ l

4.4.12 Sequencing DNA

1. Pelet DNA dengan *Template Suppresion Reagent (TSR)* 25 μ l
2. *Yellow tips* steril

3. *Microtube* steril

4.5 Instrumen Penelitian

1. *Micropipet* 20 μ l, 200 μ l dan 1000 μ l
2. Mesin sentrifus *High Speed Micro Refrigerator Centrifuge* MRX150(Tomy)
3. Rak tabung *eppendorf*
4. Kulkas
5. *Ice box*
6. *Autoclave*
7. *Hot air oven*
8. *Block incubator*
9. *Freezer : Ultra Flow* (-80°C dan -20 °C), Sanyo
10. *Microsentrifuge* : Milipore
11. *Vortex* : Genie-2
12. *Biosafety Cabinet : Bio Clean Bench* MCV-16BSF (Sanyo)
13. *Thermal Cyclers*
14. Mesin *electrophoresis*
15. *Transilluminator* UVP Mariya RB67 Pro SD dengan kamera polaroid
16. *Cutter*
17. Pinset
18. *Vacuum Pump*
19. *Timer*
20. ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer)
21. Komputer dengan perangkat lunak *Genetyx for windows* versi 9.0 dan dilengkapi fasilitas internet

4.6 Lokasi penelitian dan waktu penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Pengambilan spesimen serum penderita dilaksanakan di Puskesmas Mengwi I, Kabupaten Badung, Bali. Puskesmas Mengwi I adalah Puskesmas terbesar yang ada di Mengwi dan terletak di pusat Kecamatan Mengwi. Puskesmas Mengwi I merupakan Puskesmas rujukan dari beberapa Puskesmas dan Puskesmas pembantu yang ada di Kecamatan Mengwi. Puskesmas ini juga dilengkapi dengan fasilitas rawat inap dan UGD 24 jam. Pemeriksaan spesimen serum dilakukan di Laboratorium Hepatitis, *Institute Of Tropical Disease (ITD)*, Universitas Airlangga, Surabaya.

4.6.2 Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan sejak proposal penelitian ini dinyatakan diterima dan berakhir direncanakan empat bulan setelahnya.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeriksaan ALT

Kadar ALT diperiksa dengan menggunakan Kit komersial ALT(SGPT) (IFCC mod, Diasys, Germany, Cat.no.2 5010 99 10 030) dengan prosedur kerja sesuai dengan petunjuk pada kit.

4.7.2 Pengukuran titer HBsAg dengan ELISA

Pengukuran titer HBsAg dilakukan dengan Kit komersial HBsAg metode ELISA, *Axiom Diagnostic*, Cat.no.88 03 18 dengan prosedur kerja sesuai dengan petunjuk pada kit.

4.7.3 Ekstraksi DNA

DNA dari serum sampel diekstraksi menggunakan kit komersial QIAamp DNA mini kit (*Qiagen, Inc*) dengan prosedur kerja sesuai dengan petunjuk pada kit.

4.7.4 Amplifikasi DNA dengan PCR (*first round*)

Reaction mixture disiapkan dengan volume total 25 μ l dibuat dalam sebuah tabung *microcentrifuge* steril dengan komposisi : *Master mix* 12,5 μ l, *Primer P7* 25 pmol/ μ l 1 μ l, *Primer P8* 25 pmol/ μ l 1 μ l, DW 1 μ l, dan DNA 9,5 μ l. Campuran tadi dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* dan program file pada mesin dijalankan. PCR *first round* ini dilakukan sebanyak 40 siklus dimana setiap siklus terdiri dari tahapan: *denaturation* selama 1 menit pada temperatur 94°C, *annealing* selama 1 menit pada temperatur 55°C dan *extension* selama 2 menit pada temperatur 72°C.

4.7.5 Amplifikasi DNA dengan PCR (*second round*)

Apabila amplifikasi PCR *first round* hasilnya negatif, maka kemudian dilakukan PCR *second round* dengan menggunakan *primer HBS1* dan *HBS2* dengan kondisi yang sama seperti PCR *first round*.

4.7.6 Deteksi produk PCR dengan elektroforesis

Gel agarose 2% dibuat sebelumnya yang telah mengandung *ethidium bromide* dan kemudian diletakkan dalam elektroforesis gel *apparatus* dan ditambahkan TBE *buffer* 1x hingga gel terendam seluruhnya. *Marker* sebanyak 10 μ l dicampur secara *gently pipetting* dengan 10x *loading buffer* sebanyak 2 μ l yang telah diteteskan di atas parafilm. Produk PCR *first round* sebanyak 7 μ l diambil dan dicampur secara *gently pipetting*

dengan 10x *loading buffer* sebanyak 2 μ l yang telah ditetaskan di atas parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam *slot* gel. Elektroforesis gel *apparatus* ditutup dan dijalankan dengan 100 volt selama kurang lebih 30 menit, selanjutnya dilihat di bawah sinar ultra violet *short wave*. Kemudian hasil yang tampak didokumentasikan dengan kamera polaroid.

4.7.7 Isolasi DNA dengan *low melting agarose*

DNA yang tampak pada elektroforesis dengan gel agarose biasa kemudian diulang lagi dengan menggunakan gel agarose *low melting*. Gel agarose menggunakan agarose L (*low melting agarose*) 2% disiapkan, kemudian dibuat campuran DNA 18 μ l dan 10x *loading buffer* 2 μ l. Campuran ini diaplikasikan pada *slot* gel dengan interval tanpa menggunakan *marker* dan selanjutnya mesin elektroforesis dijalankan. Hasil elektroforesis dilihat dengan sinar ultra violet *long wave*. Gel yang mengandung DNA dipotong dengan *cutter* yang dicuci setiap kali pemotongan. Potongan gel dimasukkan dengan pinset ke dalam sebuah tabung *eppendorf* 1,5 μ l steril. Kemudian dikerjakan isolasi DNA hasil PCR dari *low melting agarose* menggunakan kit komersial QIAamp DNA Mini kit (*Qiagen, Inc*) dengan prosedur kerja sesuai dengan prosedur yang terdapat pada kit.

4.7.8 Labeling dengan PCR untuk *sequencing*

Labeling dengan PCR untuk *sequencing* menggunakan *Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (ABI Prism Big Dye Terminator v1.1, *Applied Biosystems*). *Sequencing reaction* dengan volume total 20 μ l dibuat dalam sebuah tabung *microcentrifuge* steril dengan komposisi: DNA hasil PCR 5 μ l, *primer sense* atau *antisense* 4 pmol/ μ l untuk VHB : 1,5 μ l (*primer P7*), *Ready reaction mixture Big Dye Terminator* 2 μ l, *Buffer Big*

Dye 7 μ l, DW 4,5 μ l yang dicampur dengan *gently pipetting*. Selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* yang telah diatur hingga temperatur 94°C selama 3 menit. PCR dilakukan sebanyak 25 siklus. Setiap siklus terdiri dari tahapan : *denaturation* : selama 10 detik pada temperatur 96°C, *annealing* selama 5 detik pada temperatur 50°C, *extension* selama 4 menit pada temperatur 60°C. Setelah siklus selesai, didinginkan hingga temperatur 4°C.

4.7.9 Purifikasi hasil *labeling* DNA dengan presipitasi etanol

Tabung berisi 20 μ l *sequencing reaction* dikeluarkan dari *thermal cycler* dan diputar-putar sebentar, selanjutnya diaspirasi dan dipindahkan ke dalam sebuah tabung *ependorf* 1,5 ml steril. Kemudian sodium asetat sebanyak 2,5 μ l dan etanol absolut sebanyak 50 μ l ditambahkan ke dalam tabung, selanjutnya dicampur dengan cara tabung disentil-sentil. Campuran diinkubasi pada temperatur ruangan selama 5 menit. Kemudian disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 6°C. Supernatan yang ada diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer. Kemudian Etanol 70% sebanyak 100 μ l ditambahkan ke dalam tabung. Disentrifus kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 7 menit pada temperatur 6°C. Supernatan yang ada diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer tabung telah berisi pelet DNA dalam keadaan terbuka dibungkus dengan *wrap* plastik dan dikeringkan dengan menggunakan *vacuum pump* selama 15 menit. Setelah itu pelet DNA kering dapat disimpan pada temperatur 4°C setelah ditutup rapat dengan kertas aluminium.

4.7.10 Sequencing DNA

Sequencing DNA menggunakan mesin ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer). Sebelumnya disiapkan campuran DNA sebelum di *sequencing*. HiDi *formaldehyde* sebanyak 25 μ l ditambahkan pada tabung yang berisi pelet DNA kering. Di-*Vortex* dan selanjutnya diinkubasi pada temperatur 95°C selama 2 menit. Kemudian diinkubasi dalam es selama kurang lebih 3 menit dan selanjutnya di-*spin down*. Tabung tetap disimpan dalam es sampai siap dianalisis, selanjutnya diaspirasi dan dipindahkan ke dalam sebuah *microtube* steril khusus untuk *sequencing*. Kemudian tabung dimasukkan ke mesin dan dijalankan pada mesin ABI Prism 310 *Genetic Analyzer*.

4.7.11 Analisis filogenetik

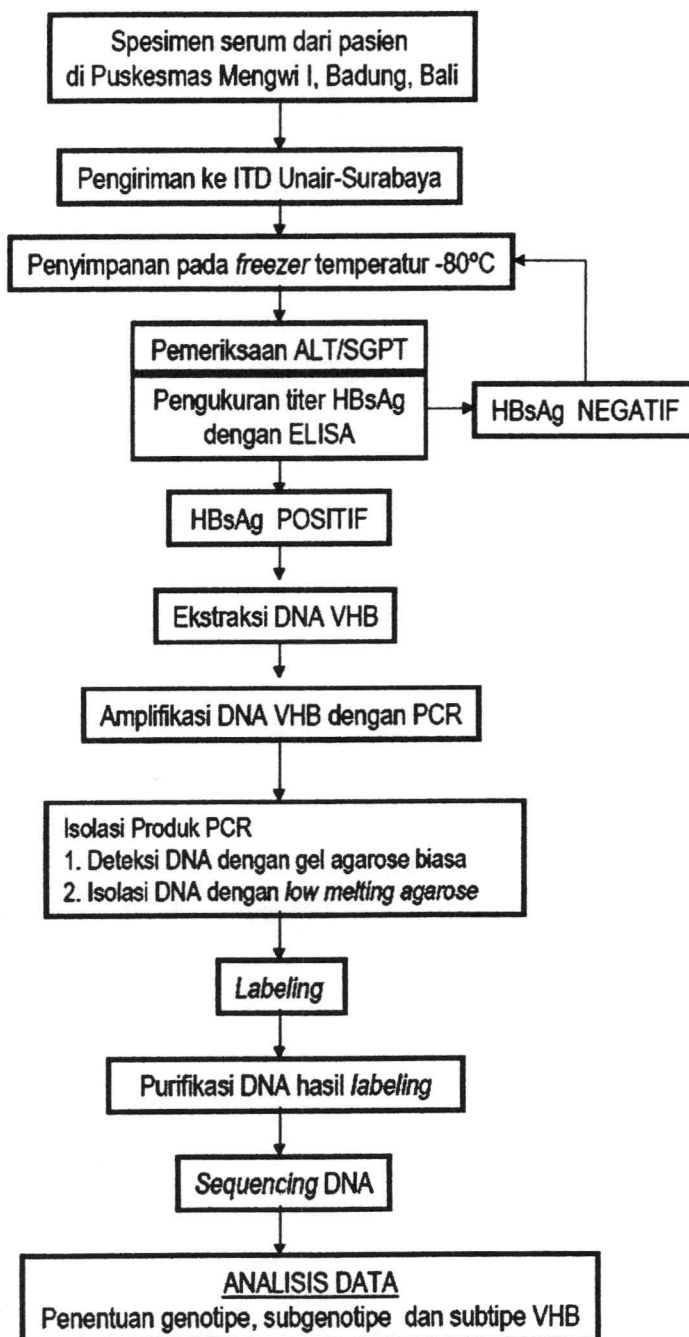
Hasil sekuens nukleotida spesimen dibandingkan dengan sekuens nukleotida yang diperoleh dari bank data DNA internasional (DDBJ, NCBI *GenBank*) yang diunduh dari internet. Genotipe VHB ditentukan berdasarkan persentase homologi lebih dari 96% pada level gen regio S. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA) *clustering* menggunakan program komputer *Genetyx for windows* versi 9.0. Penentuan subgenotipe virus hepatitis B diperoleh dari analisis filogenetik diatas.

4.7.12 Analisis subtipe VHB

Hasil sekuens nukleotida spesimen diterjemahkan ke dalam urutan asam aminonya kemudian dilakukan *multiple alignment*, dan dianalisis urutan kodon tertentu. Subtipe VHB spesimen ditentukan berdasarkan hasil

analisis asam amino spesimen pada posisi 122, 127, 134, 159, 160 dan 177 pada gen S VHB, menggunakan program komputer.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5**ANALISIS HASIL PENELITIAN****5.1 Distribusi Sampel**

Dalam penelitian ini telah dikumpulkan sebanyak 75 sampel serum dari pasien yang datang ke Puskesmas Mengwi I dengan keluhan gejala penyakit hepatitis dan semua sampel bertempat tinggal atau berdomisili di sekitar wilayah Kecamatan Mengwi. Karakteristik penderita sebagai sampel dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.1 Karakteristik sampel penelitian berdasarkan umur dan jenis kelamin

Umur	Jenis Kelamin		Jumlah
	Laki-laki	Perempuan	
0-10 tahun	0	0	0
11-20 tahun	8	7	15
21-30 tahun	14	13	27
31-40 tahun	11	5	16
41-50 tahun	6	1	7
51-60 tahun	3	2	5
61-70 tahun	1	3	4
>70 tahun	2	0	2
Jumlah	45/75 (60%)	30/75 (40%)	75/75 (100%)

Sampel pada penelitian ini lebih banyak pada jenis kelamin pria yaitu sebanyak 45 dari 75 pasien (60%) dibandingkan dengan perempuan yaitu sebesar 30 dari 75 pasien (40%). Dari karakteristik umur semua sampel paling banyak sampel berasal dari kisaran umur 21-30 tahun yaitu 27 dari 75 pasien (36%), demikian juga pada jenis kelamin laki-laki maupun perempuan dimana masing-masing ditemukan usia pasien terbanyak dari usia 21-30 tahun, yaitu pada laki-laki sebanyak 14 dari 45

pasien (31%) dan pada perempuan sebanyak 13 dari 30 pasien (43%).

Sebanyak 75 pasien yang datang ke Puskesmas Mengwi I dengan keluhan gejala penyakit hepatitis dan ikut serta sebagai subyek penelitian, dapat dijabarkan gejala-gejala hepatitis yang diderita pasien, yaitu dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Frekuensi gejala-gejala hepatitis yang diderita pasien subyek penelitian

Gejala	Frekuensi	Persentase
<i>Icterus Jaundice</i>	5	5/75 (6,7%)
Demam	65	65/75 (86,7%)
Lemah, letih, lesu	38	38/75 (50,6%)
Mual-muntah	38	38/75 (50,6%)
Nyeri/tidak enak di perut kanan atas	9	9/75 (12,0%)
Pembengkakan di perut kanan atas	0	0/75 (0%)
Sedang/pernah menderita hepatitis	2	2/75 (2,7%)

Dari tabel 5.2 didapatkan gejala hepatitis yang paling banyak diderita pasien adalah gejala demam yaitu diderita sebanyak 65 dari 75 pasien (86,7%), diikuti oleh gejala lemah, letih, lesu dan mual-muntah yaitu masing-masing sebanyak 38 dari 75 pasien (50,6%). Sedangkan gejala pembengkakan di daerah perut kanan atas tidak ada diderita oleh pasien.

5.2 Hasil Pemeriksaan ALT/SGPT

Sampel serum yang didapatkan dari darah penderita kemudian sampel serum ini dibagi tiga bagian untuk dilakukan tiga pemeriksaan yaitu pemeriksaan ALT, pemeriksaan HBsAg dan pemeriksaan PCR. Pemeriksaan ALT dilakukan dengan menggunakan kit komersial (Diasys,Germany). Hasil pemeriksaan ALT dari serum sampel dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.3 Hasil pemeriksaan ALT dari pasien

Jenis Kelamin	< 2x BNA*	≥ 2x BNA	Jumlah
Laki-laki	43	2	45
Perempuan	30	0	30
Jumlah	73/75 (97,3%)	2/75 (2,7%)	75/75 (100%)

*BNA : Batas Normal Atas (Diasys, Germany)

laki-laki = < 41 U/l

perempuan = < 31 U/l

Dari pemeriksaan ALT didapatkan hanya 2 orang dari 75 sampel (2,7%) mengalami kenaikan kadar ALT melebihi dari dua kali batas normal atas dan sebagian besar yaitu 73 dari 75 sampel (97,3%) memiliki kadar ALT berada di bawah BNA.

5.3 Hasil pemeriksaan Virus Hepatitis B (VHB)

5.3.1 Hasil Pemeriksaan HBsAg

Semua sampel yang dikumpulkan kemudian dilakukan pemeriksaan serologis HBsAg dengan menggunakan metode ELISA. Dari hasil pemeriksaan HBsAg dengan metode ELISA didapatkan hasil seperti pada tabel berikut :

Tabel 5.4 Hasil pemeriksaan HBsAg berdasarkan jenis kelamin

Jenis Kelamin	HBsAg positif	HBsAg negatif	Jumlah
Laki-laki	10	35	45
Perempuan	1	29	30
Jumlah	11/75 (14,7%)	64/75(85,3%)	75/75 (100%)

Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar HBsAg didapatkan hanya 11 dari 75 sampel (14,7%) dengan kadar HBsAg positif. Dari 11 sampel tersebut satu orang berjenis kelamin perempuan (9,1%), dan sebagian besar HBsAg positif dari sampel ditemukan pada laki-laki yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%).

Tabel 5.5 Karakteristik subyek penelitian berdasarkan suku bangsa dan hasil pemeriksaan HBsAg

Hasil pemeriksaan HBsAg	Suku Bangsa			Jumlah
	Bali	Non-Bali	Warga Negara Asing	
HBsAg (+)	9	2	0	11
HBsAg (-)	57	7	0	64
Jumlah	66/75 (88%)	9/75 (12%)	0/75 (0%)	75/75 (100%)

Pada tabel 5.5 menunjukkan sebanyak 11 dari 75 sampel dengan HBsAg positif (14,7%) dan 64 dari 75 sampel (85,3%) dengan HBsAg negatif. Sebagian besar sampel penelitian merupakan penduduk dengan suku Bali yaitu sebesar 88%, sedangkan lainnya merupakan suku non-Bali yaitu sembilan pasien dari 75 sampel (12%) serta tidak ada sampel penelitian merupakan warga negara asing. Kecamatan Mengwi beberapa tahun belakangan berkembang cukup pesat termasuk dinamika dan mobilisasi penduduknya sehingga berbagai suku bangsa dapat tinggal dan menjalani kehidupannya di Mengwi, dengan demikian pasien-pasien yang datang berobat ke Puskesmas Mengwi I dapat dari berbagai suku.

Tabel 5.6 Hasil pemeriksaan HBsAg dan kadar ALT

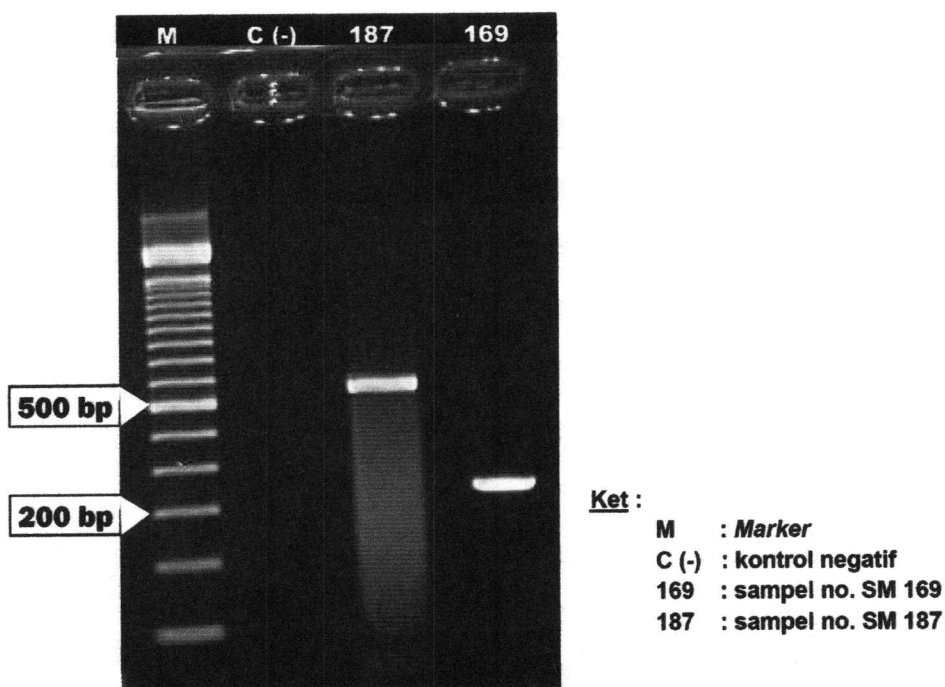
Kadar ALT	HBsAg positif	HBsAg negatif	Jumlah
> 2 kali BNA	2	0	2
≤ 2 kali BNA (Normal)	9	64	73
Jumlah	11/75 (14,7%)	64/75 (85,3%)	75/75 (100%)

Sampel dengan HBsAg positif yaitu sebanyak 11 dari 75 sampel (14,7%) memiliki rata-rata titer sebesar 2,490 dimana *cut off point* titernya adalah sebesar 0,105. Dari semua sampel dengan HBsAg positif ditemukan diantaranya dua sampel mempunyai kadar ALT lebih dari dua kali BNA.

5.3.2 Hasil Pemeriksaan PCR VHB

Sampel dengan HBsAg positif sebanyak 11 orang kemudian dilakukan tahapan-tahapan identifikasi genotipe virus hepatitis B, dimulai dari tahap ekstraksi DNA, amplifikasi dengan PCR, deteksi DNA dengan elektroforesis, isolasi DNA dengan *low melting agarose*, *labeling*, presipitasi etanol, *sequencing* sampai dengan analisis genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB dengan menggunakan program *Genetyx for Windows* versi 9.0 dan membandingkannya dengan *database* di *Genbank* NCBI dan DDBJ.

Pada tahapan identifikasi DNA VHB dengan PCR menggunakan *primer-primer* spesifik dan dilakukan elektroforesis dengan gel agarose 2% memberikan hasil gambaran dibawah sinar UV *short wave* dengan hasil sebagai berikut (digambarkan pada laporan ini hanya beberapa contoh sampel saja) :



Gambar 5.1 Contoh elektroforesis hasil PCR sampel Puskesmas Mengwi I
 Elektroforesis hasil PCR sampel SM 187 dengan *primer* P7-P8 regio S tampak pita di atas 500 bp dan pada sampel SM 169 dengan *primer* HBS1 dan HBS2 regio S tampak pita di atas 200 bp.

Pada gambar 5.1 menunjukkan hasil elektroforesis produk PCR sampel SM 187 dengan pasangan *primer* spesifik P7-P8 regio S tampak pita pada posisi yang diharapkan pada kisaran 541 bp yang artinya menunjukkan hasil yang positif, sedangkan sampel SM 169 dengan pasangan *primer* spesifik HBS1-HBS2 regio S tampak pita pada posisi yang diharapkan pada kisaran 259 bp yang artinya menunjukkan hasil yang positif. Sampel SM 169 mulanya diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang *primer* spesifik P7 dan P8 regio S (*first round*), pada hasil elektroforesis tidak tampak pita yang diharapkan pada kisaran 541 bp. Kemudian dilakukan amplifikasi DNA ulang dari PCR *first round* dengan PCR menggunakan *primer* yang berbeda yaitu sepasang *primer* spesifik HBS1 dan HBS2 pada regio S (*second round*).

Semua sampel dengan HBsAg positif dilakukan amplifikasi dengan PCR baik *first round* maupun *second round* mendapatkan hasil seperti yang tampak pada tabel di bawah :

Tabel 5.7 Nomor sampel yang menunjukkan hasil positif PCR sesuai dengan *primer* yang digunakan pada regio S

	PCR positif dengan <i>Primer</i> P7-P8	PCR positif dengan <i>Primer</i> HBS1-HBS2
Nomor Sampel	SM 187 SM 228 SM 230 SM 231 SM 232 SM 233 SM 234 SM 235	SM 169 SM 214 SM 236
Jumlah	8/11 (72,7 %)	3/11 (27,3%)

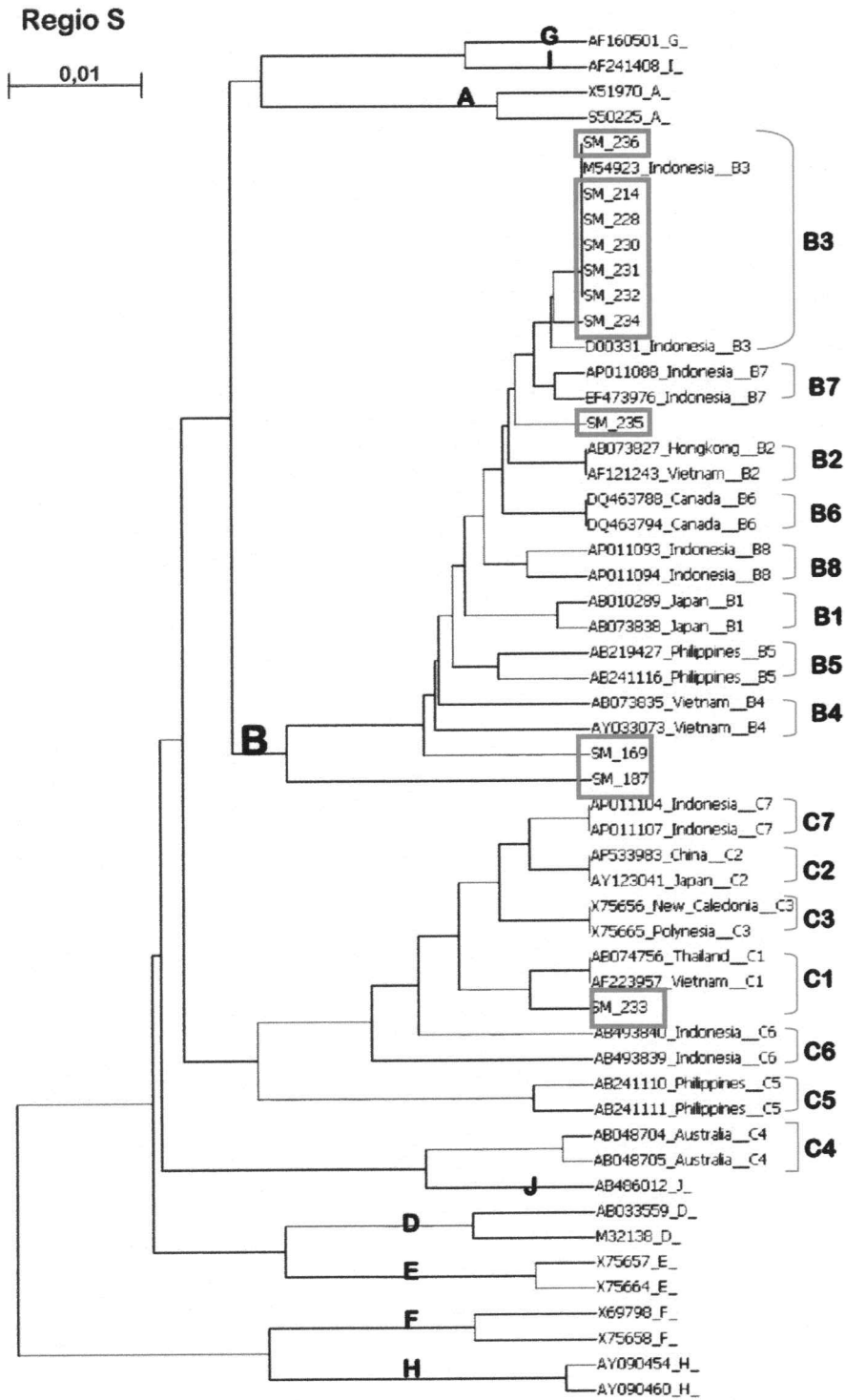
Dari 11 sampel yang positif HBsAg setelah dilakukan pemeriksaan dengan PCR ditemukan 11 sampel (100%) dapat diidentifikasi dengan PCR, yang terdiri dari

delapan sampel yang positif dengan PCR menggunakan pasangan *primer* P7-P8 dengan amplifikasi 541 bp dan tiga sampel yang positif dengan PCR menggunakan *primer* HBS1-HBS2 dengan hasil amplifikasi 259 bp dari gen S. Sebagian besar yaitu 8 dari 11 sampel (72,7%) dapat dideteksi dengan PCR menggunakan pasangan *primer* P7-P8 (*first round*), sedangkan sisanya didapatkan 3 dari 11 sampel (27,3%) yang dapat dideteksi dengan pasangan *primer* HBS1-HBS2 (*second round*).

5.3.3 Hasil *sequencing* dan analisis filogenetik VHB

Proses *sequencing* dilakukan kemudian setelah PCR memberikan hasil positif. DNA sampel hasil PCR kemudian dilakukan persiapan untuk *sequencing* yaitu mulai dari isolasi DNA dengan *low melting agarose*, *labeling*, purifikasi etanol dan sodium asetat, kemudian di-*sequencing*. Hasil *sequencing* masing-masing sampel kemudian diolah dan dianalisis dengan menggunakan program komputer *Genetyx for Windows* versi 9.0 dengan membandingkan terhadap sekuen VHB yang sudah dipublikasikan, yang diambil dari *database* NCBI *Genbank* dan DDBJ yang diunduh dari internet.

Pohon filogenetik dapat dibuat dengan program komputer *Genetyx for Windows* versi 9.0 yang dapat menunjukkan pola genotipe dan subgenotipe dari sampel pasien di Puskesmas Mengwi I dan dari bank data DNA internasional (DDBJ/*GenBank*). 11 isolat VHB dari sampel dan 43 isolat VHB dari bank data DNA internasional dianalisis secara filogenetik menggunakan *unweighted pair-group method using arithmetic averages* (UPGMA). Analisis filogenetik dapat dilihat pada gambar di bawah:



Gambar 5.2 Pohon filogenetik (dendrogram) genotipe dan subgenotipe VHB berdasarkan sekuen 211 nukleotida posisi 494-704 sebagian gen regio S

Ket: Kode SM pada kotak merah menunjukkan isolat VHB dari sampel Puskesmas Mengwi I.

Analisis filogenetik dari sampel dan *database* internasional berdasarkan sekuen sebagian genom VHB regio gen S yang dapat dilihat dari dendogram pada gambar 5.2. Cabang-cabang genotipe pada huruf bagian kiri yang dicetak tebal. Dendogram pada gambar 5.2 juga menunjukkan cabang-cabang subgenotipe VHB dari sampel penelitian. Subgenotipe VHB semua sampel ditulis dengan cetak tebal di sebelah kanan nomor sampel.

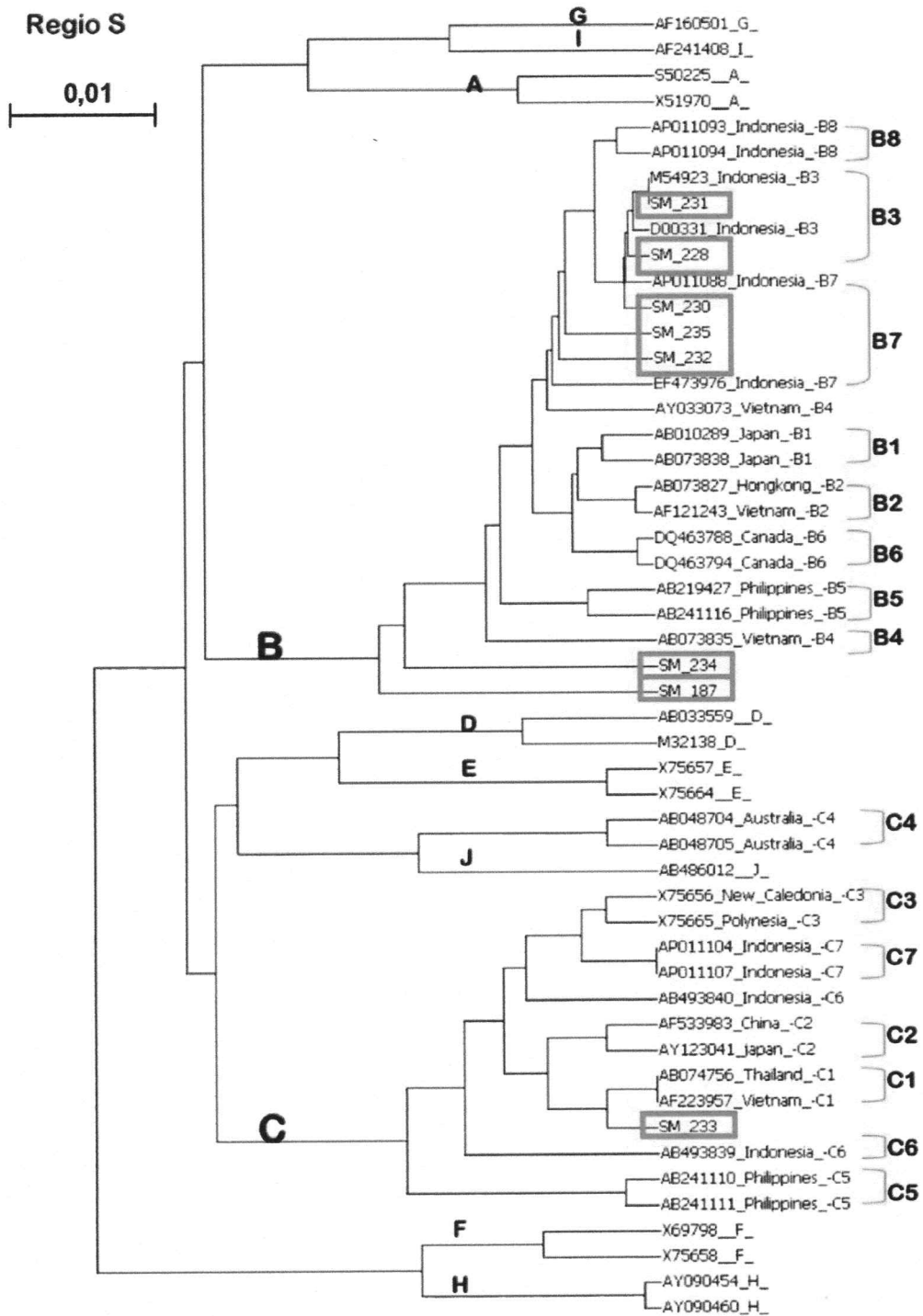
Tabel 5.8 Distribusi nomor sampel berdasarkan genotipe dan subgenotipenya dari sekuen 211 nukleotida posisi 494-704 sebagian gen regio S VHB

Subgenotipe	Genotipe B		Genotipe C
	B3	Belum dapat dipastikan	C1
No. sampel	SM 214 SM 228 SM 230 SM 231 SM 232 SM 234 SM 236	SM 169 SM 187 SM 235	SM 233
Jumlah	7/11 (63,8%)	3/11 (27,3%)	1/11 (0,9%)

Pada tabel 5.8 dapat dilihat bahwa sepuluh sampel berada pada genotipe B dan satu sampel berada pada genotipe C. Hasil identifikasi genotipe VHB semua sampel dengan hasil PCR positif, ditemukan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) merupakan genotipe B, sedangkan satu sampel lainnya (9,1%) termasuk dalam genotipe C. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa VHB genotipe B dominan pada pasien dengan HBsAg positif di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali diikuti dengan genotipe C.

Cabang-cabang pohon filogenetik menunjukkan tujuh sampel berada dalam cabang yang sama dengan isolat lain dari *database* internasional yang telah diketahui merupakan VHB subgenotipe B3, sehingga ketujuh sampel tersebut termasuk ke

dalam subgenotipe B3. Tiga sampel lainnya yang telah masuk ke dalam genotipe B mempunyai cabang subgenotipe yang tidak satu cabang dengan subgenotipe-subgenotipe VHB dari isolat *database* internasional dari subgenotipe B1 maupun sampai dengan subgenotipe B8. Sampel SM 235 memiliki kedekatan dengan subgenotipe B7, sampel SM 169 memiliki kedekatan dengan subgenotipe B4 sedangkan SM 187 tampaknya memiliki cabang tersendiri dalam genotipe B. Satu sampel yaitu SM 233 yang telah termasuk genotipe C memiliki cabang yang sama dengan isolat dari *database* internasional yang telah diketahui masuk ke dalam subgenotipe C1 sehingga sampel SM 233 dapat dikatakan memiliki subgenotipe C1.



Gambar 5.3 Pohon filogenetik (dendrogram) genotipe dan subgenotipe VHB berdasarkan sekuen 433 nukleotida posisi 289-721 sebagian gen regio S

Ket: Kode SM pada kotak merah menunjukkan isolat VHB dari sampel Puskesmas Mengwi I.

Analisis filogenetik dari sampel dan *database* internasional berdasarkan sekuen bagian genom regio gen S sepanjang 433 bp dapat dilihat dari dendrogram pada gambar 5.3. Cabang-cabang genotipe pada huruf bagian kiri yang dicetak tebal sedangkan subgenotipe VHB dari genotipe B dan C ditulis dengan cetak tebal di sebelah kanan nomor sampel.

Tabel 5.9 Distribusi nomor sampel berdasarkan genotipe dan subgenotipenya dari sekuen 433 nukleotida posisi 289-721 sebagian gen regio S VHB

Subgenotipe	Genotipe B			Genotipe C
	B3	B7	Belum dapat dipastikan	C1
No. sampel	SM 228 SM 231	SM 230 SM 232 SM 235	SM 187 SM 234	SM 233
Jumlah	2/8 (25,0%)	3/8 (37,5%)	2/8 (25,0%)	1/8 (12,5%)

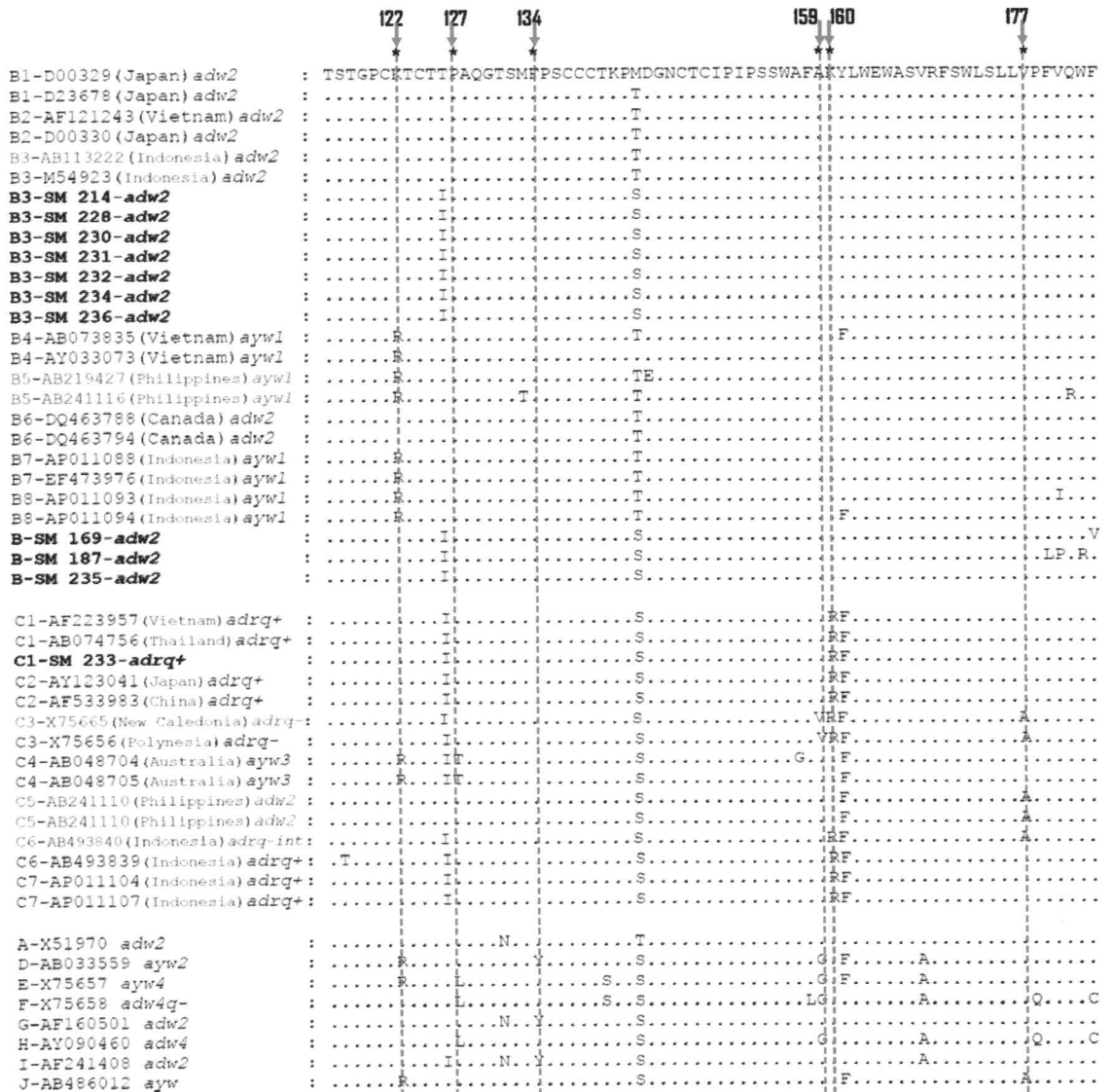
Pada tabel 5.9 dapat dilihat bahwa dari delapan sampel yang dianalisis, ditemukan tujuh sampel berada pada genotipe B (87,5%) dan satu sampel berada pada genotipe C (12,5%). Cabang-cabang pohon filogenetik pada gambar 5.3 menunjukkan dua sampel (25,0%) berada dalam cabang yang sama dengan isolat lain dari *database* internasional yang telah diketahui merupakan VHB subgenotipe B3, tiga sampel (37,5%) dengan VHB subgenotipe B7. Dua sampel lainnya (25,0%) yang telah masuk ke dalam genotipe B mempunyai cabang subgenotipe yang tidak satu cabang dengan subgenotipe-subgenotipe VHB dari isolat *database* internasional dari subgenotipe B1 maupun sampai dengan subgenotipe B8. Dua sampel tersebut yaitu SM 187 dan SM 234 tampaknya memiliki cabang tersendiri dalam genotipe B. Satu sampel yaitu SM 233 yang telah termasuk genotipe C memiliki cabang yang sama dengan isolat dari *database* internasional yang telah diketahui masuk ke dalam subgenotipe C1 sehingga sampel SM 233 dapat dikatakan memiliki subgenotipe C1.

Dua pohon filogenetik yang telah dibuat berdasarkan panjang dari sekuens 211 dan 433 nukleotida sebagian gen regio S VHB menunjukkan beberapa perbedaan dalam distribusi subgenotipe beberapa sampel. Dari analisis keduanya didapatkan dua sampel yaitu SM 228 dan SM 231 tetap berada satu cabang dengan subgenotipe B3. Satu sampel yaitu SM 187 tetap berada tidak satu cabang dengan subgenotipe-subgenotipe VHB dari isolat *database* internasional dari subgenotipe B1 maupun sampai dengan subgenotipe B8. Satu sampel lainnya yaitu SM 233 tetap berada satu cabang dengan subgenotipe C1. Pada pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan sekuens 211 pasang nukleotida tidak menunjukkan adanya sampel yang satu cabang dengan subgenotipe B7, sedangkan pada pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan sekuens 433 pasang nukleotida menunjukkan adanya tiga sampel yaitu SM 230, SM 232 dan SM 235 berada satu cabang dengan subgenotipe B7. Satu sampel yaitu SM 234 pada pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan sekuens 211 pasang nukleotida menunjukkan berada satu cabang dengan subgenotipe B3, sedangkan pada pohon filogenetik yang dibuat berdasarkan sekuens 433 pasang nukleotida menunjukkan sampel tersebut berada tidak satu cabang dengan subgenotipe-subgenotipe VHB dari isolat *database* internasional dari subgenotipe B1 sampai dengan B8.

5.3.4 Hasil analisis subtipe VHB dari sampel penelitian

Penentuan subtipe VHB ditentukan dengan cara hasil sekuens nukleotida spesimen yang telah diketahui diterjemahkan ke dalam urutan asam aminonya, kemudian dilakukan *multiple alignment*, dan dianalisis urutan kodon-kodon tertentu. Subtipe VHB spesimen ditentukan berdasarkan hasil analisis asam amino spesimen pada posisi 122, 127, 134, 159, 160 dan 177 pada gen S VHB, menggunakan program komputer.

Multiple alignment sekuen-sekuen asam amino regio S pada urutan no 116-183 yang disandi oleh nukleotida 500-703 pada gen regio S VHB yang mengacu pada isolat VHB dengan *accession number* D00329, yaitu 11 sekuen dari sampel pasien dengan gejala hepatitis di Mengwi, Badung dan 38 sekuen dari bank data DNA internasional (DDBJ/*GenBank*) diperlihatkan pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 *Multiple alignment* pada sekuen asam amino urutan nomor 116-183 pada gen regio S berbagai subgenotipe dan subtype VHB dari isolat sampel dan isolat dari bank data DNA internasional (DDBJ/*GenBank*).

Ket : Isolat dengan cetak tebal menunjukkan isolat sampel.

Pada gambar *multiple alignment* diatas dapat ditunjukkan analisis substitusi asam amino pada urutan nomor 122, 127, 134 dan 160 sehingga dapat diketahui sub tipe VHB dari isolat sampel. Analisis substitusi asam amino Ala dengan Val di posisi 159 (A159V) dan atau asam amino Val dengan Ala di posisi 159 (V159A) pada VHB sub tipe *adr* dapat diketahui ada atau tidaknya determinan *q*. Isolat dari sampel nomor SM 233 yang memiliki sub tipe *adr* tidak memperlihatkan substitusi asam amino A159V dan atau V159A, sehingga dapat diketahui isolat sampel nomor SM 233 memiliki determinan *q* (*q+*). Setelah diketahui genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB dari isolat sampel, maka hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 5.10 Pola genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB dari isolat sampel penelitian.

Nomor Sampel	Genotipe VHB	Subgenotipe VHB	Sub tipe VHB
SM 169	B	Belum dipastikan	<i>Adw2</i>
SM 187	B	Belum dipastikan	<i>Adw2</i>
SM 214	B	B3	<i>Adw2</i>
SM 228	B	B3	<i>Adw2</i>
SM 230	B	B3/B7	<i>Adw2</i>
SM 231	B	B3	<i>Adw2</i>
SM 232	B	B3/B7	<i>Adw2</i>
SM 233	C	C1	<i>Adrq+</i>
SM 234	B	B3	<i>Adw2</i>
SM 235	B	B7	<i>Adw2</i>
SM 236	B	B3	<i>Adw2</i>

Tabel 5.10 diatas menunjukkan bahwa hasil analisis genotipe VHB dari semua sampel didapatkan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) merupakan genotipe B dan satu sampel (9,1%) termasuk genotipe C. Analisis subgenotipe VHB mendapatkan tujuh dari 11 sampel (63,6%) merupakan subgenotipe B3, tiga dari 11

sampel (27,3%) termasuk subgenotipe B7, dua dari 11 sampel (18,2%) belum dapat dipastikan dan satu dari 11 sampel (9,1%) merupakan subgenotipe C1. Pada analisis subtipe VHB dari semua isolat sampel didapatkan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) memiliki subtipe VHB *adw2*, sedangkan satu sampel (9,1%) memiliki subtipe VHB *adrq+*. Dapat dikatakan bahwa hasil analisis subtipe VHB dari semua sampel menunjukkan subtipe *adw2* merupakan subtipe yang dominan dari semua isolat sampel penelitian. Tabel 5.8 juga memperlihatkan bahwa semua sampel genotipe B ternyata memiliki subtipe *adw2* dan sampel genotipe C memiliki subtipe *adr*.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan hasil pemeriksaan kadar ALT/SGPT

Kenaikan kadar ALT melebihi dua kali BNA pada dua orang pasien pada sampel menunjukkan bahwa pada kedua pasien tersebut telah terjadi kelainan pada fungsi hatinya. Pemeriksaan ALT merupakan salah satu tes fungsi hati yang umum untuk mengetahui adanya gangguan dalam organ hati. Peningkatan kadar ALT akan terjadi jika adanya pelepasan enzim intraseluler oleh sel-sel hepar ke dalam darah yang disebabkan adanya kerusakan hati misalnya nekrosis hepatoselular. Pasien dengan kadar ALT yang meningkat menunjukkan adanya proses inflamasi di organ hati. Enzim ALT dapat digunakan untuk mendeteksi dan memantau progresi atau perbaikan terhadap adanya *hepatocellular injury* (Suharjo JB,2006; Rowen K *et al.*,2009). Peningkatan kadar ALT terutama pada fase *immune clearance* infeksi VHB kronis dan sering hanya pada fase *intermittent flares*. Peningkatan kadar ALT digunakan sebagai petanda fase *immune clearance* yang dapat memperkirakan progresi penyakit (Calvaruso V *et al.*,2009).

Pemeriksaan ALT juga penting untuk menentukan keputusan terapi. Pasien dengan kadar ALT normal memiliki respon serologi yang kurang baik pada terapi antiviral. Pasien dengan kadar ALT normal dipertimbangkan untuk tidak diterapi, kecuali bila hasil pemeriksaan histologi menunjukkan proses nekroinflamasi aktif (Lok ASF,2001; Suharjo JB,2006).

6.2. Pembahasan hasil pemeriksaan HBsAg

Deteksi terhadap adanya infeksi VHB yang paling mudah adalah deteksi adanya antigen permukaan VHB yaitu HBsAg. Salah satu petanda serologis untuk infeksi VHB yang sedang aktif adalah adanya antigen dari gen regio S (*surface*) VHB yaitu HBsAg. Pasien yang ditemukan HBsAg dalam darahnya menunjukkan bahwa terdapat infeksi VHB dalam darah pasien yang dibuktikan dengan ditemukannya antigen *surface* VHB pada darah pasien (Handajani R *et al.*,2006).

Hasil pemeriksaan HBsAg pada semua sampel didapatkan 14,7% pasien memberikan hasil HBsAg positif. Dari semua sampel dengan HBsAg positif diantaranya didapatkan dua sampel mempunyai kadar ALT lebih dari dua kali BNA. Hal ini dapat menunjukkan bahwa sedang terjadi proses peradangan pada hati sehingga mengganggu fungsi hati pada kedua pasien tersebut. Kadar ALT dapat meningkat dari 8% sampai 21% pada penderita yang mengalami *hepatocellular injury* seperti pada infeksi virus hepatitis B dan hepatitis C (Rowen K *et al.*,2009).

HBsAg mulai terdeteksi dalam darah penderita sebelum tampak gejala klinis, saat puncak infeksi dan kemudian tidak terdeteksi 3-6 bulan kemudian. HBeAg, VHB-DNA, dan DNA *polymerase* terdeteksi di serum segera setelah HBsAg, pemeriksaan ini signifikan dengan kejadian replikasi virus aktif (Crawford *et al.*, 2005).

Hasil penelitian lain yang telah dipublikasikan mengenai petanda VHB pada wanita hamil di delapan kabupaten di Bali, didapatkan HBsAg positif pada 1,9% sampel dimana secara signifikan prevalensi ini lebih rendah dari penelitian 10 tahun sebelumnya, yaitu pada wanita hamil sebesar 2,6% di Bali ditemukan HBsAg positif. (Surya GP *et al.*,2005). Di area dengan tingkat endemisitas tinggi didapatkan persentase *carrier* dengan HBsAg positif pada populasi dari 8% sampai 20% (Guan R

et al.,2001). Laporan dari *Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C* menyatakan bahwa Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B sedang sampai tinggi (Khan *et al.*, 2004).

6.3. Pembahasan hasil pemeriksaan PCR

Semua sampel yang dapat diidentifikasi dengan PCR ternyata sebagian besar dapat dideteksi dengan PCR menggunakan pasangan *primer* P7-P8 (*first round*). Sisanya didapatkan tiga sampel yang dapat dideteksi dengan pasangan *primer* HBS1-HBS2 (*second round*). Hal ini dapat disebabkan oleh karena adanya ketidaksesuaian (non-komplementer) antara urutan nukleotida pada tempat menempelnya (*annealing*) *primer* dengan urutan nukleotida *primer* yang digunakan, sehingga *primer* pada *first round* tidak dapat menempel, maka dari itu perlu dilakukan PCR *second round* dengan menggunakan set-set *primer* lain yang spesifik dan sudah sering digunakan dalam pemeriksaan PCR VHB. Hasil pemeriksaan PCR positif menunjukkan bahwa adanya DNA VHB dalam tubuh penderita.

Pemeriksaan VHB dengan PCR pada suatu sampel dengan kadar HBsAg positif dapat saja memberikan hasil PCR yang negatif baik dengan PCR menggunakan *primer* P7-P8 (*first round*) maupun dengan *primer* HBS1-HBS2 (*second round*). Hal ini dapat terjadi oleh karena beberapa hal contohnya telah terjadi ketidaksesuaian urutan nukleotida pada tempat menempelnya (*annealing*) *primer* karena terjadinya mutasi sehingga *primer* tidak dapat menempel. Dapat pula disebabkan oleh karena virus dalam bentuk utuh sudah tidak ada lagi beredar dalam darah penderita (Mandel *et al.*, 2000). Di dalam darah seorang penderita dengan HBsAg positif bisa saja yang terdeteksi oleh pemeriksaan HBsAg dengan ELISA adalah partikel-partikel bebas yang hanya mengandung protein HBsAg. Dalam

sirkulasi darah, partikel *Dane* merupakan merupakan virus utuh yang lengkap dengan DNA VHB, tetapi di samping itu didapatkan partikel-partikel bebas yang hanya mengandung protein HBsAg dalam bentuk sferis maupun filamen (Kann M *et al*,1997). HBsAg sebagai pembawa (*carrier*) dapat beredar dalam darah penderita hanya dalam bentuk partikel HBsAg yang tidak komplit dan bukan merupakan virus utuh (*virion*) yang infeksius (Mandel *et al*, 2000).

6.4. Analisis genotipe VHB dari sampel penelitian

Hasil identifikasi genotipe VHB semua sampel dengan hasil PCR positif, ditemukan hampir semua sampel merupakan genotipe B, sedangkan satu sampel lainnya termasuk dalam genotipe C. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa VHB genotipe B dominan pada pasien dengan HBsAg positif di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali diikuti dengan genotipe C.

Hasil penelitian oleh Lusida MI *et al*, (2008) yang mengidentifikasi genotipe VHB berdasarkan sekuen nukleotida gen pada regio S (*surface*) dan regio *Pre-Core/Core* menyatakan genotipe B dan C secara berurutan merupakan dominan di Asia. Kombinasi genotipe B dan genotipe C VHB pada suatu wilayah di Asia Tenggara memang sering ditemukan. Kombinasi antara beberapa genotipe VHB adalah biasa terjadi pada suatu negara atau wilayah yang memiliki beberapa genotipe VHB yang berbeda (Utsumi T *et al*,2009).

Dilaporkan juga bahwa VHB genotipe B, C dan D telah diisolasi dari berbagai kota lainnya di Indonesia, yaitu Jakarta, Padang, Manado, Bajawa dan Balikpapan (Sastrosoewignjo *et al*,1991). Lusida *et al*, pada tahun 2003 melaporkan bahwa semua dari 54 isolat VHB dari Surabaya, Provinsi Jawa Timur, termasuk dalam genotipe B. Pada penelitian Sastrosoewignjo *et al*, pada tahun 1991, tidak teridentifikasi adanya

virus hepatitis B genotipe A atau E. Penelitian terbaru mengenai distribusi genotipe VHB di 28 kota di Indonesia juga melaporkan bahwa VHB genotipe B merupakan yang dominan (66%), diikuti genotipe C (24%), genotipe D (7%) dan genotipe A (0,4%) dan ditemukan juga infeksi campuran dari genotipe VHB. VHB genotipe D ditemukan dominan di Maluku Selatan, sedangkan genotipe A ditemukan di Kalimantan Timur dan di Kupang (Mulyanto *et al.*, 2009). Dalam penelitian ini tidak teridentifikasi adanya VHB genotipe A, D, E, F, G atau H pada isolat yang berasal dari Mengwi, Bali.

Jenis genotipe VHB pada suatu area geografi dapat menunjukkan perbedaan dalam distribusi geografis (Kramvis *et al.*, 2005), karakteristik klinik dan virologik (Kao, 2002). Distribusi genotipe VHB ini juga dapat dikaitkan dengan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

VHB genotipe B dan C telah diperbandingkan untuk berbagai karakteristik klinik dan virologik. VHB genotipe C dikaitkan dengan tingkat positifitas HBeAg yang lebih tinggi, frekuensi mutasi *Pre-Core stop codon* yang lebih jarang (Kao JH, 2002) dan perjalanan penyakit yang lebih agresif daripada genotipe B (Chan *et al.*, 2003). *Outcome* klinis dan respon terhadap terapi antivirus lebih buruk pada penderita yang terinfeksi VHB genotipe C daripada genotipe B (Kao JH, 2002).

Genotipe VHB ini saat ini menjadi penting karena ada indikasi bahwa genotipe ini juga berpengaruh terhadap berbagai bentuk hepatitis B kronis dan respon VHB terhadap terapi interferon (Lindh *et al.*, 1997). Dari beberapa penelitian terlihat adanya hubungan antara beberapa penyakit hati dengan VHB genotipe B dan C. Penelitian yang dilakukan di Taiwan oleh Kao JH, (2003) menunjukkan VHB genotipe B dan C merupakan dominan di Taiwan. Genotipe C terkait dengan penyakit hati

yang berat termasuk sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler, sedangkan genotipe B terkait dengan perkembangan karsinoma hepatoseluler pada pasien muda penderita penyakit hati *non-cirrhotic*. Manifestasi klinis, baik sirosis hepatis maupun karsinoma hepatoseluler, lebih buruk pada penderita yang terinfeksi dengan VHB genotipe C daripada genotipe B (Kao JH, 2002).

6.5. Analisis subgenotipe VHB dari sampel penelitian

Cabang-cabang pohon filogenetik menunjukkan tujuh sampel berada satu cabang dengan subgenotipe B3, tiga sampel berada satu cabang dengan subgenotipe B7, satu sampel memiliki subgenotipe C1 dan dua sampel masuk ke dalam genotipe B namun belum dapat dipastikan ke dalam subgenotipe B berapa. Isolat sampel yang belum dapat dipastikan subgenotipenya ini perlu dikonfirmasi dengan melakukan analisis filogenetik berdasarkan genom regio lainnya seperti contoh regio pre-S1, pre-S2, dari gen regio *Pre-Core/Core* atau keseluruhan genom virus. Penentuan genotipe VHB dari sekuen gen regio S secara umum konsisten dengan penentuan dari sekuen genom lengkap, karena itu genotipe VHB dapat ditentukan berdasarkan sekuen gen regio S (Utsumi T *et al.*, 2009). Klasifikasi subgenotipe pada beberapa strain VHB tidak dapat digunakan hanya berdasarkan pada gen regio S saja. Sekuen genom lengkap merupakan yang paling tepat digunakan untuk analisis klasifikasi genotipe dan subgenotipe VHB (Lusida MI *et al.*, 2008, Nagasaki F *et al.*, 2006).

Penelitian oleh Huy *et al.*, (2004) menyatakan bahwa sedikitnya terdapat dua subgrup pada virus hepatitis B genotipe C, yaitu subgrup C1 isolat dari negara-negara di Asia Tenggara termasuk Vietnam, Myanmar dan Thailand dan subgrup C2 isolat dari negara-negara di Asia Timur Jauh termasuk Jepang, Korea dan Cina.

Penelitian yang dilakukan oleh Mulyanto *et al*, (2009) di Denpasar, Bali ditemukan infeksi VHB dominan oleh VHB genotipe B diikuti oleh genotipe C dan ditemukan juga infeksi VHB dengan genotipe campuran. Infeksi VHB oleh genotipe B dominan ditemukan VHB subgenotipe B3 diikuti oleh subgenotipe baru yaitu VHB/B8, sedangkan dari VHB genotipe C dominan ditemukan VHB subgenotipe baru C7 diikuti oleh subgenotipe VHB/C1.

Penelitian yang pernah dilakukan oleh Utama A *et al*,(2009) menunjukkan VHB subgenotipe B3 dan subgenotipe C1 merupakan subgenotipe VHB yang dominan ditemukan di Indonesia, hal yang sama juga ditemukan oleh Mulyanto *et al*, (2009). VHB subgenotipe B3 nampaknya tidak ditemukan di negara lain selain di Indonesia, dan sepertinya VHB subgenotipe VHB merupakan subgenotipe khusus dari Indonesia. VHB subgenotipe C1 tersebar di beberapa negara di Asia termasuk China dimana subgenotipe B2, C1 dan C2 merupakan subgenotipe yang dominan. Diperkirakan ketiga subgenotipe tersebut di Indonesia telah diimpor dari wilayah negara-negara tetangga di masa lalu (Mulyanto *et al*, 2009).

6.6. Analisis subtipe VHB dari sampel penelitian

Dari hasil analisis subtipe VHB dari semua isolat sampel didapatkan hampir semua sampel (90,9%) memiliki subtipe VHB *adw2*, sedangkan satu sampel memiliki subtipe VHB *adrq+*. Subtipe *adw2* merupakan subtipe yang dominan dari semua isolat sampel penelitian.

Subtipe *adw* terdapat di daerah yang luas mulai dari Afrika, daerah Mediterania Timur, Asia Barat sampai India Utara, Eropa Barat, Amerika Utara dan Selatan. Di Asia dan Oceania subtipe *adr* banyak didapatkan di Tiongkok Utara, Korea, pulau-pulau besar di Jepang, Malaysia, Birma dan Muangthai, sedangkan

subtipe *adw* terutama terdapat di bagian selatan yaitu Tiongkok Selatan, Taiwan, Okinawa dan Amami, Filipina dan Indonesia (Rasmilah, 2001). Utama A *et al*, (2009) mendapatkan VHB subtipe *adw2* dan subtipe *adrq+* ditemukan dominan pada infeksi oleh VHB genotipe B dan C di Indonesia.

Subtipe VHB ini secara epidemiologis dapat menunjukkan perbedaan geografi dan etnis dalam penyebarannya. Pola penyebaran subtipe dapat menggambarkan pola migrasi penduduk dimasa yang lalu, sebab infeksi VHB dari suatu subtipe yang menular kepada individu yang lain akan menunjukkan subtipe yang sama. Subtipe ternyata ada hubungan dengan faktor etnik serta genetik, hal ini terutama berlaku untuk pengidap kronis (Mulyanto *et al.*, 2009).

Pada tahun 1997, Mulyanto *et al*, menyatakan bahwa nenek moyang penduduk bagian paling timur Indonesia yang terinfeksi virus hepatitis B subtipe *adr* tampaknya datang dari Melanesia di mana subtipe *adr* banyak ditemukan. Analisis substitusi asam amino pada posisi 159 dan atau 177 dari gen S mengklasifikasikan isolat virus hepatitis B dari *New Caledonia* (Melanesia) dan *French Polynesia* (Polinesia) ke dalam subtipe *adrq-* (Norder *et al.*, 1994).

Semua subtipe utama VHB ditemukan di Indonesia. Subtipe *adw*, *ayw* dan *adr* dominan di kawasan barat Indonesia, Maluku dan Papua. Subtipe *adr* sangat dominan di daerah Papua dan sebagian Sumatera (Mulyanto *et al.*, 2009). Dilaporkan juga di Yogyakarta, *adw* merupakan subtipe VHB yang paling sering ditemukan, diikuti subtipe *adr* dan subtipe-subtipe lainnya (Hadiwandowo *et al.*, 1994). Penelitian lain melaporkan bahwa subtipe *adw* (*adw2* dan *adw4*) paling sering dijumpai di Sumatera, Jawa, Kalimantan bagian selatan, Bali, Lombok, Ternate dan Morotai (Lusida MI, *et al.*, 2003). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mulyanto *et al*, (2009) di Bali yaitu di

kota Denpasar, didapatkan sub tipe VHB yang dominan menginfeksi penderita adalah sub tipe *adw*, kemudian diikuti oleh sub tipe *adr*, *ayw* dan *ayr*.

Genotipe, subgenotipe maupun sub tipe VHB memperlihatkan perbedaan dalam distribusi geografis, karakteristik klinik dan virologik (Magnius *et al.*, 1995; Kramvis *et al.*, 2005; Kao, 2002). Ketiganya juga dapat memberikan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat (Okamoto H *et al.*, 1988; Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Terdapat beberapa teori tentang populasi asli dari penduduk Indonesia, namun teori yang paling dapat diterima adalah teori oleh Brandes. Teori oleh Brandes menyatakan bahwa penduduk asli Indonesia berasal dari keturunan Austronesia. Keturunan Austronesia dapat dibagi menjadi dua yaitu Austronesia barat dan Austronesia Timur. Populasi keturunan Austronesia barat meliputi Kalimantan, Sumatera, Bali dan kepulauan di Nusa Tenggara Barat dimana pada zona wilayah ini dominan terdapat VHB subgenotipe B3 dan sub tipe *adw2*. Austronesia timur meliputi Sulawesi, Nusa Tenggara dan Maluku Selatan dimana VHB subgenotipe B7 dan B8 dengan sub tipe *ayw* merupakan yang dominan (Mulyanto *et al.*, 2009).

Dari peningkatan mobilitas penduduk dan perubahan komposisi demografi di Mengwi, Badung, Bali dalam beberapa tahun terakhir belum dapat diketahui apakah sudah terjadi pergeseran pola genotipe, subgenotipe maupun sub tipe VHB di Mengwi dikarenakan belum pernah ada data ataupun penelitian yang menggambarkan pola genotipe VHB di Mengwi sebelumnya.

Pola genotipe, subgenotipe dan sub tipe VHB pada pasien di Puskesmas Mengwi I dengan HBsAg positif ini dapat mencerminkan pola pada kelompok populasi lain di daerah disekitarnya. Karakteristik klinik dan VHB yang dominan pada pasien di Puskesmas Mengwi I ini dapat dipergunakan sebagai informasi

tambahan dalam penanganan penderita yang terinfeksi VHB di Mengwi, Badung, Bali dan membuka lahan penelitian lanjutan guna mengeksplorasi karakteristik isolat VHB di Mengwi khususnya, di Bali dan di Indonesia pada umumnya.

Beberapa kelemahan dalam penelitian ini merupakan akibat adanya keterbatasan-keterbatasan yang dijumpai. Keterbatasan tersebut antara lain adalah dalam penelitian ini tidak dilakukan penelusuran subgenotipe VHB dari sampel pada genom regio lain selain regio S, seperti dari regio *Pre-Core/Core* ataupun dari genom lengkap VHB sehingga didapatkan analisis subgenotipe yang lebih tepat. Keterbatasan lain adalah jumlah sampel dan distribusi pengambilan sampel yang kurang luas dan kurang tersebar dari semua wilayah di Mengwi maupun di Kabupaten Badung sehingga belum didapatkan data yang memang telah mewakili kondisi populasi yang sebenarnya di Kecamatan Mengwi maupun di Kabupaten Badung.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar HBsAg didapatkan pasien dengan gejala penyakit hepatitis di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali dengan kadar HBsAg positif sebanyak 11 dari 75 sampel (14,7%).
2. Hasil identifikasi genotipe VHB semua sampel dengan HBsAg positif, ditemukan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) merupakan genotipe B, sedangkan satu sampel lainnya (9,1%) termasuk dalam genotipe C. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa VHB genotipe B dominan pada pasien dengan HBsAg positif di Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali diikuti dengan genotipe C.
3. Hasil identifikasi subgenotipe VHB semua sampel dengan HBsAg positif dari pohon filogenetik mendapatkan tujuh dari 11 sampel (63,6%) merupakan subgenotipe B3, tiga dari 11 sampel (27,3%) termasuk subgenotipe B7, dua dari 11 sampel (18,2%) belum dapat dipastikan subgenotipenya dan satu dari 11 sampel (9,1%) merupakan subgenotipe C1.
4. Hasil analisis subtipe VHB dari semua sampel dengan HBsAg positif didapatkan hampir semua sampel yaitu 10 dari 11 sampel (90,9%) memiliki subtipe VHB *adw2*, sedangkan satu sampel (9,1%) memiliki subtipe VHB *adrq+*.

7.2 Saran

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini masih perlu untuk dikembangkan lagi karena adanya beberapa kelemahan dalam penelitian ini. Beberapa kelemahan dalam penelitian ini merupakan akibat adanya keterbatasan-keterbatasan. Keterbatasan tersebut antara lain adalah perlunya dilakukan penelusuran subgenotipe VHB dari sampel pada genom regio lain selain regio S, seperti dari regio *precore/core* ataupun dari genom lengkap VHB sehingga didapatkan analisis subgenotipe yang lebih tepat. Keterbatasan lain adalah perlunya distribusi pengambilan sampel yang lebih luas dan tersebar dari semua wilayah di Mengwi maupun di Kabupaten Badung sehingga didapatkan data yang memang telah mewakili kondisi populasi yang sebenarnya. Semua keterbatasan ini memerlukan penyempurnaan pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4 th Ed. W. B. Saunders Company, California, pp.137-149
- Achwan WA, Muttaqin Z, Zakaria E, Mulyanto, et al. 2007. Epidemiology of Hepatitis B, C, and E viruses and Human Immunodeficiency Virus Infections in Tahuna, Sangihe-Talaud Archipelago, Indonesia. *Intervirol* 50:408-411
- Arankalle VA, Gandhe SS, Borkakoty BJ, Walimbe AM, Biswas D, and Mahanta J. 2010. A Novel HBV Recombinant (Genotype I) Similar To Vietnam/Laos In A Primitive Tribe In Eastern India. *J Vir Hep* 10:1365-2893
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83:2059-2073
- Baron S. 1996. Hepatitis B in Medical microbiology 4th ed The University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi>
- Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. 2001. Liver biopsy. *New Engl J Med* 344(7): 495-500
- Calvaruso V, Craxi A. 2009. Implication of Normal Liver Enzymes in Liver Disease. *J Viral Hepat* 16(8):529-536
- Chan HLY, Wong ML, Hui AY, Hung LCT, Chan FKL and Sung JJY. 2003. Hepatitis B Virus Genotype C Takes a More Aggressive Disease Course than Hepatitis B Virus Genotype B in Hepatitis B e antigen positive patients. *J Clin Microbiol* 41:1277-1279
- Crawford JM. 2005. Liver and Biliary Tract in Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins and Cotran Pathologic basic of diseases. Pennsylvania : Elseviers Saunders, pp.877-937. Available at: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitis-B>

- Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. 2000. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory test in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem* 46: 2050-2068.
- Guan R, Merican I, Amarapukar D. 2001. Chronic hepatitis B infection : management practices in Asia. *Med Progress* 28: 25-29.
- Mayumi M. 1994. Hepatitis B virus subtypes and hepatitis C virus genotypes in patients with chronic liver disease or on maintenance hemodialysis in Indonesia. *J Med Virol* 43:182-186
- Handajani R, Setiawan PB, Soetjipto.2006. Precore mutant virus hepatitis B pada penderita infeksi kronis virus hepatitis B tanpa atau dengan karsinoma hepatoseluler. Seminar Nasional ke XVIII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI) di Jakarta, 6 Desember 2006.
- Hollinger FB. 1991. Hepatitis B Virus ; In Hilleman and Douglas (Eds) ; Habley and Belfus, Philadelphia, pp.233-256
- Howard BJ.1994. Clinical and pathogenic microbiology, 2nd Edition ; Mosby-Year Book Inc, St.Louis, pp.312-334
- Huy TTT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, and Abe K. 2004. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85:283-292.
- Inoue Y, Sulaiman HA, Matsubayashi K, Julitasari, Iinuma K, Ansari A, Laras K, Corwin AL. 2000. Genotypic analysis of hepatitis C virus in blood donors in Indonesia. *J Trop Med Hyg* 62(1):92-98
- Jawetz ,Melnick, dan Adelberg's.1996. Mikrobiologi Kedokteran, Edisi 20, EGC,Jakarta, hal.450-470
- Khan M, Dong JJ, Acharya SK, Dhagwahdorj Y, Abbas Z, Jafri W, Mulyono DH, Tozun N and Sarin SK. 2004. Hepatology issues in Asia : perspective from regional leaders. *J Gantroenterol Hepatol* 19:419-430.
- Kao JH. 2002 .Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 17:643-650
- Kao JH. 2003. Hepatitis B Virus Genotypes and Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. *Intervirolgy* 46:400-407

- Keefe EB, Dieterich DT, Steve, Han HB, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. 2004. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2(2): 87-106
- Khan M, Dong JJ, Acharya SK, Dhagwahdorj Y, Abbas Z, Jafri SMW, Mulyono DH, Tozun N, Sarin SK .2004. Hepatology issues in Asia: perspectives from regional leaders. *J Gastroenterol Hepatol* 19:S419–S430
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa, and Kidd AH. 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267-1280.
- Kramvis A, Kew M, and François G. 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23: 2409-2423.
- Lau GK, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, 2005. Peginterferon alfa-2a, lamivudin, and the combination for HBeAg positive chronic hepatitis B. *New Engl J Med* 352(26) : 2682
- Lee C, Cheng C, Wang J, Lumeng L. 1992. Identification of hepatitis C viruses with a nonconserved sequence of the 5'untranslated region. *J Clin Microbiol* 30:1602-1604
- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997 337(24): 1733-1745.
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. 1997. Genotypes, nt1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 175:1285-1293
- Lok ASF, McMohan BJ. 2001. AASLD Practical Guideline Chronic hepatitis B : Update of recommendations. *Hepatology*, pp.1225-1241
- Lu X, Block T. 2004. Study of the early steps of the hepatitis B virus life cycle. *Int J Med Sci* 1(1): 21-33
- Lusida MI, Surayah, Sakugawa H, Nagano-Fujii M, Soetjipto, Mulyanto, Handajani R, Boediwarsono, Setiawan PB, Nidom CA, Ohgimoto S, and Hotta H. 2003. Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. *Microbiol Immunol* 47(12):969-975.

- Lusida MI, Nugrahaputra VE, Soetjipto, Handajani R, Fujii MN, Sasayama M, Utsumi T, Hotta H. 2008. Novel subgenotypes of hepatitis B virus genotypes C and D in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* Vol 46(7):2160-2166.
- Madiyono B. 1995. *Perkiraan Besar Sampel dalam Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI. Binarupa Aksara, Jakarta, Hal.187-212
- Magnius LO, Norder H. 1995. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38:24-34
- Mandel, Douglas, Bannett's. 2000. *Hepatitis B virus and Hepatitis D virus In Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone. Chapter 135
- Mulyanto, Depamede Sn, Surayah K, Tsuda F, Ichiyama K, Takahashi M, Okamoto H. 2009. A Nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol* 154:1047-1059
- Mulyanto, Tsuda F, Karossi AT, Soewignjo S, Roestamsjah, Trisnamurti RH., Sumardi, Surayah, , Kanai K and Mishihiro S. 1997. Distribution of the hepatitis B surface antigen subtypes in Indonesia: implications for ethnic heterogeneity and infection control measures. *Arch Virol* 142: 2121-2129
- Nagasaki F, Niitsuma H, Cervantes JG, Chiba M, Hong S, Ojima T, Ueno Y, Bondoc E, Kobayashi K, Ishii M and Shimosegawa T. 2006. Analysis of the entire nucleotide sequence of hepatitis B virus genotype B in the Philippines reveals a new subgenotype of genotype B. *J Gen Virol* 87:1175-1180.
- Norder H, Hammas B, Lufdahl S, Courouce AM, Magnius LO .1992. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 73:1201-1208.
- Norder H, Couroucé AM, and Magnius LO. 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198:489-503.

- Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. 2004. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 47: 289-309
- Nurainy N, Muljono DH, Sudoyo H, Marzuki S .2008. Genetic study of hepatitis B virus in Indonesia reveals a new subgenotype of genotype B in east Nusa Tenggara. *Arch Virol* 153:1057–1065
- Okamoto H, Imai M, Shimozaki M, Hoshi Y, Iizuka H, Gotanda T, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M .1986. Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype *ayr* : comparison with genomes of the other three subtypes. *J Gen Virol* 67:2305–2314
- Okamoto HF, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M.1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69:2575-2583
- Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, Toriyama K, and Muller CP. 2008. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis* 14:1777–1780.
- Parlow, T. G., D. P. Stites, A. I. Terr and J. B. Imboden. 2001. *Medical Immunology*. 10th Ed. Mc Graw-Hill Medical Publishing Division, USA, pp.238-331
- Rasmilah. 2001. Hepatitis B. Kumpulan artikel kesehatan masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat USU. USU *digital library*.
- Rowen K, Zetterman.2009. Evaluating the Patient With Abnormal Liver Tests. *Medscape Gastroenterology*. Available at <http://www.Medscape.com/viewarticle/710045>
- Sakamoto T, Tanaka Y, Simmonetti J, Osiowy C, Berresen M, Koch A, Kurbanov F, Sugiyama M, Minuk G, McMahon J, Joh T, Mizokami M .2007. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic Indigenous population. *J Infect Dis* 196:1487–1492
- Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B, Okamoto H.1991. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. *J Gasroenterol Hepatol* 6:491-498

- Seo YA, Yoon S, Bui Xuan., Hirotaka, Kasuga M. 2005. Serum hepatitis B virus DNA levels differentiating inactive carriers from patients with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17 (7) : 753-757
- Siregar FA. 2004. Hepatitis B Ditinjau dari Kesehatan Masyarakat dan Upaya Pencegahan. Kumpulan artikel kesehatan masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat USU.nomor 6
- Soewignjo S, Gunawan S.1999. Hepatitis Virus B, EGC, Jakarta, hal.24-36
- Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y and Mizokami M. 2002. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 76:5985-5992
- Suharjo JB. 2006.Diagnosis dan manajemen hepatitis B kronis. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran* No. 150, hal 5-9
- Surya GP,Karkata K. Suwardewa TG, Mulyanto, Tsuda F, Mishiro S.2005. Serological markers of hepatitis B, C, and E viruses and human immunodeficiency virus type-1 infections in pregnant women in Bali, Indonesia. *J Med Virol* 75(4):499-503.(abstract)
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* . 83(20):10538-10547
- Utama A, Purwantom S, Siburian MD, Dhenni R, Gani RA, Hasan I, Sanityoso A, Miskad UA, Akil F, Yusuf I, Achwan WA, Soemohardjo S. 2009. Hepatitis B virus subgenotypes and basal core promoter mutations in Indonesia. *World J Gastroenterol* 15(32): 4028-4036
- Utsumi T, Lusida MI, Yano Y, Nugrahaputra VE, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H. 2009. Complete genome sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Papua, Indonesia. *J Clin Microbiol* 42(6):1842-1847
- Yuen MF, Lai CL. 2005.Treatment of chronic hepatitis B. *Med Progr* 32: 7; 349-356

Lampiran 1**JADWAL KEGIATAN**

No	Kegiatan	Bulan ke-1	Bulan ke-2	Bulan ke-3	Bulan ke-4
1	Penyusunan dan seminar pra-proposal				
2	Ujian Proposal				
3	Perbaikan Proposal				
4	Mengajukan uji etika penelitian Persiapan alat dan bahan				
5	Pengumpulan sampel				
6	Pemeriksaan sampel				
7	Analisis data Penyusunan laporan penelitian				
8	Ujian tesis				
9	Perbaikan laporan penelitian				
10	Konsultasi dengan pembimbing				

Lampiran 2**RINCIAN BIAYA****1. Mengajukan surat kelaikan etik ke LPPM Universitas Airlangga Surabaya**

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Biaya administrasi	Rp. 300.000,-
2	Biaya penggandaan materi	Rp. 100.000,-
3	Biaya konsumsi seminar	Rp. 50.000,-
	JUMLAH	Rp. 450.000,-

**2. Pengajuan surat permohonan ijin melakukan penelitian di Lab.Hepatitis
*Institute of Tropical Dieases (ITD) Unair dan kelengkapan persyaratannya***

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Institusional fee (2%), Bench Fee, Biaya pemeliharaan alat	Rp. 700.000,-
	JUMLAH	Rp. 700.000,-

**3. Pengajuan surat permohonan kerjasama penelitian dengan
Puskesmas Mengwi I, Badung**

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Honor tenaga medis Puskesmas Rp.15.000,- x 70 sampel	Rp.1.050.000,-
2	Penggandaan lembar identitas dan persetujuan	Rp. 50.000,-
	JUMLAH	Rp.1.100.000,-

4. Pembelian reagen

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Pemesanan dan pembelian reagen bekerjasama dengan lab hepatitis ITD Uanir	Rp.8.000.000,-
	JUMLAH	Rp.8.000.000,-

5. Pembelian bahan-bahan penelitian habis pakai

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Sterile disp. syringe 5 ml 1 box (100 bj)	Rp. 40.000,-
2	Alkohol swab 1 box (100 bj)	Rp. 20.000,-
3	<i>Latex Handschoen</i> 1 box (100 pasang)	Rp. 25.000,-
4	Masker 1 box	Rp. 75.000,-
5	Plaster 1 bok (100 bj)	Rp. 50.000,-
6	Tabung centrifuge 15 ml steril 100bj	Rp. 75.000,-
7	<i>Yellow tips</i> 2000 bj	Rp. 150.000,-
8	<i>Blue tips</i> 1000 bj	Rp. 120.000,-
9	Tabung eppendorf 1,5 ml steril 1000bj	Rp. 200.000,-
10	Rak tabung eppendorf 3 bj	Rp. 30.000,-
11	<i>Dry ice</i> @ 2 kg	Rp. 30.000,-
12	Kit komersial QIAamp DNA Mini kit (50)	Rp. 900.000,-
13	Kit komersial QIAGEN Gel Extraction kit (50)	Rp. 700.000,-
	JUMLAH	Rp.2.415.000,-

6. Pengambilan dan Pengiriman Sampel

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Transportasi Denpasar-Surabaya PP 3 x PP	Rp. 1.200.000,-
	JUMLAH	Rp. 1.200.000,-

7. Pemeriksaan SGPT/ALT sampel serum

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Pemeriksaan SGPT Rp.10.000 x 70 sampel	Rp. 700.000,-
	JUMLAH	Rp. 700.000,-

8. Pemeriksaan HBsAg sampel serum

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Pemeriksaan HBsAG ELISA Rp.28.000 x 70 sampel	Rp. 1.960.000,-
	JUMLAH	Rp. 1.960.000,-

9. Kegiatan penelitian identifikasi genotipe Virus Hepatitis B dari sampel yang HbsAg positif

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Identifikasi subgenotipe dan subtype VHB / sampel	Rp.1.200.000,-

10. Biaya alat-alat tulis dalam penyusunan laporan

No	Jenis Pengeluaran	Biaya
1	Alat tulis kantor	Rp 500.000,-
2.	Penggandaan laporan	Rp. 400.000,-
	JUMLAH	Rp. 900.000,-

Biaya lain-lain	Rp. 1.000.000,-
Total Biaya	Rp. 30.425.000,-

Lampiran 3



PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
 B-REPUSLIKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
BADAN KESATUAN BANGSA
 JL. PUTAT INDAH No. 1 TELP. (031)-5677935-5681237-5679493
 SURABAYA - (60189)

Surabaya, 25 Mei 2008

Kepada

Nomor : 0721/239/1212/2008
 Lampiran :
 Perihal : Penelitian/Survey/Research

- Yth. Sdr. 1. Gubernur Bali
 Di Denpasar.
- 2. Bupati Tulungagung
 Di Tulungagung.
- 3. Walikota Surabaya
 Di Surabaya.

U.p. Kabakesbang dan Lintas

Menyampaikan Surat Rektor UNIVERSITAS AIRLANGGA

Tanggal : 17 Mei 2008

Nomor : 4334/2008/1212/2008

Bersama ini diberitahukan bahwa

Nama : MARIA INSE LUSIDA, ED, PhD, FET FDC Universitas Airlangga, DRK.
 Alamat : Kampus C Mulyorejo Surabaya
 Pekerjaan : Peneliti
 Kebangsaan : Indonesia

Bermaksud mengadakan penelitian/survey/research

Judul : Japan Collaborative Research Center For Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (JCRC-ERID)

Pembimbing : Prof. Dr. H. Fachr, Apt.

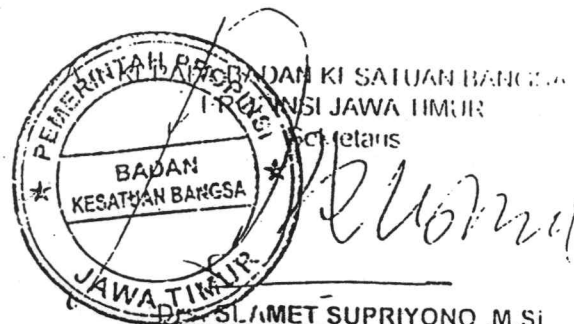
Peserta : Daftar terlampir

Waktu : 6 (enam) bulan.

Lokasi : Bali, Kab. Tulungagung dan Kota Surabaya

Penelitian wajib menta'ali peraturan dan tata tertib yang berlaku di daerah setempat

Demikian harap menjadi maklum



Dr. SIAMET SUPRIYONO, M.Si
 Pembina
 Nlp 510 063 253

Tembusan :
 Yth. 1. Sdr.
 Rektor UNAIR Surabaya

Yang bersangkutan.

TESIS

ANALISIS GENOTIPE, SUBGENOTIPE ...

MADE AGUS HENDRAYANA



PEMERINTAH PROPINSI BALI
BADAN KESATUAN BANGSA DAN
PERLINDUNGAN MASYARAKAT DAERAH
JL. D.I. PANJAITAN NO. 6 NITI MANDALA TEL.P.245395 – 245397 DENPASAR

Kepada

Nomor : 070/3411/KBPM
Lampiran : -
Hal : Rekomendasi

Yth. Bupati Badung
Up. Kepala Badan Kesbang dan Linmas

Di -
Denpasar

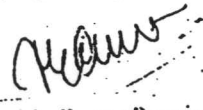
1. Dasar :
Berdasarkan Surat dari Kepala Badan Kesbang Provinsi Jawa Timur Nomor : 072/239/212/2008, tanggal 23 Mei 2008, Perihal Permohonan Ijin Penelitian.
2. Setelah mempelajari rencana kegiatan yang diajukan dan berdasarkan Peraturan Gubernur Bali Nomor 10 Tahun 2005 tanggal 9 Mei 2005 tentang Rekomendasi Ijin Penelitian, Survey KKI/KKN Study Banding, Kerkaksos, PKL, Pengabdian Masyarakat bagi Mahasiswa-Dosen, Instansi Pemerintah/Swasta, Orang Asing dan Ijin Keramaian maka dapat diberikan Rekomendasi Ijin kepada :

Nama : Maria Inge Lusida, MD, PhD, LPF/TC Universitas Airlangga dkk
Pekerjaan : Peneliti
Alamat : Kampus C Mulyorejo Surabaya
Bidang/Judul : Japan Collaborative Research Center For Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (CRC-ERID).
Lokasi : Desa Mengwi, Kecamatan Mengwi Kab. Badung.
Jumlah Peserta : 5 (lima) Orang
Lamanya : 6 (enam) Bulan

3. Dalam melakukan kegiatan agar yang bersangkutan mematuhi ketentuan sebagai berikut :
 - a. Sebelum melakukan kegiatan agar melaporkan kedatangannya kepada Bupati setempat atau pejabat yang ditunjuk.
 - b. Tidak dibenarkan melakukan kegiatan yang tidak ada kaitannya dengan bidang/judul dimaksud, apabila melanggar ketentuan akan dicabut Rekomendasi/Ijin dan menghentikan segala kegiatannya.
 - c. Mentaati sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku serta mengundilahkan ada istiadat setempat.
 - d. Apabila masa berlaku Rekomendasi/Ijin ini telah berakhir, sedangkan pelaksanaan kegiatan belum selesai maka perpanjangan Rekomendasi/Ijin agar ditujukan kepada Instansi pemohon.
 - e. Menyerahkan 2 (dua) buah hasil kegiatan kepada Pemda Provinsi Bali, melalui Ketua Bappeda Provinsi Bali 1 (satu) dan Kepala Badan Kesbang dan Linmasda Provinsi Bali 1 (satu) buah.

Denpasar 2 Juni 2008

a.n. GUBERNUR BALI
KEPALA BADAN KESATUAN BANGSA DAN
PERLINDUNGAN MASYARAKAT DAERAH
Ub. Kabid Deteksi Dan Pamasda.


Drs. Ida Bagus Pancima
Pembina
NIP. 010191114

Tembusan disampaikan kepada :

1. Kapolda Bali di Denpasar
 2. Dan Rem 163 Wirasatya di Denpasar
- TESIS



**BADAN KESATUAN BANGSA DAN
PERLINDUNGAN MASYARAKAT**

Jalan Majapahit No.6 Telp. 0361-424062

DENPASAR

**SURAT IJIN
MENGADAKAN PENELITIAN / SURVEY / KKN / PKL
NOMOR : 070 / 2008 / KESBANG**

Berdasarkan Surat Gubernur Bali Cq. Kepala Badan Kesbang dan Linmasda Propinsi Bali, tanggal 2 Juni 2008, Nomor : 070/3411/KBPM, maka Bupati Badung memberikan ijin mengadakan Penelitian / Survey / Study Perbandingan / KKN / PKL. kepada :

Nama : Maria Inge Lusida, MD,PhD, LPT/IDC Universitas Airlangga dkk.
Jabatan : Peneliti.
Alamat : Kampus C Mulyorejo Surabaya.
Tempat Tinggal : Jl. Gunung Sangiang 4 u Denpasar.
Judul Penelitian / Makalah : JAPAN COLLABORATIVE RESEARCH CENTER FOR EMERGING AND RE-EMERGING INFECTIOUS DISEASES (CRC-ERID).
Lokasi : Di Desa Mengwi Kecamatan Mengwi Kabupaten Badung .
Jumlah Peserta : 5 (lima) orang.
Tujuan : Untuk keperluan Penelitian.
Lama Penelitian : 6 (enam) bulan mulai Juni s/d Desember 2008

Dengan ketentuan sebagai berikut :

1. Sebelum mengadakan Penelitian / Survey / Study Perbandingan / PKL/ PKN melapor kepada Instansi tersebut pada tembusan surat ini.
2. Saat mengadakan Penelitian / Survey / Study Perbandingan / PKL / PKN mentaati dan menghormati ketentuan yang berlaku di wilayah setempat.
3. Selesai mengadakan Penelitian / Survey / Study Perbandingan / PKL / PKN melapor kembali kepada Pemerintah Kabupaten Badung.
4. Menyerahkan 1 (satu) exemplar hasil Penelitian / Survey / Study Perbandingan / PKL / PKN tersebut kepada Pemerintah Kabupaten Badung (Kepala Badan Kesatuan Bangsa Dan Perlindungan Masyarakat).
5. Tidak diperkenankan melakukan kegiatan di luar tujuan yang telah ditetapkan, yang melanggar akan dicabut surat keterangan dan kegiatannya dihentikan.

KEPADA :

Yang bersangkutan.

TEMBUSAN dikirim kepada :

1. Dan Dim 1611 / Badung di Denpasar.
2. Ka. Polres Badung di Mengwi.
3. Kepala Bappeda Kabupaten Badung di Denpasar.
4. Kepala Bawasda Kabupaten Badung di Denpasar.
5. Camat Mengwi di Mengwi.
6. Perbekel Mengwi di Mengwi.

Dikeluarkan di : Denpasar
Pada tanggal : 6 Juni 2008

An. Bupati Badung
Kepala Badan Kesbang Dan Linmas.





UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENYAKIT TROPIS
(INSTITUTE OF TROPICAL DISEASE)

SURAT PERNYATAAN

No. 804/ H3.14/Lit/2009

Yang bertanda tangan di bawah iri saya :


Nama : Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD, K-PTI
NIP. : 140159073
Pangkat / Gol : Pembina Utama Muda ' IV c
Jabatan : Ketua Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga

Dengan ini menyatakan tidak keberatan stok serum yang ada di Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga digunakan oleh Made Agus Hendrayana, dr sebagai sampel penelitian Tesis S2 Program Pascasarjana Universitas Airlangga dengan judul penelitian "Analisis Genotipe, Subgenotipe dan Subtipe Virus Hepatitis B (VHB) dari Genom Regio S (Surface) pada Pasien dengan HbsAg Positif di Mengwi, Badung, Bali"

Demikian surat pernyataan ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya..

Surabaya, 16 Desember 2009

Yang membuat pernyataan,



Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD, K-PTI
NIP. 19561103 198403 1 001



Perihal : permohonan ijin penggunaan fasilitas
Lab. Hepatitis LPT Unair

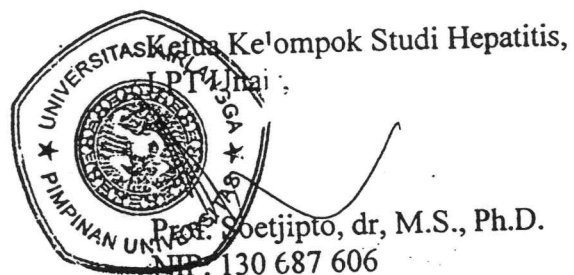
Surabaya, 14 September 2009

Kepada Yth:
dr. Made Agus Hendrayana
Mahasiswa Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga
SURABAYA

Sehubungan dengan surat Saudara tanggal 10 September 2009 kepada kami perihal pada pokok surat, dengan ini kami informasikan kepada Saudara bahwa pada prinsipnya kami tidak berkeberatan bilamana Saudara akan menggunakan fasilitas laboratorium kelompok Hepatitis LPT Unair, dengan catatan jadwal penggunaannya; mohon diatur oleh karena fasilitas laboratorium tersebut juga digunakan untuk peneliti baik dari dalam negeri maupun luar negeri.

Disamping itu kami mohon Saudara untuk mengajukan ijin tertulis juga kepada Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., KPTI, selaku Ketua Lembaga Penyakit Tropik Universitas Airlangga.

Demikian atas perhatian Saudara kami ucapkan terima kasih.



Tembusan Yth:

1. Ketua LPT Unair
2. Prof. Retno Handajani, dr., M.S., Ph.D
Kelompok Studi Hepatitis LPT Unair



IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENYAKIT TROPIS

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. 62-31-5992445-46 fax. 62-31-5992445
Website: www.itd.unair.ac.id Email: itd@lunair.ac.id dan tdrcua@rad.net.id

5 Maret 2010

No. : 166 /H3.14/Li/2010
Hal. : Ijin Penelitian di LPT

Kepada Yth.
Dekan
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga

Menjawab surat Saudara no. 228/H3.1.1/PPd.17/2010 tertanggal 4 Februari 2010 perihal permohonan ijin melakukan penelitian untuk penyusunan thesis mahasiswa Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama *Made Agus Hendrayana, dr* di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga, pada prinsipnya kami tidak keberatan dengan permohonan tersebut. Kegiatan penelitian dapat dilakukan di Laboratorium Hepatitis.

Demikian kami sampaikan. Atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih



Tembusan : Yth.
1. Ketua Kelompok Studi Hepatitis
2. Ybs



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 08/EC/KEPK/FKUA/2010

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA. TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN. MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

Analisis Genotipe, Subgenotipe dan Subtipe Virus Hepatitis B (VHB) pada Genom Regio S (Surface) dari Pasien dengan HBsAg Positif di Mengwi, Badung, Bali

PENELITI UTAMA :

Made Agus Hendrayana, dr. (NIM: 090810200M)

UNIT / LEMBAGA TEMPAT PENELITIAN :

Puskesmas Mengwi I, Badung, Bali

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Surabaya. 9 Maret 2010



Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS

Lampiran 4**IDENTITAS PASIEN**

Nomer : SM.....

Tempat pengambilan spesimen : PUSKESMAS

Nama Pasien :

Umur :tahun

J.Kelamin : Laki-laki Perempuan

Alamat :

Agama : Hindu Islam Kristen Budha Lainnya (.....)Suku : Bali Lainnya (.....)

Gejala/tanda yang diderita :

- Mata kuning
- Kulit tubuh kuning
- Demam/meriang/panas badan
- Sering lemah, letih, lesu, tidak selera makan
- Sering mual-muntah
- Nyeri/tidak enak di perut kanan atas
- Pembesaran di daerah perut kanan atas

DIAGNOSA DOKTER :

Apakah ada indikasi kelainan / penyakit pada hati : YA TIDAK

Bila YA, Sebutkan :

Hasil lab. SGOT – SGPT terakhir (bila ada) :

Pemeriksaan penunjang lainnya (bila ada) :

Tanggal Pengambilan spesimen :

Petugas pengumpul spesimen :

FORM PENJELASAN (*Information for consent*)**Judul Penelitian :****Analisis Genotipe, Subgenotipe dan Subtipe Virus Hepatitis B (VHB) dari Regio S (*surface*) pada Pasien dengan HBsAg Positif di Mengwi , Badung, Bali**

Infeksi virus hepatitis B (VHB) seperti telah diketahui dapat menjadi penyakit persisten kronis yang sering menimbulkan terjadinya hepatitis kronis dan yang lebih buruk lagi menjadi serosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler. Sekitar dua miliar orang penduduk dunia telah terinfeksi VHB. Sekitar 350 juta orang diantaranya menjadi karier kronik VHB. Sekitar seperempat dari karier tersebut berkembang menjadi penyakit hati yang serius. Penyakit ini telah membunuh sekitar satu juta orang setiap tahunnya.

Prevalensi infeksi VHB sangat bervariasi dari masing-masing daerah di Indonesia yang berkisar antara 5% sampai 10% untuk HBsAg. Prevalensi infeksi VHB di Bali diperkirakan masih tinggi dan data mengenai prevalensi infeksi, subgenotipe dan subtipe VHB di Bali dan Kabupaten Badung khususnya masih terbatas.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka kami bermaksud melakukan pemeriksaan dan penelitian untuk memeriksa serum pasien terhadap infeksi VHB serta mendapatkan identifikasi subgenotipe dan subtipe VHB yang menginfeksi pasien sehingga diagnosa terhadap infeksi virus hepatitis pada pasien dapat diketahui dan dapat diupayakan penanganan yang tepat pada pasien.

Proses pengambilan bahan pemeriksaan dari anda sebagai pasien yang berupa sampel darah vena sebanyak 4cc akan dilakukan oleh tenaga kesehatan yang terlatih dan merupakan prosedur rutin yang sering dilakukan. Adapun pengambilan bahan tersebut mengetahui adanya HBsAg di dalam tubuh pasien serta identifikasi genotipe, subgenotipe dan subtipe VHB yang menginfeksi pasien. Untuk itu kami tidak menambah beban biaya pemeriksaan kepada anda.

Catatan :

Apabila terjadi efek samping maupun akibat lain yang tidak diinginkan dalam proses pengambilan darah dari pasien walaupun hal ini sangat jarang terjadi (seperti hematome dan syok), peneliti akan bertanggung jawab untuk memberi pertolongan dan pengobatan yang sesuai sampai efek tersebut tidak ada lagi.

Kontak Peneliti = dr.Agus Hendrayana, no.HP 08123921590**Alamat : Jl. Kidal, perum Taman Borobudur no.24, Surabaya**

FORM PERSETUJUAN PENELITIAN
(Certificate of consent)

Dengan ini saya selaku pasien / keluarga pasien menyatakan bahwa setelah membaca lembar informasi penelitian diberi penjelasan oleh peneliti :

- Saya telah mendapat cukup informasi mengenai pemeriksaan dan penelitian yang akan dilakukan mencakup tujuan, manfaat, prosedur pemeriksaan dan penelitian yang akan dilakukan dan kemungkinan efek samping
- Saya setuju saya / keluarga saya ikut serta dalam pemeriksaan dan penelitian ini
- Saya tahu bahwa data pemeriksaan dan penelitian akan dirahasiakan oleh peneliti
- Saya bersedia semua data yang didapatkan akan dikumpulkan dan diproses sesuai prosedur penelitian dan saya berhak mengetahui dan mendapatkan arsip saya / keluarga saya setiap saat kepada peneliti
- Saya tidak berkeberatan bila hasil pemeriksaan tersebut menjadi milik dan koleksi *Institute Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga, Surabaya untuk dapat dilakukan penelitian selanjutnya

Demikian surat pernyataan ini dibuat sebagai bukti kesediaan saya / keluarga saya dalam pemeriksaan dan penelitian ini.

Badung,.....

Pasien / Keluarga Pasien

(Nama jelas dan tanda tangan)

(.....)

Peneliti :
dr. Made Agus Hendrayana
Program Pascasarjana
Universitas Airlangga, Surabaya
(Tanda tangan)

.....

Lampiran 5**PROSEDUR PEMERIKSAAN TITER HBsAg DENGAN METODE ELISA MENGGUNAKAN KIT AXIOM DIAGNOSTIC**

Persiapan reagen : letakkan reagen pada suhu ruang. Encerkan *wash buffer* 1:20 dengan *distilled water*



Posisikan strip yang diperlukan pada strip-holder dan pada nomor sumur yang sesuai termasuk tiga kontrol negatif (Bi, Ci, Di), dua kontrol positif (Ei, Fi) dan satu sumur kosong (Ai).



Masukkan masing-masing 50 µl kontrol positif, kontrol negatif dan spesimen kedalam sumur masing-masing



Tambahkan 50 µl HRP-*conjugate* ke setiap sumur kecuali ke dalam sumur kosong, kemudian campur dengan cara *tapping*



Tutup *plate* dengan tutupnya, inkubasi di *water-bath* pada 37°C selama 60 menit



Buka tutup *plate*, cuci sumur sebanyak lima kali dengan *wash buffer* yang telah diencerkan. Setiap mencuci kocok selama 30-60 detik



Keringkan bagian bawah *plate* dengan kertas/kain kering



Masukkan 50 µl chromogen A dan 50 µl chromogen B ke dalam masing-masing sumur termasuk sumur kosong, campur dengan cara *tapping*.



Inkubasi *plate* pada 37°C selama 15 menit, hindari terkena cahaya langsung



Akan terjadi reaksi enzimatis antara larutan chromogen dengan HRP-*conjugate* yang menghasilkan warna biru pada sumur kontrol positif dan pada sampel dengan HBsAg positif



Tambahkan 50 µl *stop solution* ke dalam masing-masing sumur dan campurkan dengan baik. Perlahan-lahan akan muncul warna kuning pada sumur kontrol positif dan pada sampel dengan HBsAg positif. Biarkan 5 menit



Siapkan *plate-reader*, kalibrasi *plate-reader* dengan sumur kosong, dan baca *absorbance* pada 450 nm. Kalkulasikan *cut off value* dan evaluasi hasilnya

**Prosedur Ekstraksi DNA dari Serum
dengan *Spin Collum* QIAamp kit (QIAGEN)**

- Pipet 20 µl QIAGEN protease ke dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml
- ↓
- Tambahkan 200 µl serum sampel ke dalam tabung
- ↓
- Tambahkan 200 µl buffer AL ke dalam tabung
- ↓
- Campur dengan *divortex* selama 15 detik
- ↓
- Inkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit
- ↓
- Spin down* tabung dengan hati-hati
- ↓
- Tambahkan 200 µl etanol 100% ke dalam tabung
- ↓
- Campur dengan *divortex* selama 15 detik
- ↓
- Spin down* tabung dengan hati-hati
- ↓
- Pipet hasil *solution* tadi ke dalam QIAamp *spin collum* tanpa mengenai rim, cap ditutup
- ↓
- Centrifuge collum* pada 8000rpm selama 1 menit,
- ↓
- Buang semua filtrat yang ada di tabung 1,5ml
- ↓
- Letakkan *collum* pada *collection tube* 2ml baru
- ↓
- Buka cap *collum*, tambahkan 500 µl buffer AW1, tutup cap
- ↓
- Centrifuge* pada 8000rpm selama 1 menit
- ↓
- Letakkan *collum* pada *collection tube* 2ml baru
- ↓
- Buka cap *collum*, tambahkan 500 µl buffer AW2, tutup cap
- ↓
- Centrifuge* pada 14.000 rpm selama 3 menit
- ↓
- Letakkan *collum* pada *collection tube* 2ml baru
- ↓
- Centrifuge* pada 14.000 rpm selama 1 menit
- ↓
- Letakkan *collum* pada tabung 1,5ml baru
- ↓
- Buka cap *collum*, tambahkan 40 µl buffer AE atau DW tepat ditengah-tengah filter, pada suhu ruang, tutup cap kembali
- ↓

Inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit



Centrifuge dengan 8000rpm selama 1 menit



Buang *collum*, DNA sudah tertampung di dalam tabung 1,5ml



Apabila DNA disimpan, simpan pada suhu -20° C

**Prosedur Ekstraksi DNA dari Gel Agarose
dengan Spin Collum QIAquick kit (QIAGEN)**

Potong pita DNA dari gel agarose, letakkan dalam tabung 1,5ml
↓
Tambahkan 500 µl buffer QG ke dalam tabung
↓
Inkubasi pada *water bath/heating block* pada suhu 50°C selama 10 menit
↓
Tambahkan 100 µl isopropanol atau 2-propanol ke dalam tabung, campur dengan cara *up-down pipeting*
↓
Pipet hasil *solution* tadi ke dalam QIAquick *spin collum* tanpa mengenai rim, cap ditutup
↓
Centrifuge collum dengan 12.000rpm pada suhu ruang selama 1 menit
↓
Buang filtrat pada *collection tube*, letakkan *collum* pada *collection tube* yang sama
↓
Tambahkan 750 µl buffer PE ke dalam tabung
↓
Centrifuge collum dengan 12.000rpm pada suhu ruang selama 1 menit
↓
Buang filtrat pada *collection tube*, letakkan *collum* pada *collection tube* yang sama
↓
Centrifuge collum dengan 13.000rpm pada suhu ruang selama 1 menit
↓
Letakkan *collum* pada tabung 1,5ml baru
↓
Tambahkan 20 µl buffer EB ke dalam tabung tepat ditengah-tengah filter
↓
Inkubasi pada suhu ruang selama 2 menit
↓
Centrifuge collum dengan 10.000rpm pada suhu ruang selama 1 menit
↓
Buang *collum*, DNA sudah tertampung di dalam tabung 1,5ml
↓
Apabila DNA disimpan, simpan pada suhu -20° C



ALAT (GPT) FS* (IFCC mod.)

mit / ohne Pyridoxal-5-phosphat

Reagenz für die quantitative In-vitro-Bestimmung von ALAT (GPT) in Serum oder Plasma an photometrischen Systemen

Bestellinformation

Bestell-Nr.	Packungsgröße				
1 2701 99 10 021	R1 5 x	20 mL + R2	1 x	25 mL	
1 2701 99 10 026	R1 5 x	80 mL + R2	1 x	100 mL	
1 2701 99 10 023	R1 1 x	800 mL + R2	1 x	200 mL	
1 2701 99 10 704	R1 8 x	50 mL + R2	8 x	12,5 mL	
1 2701 99 10 917	R1 8 x	60 mL + R2	8 x	15 mL	
1 2701 99 10 191	R1 4 x	36 mL + R2	4 x	9 mL	
1 2701 99 90 314	R1 10 x	20 mL + R2	2 x	30 mL	

Zur Bestimmung mit Pyridoxal-5-phosphat-Aktivierung zusätzlich benötigt:
 2 5010 99 10 030 6 x 3 mL

Zusammenfassung [1,2]

Alaninaminotransferase (ALAT/ALT), früher Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt, und Aspartataminotransferase (ASAT/AST), früher Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) genannt, sind die wichtigsten Vertreter einer Gruppe von Enzymen, die Amino transferasen oder Transaminasen, die die Umwandlung von α -Ketosäuren zu Aminosäuren durch die Übertragung einer Aminosäure katalysieren. Als spezifisches Leberenzym ist ALAT nur bei hepatobiliären Erkrankungen signifikant erhöht. Erhöhte ASAT-Werte aber können sowohl mit Erkrankungen der Herz- und Skelettmuskulatur als auch des Leberparenchyms zusammenhängen. Parallele Bestimmungen von ALAT und ASAT werden deshalb zur Unterscheidung zwischen Leber- und Herz-/ Muskelschäden durchgeführt. Der ASAT/ALAT-Quotient wird zur Differentialdiagnose bei Lebererkrankungen herangezogen. Während ein Quotient < 1 auf einen leichten Leberschaden hinweist, treten Quotienten > 1 bei schweren, oft chronischen Lebererkrankungen auf.

Methode

Optimierter UV-Test nach IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) [modifiziert]

Prinzip

L-Alanin + 2-Oxoglutarat $\xleftarrow{\text{ALAT}}$ L-Glutamat + Pyruvat

Pyruvat + NADH + H⁺ $\xleftarrow{\text{LDH}}$ L-Lactat + NAD⁺

Der Zusatz von Pyridoxal-5-Phosphat (P-5-P) stabilisiert die Transaminasen und vermeidet falsch niedrige Werte in Proben von Patienten mit Myokardinfarkt, Lebererkrankungen und Intensivpatienten, die zu wenig endogenes P-5-P enthalten [1].

Reagenzien

Bestandteile und Konzentrationen

R1: TRIS	pH 7,15	140 mmol/L
L-Alanin		700 mmol/L
LDH (Lactatdehydrogenase)		≥ 2300 U/L
R2: 2-Oxoglutarat		85 mmol/L
NADH		1 mmol/L
Pyridoxal-5-Phosphat FS		
Good's Puffer	pH 9,6	100 mmol/L
Pyridoxal-5-phosphat		13 mmol/L

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Die Reagenzien sind bei 2-8 °C bis zum Ende des auf der Packung angegebenen Verfallsmonats verwendbar, wenn nach dem Öffnen der Flaschen Kontaminationen vermieden werden. Vor Lichteinstrahlung schützen! Reagenzien nicht einfrieren!

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Die Reagenzien enthalten Natriumazid (0,95 g/L) als Konservierungsmittel. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen für den Gebrauch von Laborreagenzien.

Entsorgung

Bitte beachten Sie die jeweiligen gesetzlichen Vorschriften.

Vorbereitung der Reagenzien

Substratstart

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Für die Bestimmung mit Pyridoxal-5-phosphat (P-5-P):

1 Teil P-5-P mit 100 Teilen Reagenz 1 mischen,

z.B. 100 μ L P-5-P + 10 mL R1

Haltbarkeit nach dem Mischen:

6 Tage bei 2 - 8 °C

24 Stunden bei 15 - 25 °C

Probenstart

(ohne Pyridoxal-5-phosphat)

4 Teile R1 + 1 Teil R2 mischen

(z.B. 20 mL R1 + 5 mL R2) = Gebrauchsreagenz

Haltbarkeit: 4 Wochen bei 2 - 8 °C

5 Tage bei 15 - 25 °C

Das Gebrauchsreagenz vor Lichteinstrahlung schützen!

Zusätzlich benötigte Materialien

DiaSys Pyridoxal-5-Phosphat FS bei Bestimmung mit

P-5-P-Aktivierung (Bestell-Nr. 2 5010 99 10 030)

NaCl-Lösung 9 g/L

Übliche Laborausrüstung

Probenmaterial

Serum, Heparin-Plasma oder EDTA-Plasma

Stabilität [4]:

3 Tage bei 20 - 25 °C

7 Tage bei 4 - 8 °C

7 Tage bei - 20 °C

Kontaminierte Proben verwerfen!

Testschema

Applikationen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

Wellenlänge 340 nm, Hg 365 nm, Hg 334 nm

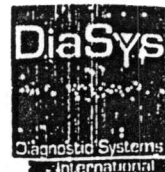
Schichtdicke 1 cm

Temperatur 37 °C

Messung Gegen Luft

Substratstart

Probe oder Kalibrator	100 μ L
Reagenz 1	1000 μ L
Mischen, 5 Min. inkubieren dann zufügen:	
Reagenz 2	250 μ L
Mischen, Extinktion nach 1 Min. ablesen und Stopp-Uhr starten. Extinktion danach nach 1,2 und 3 Min. wieder ablesen.	



Probenstart

Probenstart nicht mit Pyridoxal-5-phosphat anwenden!

Probe oder Kalibrator	100 µL
Gebrauchsreagenz	1000 µL
Mischen, Extinktion nach 1 Min, ablesen und Stopp-Uhr starten. Extinktion danach nach 1,2 und 3 Min. wieder ablesen.	

Berechnung

Mit Faktor

Aus den abgelesenen Extinktionen wird ΔE/min berechnet und mit dem entsprechenden Faktor aus der folgenden Tabelle multipliziert:

$\Delta E/\text{min} \times \text{Faktor} = \text{ALAT-Aktivität [U/L]}$

	Substratstart	Probenstart
340 nm	2143	1745
334 nm	2184	1780
365 nm	3971	3235

Mit Kalibrator

$\text{ALAT [U/L]} = \frac{\Delta E/\text{min Probe}}{\Delta E/\text{min Kalibrator}} \times \text{Konz. Kalibrator [U/L]}$

Kalibratoren und Kontrollen

Für die Kalibrierung von automatisierten photometrischen Systemen wird der DiaSys TruCal U Kalibrator empfohlen. Für die interne Qualitätskontrolle sollten DiaSys TruLab N und P Kontrollen mit jeder Probenserie gemessen werden.

	Bestell-Nr.	Packungsgröße
TruCal U	5 9100 99 10 063	20 x 3 mL
	5 9100 99 10 064	6 x 3 mL
TruLab N	5 9000 99 10 062	20 x 5 mL
	5 9000 99 10 061	6 x 5 mL
TruLab P	5 9050 99 10 052	20 x 5 mL
	5 9050 99 10 061	6 x 5 mL

Leistungsmerkmale

Messbereich

Der Test ist zur Bestimmung von ALAT-Aktivitäten geeignet, die maximal einem ΔE/min von 0,16 bei 340 nm und 334 nm und 0,08 bei 365 nm entsprechen.

Wird dieser Wert überschritten, sollen die Proben 1+9 mit NaCl-Lösung (9 g/L) verdünnt und das Ergebnis mit 10 multipliziert werden.

Spezifität/Interferenzen

Es treten keine Interferenzen mit Ascorbinsäure bis 30 mg/dL, Bilirubin bis 40 mg/dL, Hämoglobin bis 400 mg/dL und Lipämie bis 2000 mg/dL Triglyceride auf.

Testempfindlichkeit / Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze ist 4 U/L.

Präzision

Ohne P-5-P

In der Serie n = 20	Mittelwert [U/L]	Standard- abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1	22,2	1,38	6,22
Probe 2	44,8	1,17	2,62
Probe 3	101	1,02	1,00

Von Tag zu Tag n = 20	Mittelwert [U/L]	Standard- abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1	22,8	0,70	3,08
Probe 2	42,6	0,58	1,60
Probe 3	99,3	0,92	0,92

Mit P-5-P

In der Serie n = 20	Mittelwert [U/L]	Standard- abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1	33,8	1,25	3,71
Probe 2	72,0	2,04	2,83
Probe 3	128	2,77	2,16

Von Tag zu Tag n = 20	Mittelwert [U/L]	Standard- abweichung [U/L]	VK [%]
Probe 1	33,3	0,99	2,96
Probe 2	72,1	1,36	1,88
Probe 3	133	1,76	1,32

Methodenvergleich

Mit P-5-P

Bei einem Vergleich von DiaSys ALAT (GPT) FS mit P-5-P (y) mit dem IFCC-Referenzreagenz (x) wurden mit 51 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
y = 1,000 x - 0,200 U/L; r = 0,999.

Bei einem Vergleich von DiaSys ALAT (GPT) FS mit P-5-P (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 51 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
y = 0,970 x + 0,531 U/L; r = 1,000.

Ohne P-5-P

Bei einem Vergleich von DiaSys ALAT (GPT) FS ohne P-5-P (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 51 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
y = 0,971 x + 0,047 U/L; r = 1,000.

Referenzbereich

Mit Pyridoxal-5-phosphat-Aktivierung

Frauen [3]		< 34 U/L
Männer [3]		< 45 U/L
Kinder [1]	1 - 30 Tage	< 25 U/L
	2 - 12 Monate	< 35 U/L
	1 - 3 Jahre	< 30 U/L
	4 - 6 Jahre	< 25 U/L
	7 - 9 Jahre	< 25 U/L
	10 - 18 Jahre	< 30 U/L

Ohne Pyridoxal-5-phosphat-Aktivierung

Frauen	< 31 U/L
Männer	< 41 U/L

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln.

Literatur

1. Thomas L. Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST). In: Thomas L, editor. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 55-65.
2. Moss DW, Henderson AR. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 617-721.
3. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G et al. IFCC primary reference procedure for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 5: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. Clin Chem Lab Med 2002;40:718-24.
4. Guder WG, Zawta B et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001; p. 14-5.

Hersteller

DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Straße 9 65558 Holzheim Deutschland