

DISERTASI

EKSPRESI CD4 DAN CD8 SERTA KADAR IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , INF- γ PADA IMUNOPATOGENESIS HEPATITIS-C KRONIK

Suatu penelitian *cross sectional* dengan pendekatan imunopatologi



ELLYZA NASRUL

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**EKSPRESI CD4 DAN CD8 SERTA KADAR IL-1 β , IL-2, IL-10,
TNF- α , INF- γ PADA IMUNOPATOGENESIS
HEPATITIS-C KRONIK**

Suatu penelitian cross sectional dengan pendekatan imunopatologi

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Kamis
Tanggal : 17 November 2005
Pukul 10.⁰⁰ WIB**

Oleh :

**ELLYZA NASRUL
NIM : 099913633 D**

Lembar Pengesahan

UJIAN DISERTASI TAHAP II

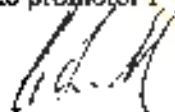
DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 17 NOVEMBER 2005

Oleh Promotor



Prof. Dr. Hermono Ontoseno Kusumobroto, dr,SpPD-KGEH
NIP. 130 345 884

Ko promotor I



Prof. Dr. P.G. Konthen, dr, SpPD-KAI

Ko promotor II



Prof. Soetjpto, dr,MS,PhD

telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal : 25 Agustus 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. Marsetio Donosoepoetro, dr, SpPK(K)

Anggota : 1. Prof. Dr. Hermomo O, Kusumobroto, dr, SpPD-KGEH
2. Prof. P.G Konthen, dr, SpPD-KAI
3. Prof. Soetjipto, dr.MS.PhD
4. Prof. Dr. Askandar Tjokropawiro, dr, SpPD-KEMD
5. Prof. Dr. Julianti Hood A, dr. MS, DSPA, FIAC
6. Prof. Dr. Sarmanu, drh, MS
7. Prof. Dr. Harijono Achmad, dr, SpPD-KGEH



Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 6790 / JO3.4 / PP / 2005
Tanggal : 6 September 2005

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan hati yang bersujud kepada Allah SWT seraya mengumandangkan salam shalawat kepada Rasulullah SAW dan keluarganya, saya panjatkan puji syukur yang sedalam-dalamnya ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan segalaanya, karunia, taufik dan hidayahNya, sehingga saya mendapat kekuatan, ketabahan serta tuntunanNya dalam menyelesaikan disertasi ini. Semoga hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Tersusunnya disertasi ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, maka dari itu dengan hati yang tulus dan dengan penuh rasa syukur saya sampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Hemomo O.Kusumobroto,dr.,SpPD-KGEH, sebagai Promotor yang telah dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, membantu, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan, serta memberikan saran dan dukungan moril secara terus-menerus, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.

Prof. Dr.P.G.Konthen,dr, SpPD-KAI sebagai Ko promotor I, yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga dan fikiran untuk membimbing, memperluas wawasan keilmuan khususnya dalam bidang imunologi, mengoreksi, mendorong, memberikan kepustakaan serta menolong saya dalam banyak hal, sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan.

Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD sebagai Ko promotor II yang telah banyak memberikan waktu, tenaga dan fikiran untuk membimbing, memberikan pengarahan, memperluas wawasan keilmuan, memberikan artikel, mengoreksi serta dorongan yang terus menerus dan dukungan moril yang diberikan selama saya mengikuti Program Doktor ini, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan, dan sebagai Ketua Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, saya juga mengucapkan terima kasih. Semoga Allah SWT akan selalu memberkahi rahmat dan hidayahNya kepada Beliau.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr, SpB-TKV serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr, DTM&H, PhD yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedijono Tirtowidarjo, dr, SpIHI yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG dan Prof. Dr. Hj. Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, SpPA, FIAC, mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, atas segala perhatian, nasehat dan dukungan dalam membantu memperlancar proses akademik selama mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Staf Pengajar di Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah membimbing dan memberikan pengetahuan kepada saya. Beliau-beliau yang terhormat adalah: Prof. H. Bambang Rahino Setokoesomo, dr, Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr, SpA.K (almarhum), Prof. Edy Pranowo Soedibyo, dr, MPH (almarhum), Prof. Dr. Josef Glinka, SVD, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr, Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, SpPA, FIAC, Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, Apt. Widodo J Pujitaharjo, dr, MS, MPH, Dr. PH, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS, Fuad Ansari, dr, MPH, PhD, Siti Pariani, dr, MSc, PhD, Prof. Kuntoro, dr, MPH, Dr. PH, Prof. Dr. H. Sarmanu, drh, MS, Prof. Dr. L. Dyson, Drs, MA.

Rektor Universitas Andalas Padang Prof. Marlis Rahman, Drs, PhD atas izin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang Prof.Dr.Fadil Oenzil,PhD,SpGK dan Muehlis Hasan, dr, SpOG serta Rusdan Djamil, dr, MSc mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas yang telah mendorong

dan mengizinkan saya mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Rismawati Yaswir, dr, SpPK(K) yang telah memberi dorongan semangat dan mengizinkan saya mengikuti pendidikan Program Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh, MS kepala I.F.MLIT Universitas Airlangga yang telah herbaik hati memberikan bimbingan dalam pengolahan data.

Ibu Sugeng Suhari dari laboratorium *Tropical Disease Research Centre Airlangga University* yang telah membantu saya dalam pemeriksaan RNA-VHC pada penderita hepatitis C kronik, dengan ini saya mengucapkan terimah kasih Kepada Desywar, dr, Rikami, dr, Tuti Pryhandani, dr , Lailan Sari yang telah banyak membantu untuk terlaksananya penelitian saya , dengan ini saya ucapkan terimah kasih.

Hanifah Taufik, dr, SpPK(K), Lilah, dr, SpPK(K), Azwar Nurdin, dr, SpPK(K), Yoesri, dr, SpPK(K), Almurdi, Drs, MS, Dian Pertiwi, Dra., MS, Zelly Dia Rovinda, dr yang telah banyak memberi dorongan dan semangat untuk berhasilnya saya dalam pendidikan Program Doktor ini.

Semua guru saya sejak dari sekolah taman kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi, yang telah memberi kepandaian kepada saya, sampai akhirnya saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Semua teman peserta didik Program Doktor Universitas Airlangga yang berasal dari Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang (kelompok 14) yaitu : Rusdan Djamil, dr, MSc, Sofina Rusdan, dr, Cert. Med, Nasrul Zubir, dr, SpPD-KGEH, Prof. Dr. Asman Manaf, dr, SpPD-KE, Adnil Edwin Nurdin, dr, SpKJ, Dr. Eryati Darwin, dr, Dr. Yanwirasti dr, Rismawati Yaswir, dr, SpPK(K), Hafni Bachtiar, dr, MPH, Dr. Masrul, dr, MSc, Suhasril ZA , dr, MPH (Almarhum), Azyria Aziz, dr dan Dr. Isnindiyah Kurniati, drg, saya sampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga atas segala kerja sama yang baik serta serta saling mendukung dalam suka dan duka selama bersama-sama menjalani pendidikan.

Yang tercinta ibunda Hj. Yusna dan Ayahanda Daniwar (Almarhum) yang selalu penuh tanggung jawab, cinta dan kasih sayang dalam mendidik saya, serta senantiasa memberi semangat, doa dan dorongan untuk maju, namun sangat disayangkan sekali, ayahanda tidak sempat menyaksikan keberhasilan putrinya. Saya selalu berdoa semoga Allah SWT akan mengampuni segala dosa dan menerima amal ibadah ayahanda dan akan ditempatkan disisi Allah SWT dengan haik.

Semua kakak dan adik saya yang selalu bergandengan tangan dalam keadaan suka maupun duka, serta memberi dorongan, semangat yang tiada hentinya kepada saya dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Suamiku tercinta . Nasrul Zubir, dr. SpPD KGBH yang dengan penuh perhatian, kecintaan dan kasih sayang yang selalu memberi dorongan untuk maju, walaupun banyak halangan dan kendala yang kita temui, tetapi berkat doa yang kita panjatkan selalu kepada Allah SWT, serta rahmatNya telah membuat saya berhasil dalam menyelesaikan pendidikan ini.

Semua anak saya yang tercinta Dody Delvin, ST dan Hendrik, ST yang terus menerus memberikan cinta kasih dan dorongan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan ini. Semoga ini baru merupakan langkah awal yang akan kalian lanjutkan kelak.

Kepada semua pihak, handai taulan dan para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan dorongan selama saya menempuh pendidikan Doktor ini. Untuk itu saya mengucapkan terima kasih.

Semoga Allah SWT selalu memberikan petunjuk, rahmat dan hidayahNya kepada kita semua didalam menjalani kehidupan di dunia ini. Amin Ya Rabbal Alamin.

RINGKASAN

EKSPRESI CD4 DAN CD8 SERTA KADAR IL-1 β , IL-2, IL-10,
TNF- α , INF- γ PADA IMUNOPATOGENESIS
HEPATITIS-C KRONIK

Ellyza Nasrul

Virus hepatitis C adalah suatu virus yang termasuk virus RNA yang *positive-stranded* dengan panjang lebih kurang 9,6 kb. Virus hepatitis C ini memiliki organisasi genetik seperti *Flaviviruses* dan *Pestiviruses*, dan telah diklasifikasi dalam famili *Flaviviridae*. Organisasi genetik dari VHC mulai dari amino sampai ujung terminal karboksi dari polipeptida digambarkan sebagai C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

Virus hepatitis C adalah virus RNA yang bersifat *quasispecies* dengan tingkat mutasi yang tinggi, khususnya di daerah *envelope* genom VHC, virus yang heterogenetik ini memungkinkan sebagai penyebab terjadinya infeksi yang persisten.

Virus hepatitis C mempunyai lebih kurang 6 genotip dan mempunyai sub tipe lebih kurang 60. Sub tipe-1b dari VHC adalah yang terbanyak ditemui di Asia dan merupakan sub tipe yang paling kurang responsif terhadap pengobatan dengan interferon, sehingga progresif dan dapat berkembang menjadi sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler.

Virus hepatitis C adalah suatu virus yang penularannya melalui darah secara parenteral dan non-parenteral. Sekitar 15-20% dari penderita dapat sembuh dari infeksi akut VHC, akibat respons imun yang berhasil untuk mengeliminasi virus tersebut. Sedangkan 80-85% dari penderita tersebut akan mempunyai risiko tinggi untuk berkembang kearah hepatitis kronik, sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler.

Pada penderita hepatitis C kronik di dalam darahnya mungkin terdapat berbagai variasi dalam jumlah maupun rangkaian genotip oleh adanya mutasi sepanjang waktu. Mutasi seperti ini mempunyai tujuan untuk menghindari serangan dari sistem imun. Saat ini masih belum jelas apakah penyakit hati dischahkan oleh virus yang bersifat sitopatik, dipicu oleh respons imun atau apakah respons imun penyebab utama secara langsung menyerang sel hati yang terinfeksi virus. Yang telah diketahui bahwa respons imun terhadap VHC ada, tetapi tidak dapat mengeliminasi virus.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memeriksa efek infeksi VHC kronik terhadap sel imunokompeten pada imunopatogenesis hepatitis-C kronik, dengan parameter: ekspresi sel-TC α 4+, sel-TC δ 8+, kadar IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , dan INF- γ . Penelitian ini menggunakan rancangan *explanatory* secara *cross sectional*. Penelitian terdiri dari 2 kelompok yaitu kelompok penderita hepatitis C kronik dan kelompok sehat sebagai kontrol. Penelitian ini terdiri dari 40 penderita hepatitis C kronik dengan umur berkisar 18-40 tahun dan kelompok kontrol sehat sebanyak 40 orang dengan umur berkisar 25-37 tahun. Sel-TC α 4+ dan sel-TC δ 8+ dianalisis secara imunohistologi dan kadar IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α ,

dan IFN- γ dianalisis dengan metoda *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA).

Identifikasi antibodi terhadap VHC dengan metoda ELISA dan penentuan RNA-VHC secara *polymerase chain reaction* (PCR).

Data dianalisa dengan mempergunakan SPSS 12.1, dan nilai $p < 0,05$ berarti terdapat perbedaan yang signifikan.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan jumlah sel-TC $CD4^+$, sel-TC $CD8^+$, dan kadar IFN- γ antara kelompok penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Kadar IL- 1β , IL-2, IL-10, dan TNF- α didapatkan meningkat di dalam darah penderita hepatitis C kronik, tetapi tidak terdeteksi di dalam darah kelompok kontrol sehat.

Hasil dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infeksi VHC kronik telah berpengaruh terhadap sel imunokompeten yang mengekspresikan sel-TC $CD4^+$ dan sel-TC $CD8^+$ serta peningkatan kadar sitokin IL- 1β , IL-2, IL-10, TNF- α , dan IFN- γ .



SUMMARY

**THE EXPRESSION CD4 AND CD8 AS WELL AS IL-1 β , IL-2, IL-10,
TNF- α , IFN- γ LEVEL ON IMMUNOPATHOGENESIS
CHRONIC HEPATITIS-C**

Ellyza Nasrul

The genome of HCV is single-stranded, positive sense RNA approximately 9.6 kb long. HCV has a genetic organization similar to that of flaviviruses and pestiviruses and has been classified as a separate genus within the family Flaviviridae. The genetic organization of the virus is such that the amino-terminal end of this polyprotein encodes the structural proteins of HCV while the remainder encodes a family of non-structural proteins that are involved in virus maturation and replication. From amino-to carboxy-terminus, the polyprotein encodes C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B.

HCV is typical of RNA viruses in having a quasi-species nature due to relatively high mutation rates, particularly in the envelope regions of the genome. Indeed, its genetic heterogeneity may be involved in persistence of infection.

HCV is classified into at least six genotypes and more than 60 subtypes. HCV subtype 1b is the most prevalent subtype in most part of Asia and is likely more frequently associated than the other HCV subtypes with poor responsiveness to interferon treatment, rapid disease progression, and development of HCC.

Hepatitis C virus is a bloodborne agent transmitted parenterally and non-parenterally. About 15 to 20 % of patients can mount a successful immune response to clear the virus in the acute phase, however 80 to 85 % of patients become chronic carriers, and these patients are at high risk of developing chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

HVC in circulating blood from patients with hepatitis C virus may vary in quantity as well as sequence, perhaps by sequential mutation over time. Such mutations may facilitate escape from attack by the host's immune system. It is not clear whether liver disease results from virus-induced cytopathic effect that trigger immune responses or whether the virus gene products directly prime immune responses that are then directed against infected hepatocytes. It is clear that immune responses to HCV contain but do not eliminate the virus.

The aim of this study was to examined the effect of chronic infection hepatitis C virus on the immunocompetent cells in immunopathogenesis chronic hepatitis C by parametric: value of the CD4+ T-cells, CD8+ T-cells, level of the IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , and IFN- γ . This study was using explanatory design.

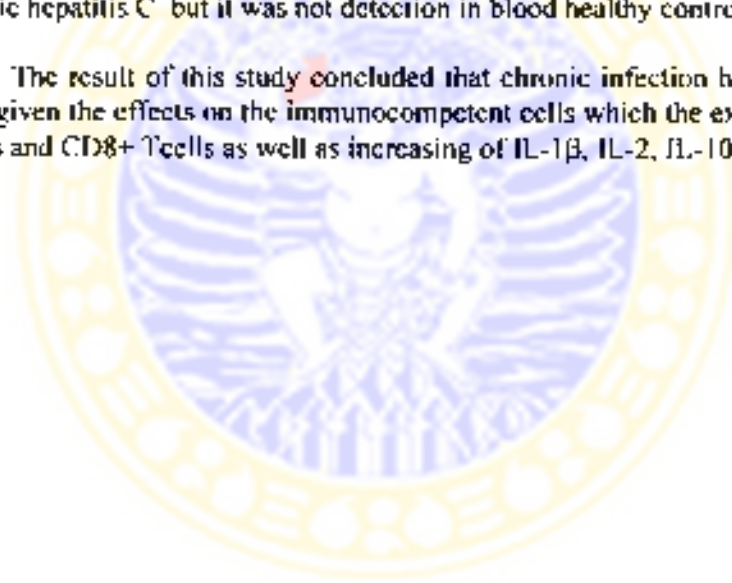
This study consist of both patients with chronic hepatitis C and healthy control group were took as sample. The experiment used 40 patients with chronic hepatitis C with age around 18 – 40 years old and 40 healthy control group with age around

25 – 37 years old. The CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were analyzed by using immunohistology examination and level of the IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , and IFN- γ were analyzed by using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method. Identification of hepatitis C antibody was generally with enzyme linked immunosorbent assay and detection of hepatitis C RNA was by polymerase chain reaction (PCR).

Data was analyzed by using SPSS 12.1, and $p < 0.05$ was consider to be significantly different.

The result in study showed that were increasing significant differences between value of both the CD4⁺ T cells, the CD8⁺ T cells and IFN- γ level in the blood patients with chronic hepatitis C compared to healthy control group. The level of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , were found increase in the blood patients with chronic hepatitis C but it was not detection in blood healthy control group.

The result of this study concluded that chronic infection hepatitis C virus have given the effects on the immunocompetent cells which the expression CD4⁺ Tcells and CD8⁺ Tcells as well as increasing of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ level.



ABSTRACT

**THE EXPRESSION CD4 AND CD8 AS WELL AS IL-1 β , IL-2, IL-10,
TNF- α , IFN- γ LEVEL ON IMMUNOPATHOGENESIS
CHRONIC HEPATITIS-C**

Ellyza Nasrul

A laboratory study on the patients with chronic hepatitis C was performed to observe the effects of chronic infection hepatitis C virus on the immunocompetent cells.

Two groups were used in this study which were consist of both the patients with chronic hepatitis C and healthy control group. The independent variable is the hepatitis C virus. The hepatitis C virus was isolated from the patients with chronic hepatitis C. They were the blood transfusion donors, who were collected from blood transfusion centers at Dr. M Djamil Hospital, Faculty of Medicine Andalas university.

The aim of this study was to examined the effects of hepatitis C virus on the immunocompetent cells on immunopathogenesis chronic hepatitis C by parametric: value of the CD4+ T-cells and the CD8+ T-cells, level of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α and IFN- γ . This study using explanatory design. This study consist of both patients with chronic hepatitis C and healthy control group were taken as samples. Fourty patients with chronic hepatitis C with age around 18-40 years old and 40 healthy samples as control group with age around 25-37 years old. The CD4+ T-cells and the CD8+ T-cells were analysed by using immunohistology examination and the level of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ were analyzed by using ELISA method. Identification of hepatitis C antibody was generally with ELISA method and detection of hepatitis C- RNA was by PCR.

Data was analysed by using SPSS 12.1, and $p < 0.05$ was consider to be significantly different.

The result of this study showed that were increasing significant differences between value CD4+ T-cell, CD8+ T-cell, IFN- γ in blood patients with chronic hepatitis C compared to control group. Increasing of CD4+ T-cell, CD8+ T-cell and IFN- γ were found in blood patients with chronic hepatitis C. The level of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α were found increase in the blood patients with chronic hepatitis C, but it was not detection in blood healthy control group.

The result of this study concluded that chronic infection hepatitis C virus have given the effects on the immunocompetent cells which the expression CD4+ Tcells and CD8+ Tcells as well as increasing of IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , IFN- γ level on immunopathogenesis chronic hepatitis-C

Keywords: Hepatitis C virus, CD4+ T cells, CD8+ T cells, Cytokines IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , and IFN- γ

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul dalam.....	i
Prasyarat gelar.....	ii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji disertasi.....	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	x
Ahstract.....	xiv
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR DAN BAGAN	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	9
1.3 Tujuan penelitian.....	9
1.4 Manfaat penelitian.....	10
2. TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Hati	13
2.1.1 Struktur hati.....	11
2.1.2 Sel hati.....	12

2.1.3 Fungsi hati.....	14
2.2 Virus hepatitis C.....	16
2.2.1 Sejarah penemuan VHC.....	18
2.2.2 Struktur genom VHC.....	19
2.2.2.1 Sifat fisiko-kimia VHC.....	19
2.2.2.2 Morfologi VHC.....	20
2.2.2.3 Struktur dan organisasi genetic VHC'.....	21
2.2.3 Komposisi protein VHC.....	23
2.2.3.1 Protein struktural.....	23
2.2.3.2 Protein non-struktural.....	25
2.2.4 Proses replikasi VHC.....	27
2.2.5 Genotipe VHC.....	31
2.3 Patogenesis infeksi VHC.....	34
2.4 Aspek imunologik infeksi VHC.....	39
2.4.1 Respons imun infeksi virus.....	39
2.4.2 Efek sitopatik langsung.....	43
2.4.3 Mekanisme imunopatologi infeksi VHC.....	44
2.4.3.1 Peran imunitas humoral.....	44
2.4.3.2 Peran imunitas seluler.....	47
2.4.4 Upaya virus menghindari respons imun.....	57

2.5 Sitokin	58
2.5.1 Interleukin-1.....	59
2.5.2 Interleukin-2.....	61
2.5.3 Interleukin-10.....	62
2.5.4 Tumor necrosis factor.....	63
2.5.5 Interferon- γ	63
2.6 Akibat infeksi VHC.....	64
2.6.1 Penanda infeksi VHC.....	64
2.6.1.1 Pemeriksaan antibodi	65
2.6.1.2 Pemeriksaan antigen dan RNA-VHC	68
2.6.2 Infeksi VHC akut	71
2.6.3 Infeksi VHC kronik.....	73
2.6.4 Sirosis hati	74
2.6.5 Karsinoma hepatoseluler.....	75
2.6.6 Infeksi asimtomatik.....	78
2.7 Epidemiologi infeksi VHC.....	78
2.7.1 Prevalensi dan insidensi.....	79
2.7.2 Transmisi infeksi VHC.....	83
2.7.3 Pencegahan.....	87
3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..	88
3.1 Kerangka konseptual penelitian.....	88
3.2 Hipotesis penelitian.....	91

4. METODE PENELITIAN.....	92
4.1 Jenis penelitian.....	92
4.2 Rancangan penelitian.....	92
4.3 Populasi, sampel, besar sampel.....	92
4.3.1 Populasi penelitian.....	92
4.3.2 Sampel penelitian.....	93
4.3.3 Besar sampel.....	93
4.3.4 Teknik pengambilan sampel.....	94
4.3.4.1 Cara pengambilan sampel.....	94
4.3.4.2 Kriteria inklusi.....	95
4.3.4.3 Kriteria eksklusi.....	95
4.4 Variabel penelitian dan definisi operasional.....	96
4.4.1 Klasifikasi variabel.....	96
4.4.2 Definisi operasional.....	96
4.5 Bahan penelitian.....	98
4.6 Alat penelitian.....	98
4.7 Lokasi dan tempat penelitian.....	98
4.7.1 Tempat penelitian.....	98
4.7.2 Waktu penelitian.....	99
4.8 Prosedur pengambilan data.....	99
4.8.1 Sampel untuk penelitian.....	99
4.8.2 Pemeriksaan plasma sampel.....	99

4.9 Cara analisis data.....	102
4.10 Kerangka operasional penelitian.....	103
5. ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	104
6. PEMBAHASAN.....	118
7. KESIMPULAN DAN SARAN.....	132
DAFTAR PUSTAKA.....	134
LAMPIRAN.....	167



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Distribusi genotipe VHC di dunia.....	33
Tabel 2.2 : Distribusi normal dari subset limfosit di dalam darah.....	48
Tabel 2.3 : Prevalensi anti-VHC pada populasi umum dan donor darah di Indonesia.....	83
Tabel 2.4 : Faktor risiko untuk terjadinya infeksi VHC.....	84
Tabel 5.1 : Data karakteristik penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol.....	107
Tabel 5.2 : Distribusi umur dan jenis kelamin penderita Hepatitis C kronik.....	108
Tabel 5.3 : Rerata kadar GOT pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kelompok kontrol.....	108
Tabel 5.4 : Rerata kadar GPT pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kelompok kontrol.....	110
Tabel 5.5 : Ekspresi sel-TC ₄ ⁺ pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol.....	111
Tabel 5.6 : Ekspresi sel-TC ₈ pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol.....	113
Tabel 5.7 : Korelasi antara kadar GOT dan GPT terhadap ekspresi CD ₄ ⁺ dan CD ₈ ⁺ pada penderita hepatitis-C kronik.....	114
Tabel 5.8 : Rerata kadar IFN- γ pada penderita hepatitis-C kronik	

dibanding kontrol	115
Tabel 5.9 : Kadar IL-1β, IL-2, IL-10, dan TNF-α pada penderita	
Hepatitis-C kronik dibanding kontrol	117



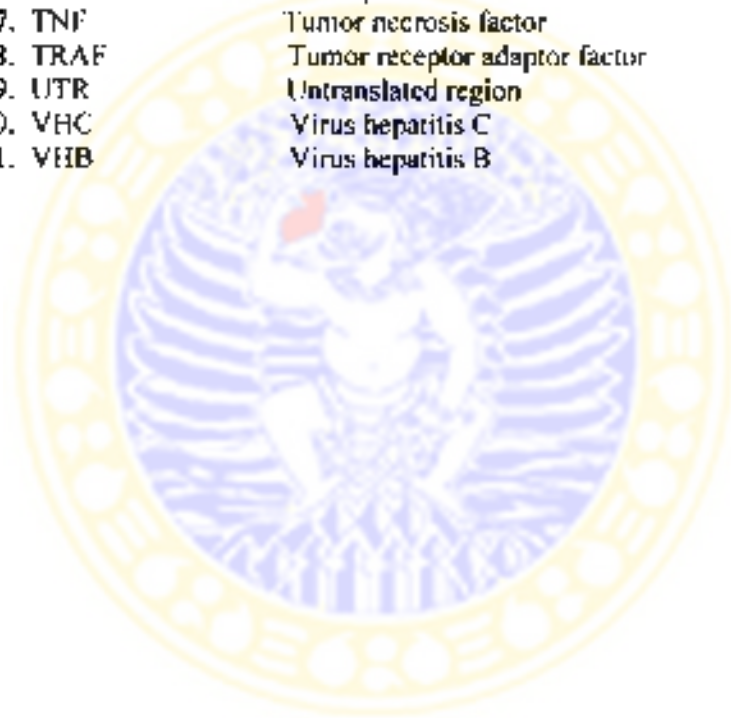
DAFTAR GAMBAR DAN BAGAN		Halaman
Gambar 2.1 : Skema organisasi genom VHC		22
Gambar 2.2 : Replikasi VHC di dalam sel hati		28
Gambar 2.3 : Mekanisme interaksi protein core VHC dengan anggota TNFR.....		37
Gambar 2.4 : Pengendalian infeksi oleh “ budding ” virus.....		42
Gambar 2.5 : Mekanisme interaksi VHC-reseptor pada hepatosit.....		46
Gambar 2.6 : Respons terhadap invasi jasad renik intraseluler dalam sitosol		50
Gambar 2.7 : Urutan respons imun terhadap virus		52
Gambar 2.8 : Respons imun seluler dan humoral yang terlibat patogenesis infeksi VHC		54
Gambar 3.1 : Kerangka konseptual penelitian		90
Bagan 4.1 : Kerangka operasional penelitian		103
Gambar 5.1 : Gambaran sel-T CD4+ di dalam darah kelompok kontrol.....		104
Gambar 5.2 : Gambaran sel-T CD4+ di dalam darah penderita hepatitis C kronik.....		105
Gambar 5.3 : Gambaran sel-T CD8+ di dalam darah kelompok kontrol.....		106

Gambar 5.4 : Gambaran sel-T CD8+ di dalam darah	
penderita hepatitis C kronik.....	106
Gambar 5.5 : Kadar GOT pada penderita hepatitis C kronik	
dan kontrol	109
Gambar 5.6 : Kadar GPT pada penderita hepatitis C kronik	
dan kontrol	111
Gambar 5.7 : Ekspresi sel-T CD4+ pada penderita hepatitis C	
kronik dan kontrol	112
Gambar 5.8 : Ekspresi sel-T CD8+ pada penderita hepatitis C	
kronik dan kontrol	114
Gambar 5.9 : Kadar IFN-γ pada penderita hepatitis C kronik	
dan kontrol	116.

DAFTAR SINGKATAN

1. ALT	Alanine aminotransferase
2. AST	Aspartate aminotransferase
3. anti-VHC	antibodi terhadap virus hepatitis C
4. APC	Antigen presenting cell
5. ALP	Alkalin fosfatase
6. AFP	Alfa feto protein
7. c	core
8. CD	Clusters of differentiation antigen
9. CDC	Centers for diseases control
10. CMI	Cell mediated immunity
11. CSF	Colony stimulating factor
12. cDNA	complementary DNA
13. DNA	Deoxy ribonucleic acid
14. E	Envelope
15. ER	Envelope receptor
16. EIA	Enzyme immuno assay
17. EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
18. FDA	Food drug administration
19. g	gram
20. gp	gliko protein
21. GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase
22. GPT	Glutamic piruvic transaminase
23. GM-CSF	Granulocyte macrophage-stimulating factor
24. Gama-GT	Gama-glutamil transferase
25. HV	Hyper variable
26. HVR	Hyper variable region
27. HLA	Human leucocyte antigen
28. IL	Interleukin
29. IFN- γ	Interferon gama
30. ICE	IL-1 β converting enzym
31. ISDR	Interferon sensitivity region
32. Ig	Imunoglobulin
33. kDa	kilo Dalton
34. LDL	Low density lipoprotein
35. LTR	Lymphotoxin- β receptor
36. ml	mili liter
37. MHC	Major histocompatibility complex
38. MAF	Macrophage activating factor
39. NS	Non structural
40. NANB	Non-A non-B
41. NCR	Non coding region

42. NOB	Neutralizing of binding
43. NKT	Natural killer T-cell
44. ORF	Open reading frame
45. p	protein
46. PCR	Polymerase chain reaction
47. PBL	Peripheral blood lymphocyte
48. PKR	Protein kinase R
49. RNA-VHC	Ribo nucleic acid-virus hepatitis C
50. RNA	Ribo nucleic acid
51. RIBA	Recombinant immunoBlot assay
52. ROI	Reactive oxygen intermediate
53. S	Structural
54. SRBI	Scavenger receptor class B type I
55. Th	T-helper
56. TCR	T-receptor
57. TNF	Tumor necrosis factor
58. TRAF	Tumor receptor adaptor factor
59. UTR	Untranslated region
60. VHC	Virus hepatitis C
61. VHB	Virus hepatitis B



BAB 1

PENDAHULUAN

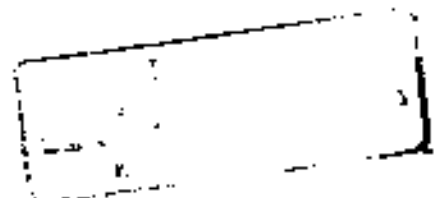
1.1 Latar Belakang

Hepatitis virus merupakan suatu infeksi sistemik yang menimbulkan peradangan dan nekrosis sel hati, sehingga mengakibatkan terjadinya serangkaian kelainan klinik, biokimia, imunologik dan morfologik (Raharja, 1996). Virus yang spesifik untuk terjadinya peradangan hati tersebut adalah virus hepatitis-A, B, C, D, E, F, G dan TT (Akbar *et al.*, 1999; Walsh and Alexander, 2001).

Virus hepatitis C (VHC) dahulunya dikenal sebagai virus hepatitis Non-A NonB (NANB) yang dapat menimbulkan penyakit hepatitis NANB, dan pertama kali diidentifikasi oleh Feinstone *et al.* (1975) yang merupakan salah satu bentuk hepatitis pasca transfusi darah. Pada saat itu diagnosis ditegakkan berdasarkan pemeriksaan serologis, untuk menyingkirkan kemungkinan hepatitis virus A dan B. Kemudian diketahui bahwa penyebab hepatitis NANB tersebut adalah virus hepatitis C (VHC) yang pertama kali ditemukan oleh Choo pada tahun 1989 (Choo *et al.* 1989), merupakan virus *positive-stranded RNA* (Houghton *et al.*, 1994; Pavio *et al.*, 2003).

Virus hepatitis C termasuk famili *Flaviviridae*, mempunyai *envelope*, dan genom virus ini terdiri dari ujung 5' dan 3' *untranslated region* (5' UTR dan 3' UTR), ujung 5'UTR penting untuk permulaan translasi protein virus sedangkan ujung 3'UTR penting untuk replikasi dari virus (Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994). Bentuk susunan dari poliprotein virus ini mulai dari asam amino sampai dengan karboksi terminal adalah sebagai C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NSSA-NS5B.

1



Virus hepatitis C diklasifikasikan menjadi 6 genotip dan terdapat lebih dari 60 sub tipe yang tersebar di seluruh dunia (Major and Feinston, 1997). VHC dengan sub tipe-1b adalah yang paling banyak ditemui di Asia termasuk Jepang (Dol *et al.* 1996; Greene *et al.* 1995; Hotta *et al.* 1997). Virus hepatitis C dengan sub tipe-1b ini dilaporkan juga sebagai sub tipe yang kurang responsif terhadap pengobatan dengan interferon dibandingkan dengan sub tipe yang lainnya, sehingga dengan cepat menjadi progresif dan berkembang menjadi karsinoma hepatoseluler (Bruno *et al.* 2000; nousbaun *et al.* 1995; Soetjipto *et al.* 1996).

Pada saat ini diperkirakan lebih dari 170 juta penduduk dunia mengalami infeksi kronik oleh VHC (Cameiro *et al.* 2001; Ogata *et al.* 2002; Forns *et al.* 2002; Frese *et al.* 2003; Ni *et al.* 2003) dan sekitar 40 000 orang kasus baru yang terinfeksi VHC setiap tahun di USA (Forn *et al.* 2002). Secara global dilaporkan bahwa lebih dari 2 % penduduk dunia telah mengalami infeksi kronik oleh virus hepatitis C (Forns *et al.* 1999). Sementara dilaporkan prevalensi anti-VHC positif di negara berkembang berkisar 1-2% dari populasi penduduk dan prevalensi yang lebih tinggi di Eropa dan Afrika, sedangkan di Arab berkisar 15% (Loza *et al.* 2001). di beberapa negara Asia 3-4%, Switzerland 50 000-70 000 orang terinfeksi VHC (Moradpour, 2001) dan di Indonesia serta Jepang prevalensi berkisar 0,2-2% (Jun *et al.* 2003).

Prevalensi anti-VHC pada penderita hepatitis C akut di Indonesia dilaporkan antara 11,8 % - 15,6 % (Sulaiman *et al.* 1990; Amiruddin *et al.* 1991; Budihusodo *et al.* 1993). Menurut hasil penelitian Muljono *et al.* (1993) di Surabaya terdapat 63 penderita hepatitis akut, yang terbanyak adalah dengan hepatitis A (44,8 %), sedangkan hepatitis NANB 24,2 % dan hepatitis B 20,7 %.

Menurut laporan dari *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) prevalensi anti-VHC positif dari populasi penduduk dunia 1,8% dengan 74% VHC-RNA positif, dari hasil penelitian tersebut 65% penderita berumur berkisar antara 30-49 tahun. Prevalensi seropositif di Afrika dan Amerika 3,2% dan 1,5% untuk *non-Hispanic whites* sedangkan pada pengguna kecanduan obat secara suntikan prevalensi berkisar 79% (Jacobson, 2001). Transmisi VHC dapat terjadi melalui parenteral dan non parenteral. Salah satu penyebab terbanyak terjadinya infeksi VHC melalui parenteral pada seseorang yang mendapat transfusi darah atau produk darah, yang mengandung virus ini. Pada tahun 1960 penderita yang menjalani terapi transfusi darah terjangkit hepatitis, dan dari beberapa peneliti lain melaporkan diperkirakan terjangkit hepatitis berkisar antara 20 % atau lebih (Alter *et al*, 1972; Anonymous, 1998). Semenjak tahun 1992 dengan tersedianya tes serologis generasi kedua untuk VHC, semua darah yang akan digunakan untuk transfusi secara rutin dilakukan tes penyaringan terhadap VHC, sehingga dengan demikian risiko terhadap infeksi VHC melalui transfusi darah dapat diturunkan berkisar 0,001 % per unit darah transfusi (Schriber *et al*, 1996).

Hampir 90 % penderita hemofili yang diobati dengan faktor VIII sebelum tahun 1985 atau dengan faktor IX sebelum tahun 1987 dilaporkan telah terinfeksi dengan VHC (Troisi *et al*, 1993; McQuillan *et al*, 1996).

Transmisi secara non-parenteral dikenal sebagai hepatitis sporadik, yaitu penularan terjadi tidak disebabkan oleh akibat transfusi darah maupun oleh akibat pemakaian jarum suntik. Transmisi non-parenteral (sporadik) dapat terjadi antara lain melalui kontak antar individu seperti misalnya cara penularan di dalam keluarga, baik

penularan secara seksual maupun non-seksual, serta penularan melalui jalur perinatal atau vertikal (Alter and Napoliner, 1989; Kurstak, 1993; Alter *et al.* 1995)

Angka kejadian infeksi VHC pada pekerja di bidang kesehatan tidak lebih tinggi dari yang terdapat pada populasi secara umum yaitu lebih kurang berkisar 1 % - 2 %, sedangkan risiko transmisi terinfeksi pasien dari pekerja kesehatan dilaporkan sangat rendah (Anonymous, 1998).

Prevalensi infeksi VHC pada penderita yang menjalani hemodialisis kronik lebih kurang 10 %, beberapa pusat hemodialisis melaporkan berkisar sampai dengan 60 %, sedangkan risiko terjadinya infeksi VHC dari tahun ketahun terus meningkat pada penderita yang menjalani hemodialisis (Anonymous, 1998). Pada infeksi virus hepatitis B biasanya transmisi melalui hubungan seksual, tidak demikian halnya dengan infeksi VHC, menurut hasil penelitian terhadap pasangan suami-istri yang salah satunya menderita hepatitis C kronik transmisi virus melalui hubungan seksual hanya berkisar 0 % - 4,4 %. Transmisi vertikal infeksi VHC, adalah dari ibu yang positif terinfeksi VHC ke anak selama periode perinatal lebih kurang 5 % (Anonymous, 1998).

Menurut peneliti lain dilaporkan bahwa angka kematian yang terjadi sebagai akibat hepatitis C kronik di USA berkisar antara 8000 - 10 000 orang per tahun (Drazen, 2000; Jun *et al.*, 2003).

Penderita hepatitis C akut, sekitar 15-20 % dari kasus ini dapat sembuh dengan cara mengeliminasi virus dengan reaksi respons imun *host* terhadap VHC, sedangkan 80-85 % dari penderita ini akan menjadi hepatitis C kronik karier selanjutnya akan berkembang menjadi sirosis hati dan karsinoma hepato seluler (KHS) (Sung *et al.*, 2000) dan merupakan alasan penting untuk dilakukan transplantasi hati.

Frekuensi anti-VHC pada penderita sirosis hepatis dan kanker hati primer juga dilaporkan sangat tinggi. Untuk penderita sirosis hepatis dari data penelitian di beberapa kota di Indonesia menunjukkan prevalensi anti-VHC berkisar antara 30,8 % - 73,9 % (Sulaiman *et al*, 1991; Sulaiman, 1994; Kusumobroto,1990; Hasan,1990; Soemoharjo *et al*, 1990).

Rerata umur penderita penyakit hati menahun yang disebabkan oleh VHC lebih tinggi dibandingkan yang disebabkan oleh virus hepatitis B (VHB). Menurut penelitian Muljono *et al* (1993) di Surabaya menunjukkan bahwa rerata umur penderita hepatitis kronik, sirosis hepatis, karsinoma hepatoseluler dengan HbsAg positif adalah 35,1 tahun, 47,3 tahun, dan 46,9 tahun; sedangkan rerata umur pada penderita dengan anti-VHC positif adalah 53,5 tahun, 55,3 tahun dan 58,5 tahun.

Seorang yang telah terinfeksi oleh VHC akan terbentuk antibodi terhadap virus hepatitis C beberapa minggu atau beberapa bulan setelah infeksi akut, dan antibodi tetap ada di dalam darah setelah penderita sembuh dari hepatitis. Mengenai hal ini perlu dibedakan apakah dalam keadaan sedang mengalami infeksi atau sudah sembuh dengan jalan melakukan pemeriksaan RNA-VHC. Secara umum pada infeksi akut RNA-VHC dapat dideteksi di dalam darah penderita dalam 3 minggu pertama infeksi, sedangkan antibodi terhadap virus akan muncul sekitar 8 – 10 minggu kemudian (Farsi *et al*, 1991; Schreiber *et al*, 1996).

Ada beberapa mekanisme yang dapat menyebabkan kerusakan sel hati selama berlangsungnya infeksi VHC: 1) Kerusakan secara langsung oleh virus hepatitis C terhadap sel hati disebut sebagai efek sitopatik. 2) Akibat efek respons imun terhadap sel hati yang terinfeksi virus. Sebagaimana yang dikemukakan oleh Chambers *et al* (1990) bahwa *Flaviviruses* sering bersifat sebagai sitopatik, sedangkan peneliti lain

menentang pendapat ini bahwa VHC tidak bersifat sitopatik. Secara kenyataan ditemui pada beberapa penderita yang terkena infeksi kronik dan pada percobaan binatang terhadap beberapa *chimpanzees* tidak terdapat bukti penyakit hati meskipun telah terjadi replikasi virus yang menetap untuk beberapa tahun dan tidak ada korelasi antara adanya virus di dalam darah dengan kadar enzim glutamat piruvat transaminase (GPT). Hal ini tidak menyokong bahwa VHC bersifat sitopatik (Villa *et al*, 1991).

Pada permulaan infeksi terjadi aktivasi dari sel makrofag dan sel *Kupffer*, sehingga menyebabkan terjadi kolestasis, kadang-kadang terjadi nekrosis, dan kolangitis, adanya kerusakan seperti ini menyokong sebagai akibat reaksi imunologik (Goodman and Ishak, 1995). Terdapat pertentangan pendapat di antara para peneliti mengenai mekanisme terjadinya kerusakan sel hati, walaupun demikian ada hal yang jelas ditemui bahwa respons imun tersebut terhadap VHC terjadi, tetapi tidak dapat mengeliminasi VHC.

Pada infeksi akut VHC, mekanisme pertahanan tubuh terdepan dilakukan oleh sel *natural killer* (NK), sel neutrofil, dan *antigen presenting cells* (APC) seperti makrofag (Moretta *et al*, 1994). Sel hepatosit merupakan tempat sasaran dari virus hepatitis C dan di dalam sel hati ini VHC akan melakukan replikasi. Virus yang telah masuk ke dalam sel hepatosit ini akan diproses oleh sel APC dari sel *Kupffer* hati secara professional. Sel NK dengan petanda sel-T atau sel NKT juga mempunyai peranan penting setelah terjadi infeksi VHC (Matsuura *et al*, 2000). Sel NKT ini teraktivasi oleh glikolipid dari *envelope* VHC yang akan menghasilkan interferon gama (IFN- γ) dan Inter leukin 4 (IL-4) yang bersifat anti viral dan merangsang perkembangan respons imun spesifik untuk menghancurkan sel yang terinfeksi virus (Kennedy *et al*,

2000). Aktivasi dari sel NKT juga akan mempertunjukkan *Fas ligand* (Fas-L.) sebagai sitotoksik (Cui *et al.*, 1997).

Sitotoksik juga terjadi oleh karena aktivasi sel NKT oleh IL-12 yang dihasilkan oleh sel sel *Kupffer* yang akan memproses antigen virus.

Pengambilan dan pemrosesan antigen virus oleh makrofag dan sel *Kupffer* di hati adalah sangat penting untuk pengenalan terhadap sel spesifik virus yaitu sel-T CD4+ pada permulaan terjadinya infeksi. Sel- TCD4+ diaktivasi dengan pengenalan epitop virus yang dipresentasikan oleh *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II pada permukaan sel APC (Murray *et al.*, 1992). Aktivasi sel-TCD4+ mengakibatkan perkembangan sel-T *helper* (sel-Th) menjadi sel-Th1 dan sel-Th2. Sel-Th1 menghasilkan sitokin IL-2, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dan interferon gama (IFN- γ) (Ramsay *et al.*, 1993) yang kemudian merangsang perkembangan sel NK dan CD8+ *cytotoxic lymphocytes* (CTLs) (Zinkernagel *et al.*, 1993). Sitokin IFN- γ sebagai imunomodulator juga akan meningkatkan aktivasi terhadap makrofag dan pengerahan dari sel-T, sel NK, atau NKT (Kancko *et al.*, 2000; Shields *et al.*, 1999).

Pengaruh dari IFN- γ juga akan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I pada sel hepatosit dan saluran empedu. Kompleks peptida virus-MHC kelas I yang terdapat pada permukaan sel hati akan dikenal oleh sel spesifik virus yaitu CD8+ CTLs, yang kemudian akan menghancurkan sel hati yang telah terinfeksi VHC ini (Ballardini *et al.*, 1995). Hal tersebut disokong oleh peneliti lain yang mendapatkan bahwa dengan peningkatan ekspresi dari MHC kelas I berhubungan dengan beratnya penyakit hati (Mossier *et al.*, 1994).

Sel APC menstimulasi sel-TCD4+ akan berdiferensiasi menjadi sel-Th2. menghasilkan sitokin IL-4, IL-5 dan IL-10 yang akan merangsang perkembangan sel-B

untuk menghasilkan antibodi (Doherty *et al.*, 1992). Menurut Abbas *et al.* (1996) bahwa sitokin yang dihasilkan oleh sel-Th2 akan mengakibatkan penurunan produksi sitokin sel-Th1, aktivitas CTL, ekspresi MHC dan derajat dari sel APC oleh makrofag. Hal ini juga berlawanan dengan hasil peneliti lain, mengemukakan bahwa kadar sitokin IFN- γ yang dihasilkan oleh sel-Th1 meningkat pada penderita hepatitis C kronik (Lechmann *et al.*, 1996).

Hasil penelitian Weiner *et al.*, 1992 mengemukakan bahwa banyak sel-TCID4+ terdapat di daerah portal hati, sedangkan oleh peneliti lain menemukan sel-TCID8+ banyak ditemui dalam lobus hati (Kuziel *et al.*, 1992), hal tersebut secara tidak langsung menunjukkan bahwa kedua sel-T tersebut mengakibatkan kerusakan hepatoseluler. Selanjutnya hal ini akan menyokong pendapat tersebut dengan adanya korelasi antara kadar enzim GPT di dalam darah terhadap beratnya penyakit hati berdasarkan gambaran histologi sel hati. Berdasarkan dari beberapa pendapat tersebut sel-T mempunyai peranan yang sangat penting pada patogenesis penyakit hati akibat infeksi VHC ini.

Penelitian ini dilakukan dengan memakai metoda *cross sectional* sehingga dapat mengemukakan keadaan respons imun penderita, khususnya sel imuno kompeten serta sitokin yang dihasilkannya dari penderita hepatitis C kronik pada saat tersebut. Juga dilakukan pemeriksaan petanda infeksi secara lengkap yaitu antibodi anti-VHC dan RNA-VHC, sehingga dapat menggambarkan keadaan viremia dan hal itu sangat diperlukan untuk dapat menjawab masalah di atas.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan dari latar belakang masalah penelitian, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah pada infeksi virus hepatitis-C kronik terjadi peningkatan jumlah sel-TCD4+ dan sel-TCD8+ ?
2. Apakah pada infeksi virus hepatitis-C kronik terjadi peningkatan kadar IL-1 β , IL-2 dan IL-10
3. Apakah pada infeksi virus hepatitis-C kronik terjadi peningkatan kadar TNF- α dan IFN- γ ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Umum

Untuk mengetahui perubahan sel imunokompeten dan kadar sitokin anti inflamasi yang dihasilkan akibat infeksi virus hepatitis-C kronik.

1.3.2 Khusus

1. Membuktikan bahwa infeksi virus hepatitis-C kronik menyebabkan peningkatan sel-TCD4+ dan sel-TCD8+.
2. Membuktikan bahwa infeksi virus hepatitis-C kronik menyebabkan peningkatan kadar IL-1 β , IL-2 dan IL-10.
3. Membuktikan bahwa infeksi virus hepatitis-C kronik menyebabkan peningkatan kadar TNF- α dan IFN- γ .

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini akan memberi manfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan karena dapat mengetahui mekanisme terjadinya kerusakan sel hati pada hepatitis-C kronik sebagai akibat proses dari sel imunokompeten serta sitokin anti inflamasi yang dihasilkan dengan menggunakan pendekatan imunopatologi. Lebih lanjut penelitian ini juga memberi manfaat bagi para klinisi dalam penanganan penderita hepatitis-C dengan tingkat kronisitas yang sangat tinggi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hati

Hati merupakan organ yang terpenting dalam tubuh manusia yang terletak dalam rongga abdomen bagian atas di bawah diafragma dengan berat berkisar 1200-1500 gram dan mempunyai banyak vaskularisasi. Sebagian besar aliran darahnya berasal dari vena porta dan sebagian kecil disuplai oleh arteri hepatica (Sage *et al.* 1999).

Semua zat yang diabsorpsi di usus akan dibawa ke hati melalui vena porta, kecuali gliserol akan dibawa melalui pembuluh limfatik (Gray, 1995).

Di dalam hati terjadi beberapa proses sintesis, modifikasi, penyimpanan, pemecahan serta ekskresi dari berbagai macam zat yang dibutuhkan untuk hidup. Fungsi dari hati ini sangat banyak sekali dan beraneka ragam serta sangat rumit sekali (Soemahardjo *et al.* 1983).

2.1.1 Struktur hati

Hati dibungkus oleh kapsul tipis yang disebut dengan kapsul *Glisson*. Kapsul ini terdiri dari jaringan kolagen, fibroblas dan pembuluh darah vena yang kecil. Kapsul tersebut lebih tipis di sekitar daerah hilus tempat masuknya vena porta dan tempat keluarnya saluran empedu di hati. Unit fungsional dari hati adalah lobulus yang berbentuk poligonal prismatic dengan ukuran 0,7 x 2 mm (Sage *et al.* 1999).

Dalam hati manusia terdapat 50.000 –100.000 lobuli, tersusun di sekeliling vena sentralis yang mengalirkan darah ke arah vena hepatica dan selanjutnya menuju

vena cava inferior. Lobuli itu pada dasarnya tersusun atas beberapa lembaran yang terdiri dari jajaran sel hati dan menyebar secara radial dari vena sentralis seperti jari roda (Soemohardjo *et al.*, 1983).

Semua lobulus berhubungan erat satu dengan yang lainnya pada seluruh permukaannya, sehingga batas antara lobulus tersebut tidak jelas. Pada daerah tertentu lobulus dipisahkan oleh jaringan penyambung dan pembuluh darah (Junqueira *et al.*, 1995). Pada daerah bagian pusat lobulus terdapat vena sentralis, sedangkan pada setiap sudut lobulus terdapat daerah segitiga *Kieman*. Pada daerah segitiga *Kieman* ini akan masuk darah ke dalam hati melalui vena interlobularis yang selanjutnya akan masuk ke dalam sinusoid (Fox, 1999).

2.1.2 Sel hati (hepatosit)

Sel hepatosit atau sel parenkim dengan ukuran diameter 10-30 μm , berbentuk *polyhedral cells* yang tersusun pada suatu lapisan dan tersebar di antara pembuluh darah atau sinusoid (Jones dan Schmucker, 1999). Lapisan hepatosit ini saling bersambungan satu dengan yang lainnya dan membentuk seperti dinding tembok. Di antara sel hati yang berdekatan serta di antara lembaran sel hati tersebut terdapat saluran empedu kecil yang bermuara dalam saluran empedu yang lebih besar yang terdapat dalam septa antara dua lobulus hati yang berdekatan. Di dalam septa tersebut juga terdapat vena porta yang menerima darah dari vena porta. Dari vena ini darah mengalir ke cabang sinusoid yang terletak di antara lembaran sel hati dan dari sini darah mengalir ke vena sentralis. Dengan demikian sel hati akan mendapat darah dari vena porta secara terus menerus. Selain vena porta di dalam septa interlobular juga



terdapat arteriola hepatica yang memberikan darah kepada jaringan septa dan sebagian lagi menuju sinusoid (Soemahardjo *et al.* 1983).

Zat yang terkandung di dalam darah yang terdapat di dalam sinusoid dapat terabsorpsi ke dalam hepatosit di sekitar sinusoid, hal ini dimungkinkan karena sinusoid mempunyai dinding tipis serupa dengan pembuluh kapiler (Bioulac-Sage *et al.*, 1999). Sinusoid di kelilingi dan disokong oleh selubung serabut retikuler halus yang penting untuk mempertahankan bentuknya. Sinusoid venosa dibatasi oleh dua jenis sel yaitu sel endotel yang khas dan sel *Kupffer* yang sebenarnya adalah sel retikuloendotelial dan mampu mengadakan fagositosis terhadap benda asing yang terdapat di dalam darah. Sel endotel yang membatasi sinusoid venosa tersusun sedemikian rupa sehingga dinding dari sinusoid itu sangat *porous*. Di bawah dinding sinusoid ini, yaitu di antara sel endotel dengan sel hati terdapat satu ruangan yang amat sempit yang disebut rongga dari *Disse*. Karena *porous* dinding sinusoid tersebut maka zat yang ada dalam plasma dapat bergerak dengan bebas ke dalam rongga *Disse*, bahkan protein plasma pun dapat bebas berdifusi ke dalam rongga tersebut. Di dalam septa interlobular juga terdapat sejumlah besar saluran getah bening terminal yang mempunyai hubungan langsung dengan rongga dari *Disse*. Dengan demikian cairan yang berlebihan yang ada dalam rongga *Disse* akan dialirkan melalui saluran getah bening tersebut (Soemohardjo *et al.*, 1983).

Hepatosit di dalam lobulus dibedakan atas 3 zona yaitu zona perifer, zona sentral dan zona sentrilobuler. Hepatosit yang terdapat pada zona perifer terletak di sekitar segitiga *Kiernan* yang pertama kali menerima darah dan zat yang terkandung di dalamnya. Selanjutnya darah akan diabsorpsi oleh sel hepatosit yang terdapat pada zona sentral dan sentrilobuler. Pada zona ini sel hepatosit akan menerima darah dengan

kadar zat yang terkandung di dalamnya lebih rendah dibandingkan dengan sel hepatosit yang terletak pada zona perifer. Darah dalam sinusoid yang terdapat di sekitar zona sentrilobuler akan keluar dari hati melalui vena hepatica (Bioulac-Sage *et al*, 1995).

Di dalam sel hati terdapat organel yang terdiri dari mitokondria, retikulum endoplasma, bahan organel (tetes lemak, glikogen), komplekss *Golgi* dan lisosom dengan satu atau dua inti bulat yang mempunyai satu atau dua anak inti yang khas. Retikulum endoplasma pada hati ada yang kasar dan halus yang dalam keadaan normal berbentuk saluran-saluran intra seluler. Sel hati mempunyai banyak mitokondria, lebih kurang 2.000 buah dengan bentuk sferis atau ovoid. Membran terdiri atas dua lapis, dimana bagian dalam terinvaginasi. Protein mitokondria hati secara terus menerus diperbaharui seperti pada sel lainnya. Sel hati banyak mengandung enzim, terutama dari siklus asam sitrat yang terlibat dalam β oksidasi asam lemak untuk menghasilkan ATP (Jones dan Schmuker, 1999).

2.1.3 Fungsi hati

Hati merupakan organ terbesar di dalam tubuh, yang mempunyai fungsi banyak sekali. Tiga fungsi dasar hati adalah: (1) Pembentukan dan sekresi empedu yang bermuara ke dalam usus halus. (2) Berperan pada aktivitas metabolisme yang berhubungan dengan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein. (3) Menyaring darah untuk membuang bakteri dan benda asing lain yang masuk ke dalam darah dan lumen usus (Fox, 1999; Ganong, 2001).

Interpretasi yang abnormal dari tes fungsi hati adalah merupakan suatu problem bagi para klinisi. Pemeriksaan fungsi hati yang sering dilakukan adalah *alanin transaminase* (ALT), *aspartate transaminase* (AST), *alkaline fosfatase* (ALP),

gamaglutamil transferase (Gama-GT), bilirubin serum, waktu protrombin dan albumin serum. Pemeriksaan fungsi hati tersebut menggambarkan fungsi hati yang berbeda, dalam hal ekskresi anion (bilirubin), integritas hepatoseluler (transaminase), pembentukan dan pengeluaran dari empedu (bilirubin dan ALP) dan sintesis protein (albumin dan fibrinogen) (Lindi dan Hyde, 2003).

Di samping ketiga fungsi di atas, hati masih mempunyai fungsi yang lain yaitu sebagai penyimpanan metabolit-metabolit dan penyimpanan vitamin seperti vitamin A.

Enzim transaminase

Enzim transaminase terdiri dari *serum aspartate aminotransferase* (AST) atau *glutamic oxaloacetic transaminase* (GOT) dan *serum alanine aminotransferase* (ALT) atau *glutamic pyruvate transaminase* (GPT).

Enzim GOT berperan sebagai katalisator pada reaksi : alanin + α -ketoglutarat \rightarrow oksaloasetat + glutamate. Sedangkan enzim GPT berfungsi sebagai katalisator pada reaksi : alanin + α -ketoglutarat \rightarrow piruvat + glutamat (Rosalki dan McIntyre, 1999).

Enzim GOT dalam konsentrasi yang tinggi banyak terdapat di dalam hati, jantung, otot rangka, ginjal, pankreas, dan sel darah merah. Apabila terjadi kerusakan dari jaringan tersebut mengakibatkan enzim ini akan keluar dari sel dan masuk ke dalam darah sehingga konsentrasi GOT dalam darah akan meningkat. Enzim GOT ini terdiri dari dua isoenzim yang satu terdapat di dalam sitoplasma dan yang lain terdapat di dalam mitokondria. Sedangkan enzim GPT dengan konsentrasi yang tinggi terdapat di dalam sel hati dan pada jaringan atau organ lain dengan konsentrasi yang rendah. Enzim ini hanya terdapat di dalam sitoplasma dan apabila terdapat enzim GPT dengan konsentrasi yang tinggi di dalam serum menunjukkan kerusakan dari sel hati. Pada hepatitis C kronik terjadi peningkatan kadar GPT di dalam serum, mulai dari yang

sedikit meningkat sampai sedang dan sering tanpa peningkatan enzim GOT (Rosalki and McIntyre, 1999).

Dari hasil observasi bahwa seseorang yang terinfeksi VHC tetap eksis dengan kadar enzim GPT serum normal, hal ini dapat terlihat pada donor darah sukarela yang terlihat sehat tetapi setelah dilakukan pemeriksaan anti-VHC ternyata positif. Sejumlah lebih kurang 65 % pada donor darah dengan anti-VHC positif dan *Recombinant ImmunoBlot Assay* (RIBA) positif dalam keadaan viremia, terdapat kadar GPT darah normal sedangkan sisanya (35 %) diperkirakan dengan tingkat viremia yang rendah (di bawah kadar yang tidak terdeteksi) atau telah sembuh. Kadangkala konsentrasi GPT di dalam darah berfluktuasi keluar dari kisaran normal, yang nilainya meningkat sampai 1.5 dari batas atas nilai normal (Rossini *et al.*1995).

Infeksi VHC dengan konsentrasi enzim GPT dalam darah berada dalam batas normal dengan kriteria sebagai berikut: 1) Antibodi anti-VHC positif, 2) RIBA positif atau terdeteksinya RNA-VHC, 3) Konsentrasi GPT serum tetap normal (Chopra, 200).

Antibodi hepatitis C yang positif pada seseorang, menggambarkan adanya kontak dengan VHC sebelumnya. Terdapatnya antibodi yang positif terhadap virus hepatitis C tersebut tidak bersifat protektif terhadap seseorang. Antibodi hepatitis C yang positif disertai dengan kadar enzim GPT yang abnormal merupakan bukti yang kuat bahwa seseorang tersebut terinfeksi VHC (Limdi, 2003).

2.2 Virus hepatitis-C

Virus hepatitis C (VHC) adalah virus RNA untai tunggal, termasuk famili *Flaviviridae*, dengan genom untai positif, berukuran kecil dengan diameter 30-60 nm, mempunyai kapsul dan terdiri dari sekitar 9500 nukleotida serta mengkode suatu

poliprotein yang terdiri dari sekitar 3010-3033 asam amino, dengan panjang diperkirakan 9,5 Kh yang mengandung satu *open reading frame* (ORF) besar. Pada kedua ujung ORF terdapat regio yang tidak ditranslasi yaitu pada ujung 5' dan 3'. VHC ini mempunyai organisasi genetik seperti *Flavivirus* dan *Pestivirus*, yang kemudian diketahui bahwa organisasi genetik VHC ini lebih mendekati *Pestivirus* (Houghton *et al.*, 1994; Soetjipto, 1997; Lauer dan Walker, 2001; He *et al.*, 2003).

Apabila ORF ini ditranslasi akan menghasilkan sebuah poliprotein yang terdiri dari 3010 – 3033 asam amino, yang kemudian apabila dipecah oleh protease dari *host* dan VHC akan menjadi beberapa bagian protein virus (Yamada *et al.*, 1994).

Organisasi genetik VHC, ujung terminal amino dari poliprotein disebut sebagai protein structural (*core* dan *envelope*) sedangkan sisanya sebagai protein non-struktural (NS) yang dilibatkan dalam proses maturasi dan replikasi dari VHC. Mulai dari amino sampai karboksi terminal dari poliprotein menyandi sebagai C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Polipeptida *core* atau *nucleocapsid* (C protein) VHC adalah ujung terminal poliprotein, kemudian diikuti oleh dua buah *envelope* glikoprotein (E1 dan E2), yang dipecah oleh satu atau lebih protease dari *host*. P7 adalah sebuah polipeptida kecil yang belum diketahui fungsinya, dihasilkan dari pemecahan E2 (Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994). Urutan selanjutnya berbatasan dengan NS2/3 protease, melalui autokatalitik menjadi NS2 dan NS3 yang matang. NS3 juga suatu protease yang bertanggung jawab terhadap pemecahan polipeptida NS: NS4A, NS4B, NS5A dan NS5B. Ujung 5' UTR mempunyai peranan penting pada permulaan translasi sedangkan ujung 3' UTR penting untuk replikasi dari VHC.

2.2.1 Sejarah penemuan VHC

Menjelang akhir tahun 1980 jumlah kasus yang cukup signifikan ditularkan secara parenteral dari virus hepatitis yang belum dapat diketahui jenis virusnya dan baru kemudian diketahui penyebab hepatitis tersebut sebagai virus hepatitis A, virus hepatitis B dan virus hepatitis D (Clarke, 1997).

Virus hepatitis non-A, non-B (NANB) merupakan penyebab lebih dari 90% hepatitis pasca transfusi darah dan 10% penderita yang mendapat transfusi darah terinfeksi virus hepatitis NANB (Alter *et al.* 1975).

Setelah ditemukan virus hepatitis A dan virus hepatitis B pada akhir tahun 1960 dan permulaan tahun 1970, dengan proporsi yang lebih banyak lagi kasus penyebab hepatitis akut dan hepatitis kronik masih belum jelas penyebabnya sehingga penderita yang terinfeksi dengan virus itu disebut dengan suspek hepatitis non-A dan non-B. Pada tahun 1989 suatu kelompok peneliti dari *Chiron Corporation* menemukan sebuah klon molekuler dari seekor simpanse terinfeksi virus yang dihubungkan dengan hepatitis non-A non-B (NANBH), akhirnya diketahui bahwa sebagai penyebab hepatitis tersebut dapat diidentifikasi sebagai virus hepatitis C (Choo *et al.* 1989). Pada penelitian itu diambil plasmanya yang mengandung konsentrasi tinggi virus NANB, kemudian disentrifus sehingga terdapat ekstrak virus berupa asam nukleat total, pada saat itu belum diketahui apakah genom tersebut berupa virus DNA atau RNA. Bahan ekstrak tersebut didenaturasi, kemudian disintesis dengan *random primers* sehingga DNA menjadi cDNA, dan produk ini dimasukkan pada vektor λ gt11. Di dalam vektor protein yang diduga NANB diperjelas sebagai perpaduan protein dengan β -galaktosidase. Klon yang sudah dimasukkan tersebut disaring bersama serum penderita dengan NANBH, sehingga berhasil mengisolasi sebagian genom virus penyebab

hepatitis yang mengkode epitop 5.1.1. Selanjutnya epitop 5-1-1 merupakan karakteristik yang didapatkan dalam serum pada kebanyakan penderita dengan hepatitis non-A, non-B (Choo *et al.*, 1989).

2.2.2 Struktur genom virus hepatitis-C

2.2.2.1 Sifat fisika-kimia virus hepatitis-C

Dengan pemeriksaan ultrasentrifugasi dapat diketahui sifat fisik dari virus hepatitis C dimana terdapat dua populasi partikel dalam serum penderita yang terinfeksi virus hepatitis C kronik yaitu pada densitas tinggi (1,186-1,213 g/ml) dan densitas rendah (1,099-1,127 g/ml). Partikel virus pada densitas tinggi berhubungan dengan imunoglobulin dan partikel virus dengan densitas rendah berhubungan dengan akumulasi perubahan basa pada regio *hypervariable* (HVR) *envelope* E2 genom VHC (Choo *et al.*, 1995).

Beberapa penelitian mengemukakan bahwa virus hepatitis C adalah dari *very low density*, yang menyerupai *low density lipoprotein* (LDL). Hal inilah yang menyokong dugaan bahwa VHC terdiri dari kadar lipid yang tinggi, dengan demikian genom VHC tersebut dapat diikat dengan antibodi. Menurut laporan dari hasil penelitian yang bersangkutan dengan hal tersebut bahwa genom VHC dapat diikat dengan anti-LDL antibodi. Sehingga dengan demikian apabila sifat fisik dari VHC dihubungkan dengan LDL, VHC akan mempergunakan reseptor LDL di hati sebagai tempat masuk ke dalam sel hati (Yoshikura *et al.*, 1994).

Virus hepatitis C yang mengandung kadar lipid tinggi ini akan sensitif terhadap kloroform, apabila diberi kloroform virus akan menjadi inaktivasi. Virus ini juga

dapat di-inaktivasi dengan formalin, panas (100°C selama 5 menit; 60°C selama 10 jam) dan sinar ultraviolet (Feinston *et al.* 1983; Hollinger, 1991; Koff, 1993).

Dari hasil penelitian lainnya dilaporkan bahwa sifat fisik lainnya menunjukkan bahwa densitas genom VHC yang utuh adalah 1,08 g/ml dan nukleokapsid adalah 1,25 g/ml yang diteliti dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas sukrosa (Myamoto *et al.*, 1992). Pada kalium bromida, densitas VHC sedikit lebih tinggi yaitu 1,115 g/ml (Takahashi *et al.*, 1992), sedangkan Bradley *et al.* (1991) melaporkan densitas VHC yang infeksius (diukur dengan inokulasi pada *chimpanzee*) adalah 1,09 – 1,11 g/ml pada sukrosa (Bradley *et al.* 1991).

2.2.2.2 Morfologi VHC

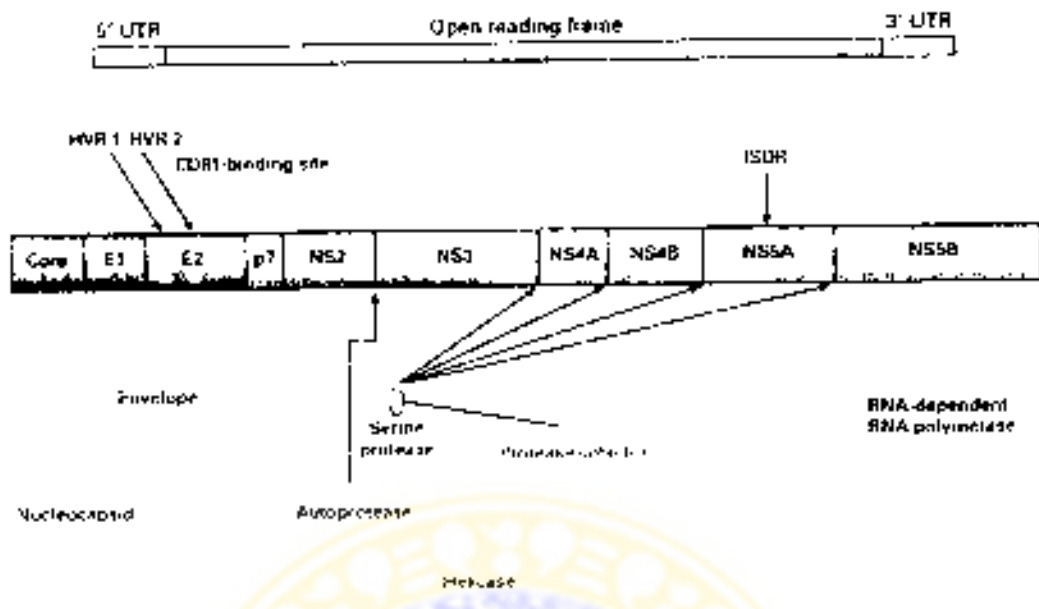
Secara visualisasi morfologi dari VHC sangat sulit dilakukan, kecuali satu laporan penelitian mengemukakan partikel VHC dapat ditunjukkan dengan menggunakan mikroskop elektron.

Dengan menggunakan mikroskop *immunoelectron* dilakukan penelitian terhadap dua sampel plasma yang mengandung RNA-VHC dengan titer yang tinggi dan menggunakan antibodi monoklonal dan poliklonal terhadap protein pembungkus VHC dapat memperjelas morfologi VHC. Partikel dari VHC berbentuk sferis dengan diameter 55–65 nm dengan proyeksi berbentuk runcing sepanjang 6 nm dan partikel *core* 30–35 nm. Partikel ini dijumpai pada fraksi 1,14–1,16 g/ml sesudah sentrifugasi dengan gradien densitas sukrosa. Partikel ini ditemui pada donor darah yang terinfeksi oleh VHC dan mempunyai gambaran morfologi yang serupa dengan flavivirus (Kaito *et al.*, 1994).

Partikel antigen *core* dari VHC juga dapat dilihat dengan mempergunakan mikroskop *immunoelectron* yang berbentuk *icosahedron* dengan diameter 33 nm. Dengan mempergunakan gradien densitas kalium bromida dijumpai aktivitas antigen *core* VHC dan pada suatu fraksi densitas 1,115 g/ml. Berat molekul dari protein *core* antigen diperkirakan sekitar 26 kDa, sehingga disebut sebagai protein p26. Partikel ini diperoleh setelah sebanyak 720 ml plasma donor darah terkumpul dengan aktivitas antigen *core* VHC titer tinggi yang dilarutkan dalam detergen Tween 80 (Takahashi *et al.* 1992).

2.2.2.3 Struktur dan organisasi genetik VHC

Virus hepatitis C termasuk anggota dari famili *Flaviviridae* yang terdiri dari molekul RNA untai positif dengan lebih kurang 9600 nukleotida. Genom VHC ini mempunyai *noncoding region* (NCR) ujung 5' dan 3', mengandung *open reading frame* (ORF) panjang yang menkode sebuah poliprotein yang terdiri dari lebih kurang 3010 asam amino (Lauer *et al.* 2001; He *et al.* 2003) (Gambar 2.1).



Gambar 2.1: Skema organisasi genom VHC (Lauer dan Walker, 2001).

Poliprotein diproses secara *co-translationally* dan *post-translationally* oleh protease inang dan virus menjadi lebih kurang 10 bagian, protein struktural (*core*, E1, E2 dan p7) dan protein non-struktural (NS) yaitu NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, dan NS5B (Varaklioti *et al*, 2002; Walewski *et al*, 2001; Xu *et al*, 2001).

Genom VHC terdiri dari 3 bagian yaitu dua bagian yang tidak ditranslasi (*untranslated region* = UTR) adalah regio 5'-UTR di ujung 5' dan 3'-UTR di ujung 3', dan satu bagian regio yang ditranslasi yaitu *open reading frame* (ORF). Sehingga ORF diapit oleh dua *region* yang tidak ditranslasi pada kedua ujungnya. Regio 5' UTR terdiri dari 329-341 nukleotida dengan persamaan urutan nukleotida lebih dari 92% di antara isolat, sehingga bagian ini merupakan bagian yang *conserved* dan merupakan target amplifikasi dengan PCR. Ujung terminal 3' menunjukkan beberapa variasi, baik pada panjang maupun urutan nukleotidanya, pada beberapa isolat pada regio ini dapat dijumpai ujung *poly-(U)* atau *poly-(A)* pada isolat lainnya (Van der Poel *et al*, 1994).

2.2.3 Komposisi protein VHC

2.2.3.1 Protein struktural

Struktural protein pertama adalah *core protein* yang berasal dari N-terminal poliprotein. Ini merupakan *nucleocapsid* virus dan sangat mirip dengan virus RNA (Baumert *et al.*, 1998). Letak dari *core protein* ini sebagian terdapat di dalam sitoplasma pada membran eksternal dari retikulum endoplasma dan sebagian lagi terletak di dalam inti, seperti kerucut terpotong (Santolini *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995).

Beberapa hasil penelitian tentang pembelahan dari *core protein* telah dapat diidentifikasi pada sel kultur, sedangkan hubungan dengan perbedaan bentuk infeksi belum bisa dibuktikan. Penelitian terhadap *core protein* ini sudah banyak dilakukan dan kelihatannya mempunyai peranan dalam berbagai macam *cellular signalling pathway* dan onkogenesis (Chang *et al.*, 1998; Lac dan Ware, 2000).

Fungsi biologi dari *core protein* terdapat di dalam nukleus, hal ini juga terjadi pada virus dalam hal replikasi, tetapi masih belum jelas. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa penekanan oleh *core* akan terjadi gangguan terhadap beberapa *host genes* maupun interfensi dalam ekspresi pada infeksi dari genom virus hepatitis B dan virus *human immunodeficiency*. Pada observasi terhadap *core* ini didapatkan hal yang menarik yaitu terjadi penekanan yang spesifik terhadap sistem apoptosis dari kematian sel dan juga adanya interaksi yang spesifik terhadap *lymphotoxin- β receptor* (LTR) yang terdapat di dalam sitoplasma, yang merupakan famili dari *tumour necrosis factor* (TNF). Semenjak LTR ini diketahui termasuk dalam *apoptotic signalling*, inilah yang sangat menyokong bahwa *core* mempunyai fungsi dalam imunomodulator dan



berperan dalam terjadinya infeksi yang persisten dan berperan dalam patogenesis dari penyakit (Clarke, 1997).

Dua protein berikutnya adalah glikoprotein *envelop* yaitu E1(gp33) dan E2/NS1(gp70) (Houghton *et al.*, 1993; Houghton *et al.*, 1994; Van der Puel *et al.*, 1994).

Ujung terminal E2 mengandung 28 segmen asam amino yang disebut *hypervariable* (HV *region*) (Bradley *et al.*, 1993). Protein struktural virus, *core protein* p16-22 (dikode pada *region C*) dan dua glikoprotein pembungkus (*envelope*), gp33-35 (regio E1) dan gp 70-72 (regio E2/NS1) dipecahi dari poliprotein oleh enzim *signal peptidase* sel inang pada lumen *endoplasmic reticulum* (Cuthbert, 1994; Shimotohno *et al.*, 1995; Lahmann *et al.*, 1996).

Envelope glikoprotein E1 dan E2 terdapat pada permukaan partikel VHC dan merupakan tempat reseptor seluler, karena sifat fisik dari VHC dihubungkan dengan *low density lipoprotein* (LDL) atau *very low density lipoprotein* (VLDL) di dalam serum. oleh sebab itu reseptor LDL di hati juga merupakan reseptor dari VHC untuk dapat masuk ke dalam hati (Scarselli E *et al.*, 2002; Pavio N dan Lai MMC, 2003).

E2/NS1 merupakan protein pembungkus disebut sebagai regio *hypervariable* (HVR) yang sangat bervariasi, sangat cepat berubah di antara isolat satu dengan lainnya bahkan di antara agen yang sama yang diisolasi sepanjang waktu pada seorang penderita (Dienstag dan Isselbacher, 1994). Menurut Hijikata *et al.*, (1991) seperti dikutip Omata and Kato (1994), pada isolat Jepang terdapat dua HVR yaitu asam amino 391-400 (HVR1) dan 474-480 (HVR2). Dengan adanya variabilitas tinggi pada HVR memungkinkan virus menghindari respons imun inang terhadap protein *envelope* VHC (Dienstag dan Isselbacher, 1994), menghasilkan *escape mutants* dan akibatnya terjadi infeksi yang persisten (Weiner *et al.*, 1992; Taniguchi *et al.*, 1993).

Suatu penelitian dengan mengkultur VHC, merupakan suatu alternatif untuk mencari tempat reseptor untuk VHC telah dilakukan dengan mempergunakan bagian yang berbentuk kerucut dari VHC berupa glikoprotein, yang telah dilarutkan untuk mengikat sel manusia. Dengan mempergunakan E2 yang telah dilarutkan dalam penelitian tersebut, telah teridentifikasi bahwa CD81 sebagai reseptor dari VHC, dengan demikian CD81 bertanggung jawab untuk mengikat E2 (Scarcelli *et al.*, 2002).

2.2.3.2 Protein non-struktural (NS)

Setelah E2 terdapat urutan protein NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A dan NS5B yang mempunyai berbagai fungsi di antaranya replikasi virus RNA atau proses proteolitik dari poliprotein (De Francesco *et al.*, 2000)

Protein NS2 merupakan protein transmembran yang mempunyai terminal karboksi melintasi lumen dari *envelope receptor* (ER) sehingga terminal amino terletak di dalam sitosol (Santolini *et al.*, 1995).

Beberapa peneliti mengemukakan bahwa NS2 dihubungkan dengan protein struktural sedangkan fungsi biologi dari NS2 ini masih belum jelas. Juga disebutkan bahwa proses proteolitik dari regio poliprotein ini sebagian tidak memperlihatkan proses proteolitik (Clarke, 1997).

NS2 dan NS3 adalah protease virus yang bertanggung jawab untuk pembelahan dari semua protein non-struktural (Grakoui *et al.*, 1993; Hijikata *et al.*, 1993).

Regio protein NS3 mempunyai ukuran kurang lebih 70 kDa dan mempunyai beberapa perbedaan dalam fungsi bio-kemikal. Regio NS3 mengandung urutan nukleotida untuk dua fungsi enzimatis yang berbeda yaitu pada ujung amino terminal untuk protease dan di dekatnya untuk helikase (Bradley *et al.*, 1993).

Setidaknya dua proteinase yang dikode virus dibutuhkan untuk proses sintesis protein non-struktural yaitu *zinc-dependent metalproteinase* mengelilingi *domain* NS2 dan bagian amino terminal NS3, yang sangat penting untuk memotong ikatan NS2/3 dan proteinase tipe serine yang terletak pada ujung amino *domain* NS3 dan dibutuhkan untuk memotong semua titik pemotongan tepat di bawah ujung karboksi NS3 (Gambar 2.1) (Cuthber, 1994; Shimotohno *et al*, 1995; Lohman *et al*, 1996). Meskipun, dua bagian *domain* NS3 mengandung aktivitas proteolitik, terdapat perkecualian bahwa pemotongan ikatan NS5A/5B hanya terjadi bila terdapat NS4A. Peptida panjang yang terdiri dari 54 asam amino ini dapat mempengaruhi atau memodulasi aktivitas proteolitik dari enzim ini pada *cis* dan *trans*, mungkin dengan cara membentuk kompleks NS3/NS4 yang stabil. Modulasi aktivitas proteinase mungkin merupakan suatu cara untuk mengendalikan ekspresi dan replikasi genom VHC (Lohmann *et al*, 1996). Mekanisme dari katalisis, seperti pembelahan pada sambungan NS2/3 mungkin melepaskan amino terminal bebas dari NS3 protease serin yang merupakan langkah sangat penting pada replikasi VHC.

Region NS4 terdiri dari dua protein yaitu NS4A dan NS4B, kedua protein ini dihasilkan dari poliprotein virus oleh serin protease NS3 yang dibelah pada *cis* NS3/NS4A dan *trans* NS4A/NS4B dan pertemuan NS4B/NS5A. NS4A adalah sebuah protein dengan berat molekul kecil, lebih kurang 8 kDa dan mempunyai fungsi beberapa macam seperti tempat replikasi kompleks dan sebagai kofaktor untuk protease NS3. Sedangkan mengenai fungsi dari NS4B tidak jelas, mungkin mempunyai peranan di dalam replikasi kompleks dari VHC (Clarke, 1997).

Regio NS5 terdiri dari dua protein yang besar yaitu NS5A (p56) dan NS5B (p65) yang dipecah sebagai hasil yang matang akibat pemecahan dari protease NS3 pada

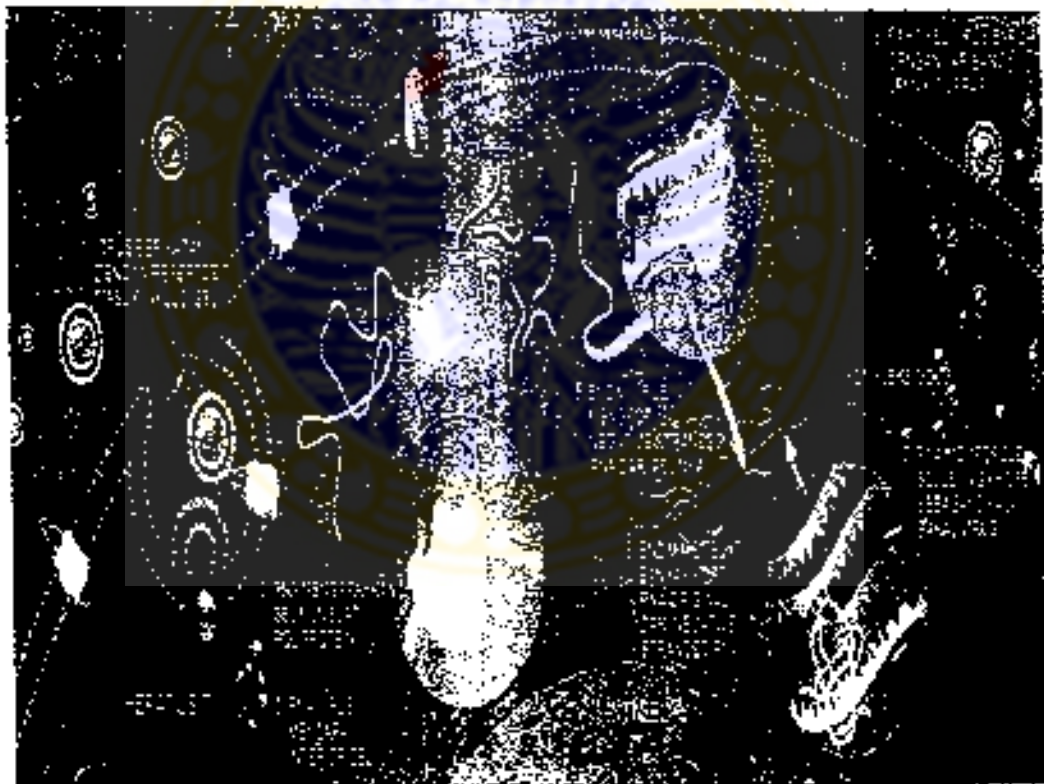
sambungan NS4. Pada permulaan penelitian didapatkan bahwa prekursor dari NSSA (p58) ada yaitu dari pelepasan amino terminal menghasilkan NSSA (p56) matang dan protein NS5C (P2). Fungsi dari NSSA ini masih belum jelas betul, berkemungkinan mempunyai peranan dalam siklus replikasi. Hasil penelitian terbaru melaporkan bahwa keberhasilan pengobatan dengan interferon (IFN) tergantung dari kerentanan virus. Juga dilaporkan bahwa IFN sensitif terhadap mutasi yang terjadi pada regio NSSA, sehingga kemudian daerah NSSA disebut sebagai *IFN sensitivity determining region* (ISDR) (Clarke, 1997).

2.2.4 Proses replikasi VHC

Terdapat kemajuan dalam hal penelitian terhadap VHC dimana simpanse dapat dijadikan sebagai model binatang percobaan untuk infeksi VHC dan penyakit yang ditimbulkannya, sehingga memberikan kesempatan untuk mempelajari beberapa aspek dari gen virus dan replikasinya. Sebagai contoh, antigen VHC hanya terdapat di dalam hepatosit dan sel endotelial, yang di dalam sel terdapat dalam sitoplasma (Krawczynski *et al.*, 1992). Kebanyakan dari hasil penelitian dengan pewarnaan sitoplasma hepatosit memperlihatkan terjadinya replikasi dari virus, pada beberapa penelitian lain juga memperlihatkan adanya infiltrasi virus ke dalam sel mononuklear (Blight *et al.*, 1994; Nouri-Aria *et al.*, 1995) dan sedikit terdapat pada sel epitel bilier (Nouri-Aria *et al.*, 1995).

Pada waktu VHC menginfeksi sel inang akan terjadi interaksi antara suatu reseptor yang terdapat pada permukaan sel inang dengan protein VHC yang berfungsi terhadap proses penetrasi ini. Protein virus yang berfungsi untuk itu adalah protein E2, dan juga pada daerah protein E2 ini merupakan tingkat mutasi virus yang tinggi, sehingga

daerah tersebut mendapat tekanan oleh spesifik antibodi terhadap virus. Pada protein E2 juga terdapat daerah yang berfungsi untuk mengikat CD81, merupakan sebuah *tetraspanin expressed* yang terdapat pada hepatosit dan sel B yang berfungsi sebagai reseptor atau koreseptor untuk virus (Lauer & Walker, 2001). Reseptor lain yang memungkinkan VHC dapat masuk ke dalam sel hati yaitu melalui reseptor LDL. Hal ini berdasarkan pada penemuan dimana sifat fisik VHC menyerupai lipoprotein, yaitu partikel VHC yang kaya dengan lemak sehingga identik dengan LDL. Melalui beberapa reseptor tersebut VHC akan masuk ke dalam sel hati, yang merupakan target VHC (gambar 2.2) dan di dalam sel hati virus akan memperbanyak diri (replikasi).



Gambar 2.2 Replikasi VHC di dalam sel hati (Bicegli & Bacon, 1999).

Keberhasilan untuk mengkultur VHC pada sel kultur telah dilaporkan oleh Beach dan kawan-kawan. menanamkan beberapa tipe berbeda dari VHC yang berasal dari plasma dan telah dimurnikan secara *sucrose gradient centrifugation*. Setelah lebih dari 30 kali percobaan mereka dapat memperoleh titer 10^4 - 10^5 genom virus/ml, yang dapat diperiksa atau ditentukan dengan cara *polymerase chain reaction* (PCR) sehingga dapat dilakukan amplifikasi dari VHC (Brown *et al.*, 1994)

Pada saat virus memasuki sel hepatosit melalui reseptornya (gambar 2.2: no 1), VHC akan melepaskan pembungkus lemak dan protein *envelope*-nya sehingga RNA-VHC akan bebas mencari bagian interior sel hepatosit (Gambar 2.2: no 2). Enzim di dalam sel akan memakai RNA-VHC ini sebagai cetakan untuk membuat protein virus yang besar yaitu poliprotein (Gambar 2.2: no 3) dan selanjutnya akan dipecah menjadi sejumlah protein kecil sebagai bahan pembentuk partikel virus yang baru serta membantu mengkopi RNA virus (Gambar 2.2: no 4) (Di Bisceglie & Bacon, 1999).

Seperti pada virus RNA lain dengan untai positif, protein virus yang dibutuhkan untuk replikasi VHC sebelumnya harus ditranslasi oleh enzim inang dari virion RNA. Struktur ujung 3' dari genom RNA diduga dapat dikenali oleh RNA polimerase virus yang sudah ditranslasi, mungkin protein NS5 dan transkripsi *negative-sense* RNA berlangsung dari ujung 3' genom virus menuju ujung 5'. Setelah untai negatif dibentuk, genom RNA *positive-strand* akan akan ditranskripsi dengan memakai untai negatif sebagai cetakan (Yoshikura *et al.* 1996; Di Bisceglie & Bacon, 1999) (Gambar 2.2: no 5,6)

Diduga replikasi VHC berlangsung melalui pembentukan untai negatif RNA sebagai perantara . Telah dilaporkan beberapa urutan nukleotida lengkap VHC dengan

satu *open reading frame* yang besar untuk proses translasi yang didahului pada ujung 5' *Untranslated Region* (5' UTR) (Choo *et al.* 1991; Okamoto *et al.* 1992).

Regio 5'UTR terdiri dari nukleotida panjang 324-340 yang merupakan urutan nukleotida paling *conserved* di antara isolasi VHC yang berbeda. Beberapa penelitian menduga bahwa ujung 5'-UTR VHC ini mengandung elemen negatif dan negatif sebagai pengendali proses translasi serta mungkin memegang peran pada patobiologi infeksi VHC kronik (Yan *et al.* 1992).

Pada ujung 5' UTR yang mempunyai panjang 341 nt, terdapat bagian genom VHC tempat proses translasi dimulai. Lokasi 5' UTR yang tepat di depan ORF memiliki peranan sangat penting pada proses replikasi atau sintesis protein VHC. Pengendali (regulator) replikasi VHC terdapat pada 5' UTR. Hal ini dimungkinkan oleh karena sifatnya *conserved*, letaknya langsung di depan ORF, serta memiliki kodon inisiator untuk mengawali atau inisiasi replikasi dan sintesis protein virus (Han *et al.* 1991).

Beberapa penulis lain mengemukakan bahwa setelah RNA untai negatif (*complement*) dikopi dari RNA-VHC aslinya, maka untai negatif ini selanjutnya berperan sebagai cetakan (*template*) untuk pembentukan untai positif RNA seperti virus aslinya. RNA-VHC untai positif yang baru ini akan bergabung dengan partikel virus yang baru, bersama dengan protein struktural, di kompleks Golgi (Gambar 2.3: no 7). Partikel virus yang lengkap akan dilepas dari sel hepatosit yang terinfeksi, sesudah mendapat pembungkus lemak (Gambar 2.3: no 8) (Di Bisceglie & Bacon, 1999).

Hasil dari pengkajian yang terbaru melaporkan bahwa infeksi VHC adalah sebuah proses dinamik yang unik dimana satu virus mempunyai waktu paruh hanya beberapa jam dan pukul rata sehari memproduksi virus lebih dari 10^{12} (Moradpour *et al.* 2001).

Persentase dari hasil positif adanya virus di dalam hepatosit dan intensitas dari pewarnaan bervariasi dari satu penelitian dengan penelitian lainnya yaitu berkisar 5% - 100%. Hal ini mungkin terjadi oleh karena perbedaan antibodi yang digunakan, fiksasi jaringan, prosedur pemeriksaan dan waktu lamanya infeksi ketika sampel jaringan didapatkan. Bentuk sel hati yang di dalamnya ada antigen VHC adalah sama dengan bentuk sel yang terlihat secara invitro yang menyokong adanya replikasi (Blight & Gowans, 1995).

2.2.5 Genotipe VHC

Secara analisis rangkaian genom VHC dari berbagai isolat yang tersebar di dunia telah memperlihatkan organisasi genetik yang konsisten dalam jumlah dan posisi dari UTRs, structural dan protein non-struktural dari virus. Tidak ada dua isolat dari virus tersebut yang mempunyai urutan yang sama, dan perbandingan klon dari bagian yang berbeda di dunia, yang telah dibagi dalam kelompok dengan kategori yang besar disebut dengan genotip (Kato *et al.*, 1990; Choo *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1992).

Genotipe VHC berarti terdapat keanekaragaman genom VHC yang ditemui pada isolat VHC berbeda, sedangkan *quasispecies* diartikan sebagai suatu keanekaragaman populasi genetik VHC yang dijumpai pada seorang individu yang terinfeksi VHC. Terdapat enam genotip dari VHC yang tersebar di dunia dan lebih dari 60 sub tipe, sedangkan sub tipe yang sering ditemukan adalah 1a, 1b, 2a, dan 2b. Evolusi dari bentuk genotip ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain faktor imun seseorang, bentuk infeksi, replikasi virus dan perpindahan penduduk (Chopra, 2001).

Ada 6 genotip yang teridentifikasi tersebut berdasarkan pada perbedaan rangkaian di dalam E1, NS4, *core* (Bukh *et al.*, 1994; Bhattacharjee *et al.*, 1995) dan *region* NS5 (Inomoto *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1992). Klon yang merupakan satu genotip mempunyai kesamaan secara keseluruhan kurang dari 70% dengan klon dari satu genotip lain (Simmonds *et al.*, 1993). Berbagai genetik di dalam satu genetik disebut sebagai subtipe, dimana klon dalam satu subtipe mempunyai kesamaan 70-80%.

Terdapat perbedaan distribusi genotip dan subtipe dari VHC di berbagai negara di dunia. dan penentuan genotip dan subtipe dari VHC ini, tidak diperlukan untuk diagnosis tetapi merupakan hal yang penting untuk menentukan respons terhadap pengobatan, dan lamanya pengobatan (Chopra, 2001; Strader *et al.*, 2004).

Terdapat 6 genotip dan subtipe dari VHC yang tersebar diseluruh dunia yaitu 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a, dan 6a, dan penyebaran genotip ini di dunia dapat dilihat pada (tabel 2.1).

Dari hasil penelitian epidemiologi memperlihatkan bahwa subtipe-1a, 1b, 2a, 2b, dan 3a tersebar diseluruh dunia (Bukh *et al.*, 1995). Sedangkan subtipe-1a dan 1b lebih menonjol di Utara dan Selatan Amerika maupun Eropah (Bukh *et al.*, 1993).

Subtipe-1b lebih banyak terdapat di negara Asia (Bukh *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Hadiwandowo *et al.*, 1994), dimana subtipe-1c telah ditemukan hanya di Indonesia (Hotta *et al.*, 1994) dan merupakan subtipe yang spesifik di Indonesia, dan subtipe-3b terdapat di Jepang, Tailan, Nepal dan Indonesia (Doi *et al.*, 1994).

Pada hasil penelitian di Surabaya melaporkan bahwa genotip subtipe-2a merupakan genotip terbanyak (52%) dari 2.3% donor darah sehat yang mempunyai anti-VHC positif, diikuti oleh subtipe-1b (15%), 1a (7%) dan subtipe yang unik di Indonesia yaitu 1c sebanyak 7%. Sedangkan pada pasien hemodialisis (anti-VHC

posisi) 76,3%) dengan subtype terbanyak adalah 1a dan 1b yaitu masing-masing 31%. Pada pasien kanker hati primer subtype-1b (57%) adalah yang terbanyak diikuti subtype-1c (19%), dan 2a sebanyak 5% (Soetjipto *et al.*, 1996).

Ditinjau dari keberhasilan pengobatan terhadap obat anti virus dilaporkan bahwa genotip 2 dan 3 mempunyai respons yang lebih baik dibandingkan dengan genotip 1. Peningkatan virulensi dari *strain* VHC ini ditentukan oleh molekuler yang spesifik dari VHC ini, sampai saat ini masih belum teridentifikasi (Farci *et al.*, 1999). Protein non-struktural NSSA memberikan hasil yang signifikan terhadap interferon yang dilaporkan dari Jepang dengan subtype-1b (Enomoto *et al.*, 1996).

Tabel 2.1 . Distribusi genotip VHC di dunia

Genotip	Distribusi VHC
1	Eropah Barat, Skandinavia, Eropah Timur, USA, Japan, dan Hongkong.
2	Eropah Barat, Skandinavia, USA, Japan dan Hongkong
3	Eropah Barat, Skandinavia dan USA
4	Timur Tengah dan Arab
5	Afrika Selatan
6	Hongkong

(Walsh dan Alexander, 2001)

Dari hasil penelitian juga telah dilaporkan bahwa beberapa genotip dari VHC lebih virulen, seperti subtype-1b dihubungkan dengan lebih tingginya frekwensi peningkatan

kadar transaminase serum dan lebih tingginya frekuensi terjadinya sirosis hati dibandingkan dengan subtype yang lain (Nousbaum *et al.*, 1995; Silini *et al.*, 1995).

2.3 Patogenesis infeksi VHC

Mekanisme terjadinya kerusakan sel hati akibat infeksi akut dan kronik oleh VHC masih belum jelas diketahui. Pada infeksi VHC primer, kerusakan sel hati bertepatan dengan terjadinya respons imun dari inang dan tidak karena infeksi dan replikasi virus. Replikasi virus yang persisten sering terjadi tanpa bukti dari kerusakan sel hati, inilah yang menyokong bahwa VHC tidak langsung sebagai sitopatik dan mekanisme imunitas dihubungkan dengan terjadinya kerusakan sel hati. Respons imun untuk melawan infeksi VHC mempunyai peranan yang sangat penting dalam patogenesis (Moradpour *et al.*, 2001; Loza *et al.*, 2001). Pada umumnya seseorang yang terinfeksi VHC dengan viremia yang persisten akan diikuti oleh berbagai tingkat peradangan hati dan fibrosis. Dari laporan hasil penelitian yang terbaru bahwa pada penderita dengan infeksi VHC kronik, hanya sejumlah kecil dari sel hepatosit yang menjadi infeksius tetapi diperkirakan lebih dari 50 % sel hati mengandung virus (Agnello *et al.*, 1998).

Adanya *regio hypervariable* (HVR) mengakibatkan VHC mampu mengadakan mutasi cepat untuk menghindari respons imun dari inang (Weiner *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1993; Dienstag *et al.*, 1994). Di samping itu VHC juga mempunyai sifat dapat membentuk *quasispecies*, yaitu suatu sifat dimana separuh molekul RNA-VHC dalam sirkulasi seorang penderita (berdasarkan analisis urutan nukleotida regio 5'UTR dan NS3/NS4 genom VHC) adalah identik, sedangkan sisanya mengandung suatu spektrum mutan yang berbeda satu dengan yang lainnya oleh satu sampai 4 nukleotida. Diduga partikel atau genom VHC yang mengalami defek ini bersama dengan regio

hypervariable F2 berperan pada mekanisme infeksi yang persisten dari VHC (Bradley *et al.*, 1993).

Sejumlah mekanisme telah dilaporkan untuk menerangkan ketidak mampuan dari respons imun untuk membersihkan atau meniadakan VHC yang telah menginfeksi seseorang, sehingga tetap menetap dalam tubuhnya dan menjadi infeksi VHC kronik.

Hal ini mungkin bisa disebabkan oleh beberapa faktor yaitu:

- (1). Faktor virus, dalam hal ini VHC yang telah menginfeksi manusia bersifat *quasispecies*
- (2). Terjadi mutasi yang berulang-ulang di daerah *envelope* dari genom VHC.
- (3). Kemungkinan adanya intervensi oleh VHC terhadap respons imun penderita (Kowdley, 1999).

Beberapa bukti telah dilaporkan oleh beberapa peneliti mengenai imunopatogenesis dari hepatitis C kronik. Hasil penelitian dari Mori *et al.*, 1994 (Jepang) tentang respons limposit terhadap antigen peptida dari VHC dengan cara menguji sel limposit. Respons proliferasi dari *peripheral blood lymphocytes* (PBL) tidak ada korelasinya dengan keadaan aktivitas biologi dari penyakit tersebut. Mereka juga mengukur secara invitro produksi antibodi terhadap VHC core dan NS3. Juga dilaporkan bahwa PBL dari penderita dengan kadar GPT yang rendah dan respons proliferasi sedikit akan menghasilkan antibodi. Untuk menjelaskan adanya perbedaan antara respons dari limposit dan aktivitas penyakit perlu penelitian lebih lanjut.

Menurut hasil penelitian dari Shimizu *etal.*, 1994 (Jepang), secara *immunohistoche-
mical* mendapatkan tingginya persentase dari sel-T yang menginfiltrasi hati pada hepatitis C kronik, dengan menemukan adanya reseptor V β 5.1 sel-T. Menurut analisa

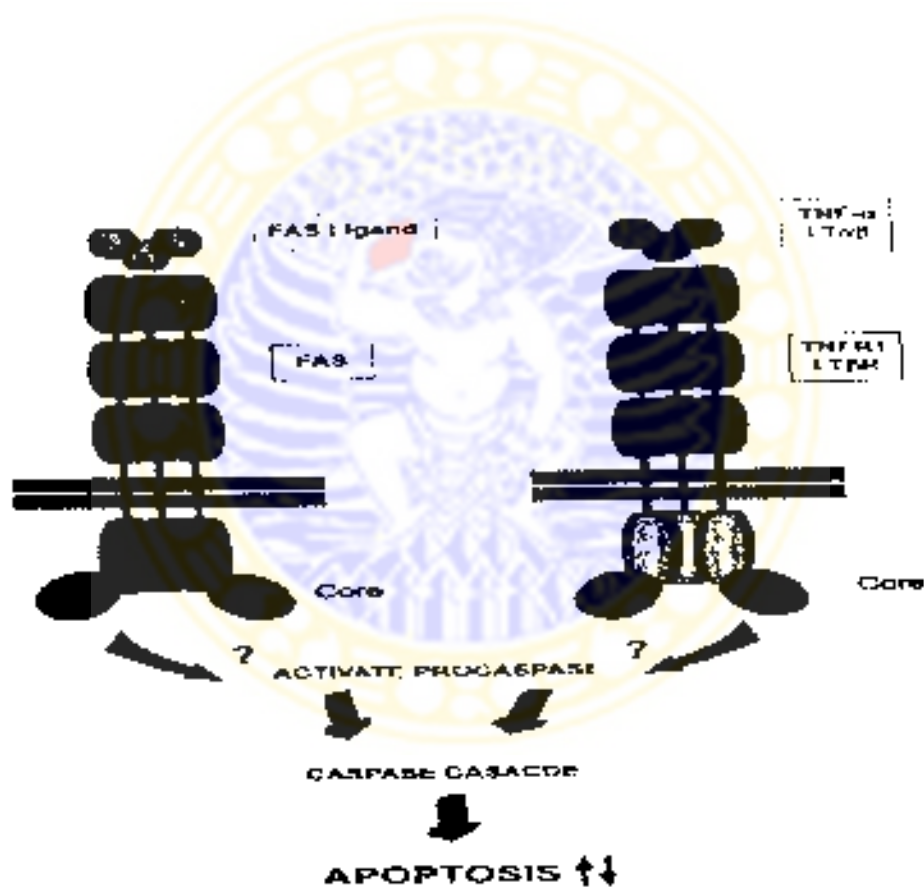
mereka dengan adanya sel-T dengan mempunyai reseptor seperti ini adalah khas untuk hepatitis C dan tidak ada pada hepatitis B, hepatitis autoimun dan sirosis bilier. Mereka juga memberikan sokongan bahwa adanya limfosit dengan reseptor VB5.1 sel-T mempunyai peranan dalam terjadinya hepatitis C kronis (Tsuji dan Chisari, 1994).

Menurut peneliti lain bahwa dengan adanya limfosit di dalam parenkhim hati merupakan suatu bukti bahwa terjadi kerusakan sel hati sebagai akibat respons imun. Dari hasil penelitian yang diamati pada infeksi VHC akut pada *chimpanzees* dan manusia sebagai kontrol dari respons imun terhadap VHC, terjadi reaksi untuk menenyapka VHC oleh sel-Tc (CD8+) dan sel-Th (CD4+) dengan adanya reaksi yang kuat dan persisten. Respons dari sel-CD4+ sangat kuat selama terjadi viremia sampai hilangnya virus (Gerlach *et al*, 1999; Lechner *et al*, 2000).

Respons yang relatif lemah dari sel-T CD8+ terjadi pada penderita dengan infeksi VHC kronis, pada keadaan viremia dan evolusi genetik dari virus, tetapi cukup menambah kerusakan pada hati sebagai akibat dari pengaruh sitokin yang dihasilkan oleh aktivasi dari sel imunokompeten (Koziel *et al*, 1995). Respons imun juga kurang efektif pada penderita hepatitis C kronik yang mengalami superinfeksi oleh genotip yang lain dari VHC (Kao *et al*, 1996).

Laporan terbaru mengemukakan bahwa beberapa protein virus terlibat dalam patogenesis penyakit hati dan penyebab resisten terhadap terapi interferon. Protein core dari VHC yang berfungsi untuk mengatur apoptosis dari sel yang diinfeksi dan mungkin juga secara langsung terlibat sebagai patogenesis terjadinya penyakit hati, proliferasi sel dan berkembang menjadi kanker hati (Ruggieri *et al*, 1997). Semenjak diketahui VHC secara spesifik melakukan mutasi yang sering untuk menghindari antibodi dan sel CTL yang spesifik untuk VHC, masih belum sepenuhnya

mencerangkan mengapa VHC⁺ menjadi persisten dengan frekuensi amat tinggi. Banyak penelitian telah dilakukan untuk menentukan apakah protein virus terlibat menghambat fungsi respons imun seluler. Beberapa penelitian telah memperlihatkan bahwa beberapa protein VHC⁺ mempunyai pengaruh penting pada jalannya sinyal dalam respons imun, proliferasi sel atau apoptosis. Interaksi protein VHC dapat terjadi dengan efektor dari sistem respons imun spesifik dan nonspesifik. Seperti terlihat pada (Gambar 2.3), terjadi interaksi antara protein *core* dengan famili reseptor TNF yang terlibat dalam sistem imun dan khususnya dalam kontrol apoptosis.



Gambar 2.3: Mekanisme interaksi protein *core* VHC dengan anggota TNFR

(Pavio & Lai, 2003)

Pada penelitian sel kultur telah memperlihatkan protein *core* VHC dapat berinteraksi dengan *lymphotoxin β -receptor* (LT β R), TNFR-I (Chen *et al.*, 1997 ; Matsumoto *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998) dan Fas (Hahn *et al.*, 2000). Interaksi LT β R terjadi antara bagian N-terminal *core* di daerah LT β R, yang berinteraksi dengan *Tumor receptor adaptor factor* (TRAF-3). Dengan adanya interaksi di antara *core*- LT β R diharapkan VHC dapat memodulasi jalannya sinyal antara LT β R dengan *ligand*-nya, sehingga apoptosis gagal dan VHC menjadi persisten. Ekspresi dari *core* di dalam *hep. a cells* akan meningkatkan sensitivitas untuk apoptosis setelah stimulasi kompleks *lymphotoxin- $\alpha\beta$* dan juga akibat stimulasi IFN- γ (Chen *et al.*, 1997).

Protein *core* maupun NSSA juga dilaporkan dapat mempengaruhi metabolisme lipid intraseluler dan lipoprotein yang secara langsung menyebabkan terjadinya steatosis, gambaran ini merupakan karakteristik dari hepatitis C, khususnya penderita yang terinfeksi oleh VHC genotip 3 (Rubbia-Brandt *et al.*, 2000). Protein NSSA terdiri dari suatu daerah yang dapat mengatur respons terhadap terapi interferon, daerah ini disebut sebagai *interferon sensitivity determining region* (ISDR) yang dapat mengikat dan menghambat protein kinase R (PKR). Protein kinase R adalah satu protein yang aktivitasnya merupakan bahan yang penting dalam sel yang berfungsi untuk merespons terapi anti virus (Albert, 2003).

Dari hasil penelitian selama terjadi infeksi VHC pada manusia sehingga menjadi hepatitis C kronik dihubungkan dengan produksi virus yang cepat, kurang kuatnya respons sel-T terhadap VHC dengan berbagai varian untuk menghindari kontrol dari respons imun. Patogenesis kerusakan sel hati pada umumnya disebabkan oleh kombinasi efek langsung sitopatik dari protein virus dan akibat mekanisme respons

imun termasuk sitolitik dan non-sitolitik oleh sel CTLs (sel-TCDB⁺) dan akibat pengaruh sitokin inflamasi (Alberti dan Benvenuto, 2003).

2.4 Aspek imunologik infeksi VHC

2.4.1 Respons imun infeksi virus

Virus merupakan mikroorganisme sebagai *agent* infeksi kelas khusus yang bersifat parasit intraseluler obligat, yang mengadakan replikasi di dalam sel inang dan sering memanfaatkan perangkat sintesis protein dan asam nukleat sel inang. Pada infeksi virus, makrofag juga dapat membunuh virus seperti halnya ia membunuh bakteri. Pada infeksi virus tertentu, makrofag tidak membunuhnya bahkan sebaliknya virus memperoleh kesempatan untuk melakukan replikasi di dalam sel. Telah diketahui bahwa virus hanya dapat berkembang biak intra seluler karena virus memerlukan DNA pejamu untuk replikasi. Sebagai akibatnya virus dapat merusak sel organ tubuh apabila ia bersifat sitopatik, sedangkan virus yang tidak bersifat sitopatik akan menyebabkan infeksi kronis dengan menyebar ke sel yang lain (Bellanti, 1993; Kresno, 2001).

Antigen presenting cell (APC) khususnya sel makrofag juga memproduksi sitokin yang berperan mengatur respons imun yang akan terjadi, Interleukin-1 yang dihasilkan oleh sel makrofag dapat merangsang sel-Th2 sehingga membangkitkan respons imun humoral. Sebaliknya IL-12 juga dihasilkan oleh sel makrofag akan merangsang sel-Th1 yang akan membangkitkan respons imun seluler (CMI) (de Vries, 1994).

Sel limfosit Th1 aktif akan memproduksi IL-2, IFN- γ , dan TNF yang dapat mengaktifkan sel makrofag sehingga sel makrofag tersebut mampu menghancurkan virus yang tumbuh dalam sel (Janeway, 1993; de Vries, 1994).

Efasiil pertemuan antara virus dan sel inang yang sesuai akan tergantung pada sifat virus, sel dan lingkungan tempat interaksi virus-sel hospes terjadi. Pada umumnya sifat virus yang paling penting adalah: (1) kemampuan virus yang dihasilkan dalam satu sel untuk memasuki sel lain sehingga menyebabkan penyebaran infeksi, dan (2) kemampuan virus untuk mengadakan perubahan fungsi dalam sel yang terinfeksi (Bellanti, 1993).

Respons imun terhadap infeksi virus melibatkan respons imun non-spesifik maupun spesifik. Mekanisme utama respons non-spesifik terhadap virus yaitu infeksi virus secara langsung merangsang produksi *interferon* (IFN) oleh sel terinfeksi virus, disini IFN berfungsi menghambat replikasi virus dan aktivasi sel *natural killer* (NK) yang akan melisis berbagai jenis sel terinfeksi virus. Sel NK dapat menghancurkan sel yang terinfeksi virus meskipun virus menghambat presentasi antigen dan ekspresi *major histocompatibility complex I* (MHC), karena sel NK cenderung diaktivasi oleh sel sasaran yang MHC-negatif (Abbas, 2000).

Beberapa hari setelah infeksi primer oleh virus maka peran imunitas non-spesifik menjadi sangat penting. Permukaan sel yang terinfeksi mengalami perubahan sehingga menarik sel sasaran yaitu sel NK yang mempunyai kemampuan sitotoksik untuk sel yang terinfeksi virus. Sensitisasi sel sasaran berhubungan erat dengan ekspresi MHC kelas I, apabila MHC kelas I membawa tanda inaktivasi dominan untuk mengurangi aktivitas sel NK, atau kemungkinan lainnya bahwa ada MHC mengaburkan sasaran potensial. Produksi IFN- α selama infeksi virus berfungsi melindungi sel sekitarnya, mengaktifkan sel NK dan meningkatkan ekspresi MHC pada sel di sebelahnya sehingga lebih rentan terhadap sitotoksitas (Roitt, 2003).

Reaksi imunologis pada infeksi virus ada dua jenis yaitu: (1) Langsung terhadap virus dan (2) Terhadap sel yang terinfeksi virus. Pada umumnya respons imun terhadap virus adalah humoral sedangkan respons yang diperantarai sel-T bereaksi terhadap sel yang terinfeksi virus (Thapel dan Hacney, 1993; Koziel, 1997).

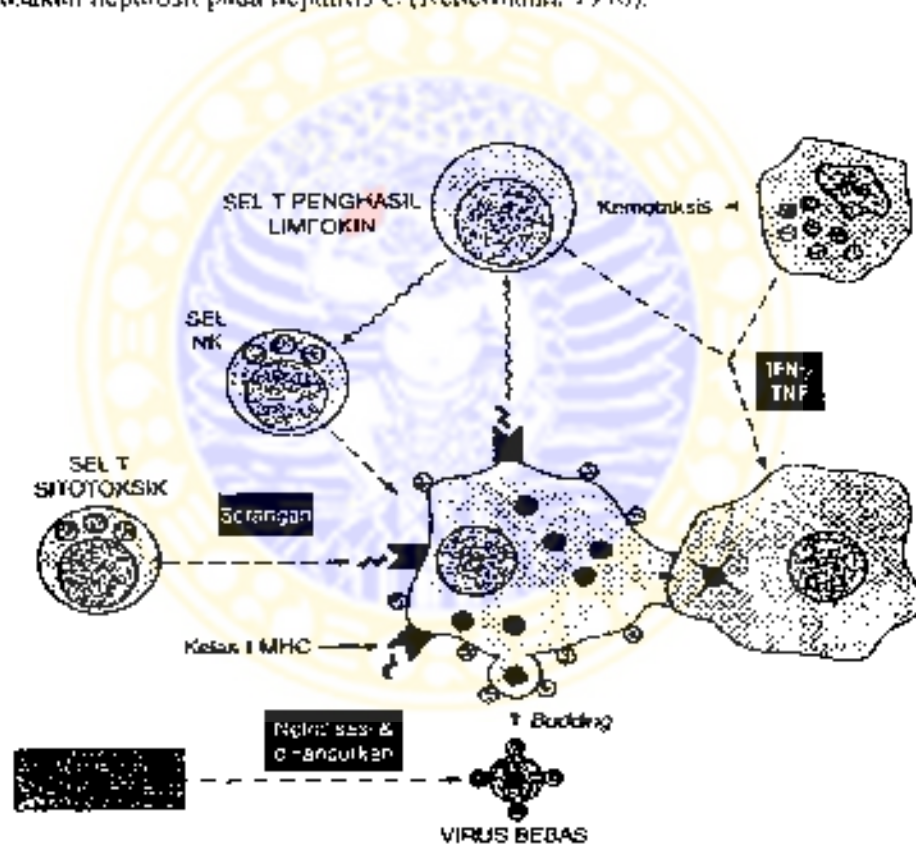
Infeksi jasad renik yang bersifat intraseluler umumnya akan terjadi respons imun seluler maupun respons imun humoral. Respons imun mana yang akan lebih menonjol perannya tergantung pada sifat dan jumlah antigen, jenis sel yang memproses atau memaparkan antigen (APC) dan faktor lingkungan mikro seperti hormon, adanya sitokin dan lain sebagainya (Romagnani, 1994).

Untuk membatasi penyebaran virus dan mencegah reinfeksi, sistem imun harus mampu menghambat masuknya virus ke dalam sel dan memusnahkan sel yang terinfeksi. Antibodi spesifik mempunyai peran penting pada awal terjadinya infeksi, dimana ia dapat menetralkan antigen virus dan melawan virus sitopatik yang dilepaskan oleh sel yang mengalami lisis. Peranan antibodi di dalam menetralkan virus terutama efektif untuk virus yang bebas atau virus yang terdapat dalam sirkulasi. Proses netralisasi virus dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menghambat perlekatan virus pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel, sehingga virus tidak bisa menembus membran sel, dengan demikian replikasi virus dapat dicegah. Antibodi juga dapat menghancurkan virus dengan cara aktivasi komplemen melalui jalur klasik atau menyebabkan agregasi virus sehingga mudah difagositosis dan dihancurkan melalui proses yang sama seperti di atas. Antibodi dapat mencegah penyebaran virus yang dikeluarkan dari sel yang telah dihancurkan. Tetapi seringkali antibodi tidak cukup mampu untuk mengendalikan virus yang telah merubah struktur antigennya dan melepaskan diri (*budding off*) melalui membran sel sebagai partikel yang infeksius,

sehingga virus dapat menyebar ke dalam sel yang berdekatan secara langsung (gambar 2. 4) (Kresno, 2001).

Masih diperbincangkan adanya kontroversi apakah virus hepatitis C bersifat sitopatik langsung atau kerusakan sel hati adalah sebagai akibat respons imun seseorang (Camps *et al.*, 1993). Beberapa bukti penelitian menunjukkan mekanisme imun lebih berperan pada patogenesis hepatitis C. Respons sel-T $CD4^+$ dan $CD8^+$ terhadap antigen

virus merupakan mekanisme penting yang mungkin bertanggung jawab terhadap kerusakan hepatosit pada hepatitis C (Rehermann, 1996).



Gambar 2.4: Pengendalian infeksi oleh " budding " virus (Reitt, 2002).

diperkirakan 74-86% dari penderita berada dalam keadaan viremia yang menetap (Lauer, 2001).

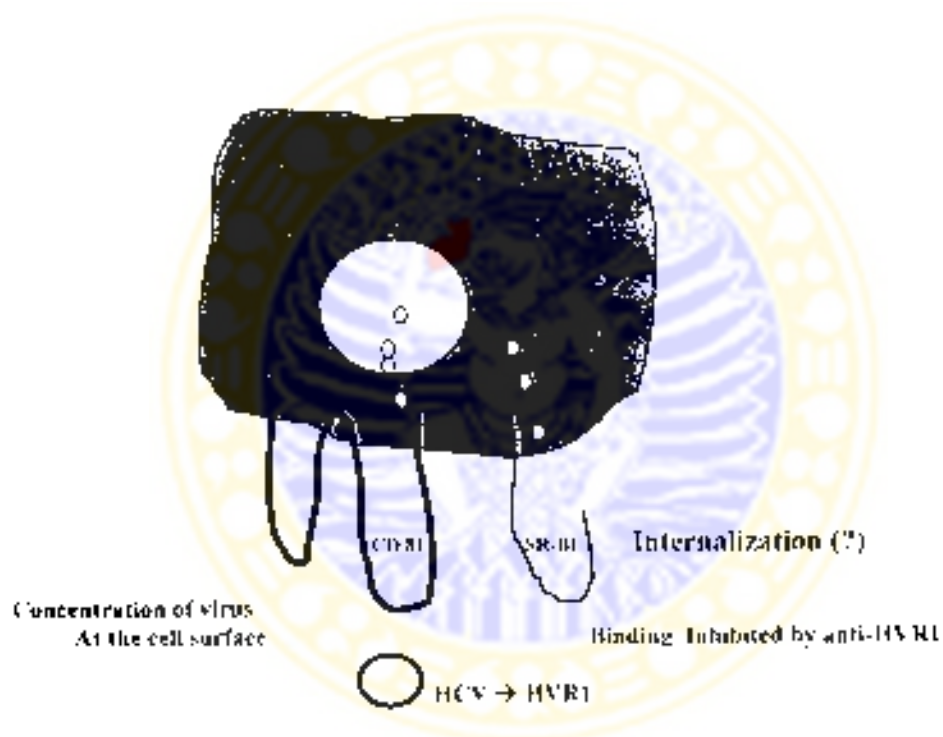
Pada infeksi VHC antibodi yang terbentuk ditujukan baik terhadap regio struktural maupun regio non-struktural dari virus VHC dan dapat ditemui selama infeksi kronik. Antibodi terhadap protein struktural VHC terdapat lebih awal, sedangkan antibodi terhadap protein non-struktural muncul lebih lambat sesudah infeksi (3-6 bulan) (Thomas, 1993).

Peran sistem humoral dalam pertahanan sistemik selama infeksi berlangsung melalui pembentukan dan aktivasi antibodi, komplemen dan mediator lain. Terhadap infeksi virus, antibodi berfungsi menghambat interaksi virus dengan sel sasaran dengan cara menetralisasi atau mengikat virus bersangkutan sehingga virus tidak dapat melekat atau menembus sel sasaran. Secara umum peran antibodi dalam sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi mikroorganisme yang bersifat ekstraseluler, dalam hal ini imunoglobulin utama yang berperan adalah IgG dan IgM (Kresno, 2001).

Suatu keadaan yang berbeda dengan hepatitis B, dimana pada hepatitis C tidak ada bentuk antibodi yang cocok untuk mengikuti perbedaan pada tahap diferensiasi dari virus. Pada infeksi virus hepatitis C telah diidentifikasi adanya epitop pada sel B terhadap *envelope*, *core*, NS3 dan NS4 dari VHC (Cerino dan Mondelli, 1991; Akatsuka *et al*, 1993; Simmonds *et al* 1993).

Pada penderita infeksi VHC kronik peranan antibodi untuk menetralkan VHC menemui kegagalan oleh karena identifikasi yang kompleks dari epitop antibodi sebagai protektif terhadap VHC masih belum jelas. Protein *envelope* E2 dari VHC menjadi hal yang menarik oleh karena daerah ini merupakan daerah yang hipervariabel yang terdiri dari berbagai urutan dari *region* N-terminal (HVR1) yang mengkode

epitop sel-B penetral. CD 81 merupakan suatu *transmembrane expressed* yang terdapat pada hepatosit dan sel B yang berfungsi sebagai reseptor, akan mengikat VHC melalui HIVRI pada permukaan sel. Pada saat ini telah teridentifikasi adanya ko-reseptor yang disebut *scavenger receptor class B type 1* (SRB1) yang akan mengikat partikel virus sehingga virus akan dapat masuk ke dalam sel (Gambar 2.3). Dengan adanya daerah SRB1 ini telah membuktikan bahwa VHC menghindari respons imun dengan cara demikian (Mondelli *et al.*, 2003).



Gambar 2.5: Mekanisme interaksi VHC-reseptor pada hepatosit (Mondelli *et al.*, 2003).

Pada tahun 1994 Shimizu *et al.* melakukan percobaan dengan memberikan imunisasi pasif kepada binatang percobaan *chimpanzees*. Pada binatang percobaan disuntikan *neutralizing antibodies* yang berasal dari *recombinant protein envelop*

sehingga dapat sebagai protektif terhadap infeksi VHC. Situasi ini sangat berbeda dibandingkan dengan manusia, dimana sel B sebagai penghasil antibodi untuk ditargetkan mengikat envelope E2 di daerah IIVR] dari VHC mengalami kegagalan. Dari hasil penelitian telah terjadi mutasi dari virus hepatitis C dengan berbagai strain atau *quasispecies*, hal ini yang mendukung hipotesis bahwa VHC dapat menghindari respons imun inang sehingga terjadi infeksi kronis.

2.4.3.2 Peran imunitas seluler

Semua sel yang berfungsi dalam respons imun berasal dari sel induk pluripoten yang kemudian berdiferensiasi melalui dua jalur yaitu: a) jalur limfoid yang membentuk limfosit dan subsetnya, b) jalur mieloid yang membentuk sel fagosit dan sel lain. Sel imunokompeten utama adalah sel limfosit T (sel-T) dengan berbagai subsetnya, yaitu *T-helper* (Th), T-supresor (Ts), T-sitotoksik (Tc) dan sel B. Sel-T berdiferensiasi dalam kelenjer timus sedangkan sel B berdiferensiasi pada mamalia dalam sum-sum tulang dan organ limfoid perifer sedangkan pada burung dalam bursa *fabrisius* (Lanier *et al*, 1991; Lydyard *et al*, 1996).

Sel-T merupakan sel yang paling dominan terdapat di dalam sirkulasi darah (70-80%), secara konstan dari sirkulasi darah menuju kelenjer limfe, jaringan dan limfatik, kemu dian kembali masuk dalam sirkulasi darah. Sebagian besar sel-T dapat hidup beberapa bulan sampai beberapa tahun pada kondisi yang normal. Sel-T mempunyai peranan di dalam sistim imun untuk perkembangan respons imun melawan antigen yang masuk ke dalam tubuh. Sel-B yang terdapat di dalam darah lebih sedikit dibandingkan dengan sel-T yaitu berkisar sekitar 10-15% dan tidak masuk ke jaringan seperti halnya sel-T, serta lama hidup sel-B juga lama seperti halnya sel-T. Sel utama

yang lain dari limfosit adalah sel natural killer (NK) terdapat dalam sirkulasi sekitar 10-15%, sebagian berasal dari makrofag dan mempunyai fungsi yang cepat terhadap antigen seperti halnya sel-T. Sel NK ini lebih diutamakan untuk mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi virus dan beberapa tumor. Mengenai lamanya terdapat di dalam sirkulasi darah dan polanya tidak ada batasan yang jelas. Dari tabel 2.2 dapat dilihat distribusi normal dari subset limfosit dalam darah (Hilman & Auli, 2002)

Tabel 2.2. Distribusi normal dari subset limfosit di dalam darah

Subset	Persentase limfosit	Jumlah absolute (sel/ μ l.
Limfosit	100	1500 - 2500
Sel-T	65 - 75	1300 - 1500
Sel-B	10 - 15	200 - 300
Sel-NK	10 - 20	200 - 400
Sel-TC $CD4^+$	35 - 45	700 - 900
Sel-T $CD8^+$	30 - 40	600 - 800

(Hilman & Auli, 2002)

Bila sistem pertahanan tubuh alamiah tidak dapat mengatasi infeksi suatu patogen maka tubuh akan mengerahkan sistem imun spesifik.

Respons imun yang terbentuk akan melalui beberapa tahapan, sebagai berikut:

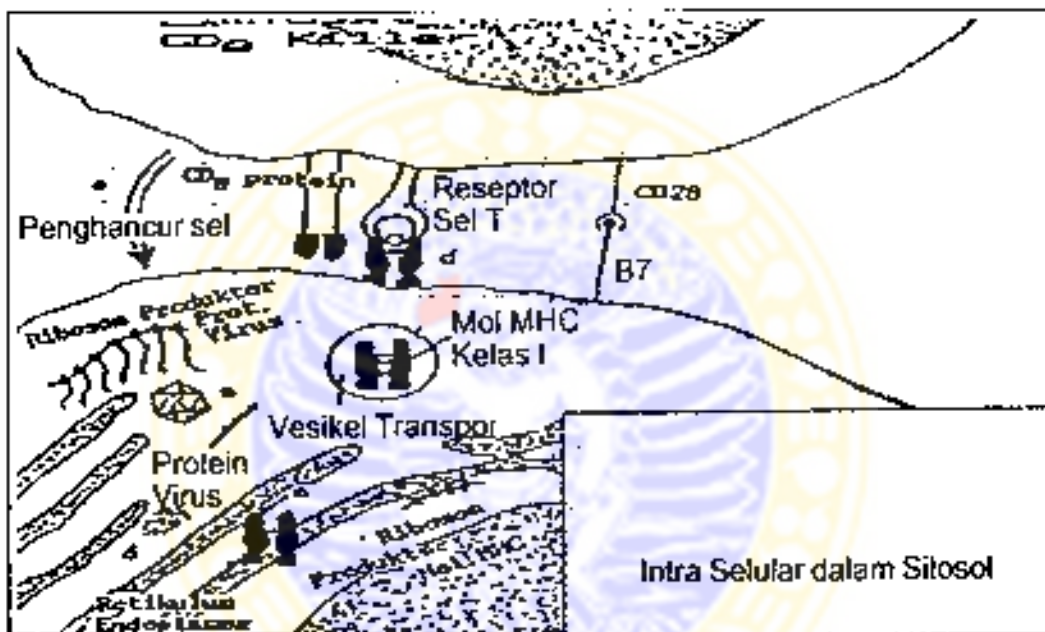
1. Pemberian sinyal bahwa tubuh telah terinfeksi oleh suatu patogen yang dilanjutkan dengan pemberosesan dan pemaparan antigen tersebut ke permukaan *Antigen Processing Cell* (APC).
2. Pengenalan antigen pada permukaan APC diperlukan beberapa sel yang dibuat khusus untuk keperluan tersebut yaitu sel-TC₄⁺ dan sel-TC₈⁺.
3. Aktivasi dari beberapa sel-T CD₄ dan Sel-TC₈⁺ akan memproduksi sitokin untuk menghancurkan patogen secara langsung atau melalui fagositosis dan komplemen (Handoyo, 2003).

Virus merupakan jasad renik yang hidup intraseluler di dalam sitosol dari sel yang terinfeksi dan menggunakan DNA atau RNA dari sel *host* untuk mensintesis protein atau asam amino yang diperlukan untuk berkembang biak. Protein yang diproduksi oleh virus tersebut akan dipecah oleh enzim dalam sel menjadi peptida, dan peptida ini akan diikat oleh molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas I yang dibentuk oleh retikulum endoplasma dari sel *host*, hal ini dapat dilihat pada (Gambar 2.4) (Handoyo, 2003).

Adanya peptida asing yang diikat dalam kantong atau celah dari molekul MHC tersebut akan memberikan sinyal untuk sistem imun bahwa sel tersebut terinfeksi virus dan kompleks antigen-molekul MHC tersebut bergerak ke permukaan sel *host* sehingga kompleks tersebut dikenal dan selanjutnya diikat oleh reseptor dari sel-TC₈⁺ yang sedang lewat. Sebelum sel-TC₈⁺ dapat melaksanakan aktivitasnya perlu diaktifkan terlebih dahulu oleh sinyal kedua yang akan terjadi apabila molekul sel-T CD₂₈ pada permukaan sel-T terikat pada molekul pasangannya B7 yang terdapat pada permukaan sel yang terinfeksi virus. Sel-TC₈⁺ akan mengeluarkan sitokin

yang dapat menghancurkan seluruh sel yang terinfeksi termasuk virus yang tumbuh di dalamnya (Janeway, 1993; de Vries, 1994).

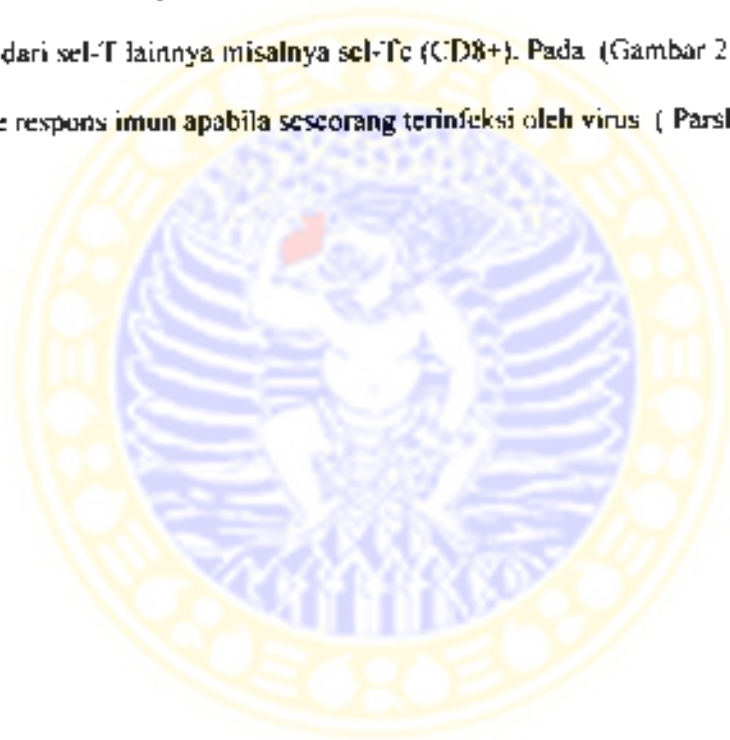
Seseorang yang terinfeksi oleh virus akan terjadi aktivitas makrofag atau berbagai sel yang tergolong *antigen presenting cell* (APC) yang akan memproses antigen sedemikian rupa sehingga dapat dikenali oleh berbagai sel imunokompeten yang lain. Interaksi antar kompleks antigen-MHC dengan reseptor berbagai sel

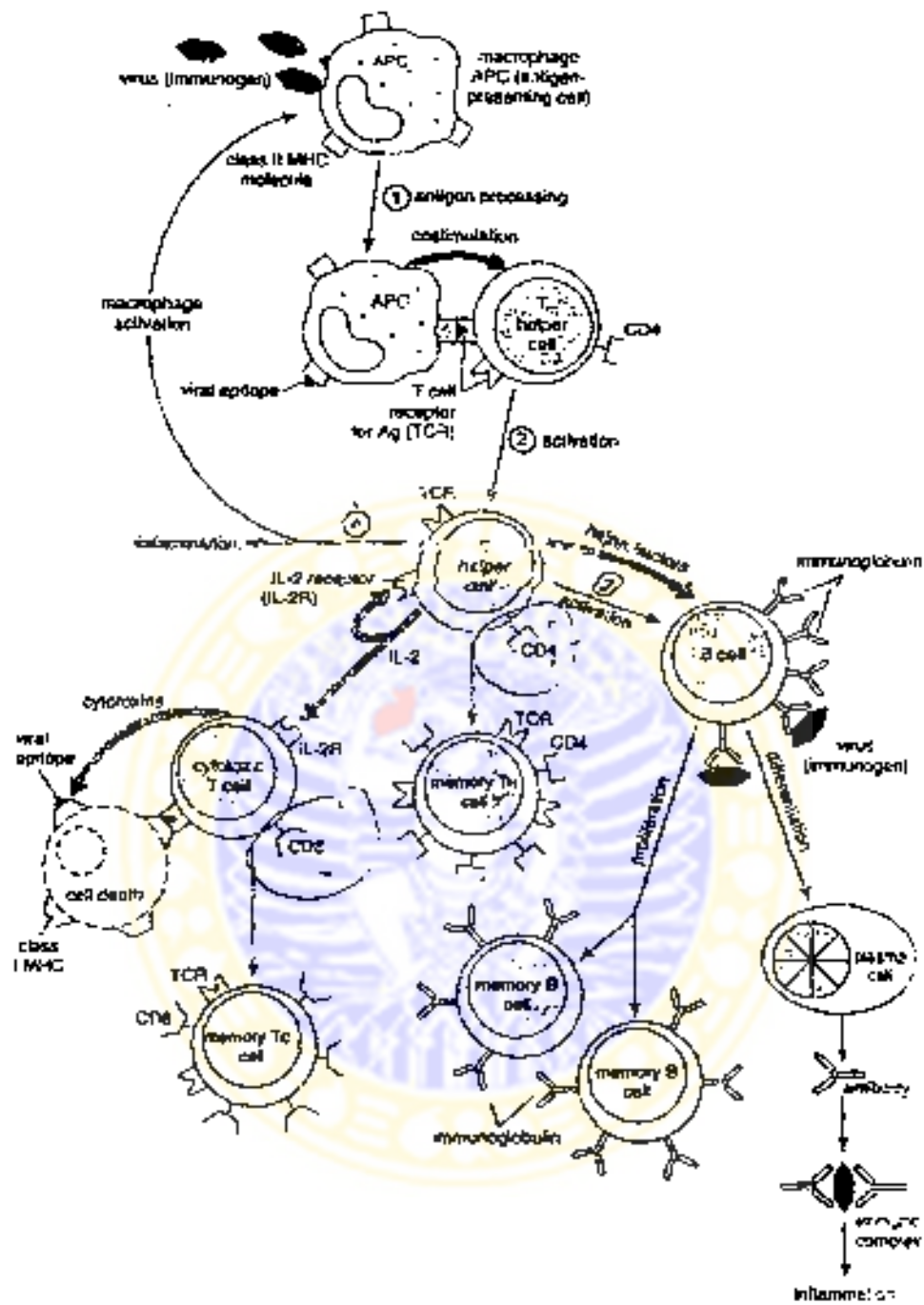


Gambar 2.6: Respons imun terhadap invasi jasad renik intraseluler dalam sitosol
(Dikutip: Handoko, 2003)

imunokompeten akan berakibat terjadinya rangsangan terhadap berbagai sel imunokompeten tersebut sehingga akan berproliferasi, berdiferensiasi atau melepas sitokin yang kemudian akan mempengaruhi berbagai sel imunokompeten yang lain lagi (Sigal & Ron, 1994; Kuby, 1994).

Pengenalan sel yang terinfeksi virus oleh limfosit TCD4⁺ dan CD8⁺ membutuhkan presentasi peptida virus masing-masing oleh molekul *human leucocyte antigen* (HLA) kelas II dan kelas I. Sel-TCD4⁺ memberikan respons terhadap antigen/virus yang dipresentasikan sebagai peptida bersama MHC kelas II dan sel-TCD8⁺ bersama MHC kelas I. Sel-TCD4⁺ (Th) berdiferensiasi menjadi sel-Th1 atas pengaruh IL-12 yang diproduksi oleh makrofag. Aktivasi limfosit T menyebabkan ekspresi reseptor IL-2 pada permukaan sel, dan produksi IL-2 serta mediator lain. IL-2 merupakan faktor mitogenik yang kuat untuk sel limfosit T dan sangat penting untuk proliferasi dari sel-T lainnya misalnya sel-Tc (CD8⁺). Pada (Gambar 2.7) dapat dilihat mekanisme respons imun apabila seseorang terinfeksi oleh virus (Parslow, 1997).

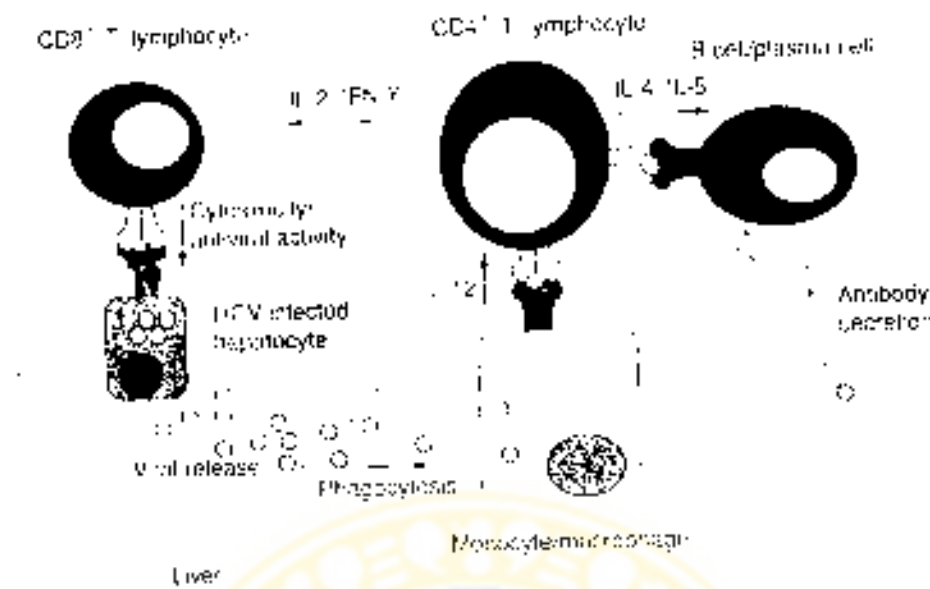




Gambar 2.7: Urutan respons imun terhadap virus (Parslow, 1996).

Sel hepatosit merupakan tujuan dari VHC untuk tempat replikasi virus, antigen dan partikel virus akan bertahan selama masa inkubasi, yang kemudian dikenal dan diproses oleh APC dari sel *Kupffer* di hati. Sel NK dengan petanda sel-T (NKT) mempunyai peranan penting segera setelah terjadi infeksi oleh VHC (Matsuura *et al.*, 2000). Sel NKT paling banyak terdapat di hati sebagai akibat aktivasi oleh glikoprotein antigen yang mungkin berasal dari *envelope* VHC (Gumperz *et al.*, 2000). Akibat aktivasi sel NKT akan menghasilkan sitokin IFN- γ dan IL-4, secara langsung bersifat sebagai anti virus dan juga akan merangsang respons imun spesifik untuk menyerang virus yang menginfeksi sel (Kennedy *et al.*, 2000). Ada pertentangan pendapat mengenai peranan sel NK dan NKT pada fase permulaan terjadi infeksi VHC, karena masih sedikit bukti yang dapat menyokong kerja dari sel tersebut pada saat ini.

Antigen VHC dengan cepat diproses oleh makrofag dan sel *Kupffer* di dalam hati, dalam hal ini sangat penting peranan dari sel-T spesifik terhadap VHC pada permulaan infeksi. Sel-T CD4⁺ diaktivasi dengan cara mengenal epitop virus yang dipresentasikan bersama MHC kelas II pada permukaan APC tersebut (Murray *et al.*, 1992). Aktivasi dari sel-T CD4⁺ ini juga disebabkan oleh pengaruh IL-12 yang dihasilkan oleh sel APC tersebut (Sypik *et al.*, 1993) (Gambar 2.6).



Gambar 2.8: Respons imun selular dan humoral yang terlibat patogenesis infeksi VHC (Diepolder *et al.*, 1998)

Kemampuan sel-T reseptor (TCR) untuk mengikat satu kompleks peptidaVHC - MHC ditemukan, apakah sel-T CD4⁺ yang teraktivasi tersebut berkembang menjadi sel-Th1 atau sel-Th2. Sel-Th1 akan menghasilkan IL-2, TNF- α , dan IFN- γ (Ramsay *et al.*, 1993) yang kemudian akan merangsangperkembangan sel NK dan sel-TCDS⁺ (CTL) (Zinkertagel *et al.*, 1993). Sebagai suatu imunomodulator IFN juga meningkatkan aktivasi makrofag, sel-T, sel-NK, dan sel-NKT. Pengaruh dari IFN secara *in vivo* pada percobaan binatang ditekan oleh adanya suatu *transgenic* dari tikus, dengan adanya bahan tersebut terjadi penekanan terhadap kadar IFN- γ yang tinggi, sehingga berkembang menjadi hepatitis kronis aktif (Toyonaga *et al.*, 1994).

Pada penderita hepatitis C kronis sel respons imun yang paling banyak didapatkan dari hasil pemeriksaan hati adalah sel-Th1 yang menghasilkan IFN- γ dan tidak IL-4 ataupun IL-5, dimana sel-Th1 mempunyai peranan penting dalam kerusakan sel hati

yang kronik (Bertoletti *et al.*, 1997). IFN- γ juga mempengaruhi peningkatan ekspresi molekul MHC kelas I pada hepatosit dan sel saluran empedu. Ikatan peptida virus dengan molekul MHC kelas I pada permukaan sel hepatosit dapat dikenal oleh sel spesifik terhadap VHC yaitu sel-TC D8^+ (CTL) yang kemudian melisis sel yang terinfeksi VHC. Hal ini yang menguatkan pendapat tentang didapatkannya gambaran mengenai peningkatan ekspresi molekul MHC kelas I, berhubungan dengan beratnya penyakit hati yang disebabkan oleh VHC (Mossier *et al.*, 1994). Kemungkinan lain sel APC akan mengaktivasi sel-TC D4^+ (Th) untuk berdiferensiasi menjadi sel-Th2. Sel-Th2 akan menghasilkan IL-4, IL-5 dan IL-10, berfungsi mengaktivasi pembentukan antibodi spesifik terhadap VHC yang dihasilkan oleh sel-B (Doherty *et al.*, 1992). Sitokin yang dihasilkan oleh sel-Th2 akan menurunkan produksi sitokin sel-Th1, aktivitas sel-TC D8^+ , ekspresi MHC, dan derajat presentasi antigen oleh sel makrofag, sel *Kupffer*, dan sel hepatosit yang terinfeksi (Abbas *et al.*, 1996).

Pada Infeksi VHC kronik respons dari CTL adalah kuat, poliklonal dan multispesifik, hal ini masih belum jelas dapat diterangkan mengapa hal ini terjadi pada penderita hepatitis C kronik. Respons dari sel-TC D4^+ yang dipresentasikan oleh MHC kelas II ditargetkan untuk mengeliminasi virus, dapat ditemui di dalam darah tepi dan infiltrat intrahepatik penderita. Pada hasil biopsi hati dapat diisolasi VHC dan kebanyakan berasal dari core, NS3, dan NS4, juga dapat diisolasi klon NS4-sel-T spesifik. Dengan demikian hasil isolasi terhadap tipe klon dan fungsi yang berbeda tersebut dapat dijadikan sebagai penggolongan dari penyakit (Minutello *et al.*, 1993).

Pada observasi yang telah dilakukan terdapat hal untuk menyokong hipotesis bahwa keseimbangan di antara respons Th1 dan Th2 pada fase permulaan infeksi akut ditentukan oleh akibat infeksi tersebut. Hal ini secara empirik disokong oleh bukti

bahwa penderita dengan fase awal, terjadi proliferasi yang meningkat dari respons sel-Th1 ditandai dengan peningkatan kadar IL- γ , yang tujuannya mungkin untuk mengeliminasi dan penyembuhan hepatitis C akut disebabkan oleh VHC. Dalam hal ini terdapat perbedaan di antara peneliti lain bahwa respons dari sel-Th2 yang kuat didapatkan pada kebanyakan penderita dengan infeksi VHC kronik (Lechmann *et al.* 1996; Gerlach *et al.* 1999; Takaki *et al.* 2000).

Hal ini ditentang lagi oleh peneliti lain, yang mengemukakan bahwa sel-TCID4+ predominan terdapat di daerah portal (Weiner *et al.* 1992) dan sel-TCID8+ kebanyakan terdapat di lobus hati (Koziel *et al.* 1992), secara tidak langsung kedua sel-T tersebut akan menyebabkan kerusakan sel hati. Hal ini selanjutnya disokong oleh hasil observasi dari beberapa peneliti lain, dimana terdapat hubungan antara kadar GPT serum dengan hasil gambaran histologi terhadap beratnya penyakit hati. Beberapa penemuan ini memperkuat pendapat para peneliti bahwa sel-T sangat berperan dalam patogenesis penyakit hati.

Sel-TCID4+ merupakan sel yang berfungsi paling dominan untuk menghancurkan di lokasi C terminal dari HVRI, hal ini dapat terjadi pada penderita yang telah sembuh dari infeksi VHC setelah mendapat pengobatan dengan obat anti virus (Del Porto *et al.* 2000). MHC kelas II memberikan respons kepada sel-TCID4+ sangat peka terhadap protein core, NS3, dan NS4 dari VHC yang sangat imunogenik. Sel-TCID4+ akan merusak enzim helikase pada NS3 dari VHC, hal ini terjadi pada seseorang yang telah sembuh dari infeksi akut.

Perbandingan antara sel-Th1 dengan sel-Th2 mungkin setengah, hal ini tergantung pada aktivitas sel-NKT selama fase permulaan sekali dari waktu terjadinya infeksi VHC. Keadaan ini disebabkan oleh banyak faktor yang mempengaruhi respons

terhadap sel-T setelah infeksi akut. Di antara faktor-faktor tersebut adalah individual itu sendiri yang mungkin memperbesar variabel dalam infeksi oleh VHC tersebut (Bendelac *et al.* 1995).

2.4.4 Upaya virus menghindari respons imun inang

Virus hepatitis C adalah sebagai virus yang mempunyai banyak variabel, dengan munculnya berbagai epitop. Modifikasi dari berbagai bentuk epitop sel-B dan sel-T selama infeksi VHC telah diobservasi dan dapat sebagai kontribusi dari VHC untuk menghindari respons imun (Cerny and Chisari, 1994; Weiner *et al.* 1995).

Satu kemungkinan untuk menghindari respons imun adalah dengan jalan memperbanyak perbedaan epitop dari VHC sehingga tidak dapat dinetralkan oleh antibodi. Beberapa penelitian melaporkan bahwa selama infeksi VHC daerah HVR1 dari E2 semakin progresif dan heterogen, dan hal ini yang menyokong terhadap seleksi antibodi sebagai anti virus (Fanci *et al.*, 2003). Seseorang yang telah terinfeksi VHC, antibodi akan dibentuk lebih awal setelah infeksi tersebut.

Fanci *et al.* (2000) melaporkan bahwa bentuk *quasispecies* pada HVR1 selama fase akut merupakan prediksi bahwa telah terjadi infeksi dari VHC. Apabila bentuk *quasispecies* ini dapat ditekan, merupakan tanda bahwa infeksi bisa di atasi dan virus dapat dieliminasi. Apabila bentuk *quasispecies* ini terus berkembang, ini menandakan bahwa infeksi terus menetap.

Antibodi anti-HVR1 yang bertindak sebagai *neutralizing of binding* (NOB) dapat mengikat E2 *recombinant*, partikel yang menyerupai virus atau partikel virus. Tetapi dalam hal ini tidak ada bukti bahwa antibodi tersebut bisa mencegah VHC tersebut

masuk. Dalam hal ini antibodi anti-HIV-1 kemungkinan gagal untuk mengeliminasi VHC sehingga terjadi infeksi yang menetap (Pavio dan Lat, 2003).

2.5 Sitokin

Sitokin adalah suatu protein yang disekresi oleh berbagai sel dari sistem imun. Sitokin meliputi semua mediator kimia yang dihasilkan oleh komponen pertahanan tubuh, kecuali yang dihasilkan organ kelenjer khusus (hormon). Sitokin dapat berfungsi sebagai sistem pengendalian antar sel pertahanan tubuh (Tizard, 1995).

Protein yang disekresi dengan berat molekul rendah, biasanya 15-25 kDa, memperantarai pertumbuhan sel, peradangan, imunitas, diferensiasi dan perbaikan. Sitokin mengatur amplitudo dan lamanya respons imun peradangan, maka sitokin harus diproduksi tidak secara terus menerus (sementara) dan diatur secara ketat oleh adanya bahan asing (Roitt, 2003).

Ada beberapa sifat umum yang dimiliki oleh setiap jenis sitokin yaitu (Kresno, 2001):

1. Sekresi sitokin pada umumnya terjadi singkat dan membatasi diri, sitokin tidak pernah disimpan sebagai molekul yang *preformed* dan sintesis sitokin biasanya diawali dengan transkripsi gen yang terjadi akibat stimulasi. Segera setelah disintesis sitokin dengan cepat disekresikan dan menghasilkan aktivitas yang diperlukan.
2. Setiap jenis sitokin biasanya diproduksi oleh lebih dari satu jenis sel, dapat bereaksi terhadap berbagai jenis sel (pleitropik) dan memberikan dampak yang berbeda pada berbagai sel sasaran. Di lain pihak berbagai jenis sitokin memberikan dampak berbeda pada satu jenis sel sasaran yang sama.
3. Sitokin sering mempengaruhi sintesis dan aktivitas sitokin lainnya, memungkinkan terjadinya suatu kaskade di mana sitokin kedua atau ketiga dapat memperantarai

- efek sitokin pertama, mungkin juga dua sitokin bekerja sebagai antagonis satu dengan lain, atau berinteraksi untuk menghasilkan efek tambahan atau menghasilkan efek yang lebih besar dari yang diharapkan.
4. Aktivitas sitokin dapat lokal maupun sistemik. Sebagian besar sitokin beraksi dekat dengan tempatnya diproduksi, baik dalam sel yang memproduksinya (*autocrine action*), maupun pada sel yang letaknya berdekatan (*paracrine action*). Bila diproduksi dalam jumlah banyak, sitokin dapat masuk dalam sirkulasi dan bekerja sistemik (*endocrine action*).
 5. Sitokin merupakan mediator respons imun yang sangat poten dan mampu berinteraksi dengan reseptor pada permukaan sel. Sitokin mengawali aksinya dengan berikatan dengan reseptor sitokin pada membran sel sasaran dengan afinitas sangat tinggi. Ekspresi reseptor dipengaruhi oleh beberapa sinyal eksternal, misalnya stimulasi sel-T atau sel B akan meningkatkan ekspresi reseptor sitokin dengan demikian turut mengatur kepekaan sel-T tersebut terhadap sitokin.
 6. Respons seluler terhadap sebagian besar sitokin terdiri atas perubahan ekspresi gen pada sel sasaran yang berakibat ekspresi fungsi baru atau proliferasi sel sasaran.

2.5.1 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) merupakan suatu protein yang terdiri dari IL-1 α dan IL-1 β , dihasilkan oleh suatu gen, dan mempunyai reseptor yang sama pada permukaan sel. Reseptor tersebut tidak ditemui pada sel keratinosit, beberapa sel epitel dan sel jaringan saraf. Interleukin-1 tidak diproduksi apabila seseorang dalam keadaan sehat dan akan terjadi respons apabila terjadi inflamasi, infeksi, adanya endotoksin, hal ini semua akan

meningkatkan produksi IL-1 oleh sel makrofag dan beberapa sel lainnya (Anonymous, 2000).

IL-1 dihasilkan oleh semua sel yang berinti, termasuk monosit-makrofag, sel B, sel NK, sel-T, keratinisit, sel dendrik, astrosit, fibroblas, neutrofil, sel endotel, dan sel otot polos. IL-1 α dan IL-1 β berupa peptida dengan jumlah asam amino masing-masing 159 dan 153 dan hanya 26 % yang urutan asam aminonya sama. Kedua interleukin ini mempunyai potensi dan aktivitas biologis yang sama serta mempunyai afinitas yang sama untuk berikatan dengan reseptornya pada permukaan sel. IL-1 α merupakan suatu peptida yang aktif dengan berat molekul 13 kD sedangkan IL-1 β merupakan peptida yang belum aktif dengan berat molekul 17 kD dan diaktifkan oleh *IL-1 β -converting enzym* (ICE).

Pada manusia, makrofag terutama mensekresi IL-1 β , sedangkan sel lainnya memproduksi IL-1 α . Dampak biologis IL-1 bergantung pada jumlah sitokin yang dilepaskan. Pada kadar rendah fungsi utamanya adalah sebagai mediator inflamasi lokal, misalnya berinteraksi dengan sel endotel untuk meningkatkan koagulasi dan meningkatkan ekspresi molekul permukaan yang membantu adhesi leukosit. Dalam kadar tinggi IL-1 masuk ke dalam sirkulasi dan melancarkan efek endokrin (Male *et al.* 1991; Abbas *et al.*, 2000).

IL-1 berfungsi meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi limfosit dan juga merangsang secara nonspesifik ekspresi berbagai reseptor antigen pada permukaan sel sehingga secara tidak langsung meningkatkan respons imun spesifik. Selain itu IL-1 juga merangsang produksi limfokin, di antaranya IL-2, IFN- γ dan faktor kemotaktik (Oppenheim *et al.*, 1991; Male *et al.*, 1991).

2.5.2 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) adalah suatu sitokin yang dihasilkan oleh mitogen atau sel-T yang sudah teraktivasi, yang mempunyai peranan penting dalam perkembangan sel-T spesifik terhadap antigen. IL-2 terdiri dari 153 asam amino, sedangkan prekursornya berupa glikoprotein yang terdiri dari 20 asam amino berupa peptida yang dipecah menjadi bentuk protein yang matur. Adapun gen pengatur dari IL-2 ini terdapat pada regio q26-28 pada kromosom 4q (Anonymous, 2004).

Sel-T apabila tidak teraktivasi tidak dapat berinteraksi dengan IL-2 dan juga tidak memproduksi IL-2 secara spontan. Tetapi apabila mendapat rangsangan dari antigen, mengakibatkan mRNA IL-2 akan disintesis dan dapat dideteksi dalam waktu 1 jam, mencapai kadar maksimum dalam waktu 6-8 jam, kemudian kadarnya akan turun kembali dalam waktu 24 jam. Semua sel yang mengekspresikan reseptor IL-2 (IL-2R) dapat berproliferasi atas rangsangan IL-2. Semua subset Limfosit T dapat mengekspresikan IL-2R dan memberikan respons terhadap IL-2, sel-T juga memproduksi IL-2 sehingga sel-T juga termasuk termasuk sebagai autokrin yang diatur secara ketat oleh rangsangan eksternal (Kresno, 2001).

Interleukin-2 juga dikenal sebagai faktor pertumbuhan parakrin oleh karena dapat merangsang proliferasi sel-T lain yang berdekatan. IL-2 diproduksi terutama oleh sel-T *helper* (Th) atas rangsangan IL-1 yang dilepaskan oleh makrofag. Selain diproduksi oleh sel-Th, IL-2 juga diproduksi oleh sel-T-supresor (Ts) dan sel-T-sitotoksik (Tc) dalam jumlah yang lebih sedikit, atas rangsangan yang sesuai yaitu MHC kelas I (Oppenheim, 1991).

ternyata IL-2 mempunyai peranan sangat penting terhadap:

1. Proliferasi sel-T
2. Merangsang produksi IFN- γ
3. Mengekspresikan MHC
4. Mengstimulasi proliferasi dan diferensiasi sel B
5. Meningkatkan aktivitas sel-NK
6. Merangsang produksi *colony stimulating factor* (CSF)
7. Meningkatkan efek sitotoksik dari sel-T sitotoksik (Kresna, 2001; Anonymous, 2004)

2.5.3 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) adalah suatu sitokin yang mempunyai peranan penting sebagai regulator dari fungsi sel limfoid dan mieloid. Ada dua fungsi utama dari IL-10 ini yaitu menghambat produksi jenis sitokin (TNF, IL-1, IL-12, kemokin) dan menghambat fungsi makrofag dalam aktivasi sel-T dan sel-NK. Sebagai tambahan IL-10 juga ikut dalam mengatur proliferasi dan diferensiasi dari sel B, *naïve cells* dan timosit (Moore *et al.*, 1993; Oppenheim dan Rucetti, 1997).

IL-10 merupakan suatu protein yang terdiri dari 160 asam amino dengan berat molekul 18,5 kDa (Anonymous, 2004). IL-10 dapat bekerja sama dengan sitokin lain untuk merangsang proliferasi sel B dan sel mastosit pada mukosa. Dampak akhir dari aktivitas IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non-spesifik maupun spesifik yang diperantarai sel-T, karena itu IL-10 juga disebut *cytokine synthesis inhibitory factor* dan sitokin anti inflamasi (Oppenheim and Rucetti, 1997).

2.5.4 Tumor Necrosis Factor (TNF)

Tumor Nekrosis Faktor α (TNF- α) juga dikenal sebagai *cachectin*, adalah suatu polipeptida berupa sitokin yang dihasilkan oleh monosit dan makrofag. Mempunyai banyak fungsi antara lain sebagai modulator dari respons imun dan sangat poten terhadap pirogen (Anonymous, 2004).

Ada dua bentuk TNF, yaitu TNF α dan TNF β . TNF α diproduksi oleh berbagai jenis sel antara lain makrofag, sel-T, sel B, sel NK, astrosit dan sel *Kupffer*. Pembentukan terjadi sebagai respons terhadap rangsangan bakteri, virus dan sitokin (*Granulocyte-macrophage stimulating factor*=GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- γ), kompleks imun, komponen komplemen C5a dan *reactive oxygen intermediates* (ROI). Sedangkan TNF β disekresi oleh sel-T dan sel B yang teraktivasi (Kresno, 2001).

TNF α dan TNF β 2'-5'(A) sintetase, yaitu protein yang diaktifkan oleh INF dan terlibat pada proteksi terhadap virus. TNF juga mempunyai kemampuan lain yaitu mematikan sel-T tertentu, karena matinya sel-T terinfeksi sebelum terjadinya replikasi virus menguntungkan penjamu (Roitt, 2002).

2.5.5 Interferon- γ

Interferon- γ adalah suatu glikoprotein yang berisi lebih kurang 21-24 kD subunit, sedangkan gen untuk pengatur INF ini berlokasi pada kromosom 12. Interferon- γ ini dihasilkan oleh sel-T dan sel NK apabila ada suatu infeksi (Anonymous, 2004).

Secara umum IFN dikelompokkan dalam IFN tipe I yang terdiri atas IFN- α dan IFN- β dan IFN tipe II yang mencakup IFN- γ . Ketiga interferon ini dapat meningkatkan aktivitas sitotoksik sel NK dengan berbagai cara, di antaranya meningkatkan ekspresi molekul pengenalan pada permukaan sel sasaran, merubah sifat cairan yang ada dalam

sel- NK maupun sel sasaran sehingga kedua sel lebih mudah saling melekat, hal ini akan meningkatkan produksi molekul sitolitik oleh sel-NK (Kresno, 2001).

Sel yang terinfeksi virus akan di atasi oleh IFN- γ dengan cara menolak masuknya virus ke dalam perangkat replikasi sel, dan menyiapkan sel untuk destruksi dengan merangsang pembentukan reseptor TNF (Roitt, 2003).

Sifat penting dari IFN- γ adalah (Marsetyawan, 2000) :

1. Aktivator yang potensial dari *antigen presenting cells*, sebagai *Macrophages activating factors* (MAF).
2. Meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I dan II.
3. Memacu langsung diferensiasi sel-T dan sel-B.
4. Mengaktifkan sel-NK, neutrofil dan sel endotel vaskuler sehingga daya adesi terhadap sel-TC(D4) meningkat.

2.6 Akibat infeksi VHC

2.6.1 Penanda infeksi VHC

Dikenal empat macam penanda virus untuk infeksi virus hepatitis C yang dipakai di klinik untuk penanganan penderita hepatitis C yaitu penentuan genotip virus hepatitis C, RNA-VHC, antigen *core*, dan antibodi untuk virus hepatitis C (anti-VHC). Diagnosis akut dan kronis penderita hepatitis C didasarkan pada penentuan anti-VHC secara *enzyme immunoassays* (EIA) dan RNA-VHC secara teknik biologi molekuler (Pawlutsky, 2002).

2.6.1.1 Pemeriksaan antibodi

Pemeriksaan serologi berguna untuk mendeteksi apakah terdapat antibodi anti-VHC di dalam darah seseorang yang terinfeksi VHC. pemeriksaan serologi ini berguna untuk tes penyaring terhadap anti-VHC dan tes antibodi tambahan. Untuk pemeriksaan tes penyaring untuk anti-VHC adalah dengan cara *enzyme immunoassay* (EIA). Pemeriksaan secara EIA ini mempunyai banyak keuntungan antara lain mudah dikerjakan, dengan variabel yang rendah, otomatisasi dan relatif murah harganya (Gretch, 1997).

Tes serologi dapat dipergunakan untuk diagnosis infeksi VHC masa lampau atau pada keadaan sekarang, membantu para klinisi dalam penanggulangan penderita dan pencegahan infeksi melalui tes saring terhadap donor darah dan plasma (WHO, 1999).

Antibodi anti-VHC merupakan *serologic window* di antara terjadinya infeksi VHC dan dengan penemuan antibodi yang spesifik dari penderita hepatitis C. Pada pemeriksaan, serokonversi akan terjadi berkisar 7 – 8 minggu setelah infeksi akut. Anti-VHC dapat dideteksi sekitar 50-70 % dari penderita hepatitis C dengan adanya gejala klinis dan akan menetap sampai kemudian hari. Seseorang yang sembuh dari infeksi VHC, anti-VHC akan menetap seumur hidup atau menurun secara perlahan ataupun akan hilang setelah beberapa tahun. Pada penderita hepatitis C kronik anti-VHC akan tetap positif (Pawlotsky, 2002).

Pemeriksaan imunologi terhadap infeksi VHC berkembang setelah penemuan metoda deteksi antibodi terhadap VHC dengan protein *recombinant* yang berasal dari nukleorida genom VHC (Kuo *et al.*, 1989; Choo *et al.*, 1989).

Penentuan anti-VHC baik generasi pertama maupun generasi kedua terutama ditujukan hanya untuk mendeteksi imunoglobulin G (IgG). Antibodi imunoglobulin M

(IgM) terhadap protein rekombinan c100-3, berasal dari protein non-struktural (Kuo *et al.*, 1989) dan peptida sintetik CP-14, asam amino 5-40 protein *core*, tampak muncul untuk sementara waktu pada penderita hepatitis C akut dan cenderung terus menurun bila hepatitis mengalami perbaikan, serta menurun atau meningkat bila infeksi tidak mengalami perbaikan atau mengalami kekambuhan. IgM anti CP-14 dan IgM anti-VHC *core* menggambarkan aktivitas penyakit hati, bermanfaat untuk mengikuti perjalanan dan hasil akhir infeksi hepatitis C akut (Nagayama *et al.*, 1994; Papatheodoridis *et al.*, 1997), serta IgM anti CP-14 dan IgM anti *core* bermanfaat untuk memantau keberhasilan terapi dengan interferon pada hepatitis C kronik (Nagayama *et al.*, 1994; Picciotto *et al.*, 1995). Antibodi IgG terhadap protein *core* c22-3 muncul lebih dini dibandingkan dengan antibodi terhadap protein *recombinant* yang berasal dari *region non struktural* (van der Poel *et al.*, 1991).

Pemeriksaan anti-VHC dengan tes EIA generasi pertama (EIA-1) untuk mendeteksi antibodi terhadap c100-3 adalah polipeptida *recombinant* yang berasal dari NS4 genom VHC. Meskipun banyak penderita hepatitis C kronik mempunyai antibodi yang bereaksi terhadap c100-3, dan sebagian penderita tetap negatif. Sensitivitas dari tes generasi pertama ini tergantung dari populasi yang diteliti, lebih tinggi yaitu 80-90% pada individu dengan faktor risiko parenteral dan kadar aminotransferase yang meningkat sesuai untuk hepatitis C kronik (Bresters *et al.*, 1992) dan lebih rendah yaitu sampai 60% pada donor darah sukarela (Watanabe *et al.*, 1993), sedangkan spesivitas dari tes generasi pertama ini kurang baik.

Penentuan anti-VHC dengan cara EIA generasi kedua atau ketiga dan sekarang telah tersedia berbagai produk dari berbagai macam pabrik, yang sebagian telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dan sebagian lagi belum disetujui.

Adapun produk untuk anti-VHC yang telah direkomendasi oleh FDA yaitu yang diproduksi oleh *Abbott* dan *Ortho*. Pemeriksaan tersebut untuk deteksi antibodi terhadap *core*, NS3, NS4 dan NS5 dari virus hepatitis C, dengan cara ini *microciter plates*, *microbeads* atau *specific holders* dilapisi dengan antigen virus. Spesivitas secara EIA untuk anti-VHC lebih dari 99%, sedangkan untuk sensitivitas lebih sukar ditentukan sehingga kurang untuk sebagai *gold standar* (Pawlotsky, 2002)

Pemeriksaan EIA generasi kedua (EIA-2) untuk deteksi anti-VHC banyak dipakai dengan memakai beberapa protein *recombinant* virus atau peptida yang berasal dari *region core* (c-33-3), NS2 (5-1-1) dan *region NS4* (c-100-3). EIA-2 ini lebih sensitif dan spesitivitas yang lebih baik dari EIA generasi pertama (EIA-1). walaupun demikian hasil tes positif palsu masih terjadi khususnya apabila ada keadaan hiperglobulinemia . Pada donor darah, sekitar 50% dengan hasil tes anti-VHC positif dengan EIA-2 tidak dapat dikonfirmasi dengan pemeriksaan tambahan yang lain karena pemeriksian tambahan tersebut mempunyai spesitivitas yang rendah. Oleh karena adanya reaksi non-spesifik maka dikembangkan pemeriksaan tambahan dengan *Recombinant immunoblot Assay* (RIBA), dimana protein *recombinant* virus dikeringkan di atas potongan (strip) nitroselulosa. Sampel serum yang akan diperiksa diinkubasikan pada strip tersebut dan antibodi akan berikatan pada berbagai protein virus tersebut yang dapat dideteksi dengan terjadinya perubahan warna.

Dengan pemeriksaan EIA generasi ketiga (EIA-3) dapat dideteksi lebih dari 95% penderita dengan infeksi VHC kronik, tetapi lamanya interval antara mulainya infeksi dengan terbentuknya anti-VHC lebih rendah yaitu berkisar antara 50-70% selama infeksi akut. Sedangkan pada donor darah nilai prediksi positif hanya berkisar 60-80%. Ditemui hasil positif palsu yang tinggi dengan tes EIA, meskipun sensitivitas dan

spesitivitas tinggi dari tes EIA sehingga dalam keadaan yang demikian tes kontinuitas tidak berguna. Dalam hal ini diperlukan pemeriksaan *recombinant immunoblot assay* (RIBA), reaksi antara antibodi dengan VHC penderita, juga diperlukan pemeriksaan terhadap genom VHC (WHO, 1999).

2.6.1.2 Pemeriksaan antigen dan RNA-VHC

Pemeriksaan secara molekuler dari virus hepatitis C dengan cara *polymerase chain reaction* (PCR), dapat dibagi atas dua bagian yaitu (1) pemeriksaan VHC secara kualitatif dan (2) pemeriksaan secara kuantitatif, untuk mengetahui kadar dari VHC dan penentuan genotip dari VHC (Gretch, 1997).

Pemeriksaan PCR secara kualitatif adalah untuk menentukan ada atau tidak adanya RNA-VHC, dan merupakan tes yang paling sensitif untuk diagnosis terhadap infeksi VHC. Hasil tes negatif palsu secara kualitatif ini disebabkan oleh kesalahan dalam penanganan atau penyimpanan sampel yang akan diperiksa, hal ini bisa terjadi kesalahan sampai 40 %. Seperti halnya dengan menggunakan anti koagulan *ethylene diamine tetra-acetic acid* (EDTA) atau meletakkan sampel pada suhu kamar sampai lima hari. Sedangkan hasil positif palsu dapat disebabkan oleh adanya kontaminasi, hal ini disebabkan karena PCR dapat mendeteksi kadar yang amat rendah dari RNA-VHC sehingga diperlukan kerja yang sangat teliti untuk mencegah kontaminasi ini. Pemeriksaan secara kuantitatif dari RNA-VHC, adalah menentukan jumlah RNA-VHC dalam satu mililiter serum (Natoy dan Pereira, 2005).

Pemeriksaan molekuler terhadap genom RNA-VHC yang terdapat dalam darah dan jaringan hati dapat dilakukan dengan cara *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan *branched DNA assay* (bDNA). Pemeriksaan RNA-VHC ini

berguna untuk konfirmasi terhadap tes serologis, mengetahui apakah seseorang terinfeksi atau tidak oleh VHC dan juga dapat digunakan sebagai pemantauan terhadap efektivitas pengobatan dengan obat anti virus (WHO, 1999).

Pemeriksaan RNA-VHC secara kuantitatif dengan cara *branched-chain* DNA batas paling rendah penentuan jumlah RNA-VHC adalah 200 000 RNA/ml, sedangkan batas paling rendah dengan cara RT-PCR lebih kecil dari 100 RNA/ml. Dengan demikian pemeriksaan RT-PCR lebih sensitif dari pada cara *branched-chain* DNA (Nativ dan Pereira, 2005).

Deteksi RNA-VHC dengan cara PCR merupakan pemeriksaan *gold standard* untuk mengidentifikasi adanya infeksi oleh VHC. Pada penderita hepatitis C yang terjadi setelah mendapat transfusi darah, tingginya jumlah virus di dalam sirkulasi darah dapat dideteksi dengan pemeriksaan PCR dalam satu minggu terkontaminasi dengan VHC dan sebelum terbentuknya antibodi anti-VHC atau sebelum meningkat kadar enzim transaminase (Nativ dan Pereira, 2005).

Terdapatnya RNA-VHC di dalam darah perifer menandakan terjadinya replikasi yang aktif dari virus tersebut di dalam sel hati. RNA-VHC dapat dideteksi di dalam serum 1-2 minggu setelah infeksi dan meningkat terus mencapai puncaknya, dan tidak ditemui apabila terjadi penyembuhan spontan. Sebagian besar penderita ini akan menjadi infeksi kronik, RNA-VHC akan menurun secara perlahan dan kemudian akan stabil. Jumlah RNA-VHC mungkin meningkat sedikit setelah beberapa tahun terjadinya infeksi kronik (Pawlotsky, 2002). Deteksi RNA-VHC dengan PCR mempunyai sensitivitas 93%, meskipun spesivitasnya sampai 100% (Silvia *et al.* 1994).

Deteksi urutan nukleotida VHC dapat dikerjakan baik dengan teknik amplifikasi PCR standar, menggunakan primer oligo nukleotida *conserved* diikuti hibridisasi dengan pelacak (*probe*) yang dilabel terhadap urutan internal, atau dengan *nested* atau amplifikasi PCR dua tahap dengan primer internal dan eksternal untuk selanjutnya dilakukan visualisasi sesudah elektroforesis dengan gel (Cuthbert, 1994).

Sebagaimana diketahui bahwa terjadinya hepatitis NANB sekitar 6 minggu setelah terinfeksi VHC, untuk ini sangat diperlukan deteksi dini terhadap RNA-VHC sebagai diagnosis pasti. Hal ini juga sangat penting dalam pengamatan, khususnya didapatkan tingginya prevalensi untuk terjadi infeksi kronik setelah infeksi akut (Puoti *et al.*, 1992; Schriber *et al.*, 1996). Deteksi dini dari RNA-VHC juga penting untuk membantu mengurangi insiden terhadap hepatitis pas transfusi dengan cara pemeriksaan RNA-VHC pada darah donor dengan anti-VHC yang negatif. Pemeriksaan RNA-VHC juga berguna untuk membedakan antara infeksi yang telah lalu dan infeksi yang terus menerus, dimana pada infeksi yang terus menerus ditandai dengan adanya RNA-VHC di dalam darah. Sedangkan infeksi yang telah lalu ditandai dengan terdapatnya RNA-VHC secara konsisten didapatkan lebih dari beberapa tahun (Saldanha & Minor, 1996).

Penentuan dari RNA-VHC juga berguna untuk mengetahui asal atau sumber dari infeksi VHC, suatu laporan kasus mengenai transmisi melalui heteroseksual dari VHC dengan hasil yang negatif. Hal ini menandakan bahwa transmisi VHC melalui hubungan heteroseksual tersebut adalah tidak biasa (Gordon *et al.*, 1992; Brosters *et al.*, 1993). Transmisi VHC antara ibu-anak terjadi 3 – 5 % dari setiap kelahiran anak yang terjadi pada ibu dengan RNA-VHC positif, angka ini akan meningkat apabila siibu mempunyai jumlah VHC yang lebih tinggi (Lim *et al.*, 1994; Aizaki *et al.*, 1996). Selama menyusui terjadi transmisi anti-VHC secara pasif kepada si anak, dengan

pemeriksaan RNA-VHC pada darah si anak untuk membedakan antara adanya anti-VHC yang didapat secara pasif dari ibu dengan adanya infeksi yang aktif pada si anak (Boudot-Thoraval *et al.*, 1993). Selanjutnya deteksi dari RNA-VHC juga untuk menentukan sumber dari infeksi nasokomial di berbagai rumah sakit.

Pemeriksaan RNA-VHC secara kuantitatif sangat berguna untuk pengobatan penderita dengan obat anti virus, mengikuti atau *follow up* dari terapi, dan apakah pengobatan tersebut diteruskan atau diakhiri. Sebagai contoh dimana seorang penderita hepatitis C yang diobati dengan interferon memberikan hasil yang signifikan, pada permulaan pengobatan dengan kadar RNA- VHC yang rendah dibandingkan dengan penderita yang *relaps* atau tidak responsif terhadap pengobatan. Hal ini merupakan bukti juga bahwa rangkaian genom VHC yang berbeda pada setiap individu mungkin akan mempengaruhi apakah penderita itu responsif terhadap pengobatan dan jenis pengobatannya (Hagiwara *et al.*, 1993; Rumi *et al.*, 1996).

2.6.2 Infeksi VHC akut

Respons imun spesifik terhadap VHC pada umumnya tidak dapat memusnahkan VHC, dengan demikian penyembuhan secara spontan jarang terjadi sehingga lebih dari 80 % dari infeksi akut akan menjadi persisten. Pada umumnya selama infeksi VHC dengan tanpa gejala untuk beberapa tahun sehingga penyakit ini sudah terlambat diketahui (Everhart *et al.* 1997).

Yang dimaksud dengan infeksi akut dari virus hepatitis C adalah apabila infeksi berlangsung kurang dari 6 bulan. Hanya sedikit sekali penderita hepatitis C akut ini sembuh dengan sempurna, dan sebagian besar akan berlanjut menjadi kronik (Albert and Bortolotti, 1999).

Selama fase akut infeksi VHC jarang terdiagnosis, dan manifestasi klinik atau masa inkubasi dapat terjadi rerata 7-8 minggu (*range* 2-26 minggu) setelah terinfeksi oleh VHC. Sebagian besar orang yang terinfeksi oleh VHC ini tanpa gejala atau dengan gejala yang ringan, sedangkan terjadinya hepatitis fulminan pada masa periode ini sangat jarang sekali. Pada kasus dengan gejala yang ringan biasanya ditemui adanya ikterus, lemah dan lesu serta mual, dan diperkirakan 74-86% dari kasus akan ditemui viremia yang persisten (Lauer and Walker, 2001).

Hepatitis C akut dapat terjadi pada semua usia, namun kebanyakan kasus terjadi pada usia dewasa muda. Penyakit ini jarang dijumpai pada masa anak-anak, tetapi di antara orang dewasa yang berusia di atas 40 tahun hepatitis C merupakan penyebab tersering dari hepatitis C akut. Tidak terdapat predileksi jenis kelamin yang konsisten untuk hepatitis C, kecuali frekuensi lebih tinggi pada kasus yang berhubungan dengan pemakaian obat intravena pada kaum pria. Hepatitis C dapat terjadi di seluruh dunia dan pada semua ras atau kelompok etnik (Alter, 1995).

Terbentuknya antibodi anti-VHC di dalam darah setelah terjadi gejala klinis, sedangkan pada penderita dengan gejala subklinik pembentukan antibodi ini bisa terlambat. Hasil penelitian dari 19 orang penderita yang mendapat infeksi VHC akibat pemakaian obat suntik intravena, didapatkan kadar RNA-VHC yang rendah di dalam darah atau dalam sel mononuklear darah tepi, rata-rata setelah 41 bulan (13-94 bulan). Hal ini lebih dahulu terdeteksi dari pada terbentuknya antibodi anti-VHC pada hasil penelitian tersebut (Beld *et al*, 1999).

Setelah terjadi infeksi VHC akut kadar aminotransferase (GPT) biasanya berfluktuasi dan seringnya lebih dari 40% berada dalam kadar yang normal. Pada penderita yang sembuh dari infeksi akut VHC ditentukan dengan tidak terdeteksinya

VHC di dalam darah penderita tersebut, dan ini terjadi hanya kurang dari 15% penderita. Selanjutnya RNA-VHC bisa dideteksi di dalam hati, sedangkan di dalam serum penderita tersebut tidak terdeteksi meskipun gejala klinik tidak jelas. Dengan demikian bila kadar enzim transaminase serum normal setelah infeksi akut tidak berarti bahwa infeksi dari VHC tersebut telah teratasi (Haydon *et al.*, 1998).

2.6.3 Infeksi VHC kronik

Yang dimaksud dengan infeksi VHC kronik adalah apabila infeksi oleh VHC berlangsung lebih dari 6 bulan dengan atau tanpa gejala manifestasi dari hati atau adanya penyakit di luar hati. Penderita karier dimana tidak adanya tanda maupun gejala penyakit hati dan dengan kadar enzim aminotransferase dalam batas normal (Albert dan Bartolotti, 1999).

Sekitar 80% penderita yang terinfeksi VHC akan berkembang menjadi progresif secara perlahan, dalam hal ini penderita dapat tanpa gejala untuk selama 20 tahun atau lebih yang akhirnya virus akan menyerang hati. Sebagian besar penderita yang terinfeksi VHC menunggu untuk dilakukan transplantasi hati (Lai, 2002).

Pada penderita yang karier biopsi hati merupakan peranan penting untuk menentukan adanya kerusakan hati. Pada hepatitis C kronik secara biokimia ditandai oleh kadar GPT yang bervariasi dan secara histologi terjadi perubahan dari bentuk ringan sampai pada keadaan inflamasi yang berat dan terjadinya fibrosis (Albert dan Bartolotti, 1999)

2.6.4 Sirosis hepatis

Sekitar 5-20 % penderita hepatitis C kronik akan berkembang menjadi sirosis hepatis, setelah lebih kurang 20 - 25 tahun kemudian. Sirosis hati yang disebabkan

VHC mempunyai risiko untuk terjadinya penyakit hati terminal, lebih kurang 30 % setelah 10 tahun kemudian (Strader *et al.*, 2004).

Komplikasi yang paling sering terjadi pada penderita hepatitis C kronik adalah sirosis hati. Menurut hasil penelitian secara kohor prospektif dilaporkan bahwa dari 838 penderita hepatitis C kronik yang diobservasi selama 50 bulan didapatkan 62 penderita meninggal (31 orang dengan penyakit hati dan 31 orang lagi dengan penyebab yang lain). 30 penderita yang hidup dengan komplikasi sirosis. Lebih kurang 7 % dari penelitian ini berhubungan dengan morbiditi dan mortaliti selama dilakukan *follow-up* dari penelitian ini. Peningkatan angka kematian di antara penderita tersebut terjadi pada penderita dengan sirosis hati pada waktu penelitian dimulai (Chopra, 2001).

Terjadinya sirosis ini pada kebanyakan penderita adalah secara tersembunyi, tanpa diketahui oleh penderita tersebut. Meskipun penderita itu mempunyai gejala (simtomatik) dihandingkan dengan hanya dengan hepatitis C kronik saja, tanpa gejala klinis, adanya tanda pemeriksaan fisik atau tes laboratorium yang sensitif atau spesifik untuk diagnosis. Pada pemeriksaan fisik ditemukan hepatomegali (68 %) atau splenomegali (Tong *et al.*, 1995). Hasil pemeriksaan laboratorium dapat membantu mengidentifikasi penderita hepatitis C kronik dengan sirosis, yang menyokong untuk ini adalah peningkatan konsentrasi bilirubin serum (40 %), hipoalbuminemia (10 %), atau penurunan jumlah trombosit pada penderita sirosis hepatis (Garcia-Suarez *et al.*, 2000).

Pada pemeriksaan *alfa feto protein* (AFP) serum mungkin meningkat sedikit pada penderita hepatitis C kronik, sampai 43 % penderita dengan sirosis tanpa hepatoseluler karsinoma menunjukkan kadar AFP serum berkisar 10-100 ng/mL. Untuk hal ini perlu

diketahui berapa konsentrasi AFP serum untuk dapat menyingkirkan hepatoseluler karsinoma. Melakukan pemeriksaan AFP secara berkesinambungan (serial) untuk beberapa bulan sangat diperlukan apabila hasil tes negatif, jika terjadi peningkatan kadar AFP pada pemeriksaan serial tersebut merupakan indikasi terjadinya suatu keganasan (Merican *et al.* 1993; Fattovich *et al.* 1997).

Sirosis hati merupakan komplikasi terbanyak yang dijumpai pada penderita hepatitis C kronik. Dari hasil penelitian dilaporkan bahwa sebanyak 384 penderita sirosis pada tahap kompensasi yang disebabkan oleh VHC didapatkan risiko untuk terjadinya dekompensasi hati adalah sebanyak 3,9 % pertahun. Kebanyakan bentuk dari dekompensasi tersebut adalah asites, perdarahan varises, ensefalopati dan kuning hampir selalu tanda ini ditemui pada penyakit hati lanjut pada penderita hepatitis C kronik (Fattovich *et al.* 1997).

2.6.5 Karsinoma hepatoseluler

Diperkirakan 30 juta penduduk dunia menderita sirosis hati sebagai akibat infeksi VHC kronik, dan sirosis hati ini akan berkembang menjadi karsinoma hepatoseluler (KHS) dalam proporsi yang tinggi. Penderita Hepatitis C dengan sirosis mempunyai risiko tinggi untuk terjadinya KHS, dan di Jepang 6-8 % penderita hepatitis C dengan sirosis akan berkembang menjadi KHS setiap tahunnya (Oka *et al.* 1990; Kaneko *et al.* 1994).

Bagaimana terjadinya karsinoma hepatoseluler sebagai akibat infeksi virus hepatitis sampai saat ini masih belum jelas, dalam hal ini di Jepang telah melaporkan bahwa lebih dari 95 % penderita dengan karsinoma hepatoseluler sebagai akibat infeksi VHB, VHC, atau keduanya (Kiyosawa *et al.* 1990; Yotsuyanagi *et al.* 2000).

Infeksi oleh kedua virus tersebut yang mengakibatkan karsinoma hepatoseluler di negara lain juga sering terjadi tetapi dalam jumlah yang lebih sedikit dari yang terjadi di Jepang.

Proses inflamasi yang disebabkan oleh virus hepatitis yang terjadi pada seseorang dengan berbagai bentuk dari hepatitis, telah menjadi pertimbangan sebagai kapasitas dalam studi karsinogenik dari virus hepatitis. Hal ini telah berulang kali di kemukakan bahwa nekrosis dari sel hati yang disebabkan oleh inflamasi kronik dan regenerasi akan meningkatkan mutagenesis di dalam sel inang, akumulasi dari proses tersebut mungkin mencapai puncak akan menjadi karsinoma hepatoseluler nantinya. Seseorang yang terinfeksi oleh VHC memerlukan waktu yang panjang untuk berkembang menjadi karsinoma hepatoseluler berkisar 30 – 40 tahun kemudian (Koike *et al*, 2002).

Karsinoma hepatoseluler adalah suatu tumor ganas . pada kebanyakan kasus yang dihubungkan dengan sirosis hati. Insiden dari KHS ini berkisar antara 3-9% dan ini merupakan penyebab kematian dari penderita sirosis hati. Apabila KHS didiagnosis pada fase asimtomatik , sedangkan pengubatan pada fase ini jarang sekali dilakukan sehingga prognosisnya menjadi buruk (Velazquez *et al*, 2003).

Telah dilaporkan bahwa terjadi perkembangan secara perlahan dan bertahap dari hepatitis C akut menjadi hepatitis C kronik dan sirosis hepatis yang selanjutnya berkembang menjadi karsinoma hepatoseluler. Risiko untuk terjadinya karsinoma hepatoseluler ini lebih kurang 1-2 % pertahun (Strader *et al*, 2004).

Banyak hipotesis yang diajukan mengenai patogenesis terjadinya KHS. salah satu di antaranya adalah akibat dari inflamasi yang berulang-ulang dan proliferasi yang

meningkat (aktivitas mitosis) dari sel jaringan sehingga terjadi keganasan, sebagai akibat dari kromosom yang tidak stabil dan meningkatnya mutasi (Kazuo *et al.* 1999).

Suatu perbedaan yang penting antara infeksi virus hepatitis B dengan VHC yakni pada infeksi oleh VHC terjadinya karsinoma hepato seluler hampir selalu pada penderita dengan sirosis, sehingga sirosis merupakan faktor risiko yang besar untuk terjadinya KHS. Pada percobaan binatang dapat dibuktikan, bahwa tikus yang telah dibuat *transgenic* dengan *VHC-core* dan berkembang menjadi adenoma dan karsinoma (Moriya, 1998).

Pencegahan terhadap terjadinya KHS pada penderita tersebut adalah sangat penting oleh karena penderita hepatitis C dengan sirosis biasanya tidak diobati dengan interferon karena kurang berhasil. Untuk pencegahan ini yang penting dilakukan adalah penelitian dasar mengenai mekanisme hepatokarsinogenesis dari penderita tersebut (Tarao *et al.* 1999).

Dari hasil penelitian Tarao *et al.* (1998) dilaporkan bahwa apabila terjadi peningkatan kadar GPT serum secara menetap, hal ini merupakan risiko tinggi untuk terjadinya KHS, dan sebaliknya apabila kadar GPT serum rendah dan menetap merupakan risiko lebih rendah untuk terjadinya KHS. Dari hasil penelitian tersebut juga didapatkan bahwa dengan kadar GPT yang tinggi terjadinya KHS dalam 5 tahun sejak dari permulaan terjadi sirosis. Hal ini berbeda dengan kelompok yang kadar GPT serum rendah, dimana KHS terjadi setelah 5 tahun sejak secara histologi terdiagnosis sebagai sirosis. Peneliti ini juga melaporkan bahwa kadar GPT serum berhubungan erat dengan terjadinya KHS dari pada kadar ALP serum (Tarao *et al.* 1999).

2.6.6 Infeksi asimtomatik

Pada waktu terjadinya hepatitis C akut sebagian besar penderita tidak mengetahui, oleh karena tanpa gejala baik secara subjektif maupun objektif. Hal ini diketahui pada waktu donor darah, waktu dilakukan tes penyaring didapatkan anti-VHC positif dan ini dikonfirmasi dengan pemeriksaan RNA-VHC serum. Penderita ini digolongkan pada status hepatitis C karier. Sedikit diketahui tentang status hepatitis karier ini, oleh karena mereka hanya diketahui sewaktu melakukan donor darah. Pada penderita karier ini dilakukan biopsi hati, gambaran histologi terlihat perubahan dengan berbagai tingkat kerusakan bahkan sampai pada tingkat sirosis. Lebih kurang 30 % penderita karier ini terjadi peningkatan kadar enzim transferase di dalam darah (Lino, 2002).

Telah dilakukan penelitian terhadap 52 orang donor darah "sehat" yang terinfeksi VHC, menunjukkan bahwa 50 orang di antaranya disertai dengan kelainan jaringan biopsi hati. Kelainan ini bervariasi dari perlemakan hati, hepatitis kronis persisten, hepatitis kronik aktif sampai pada sirosis hati (Irving *et al.* 1994).

Hepatitis C karier terjadi setelah infeksi VHC akut dengan frekwensi berkisar dari 60 % sampai 100 %. Dari pemeriksaan darah donor dengan anti-VHC positif didapatkan RNA-VHC serum positif sekitar 60-70 %, sedangkan enzim transaminase (GPT) berfluktuasi dan RNA-VHC akan positif selama kadar GPT meningkat (Lino, 2002).

2.7 Epidemiologi infeksi VHC

Virus hepatitis C dianggap sangat penting oleh karena dapat menimbulkan problem kesehatan yang sangat besar dan sebagai penyebab utama dari berbagai

penyakit hati kronik. Diperkirakan sekitar 85 % dari yang terinfeksi VHC akan menderita penyakit hati kronik (Lanford and Rigger, 2001).

Penyakit hati kronik ini kebanyakan asimtomatis atau hanya dengan keluhan yang ringan, dan hal ini dapat terjadi untuk beberapa dekade. Sampai sekitar 20 % individu yang terinfeksi oleh VHC ini akan berkembang menjadi sirosis hati dan beberapa kasus akan berkembang menjadi karsinoma hepatoseluler (Alter dan Seeff, 2000).

2.7.3 Prevalensi dan insidensi

Pada saat ini menurut laporan dari *the Centers for disease Control and prevention* di Amerika diperkirakan lebih dari 2,7 juta orang mengalami infeksi VHC (Strader *et al.*, 2004). Diseluruh dunia diperkirakan 170 juta orang telah terinfeksi oleh VHC dan dengan demikian virus bersifat pandemik, sedangkan pada penderita *human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)* akan meningkat sampai 5 kali (Lauer and Walker, 2001). Menurut laporan dari World Health Organization (WHO) diperkirakan lebih kurang 3 % dari penduduk dunia telah terinfeksi oleh VHC (Candotti *et al.*, 2003).

Prevalensi dari infeksi VHC ini bervariasi dari setiap negara di dunia tergantung dari lokasi dan populasi penduduk yang diteliti. Jumlah yang terbesar telah dilaporkan oleh negara Arab oleh karena di negara ini dipergunakan obat antihistosomal secara parenteral, yang merupakan antibodi untuk melawan VHC sehingga meningkatkan prevalensi infeksi VHC di berbagai daerah di Arab dari 6 % - 28 % (rata-rata 22 %) (Frank *et al.*, 2000).

Di Amerika Serikat dilaporkan bahwa 1,8 % dari populasi penduduk dengan anti-VHC positif, dan 3 dari setiap 4 yang positif anti-VHC berada dalam keadaan viremia dan diperkirakan 2,7 juta orang berada dalam keadaan infeksi aktif. Alasan kuat

sebagai faktor penyebabnya dihubungkan dengan pemakaian obat injeksi dan penerima transfusi darah sebelum tahun 1990 (Alter *et al*, 1999).

Di negara yang sedang berkembang sampai saat ini melalui transfusi darah merupakan risiko besar untuk mendapatkan infeksi VHC. Sejak tahun 1990 dan 1992 diperkenalkan suatu pemeriksaan anti-VHC, sebagai tes penyaring dari darah donor untuk transfusi terhadap VHC sehingga secara dramatis terjadi penurunan risiko terhadap infeksi VHC. Risiko penularan melalui darah transfusi di Amerika adalah negatif untuk anti-VHC, hanya terdapat kurang dari satu dalam 103 000 unit transfusi darah (Schreiber *et al*, 1996). Jarak antara terjadi infeksi sampai dengan terdeteksi anti-VHC diperkirakan kurang dari 12 minggu. Untuk masa sekarang risiko untuk mendapatkan infeksi VHC melalui transfusi darah dapat lebih diturunkan lagi sejak adanya tes penyaring yang baru, yaitu pemeriksaan sampel darah dengan cara PCR sehingga dapat mendeteksi adanya infeksi VHC sekitar 3 minggu (Beld *et al*, 2000).

Penderita yang mengalami hemodialisis akan mendapatkan risiko tinggi terhadap infeksi virus hepatitis C, seperti beberapa faktor lain, yaitu transfusi darah, immunosupresi parsial dan seringnya melakukan injeksi parenteral. Beberapa peneliti telah melaporkan mengenai prevalensi anti-VHC positif pada penderita yang mengalami hemodialisis, berkisar dari 2 % di Barat Daya Eropa, sampai 76,3 % di Indonesia (Soetjipto *et al*, 1996; Schneberger *et al*, 1998). Juga telah dilakukan penelitian di Brazil terhadap penderita yang mengalami hemodialisis, disini juga didapatkan angka prevalensi yang tinggi berkisar 29,4 %- 65 % (Karoht *et al*, 1995; Vanderborghi *et al*, 1995; Naghettini *et al*, 1997; Gungora, 1998).

Hasil penelitian dari kota Goiania didapatkan tingginya prevalensi terhadap infeksi VHC pada penderita yang mengalami hemodialisis apabila dibandingkan dengan

angka prevalensi dari donor darah (1,4 %) dan prevalensi pada populasi wanita (0,9 %).

Prevalensi anti-VHC positif dari populasi hemodialisis penduduk Brazilia (39 %) adalah lebih tinggi dari yang dilaporkan dari Goiania Porto Alegre (Krohl *et al.* 1995; Naghettini *et al.* 1997), dan angka prevalensi yang sama terjadi di Sao Paulo (Gongora, 1998) sedangkan prevalensi yang lebih rendah ditemui di Rio de Janeiro (Vanderknaigh *et al.* 1995).

Prevalensi infeksi VHC di kota-kota Afrika Selatan dan Afrika sub-Saharan dilaporkan kurang dari 1 %, sedangkan di sentral Afrika berkisar 1,7 % sampai 27,5 %, dan Afrika Barat dan Timur berkisar antara 1,4 % sampai 7 %. Variasi prevalensi ini terjadi disebabkan tidak hanya oleh karena heterogenitas populasi tetapi juga oleh karena metoda yang dipergunakan untuk pemeriksaan deteksi terhadap VHC yang berbeda-beda (Candotti *et al.* 2003).

Di Beijing Cina, Prevalensi anti VHC pada populasi umum dilaporkan 2,1 % (Jao *et al.* 1991), sedangkan pada donor darah sukarela RNA-VHC dideteksi 0,3 % lebih rendah dari donor komersial (5,7 %). Sebanyak 13 % donor darah dengan RNA-VHC positif tetapi anti-VHC tidak terdeteksi dengan ELA II (Wang *et al.* 1994).

Insiden infeksi VHC sporadik di Jepang pada akhir ini didapatkan sangat rendah.. Sebanyak 114.266 donor darah teratur melaporkan insidensi perolehan infeksi VHC masing-masing 0 pada kelompok pertama dan kedua, dan 1,78 per 100.000 orang /tahun pada kelompok ketiga (Sasaki *et al.* 1996).

Prevalensi anti-VHC pada donor darah sukarela di beberapa kota di Indonesia dilaporkan berkisar antara 3,6 % sampai 15 %, dengan angka prevalensi tertinggi dilaporkan berasal dari Denpasar Bali yaitu sebesar 15 % (termasuk anti-VHC titer

rendah). Bila dilihat dari hasil titer tinggi ($\geq 2,0$) maka prevalensi anti-VHC pada donor darah bervariasi antara 0,2 % sampai 2,2 %. Frekuensi anti-VHC pada donor darah di Denpasar lebih tinggi dibanding Surabaya, Malang, Solo, Mataram dan Balikpapan. Pada kelompok individu sehat lain dikemukakan prevalensi anti-VHC berkisar 1,4 sampai 4,4 % (termasuk titer rendah) (Mulyanto *et al.*, 1993). Dari tabel 2.3 dapat dilihat prevalensi anti-VHC pada populasi umum dan donor darah di beberapa kota di Indonesia.

Tabel 2.3. Prevalensi anti-VHC pada populasi umum dan donor darah di Indonesia

Daerah & Peneliti	Populasi Umum		Donor Sukarela		Metoda
	N	%	N	%	
Jakarta Timan <i>et al.</i> , 1993			193	1,6	EI/Ortho
Yogyakarta Triwibowo, 1993			368	1,1	EI/Organon
Ujung Pandang Amiruddin, 1991			196	3,1	EI/Ortho
Jakarta Budihusodo, 1991			243	2,5	EI/Ortho
Jakarta Akbar <i>et al.</i> , 1997	985	3,9			Dipstick
Denpasar Wibawa, 1992			300	2,3	EIA-2/UBI
Indonesia Mulyanto, 1993	1214	3,4	3920	6,2	CP10&CP9
Yogyakarta Soeliadi, 1993	705	9,5			Ortho II
Padang Mira, 2002			15348	0,52	Ortho II

Keterangan: EI/Ortho - Metoda *enzyme immunoassay* generasi I (Ortho)
 Ortho-II - Metoda *enzyme immunoassay* generasi II
 EIA-II/UBI - Metoda *enzyme immunoassay* generasi II (UBI)
 EI/Organon - Metoda *enzyme immunoassay* generasi I (Organon Teknika)
 CP9&CP10 - Antibodi terhadap peptida *core* sintetik
 m - Karyawan rumah sakit

2.7.2 Transmisi infeksi VHC

VHC adalah virus *blood-borne* yang beredar di dalam sirkulasi darah akibat terinfeksi virus ini. Bentuk transmisi yang paling sering untuk penularan VHC ini adalah melalui pemakaian bersama jarum suntik yang terkontaminasi dengan VHC di antara pemakai obat injeksi tersebut dan melalui transfusi darah sebelum tahun 1990 (Alter *et al.*, 1994).

Pada tahun 1960 beberapa peneliti melaporkan bahwa diperkirakan sekitar 20 % atau lebih dari penderita yang menjalani terapi transfusi darah atau produk darah telah terinfeksi oleh VHC. Semenjak tahun 1992 dengan sudah tersedianya pemeriksaan VHC dengan mempergunakan antibodi generasi kedua (EIA-II), semua darah untuk transfusi secara rutin dikerjakan tes penyaring terhadap VHC. Sehingga dengan cara demikian risiko terhadap infeksi VHC melalui transfusi darah dapat diturunkan, diperkirakan hanya 0,001 % per unit darah transfusi (Schreiber *et al.*, 1996). Demikian juga halnya dengan penderita hemofilia yang mendapat pengobatan dengan faktor VIII sebelum tahun 1985 atau factor IX sebelum tahun 1987 telah terinfeksi oleh VHC sampai 90 % (Troisi *et al.*, 1993; McQuillan *et al.*, 1996).

Mengenai beberapa transmisi yang merupakan faktor risiko untuk terjadinya infeksi oleh virus hepatitis C ini dapat dilihat pada tabel 2.4.

Tabel 2.4. Faktor risiko untuk terjadinya infeksi virus hepatitis C

No	Cara penularan
1	Yang menerima darah atau produk darah (khususnya sebelum tahun 1992)
2	Mempergunakan obat-obat secara intravena
3	Mempergunakan kokain intranasal
4	Hemodialisis kronik
5	Ibu dengan VII C yang positif (khususnya bersama dengan HIV positif)
6	Set jarum suntik di bidang kesehatan
7	Kontak seksual dengan seseorang yang mengidap VHC (rendah)
8	Adanya riwayat tato dan tindik badan

(Jacobson, 2001)

Transmisi dari virus melalui penggunaan dan pemakaian bersama jarum suntik atau peralatan untuk obat-obat terlarang secara intravena, cukup berarti. Sebuah penelitian melaporkan bahwa terjadinya transmisi VHC selama inhalasi kokain melalui sedotan yang sudah terkontaminasi VHC (Conry-Cantilena *et al*, 1996). Transmisi melalui kokain intranasal ini sebagai faktor risiko untuk terjadinya infeksi VHC, apakah signifikan masih dipertanyakan. Dari pengalaman sipengarang didapatkan riwayat infeksi melalui kokain intranasal sebagai faktor risiko cukup banyak penderitanya (Jacobson, 2001).

Transmisi nasokomial dari VHC di USA sudah jarang , dimana semua pekerja kesehatan harus menyadari akan risiko apabila kontrol terhadap infeksi tepat dan prosedur dekontaminasi tidak dilatih. Dengan demikian angka infeksi VHC di antara

pekerja kesehatan tidak lebih tinggi apabila dibandingkan dengan yang didapat dalam populasi umum yaitu berkisar 1 % - 2 % (Anonymous, 1998).

Di rumah sakit bagian unit hemodialisis angka prevalensi di antara penderita hemodialisis kronik berkisar sekitar 10 %, yang beberapa senter unit hemodialisis melaporkan prevalensi ini bervariasi yaitu sampai 60 %. Risiko terhadap infeksi VHC ini terus meningkat dari tahun ketahun pada penderita yang menjalani terapi hemodialisis (Tokars *et al.*, 1998).

Virus hepatitis B (VHB) biasanya transmisi melalui hubungan seksual, sedangkan VHC transmisi dengan cara demikian sangat kurang sekali. Dari hasil penelitian terhadap pasangan suami istri yang salah satunya menderita hepatitis C kronik menyatakan bahwa angka transmisi melalui hubungan seksual ini sangat rendah berkisar 0 % - 4,4 % (rata-rata 1,5 %) (Anonymous, 1998). Menurut laporan dari CDC sekitar 15 % dengan infeksi akut VHC mempunyai riwayat kontak seksual, dengan seorang yang sudah terinfeksi VHC atau dengan beberapa orang teman seksualnya, dan tidak mempunyai faktor risiko lainnya untuk transmisi (Alter, 1997; Anonymous, 1998). Dalam hal ini CDC telah mengambil suatu kesimpulan bahwa infeksi VHC dapat terjadi pada transmisi seksual dengan angka yang relatif kecil.

Transmisi vertikal VHC, dari ibu dengan VHC positif kepada anaknya dapat terjadi selama masa perinatal, dengan angka kejadian berkisar 5 %. Apabila ibunya juga mengidap HIV positif, angka kejadian ini juga akan meningkat berkisar 14 % atau lebih (Anonymous, 1998). Prevalensi untuk transmisi nonseksual di rumah tangga berkisar 4 % (Alter, 1995), tetapi kebanyakan para klinisi di USA menyatakan bahwa transmisi di rumah tangga lebih rendah. Secara teori transmisi di rumah tangga dapat terjadi dengan pemakaian bersama pisau cukur, penggosok gigi dan alat-alat lain

dirumah tangga yang mempunyai potensial terkontaminasi dengan darah yang mengandung VHC. Penderita dengan infeksi VHC dianjurkan untuk tidak mempergunakan alat-alat tersebut secara bersama dalam anggota keluarga.

Transmisi VHC secara tato, tindik badan, pisau cukur dan penggunaan obat secara parenteral dapat terjadi. Tetapi beberapa kasus tanpa ada faktor risiko dapat terinfeksi virus hepatitis C, seperti halnya di USA berkisar 10 % yang tidak ada hubungannya dengan faktor risiko tersebut (Anonymous, 1998).

Penybaran infeksi VHC melalui jalur penularan selain transfusi darah, hal ini mungkin tergantung terhadap adanya virus dengan titer tinggi tertentu atau pada luasnya kerusakan pada kulit, membran mukosa atau *barrier* pembuluh darah (Kiyosawa *et al.*, 1991).

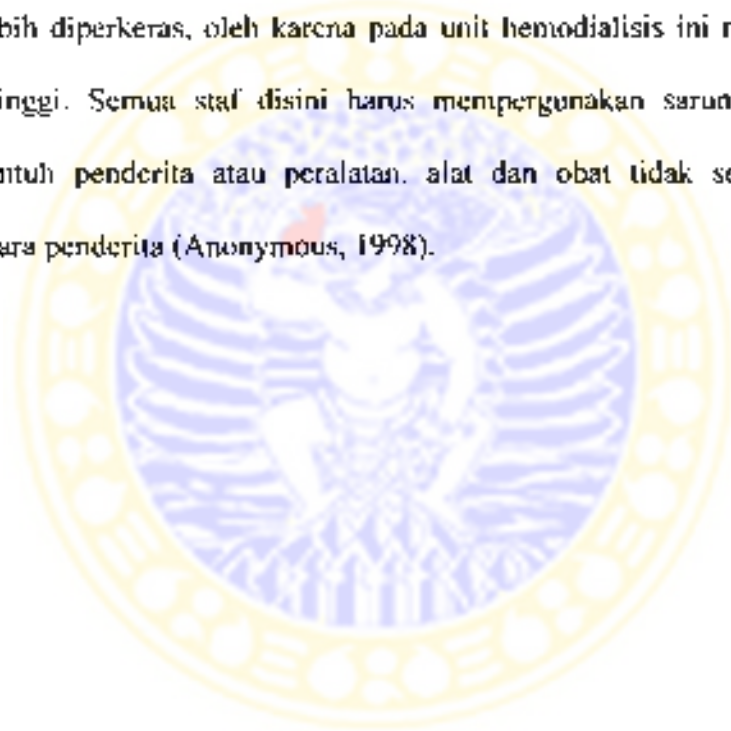
2.7.3 Pencegahan

Sampai saat ini belum ada vaksin untuk mencegah terjadinya infeksi VHC terhadap manusia. Sebagai pedoman untuk pencegahan primer terhadap terjadinya infeksi VHC dilakukan beberapa langkah sebagai berikut yaitu: dilakukan penyaringan terhadap semua darah, plasma, jaringan, organ, dan cairan mani donor dengan anti-VHC (Jacobson, 2001). Sebelum dilakukan tes penyaring, semua donor yang diketahui mempunyai faktor risiko terhadap adanya VHC dikeluarkan. Produk plasma, termasuk faktor pembekuan dan produk imunoglobulin harus melalui proses deaktivasi dari virus.

Pencegahan primer lainnya dilakukan konseling terhadap pemakai obat narkotik dengan memasukan mereka ke dalam program pengobatan, apabila mereka masih tetap mempergunakan obat injeksi, beri mereka penjelasan bahwa berbahaya

mempergunakan jarum suntik dan peralatan lainnya secara bersama (Anonymous, 1998).

Terhadap pekerja kesehatan dan di rumah sakit sangat penting adanya setandar pencegahan terhadap penanganan darah dan jarum suntik yang sudah dipakai harus secara ketat diawasi. Semua staf harus sudah tahu terhadap tindakan pencegahan antara lain menggunakan sarung tangan apabila menyentuh darah, cairan tubuh, sekresi, ekskresi dan peralatan yang terkontaminasi. Tindakan pencegahan pada unit hemodialisis lebih diperkeras, oleh karena pada unit hemodialisis ini risiko terhadap infeksi lebih tinggi. Semua staf disini harus menggunakan sarung tangan bila mereka menyentuh penderita atau peralatan, alat dan obat tidak secara bersama memakai di antara penderita (Anonymous, 1998).

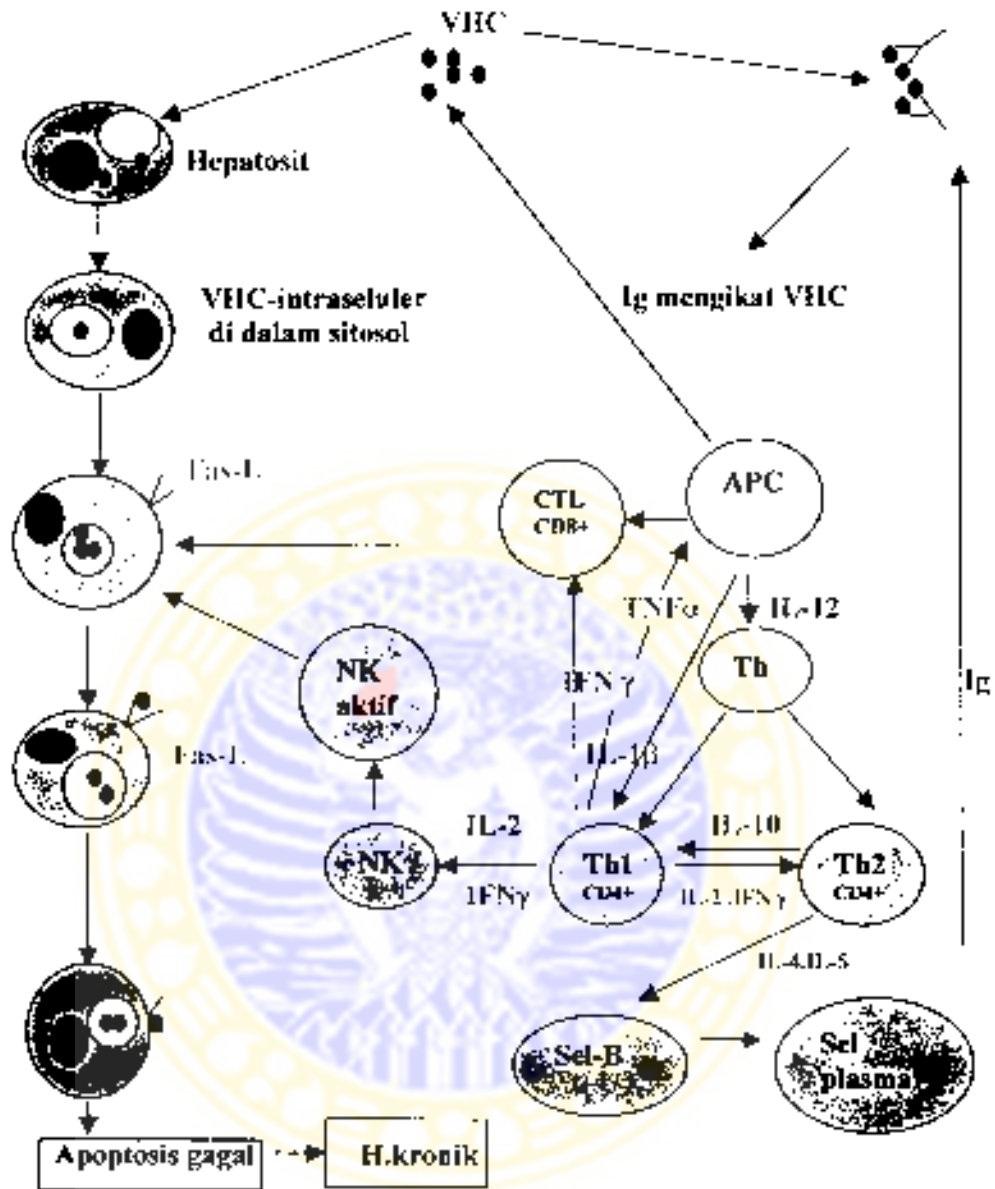


akan mengaktivasi sel NK sehingga menghancurkan sel hepatosit yang terinfeksi virus VHC dan mencegah sel sekitar yang terinfeksi tidak diinfeksi oleh virus.

IL-2 yang dihasilkan oleh sel-Th1 bersama dengan IFN- γ akan mengaktivasi sel-Th2. Sel-Th2 yang teraktivasi ini akan memproduksi IL-4, IL-5 dan IL-10. Interleukin-4 dan IL-5 akan mengaktivasi sel B sehingga berproliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma, yang akan memproduksi imunoglobulin. Apabila antibodi pada permukaan sel B menemukan VHC dalam sirkulasi darah atau dalam cairan tubuh lainnya, maka virus tersebut akan diikat oleh antibodi dan selanjutnya virus dimasukkan ke dalam vesikel di dalam sel B. Di dalam vesikel, virus akan dihancurkan menjadi beberapa fragmen peptida oleh enzim dan peptida tersebut akan diikat oleh MHC kelas II. Kompleks ini selanjutnya akan membawa peptida yang diikatnya ke permukaan sel yang dapat dikenal oleh sel-T CD4 dan diikat oleh reseptornya. Sel-TC8- (CTL) yang teraktivasi akan mengenal sel yang terinfeksi VHC yang dimunculkan oleh MHC kelas I pada permukaan sel sehingga sel yang terinfeksi VHC tersebut akan dihancurkan.

Protein core virus hepatitis C dapat berinteraksi dengan *lymphotoxin β -receptor* (LT β R), *tumour necrosis factor receptor 1* (TNFR1) dan Fas sehingga sinyal ke Fas-Ligand akan terganggu mengakibatkan proses apoptosis sel yang terinfeksi VHC akan terganggu (gagal) sehingga VHC akan tetap hidup di dalam sel yang diinfeksi, selanjutnya berkembang menjadi hepatitis kronik.

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



Catatan: - Tulisan yang berwarna merah adalah yang diperiksa pada penelitian ini

- ● inti sel hati
- ● VHC

3.2 Hipotesis penelitian

Berdasarkan teori pada uraian kaji pustaka, maka dapat dibuat hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Infeksi virus hepatitis C kronik meningkatkan jumlah sel-TCID4+ dan sel-T CD8+.
2. Infeksi virus hepatitis C kronik meningkatkan kadar IL-1 β , IL-2, dan IL-10.
3. Infeksi virus hepatitis C kronik meningkatkan kadar TNF- α dan IFN- γ .



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian *observasional* dan *cross sectional* dengan rancangan *explanatory* terhadap penderita hepatitis C kronik.

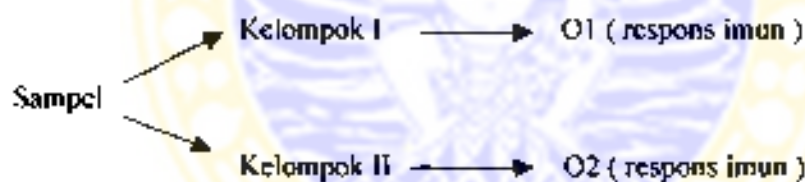
4.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian adalah eksplanatori pada penderita hepatitis C kronik.

Dibagi atas 2 kelompok:

1. Kelompok I : Penderita dengan infeksi VHC kronik
2. Kelompok II : Merupakan kelompok kontrol yang terdiri dari orang sehat

Masing-masing kelompok diambil darahnya sebagai sampel untuk penelitian, sehingga bagian rancangan penelitian dapat dibuat sebagai berikut:



4.3 Populasi, sampel, besar sampel dan tehnik pengambilan sampel

4.3.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah penderita hepatitis C kronik yang didapatkan dari donor darah sukarela dari Dinas Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Padang di RSUP Dr. M Djamil Padang.

4.3.2 Sampel penelitian

Sampel penelitian terdiri dari penderita hepatitis C kronik yang memenuhi persyaratan:

- Jumlah sampel memenuhi persyaratan yang diperlukan dalam penelitian ini.
- Sampel yang diambil adalah penderita hepatitis C kronik yang telah dites ulang, dengan anti-VHC tetap positif setelah 6 bulan dari pemeriksaan pertama.

4.3.3 Besar sampel

Besar sampel yang diperlukan dalam penelitian ini, dengan mempergunakan rumus Schlessman (1982).

$$n = \frac{(Z_{\alpha} \sqrt{2PQ} + Z_{\beta} \sqrt{P_1Q_1 + P_0Q_0})^2}{(P_1 - P_0)^2}$$

n = Jumlah sampel

$$Z_{\alpha} = 1,96 \quad P_1 = P_0R / (1 + P_0 (R - 1))$$

$$P = \frac{1}{2} (P_1 + P_0)$$

$$Z_{\beta} = 1,28 \quad Q = 1 - P$$

$$Q_1 = 1 - P_1$$

$$\alpha = 0,05 \quad Q_0 = 1 - P_0$$

$$\beta = 0,10$$

Z_{α} = Nilai standar normal, besarnya tergantung α

$$\text{Bila } \alpha = 0,05 \quad \text{maka } Z_{\alpha} = 1,96$$

Z_{β} = Nilai tergantung β yang ditentukan (berdasarkan tabel)

$$\text{Biasa digunakan } \beta = 0,10 \quad \text{maka } Z_{\beta} = 1,28$$

β = *Power test*

$Po = 0,12$ dan $R = 4,23$ (Tillman *et al*, 2001)

$P1 = 0,37$ $P = 0,29$ $Q = 0,71$ $Q1 = 0,63$ $Qo = 0,88$

Maka: $n = 2,1 / 0,06$

$n = 33,6 \rightarrow$ Dibulatkan menjadi 40 sampel

4.3.4 Teknik pengambilan sampel

4.3.4.1 Cara pengambilan sampel

a. Sumber:

- 1) Diambil dari peserta donor darah sukarela dari Unit Transfusi Darah Cabang Palang Merah Indonesia (UTDC-PMI) Padang yang dengan anti-VHC positif.
- 2) Orang sehat untuk kontrol.

b. Tatalaksana

Peserta donor darah sukarela pada UTDC-PMI Padang yang telah diambil darahnya dilakukan pemeriksaan: anti-VHC, HBsAg dan anti-HIV. Apabila hasil dari pemeriksaan ini terdapat hanya anti-VHC saja yang positif, maka orang ini yang akan diambil untuk penelitian sesuai dengan kriteria inklusi. Setelah 6 bulan kemudian yang memenuhi kriteria diagnosis sesuai dengan protokol penelitian, dipanggil ke RSUP. dr.M Djamil Padang di bagian Laboratorium Patologi Klinik. Sebelum diambil darahnya disuruh mengisi formulir Persetujuan tindakan medis, setelah ini baru diambil darahnya sebanyak 8 ml setiap orang dengan *vacutainer* berheparin. Apabila berhalangan dilakukan pengambilan contoh darahnya di rumah peserta tersebut. Darah yang telah diambil dipisahkan sebanyak 2 ml untuk pemeriksaan sel-TCD4 dan sel-TCD8, kemudian sisanya sebanyak 6 ml disentrifus untuk diambil plasmanya.

Sebagian plasma dipisahkan dan disimpan pada suhu -80°C untuk pemeriksaan RNA-VHC dan sebagian lagi untuk pemeriksaan enzim transaminase dan sitokin. Sampel untuk pemeriksaan sitokin disimpan pada suhu -20°C , sedangkan untuk transaminase langsung diperiksa. Semua sampel dikumpul dan disimpan sampai jumlah yang diperlukan sudah cukup menurut perhitungan besar sampel. Penderita dengan anti-VHC dan RNA-VHC positif diambil untuk penelitian ini.

4.3.4.2 Kriteria inklusi

1. Penderita hepatitis C kronik dengan kriteria anti-VHC dan RNA-VHC positif setelah 6 bulan dari pemeriksaan anti-VHC pertama kali.
2. Jenis kelamin laki-laki dan perempuan
3. Umur 17 - 45 tahun
4. Bersedia ikut dalam penelitian dengan menandatangani surat persetujuan (lampiran)

4.3.4.3 Kriteria eksklusi

1. Penderita hepatitis B
2. Penderita HIV
3. Penderita dengan riwayat penyakit autoimun
4. Penderita yang sedang mengalami infeksi oleh virus, bakteri dll.

4.4 Variabel penelitian dan definisi operasional

4.4.1 Klasifikasi variabel

Penelitian ini merupakan penelitian *univariate* yang mempunyai :

1. Variabel bebas, yaitu :

Individu yang terinfeksi VHC dengan parameter anti-VHC positif dan RNA-VHC positif.

2. Variabel tergantung, yaitu :

- a. Sel-T- CD4+
- b. Sel-T CD8+
- c. IL-1
- d. IL-2
- e. IL-10
- f. TNF- α
- g. INF- γ

4.4.2 Definisi Operasional Variabel

- a. Hepatitis-C kronis adalah penderita dengan anti-VHC positif dengan RNA-VHC positif lebih dari 6 bulan.
- b. Anti-VHC adalah antibodi terhadap virus hepatitis C, yang diperiksa dengan metoda ELISA generasi ketiga.
- c. RNA-VHC adalah asam ribonukleat virus hepatitis C, diperiksa dari sampel plasma dengan metoda *RT-PCR* .
- d. Yang dimaksud dengan penyakit hati menahun adalah hepatitis kronis, sirosis hepatis, dan karsinoma hati.

- e. Donor darah sukarela adalah donor darah sukarela di RSUD Perjan Dr M djamil Padang. Setiap donor darah sukarela diperiksa anti-VHC, HbsAg dan anti-HIV, apabila anti-VHC saja yang positif diambil untuk penelitian.
- f. Sel-T CD4+ adalah diferensiasi populasi dari sel-T yang akan berinteraksi dengan MHC kelas II, sel-Th (CD4+) merupakan bagian yang terbanyak dari sel-T. Pada infeksi VHC kronis mempunyai peranan penting dan dapat dijadikan sebagai indikator.
- g. Sel-T CD8+ adalah sel-Tc (sel-T sitotoksik) merupakan diferensiasi populasi dari sel-T yang akan berinteraksi dengan MHC kelas I dan jumlahnya relatif sedikit. Pada infeksi VHC kronis sangat berperan sekali dalam perjalanan penyakit dan dapat dijadikan sebagai indikator.
- h. IL-1 β adalah salah satu sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh beberapa sel berinti antara lain monosit-makrofag, limfosit B, sel NK, limfosit T, keratinosit, sel dendrit, astrosit, fibroblas, neutrofil, sel endotel dan sel otot polos. Pada infeksi VHC kronis, sitokin ini kadarnya dapat dijadikan sebagai indikator akibat teraktivasi oleh adanya antigen VHC.
- i. IL-2 adalah salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel-T yang teraktivasi, sel-Tc dan sel NK yang merupakan faktor pertumbuhan bersifat sebagai autokrin dan parakrin. Pada penelitian ini kadarnya dapat sebagai indikator pada infeksi VHC kronik akibat teraktivasi oleh adanya antigen VHC.
- j. IL-10 adalah salah satu sitokin yang dihasilkan oleh aktivasi sel-Th2, sel-B, sel-T CD8+ dan makrofag. Sitokin ini mempunyai kemampuan untuk menghambat produksi IL-2 dan INF- γ yang dihasilkan oleh sel-Th1. Pada

infeksi VHC kronis mempunyai peranan penting dan dapat dijadikan sebagai indikator bahwa telah terjadi aktivasi IL-10 akibat antigen VHC.

- k. TNF- α adalah salah satu sitokin yang dihasilkan oleh APC, sel-Th yang teraktivasi. Pada infeksi VHC kronis kadarnya dalam plasma dapat dijadikan sebagai indikator bahwa telah terjadi aktivasi sitokin ini akibat antigen VHC.
- l. IFN- γ adalah salah satu sitokin yang dihasilkan oleh sel-T dan kadarnya dapat dijadikan sebagai indikator pada infeksi VHC kronik, karena telah teraktivasi akibat antigen VHC.

4.5 Bahan penelitian

Bahan penelitian adalah sampel plasma dari penderita hepatitis C kronik yang diikutkan dalam penelitian ini.

4.6 Alat penelitian

Pemeriksaan laboratorium sesuai dengan prosedur 4.8.2.

4.7 Lokasi dan tempat penelitian

4.7.1 Tempat penelitian:

Penelitian dilakukan di RSUP Dr M Djamil Padang, Laboratorium Patologi Klinik Sub bagian imunologi dan Laboratorium *Tropical Disease Centre Airlangga University* (TDC Airlangga University) di Surabaya.

4.7.2 Waktu penelitian

Diperkirakan waktu penelitian adalah 1 sampai 1 1/2 tahun.

4.8 Prosedur pengambilan data

4.8.1 Sampel untuk penelitian

a). Sampel dari donor darah sukarela yang mengidap hepatitis C kronik

Donor darah sukarela di RSUP Dr M Djamil Padang diperiksa anti-VHC, apabila positif ditunggu 6 bulan kemudian. Setelah 6 bulan diperiksa kembali anti-VHC donor darah sukarela tersebut, apabila tetap anti-VHC positif, dilanjutkan dengan pemeriksaan SGOT, SGPT dan RNA-VHC. Apabila terdapat anti-VHC dan RNA-VHC masih positif maka donor darah sukarela tersebut diikutkan dalam penelitian ini.

b). Sampel dari kelompok kontrol sehat

Untuk bahan kontrol pada penelitian ini diambil darah dari orang yang betul berada dalam keadaan sehat, pada penelitian ini diambil darah dari peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis (PPDS) yang sedang menjalani pendidikan di RSUP Dr M Djamil Padang dan analis yang bekerja di laboratorium Patologi klinik.

4.8.2 Pemeriksaan sampel plasma

a). Pengambilan darah

Setiap sampel diambil 8 ml darah vena dengan *vacutainer* heparin, 2 ml darah dipisahkn untuk pemeriksaan sel-T CD4+ dan sel-T CD8+. Darah yang 6 ml dipisahkan plasmanya, sebagian plasma disimpan dalam pendingin (*freezer -20^o*), dikumpul untuk pemeriksaan sitokin dan anti-VHC, dan sebagian lagi dikumpul

untuk disimpan pada suhu -80°C untuk pemeriksaan RNA-VHC. Apabila anti-VHC positif, plasma yang disimpan pada suhu -80°C dikirim ke Laboratorium Hepatitis TDC di Surabaya untuk pemeriksaan RNA-VHC secara PCR (lampiran 9).

b). Pemeriksaan anti-VHC

Pemeriksaan anti-VHC pada plasma penderita yang telah dipisahkan dilakukan dengan kit *Elisa* generasi ketiga sesuai dengan petunjuk yang terlampir pada kit tersebut. Pembacaan hasil dilakukan dengan *Microplate Elisa Reader* (lampiran 2a dan 2b)

c). Pemeriksaan transaminase plasma.

Pemeriksaan enzim GPT dan GOT dikerjakan dengan metoda kintik, menggunakan alat otomatis *Hitachi 912* (lampiran 1a, 1b, 1c).

d). Pemeriksaan RNA-VHC

Dilakukan dengan cara PCR dengan menggunakan primer no 167 R, 166, 23, 24, 26 dll (lampiran 11).

e). Pemeriksaan sel-T CD4+ dan sel-T CD8+

Isolasi limfosit dilakukan dengan metoda *Ficoll gradient sentrifugasi* Teknik atau prosedur untuk isolasi limfosit, ini dapat dilihat pada lampiran tentang protokol untuk melakukan isolasi limfosit. Isolasi limfosit yang diperoleh digunakan untuk keperluan menghitung sel-CD4+ dan sel- CD8+. Untuk pemeriksaan CD4+ dan CD8+ secara imunohistologi yang digunakan dalam penelitian ini kit dari *Lab Vision Corporation* (lampiran 3a dan 3b).

f). Pengukuran kadar IL-1 β

Pengukuran kadar sitokin dari plasma, menggunakan *Elisa Kit* yang diproduksi oleh *Bender Med Systems A-1033 Vienna Austria*. Prosedur laboratorium untuk

pengukuran kadar sitokin ini dapat dilihat dilampiran tentang protokol melakukan pengukuran kadar sitokin (lampiran 4a dan 4b).

g). Pengukuran kadar IL-2

Pengukuran kadar IL-2 dari plasma, menggunakan *Elisa Kit* yang diproduksi oleh *Bender Med Systems A-1030 Vienna Austria*. Prosedur laboratorium pengukuran kadar sitokin ini dapat dilihat dilampiran tentang protokol melakukan pengukuran kadar sitokin (lampiran 5a dan 5b).

h). Pengukuran kadar IL-10.

Pengukuran kadar IL-10 dari plasma, menggunakan *Elisa Kit* yang diproduksi oleh *Bender Med Systems A-1030 Vienna Austria*. Prosedur laboratorium pengukuran kadar sitokin ini dapat dilihat dilampiran tentang protokol melakukan pengukuran kadar sitokin (lampiran 6a dan 6b).

i). Pengukuran kadar TNF- α

Pengukuran kadar TNF- α dari plasma menggunakan *Elisa Kit* dari *Bender Med Systems A-1030 Vienna Austria*. Prosedur laboratorium pengukuran kadar sitokin ini dapat dilihat dilampiran tentang protokol melakukan pengukuran kadar sitokin (lampiran 7a dan 7b).

j). Pengukuran kadar IFN- γ

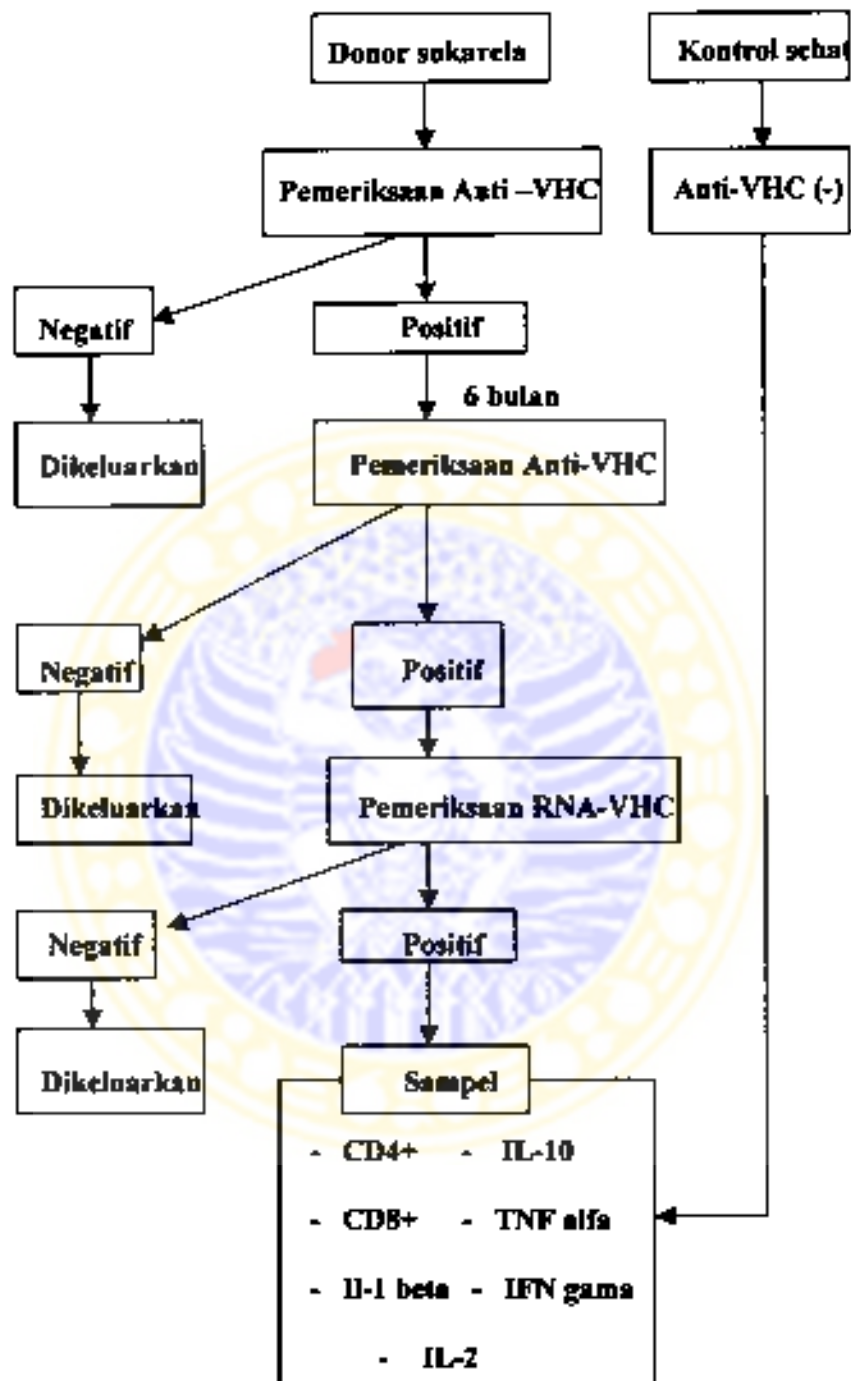
Pengukuran kadar sitokin ini dari plasma menggunakan *Elisa Kit* yang diproduksi oleh *Bender Med Systems A-1030 Vienna Austria*. Prosedur laboratorium pengukuran kadar sitokin ini dapat dilihat dilampiran tentang protokol melakukan pengukuran kadar sitokin (lampiran 8a dan 8b).

4.9 Cara analisis data

Hasil analisis di laboratorium yang diperoleh terdiri dari hasil analisis anti-VHC, RNA-VHC, enzim transaminase, CD4⁺, CD8⁺, IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α , dan IFN- γ . Data yang diperoleh dilakukan pengolahan data kuantitatif secara manual dan komputer program SPSS *release 12.1 for Window* serta disajikan dalam bentuk tabel dan histogram. Dilanjutkan dengan uji t kalau distribusi data normal dan Mann-Whitney test untuk distribusi yang tidak normal. Hasil analisis statistik dinyatakan bermakna bila didapatkan harga $p < 0.05$.



4.10 KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



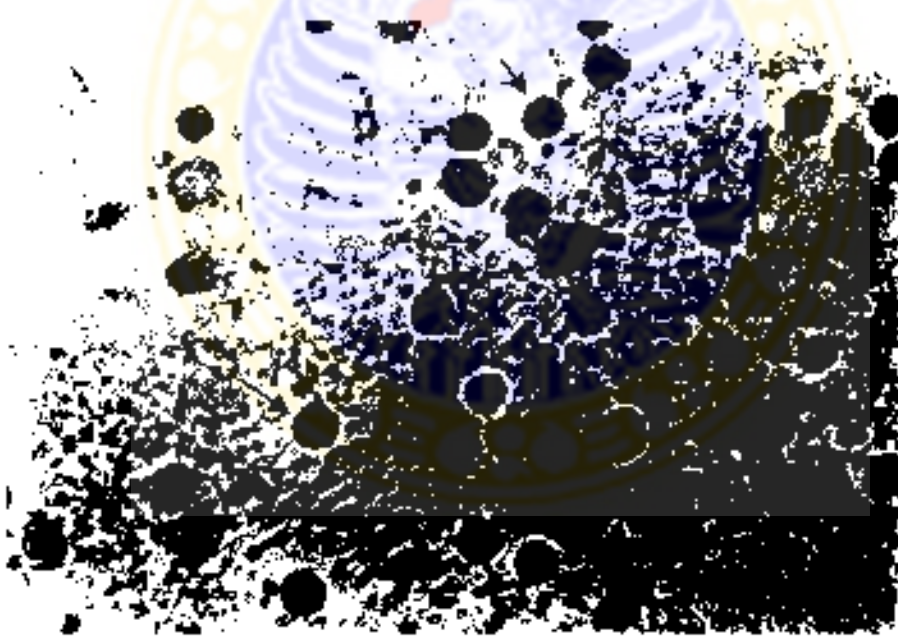
Gambar 4.1: Kerangka operasional penelitian

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

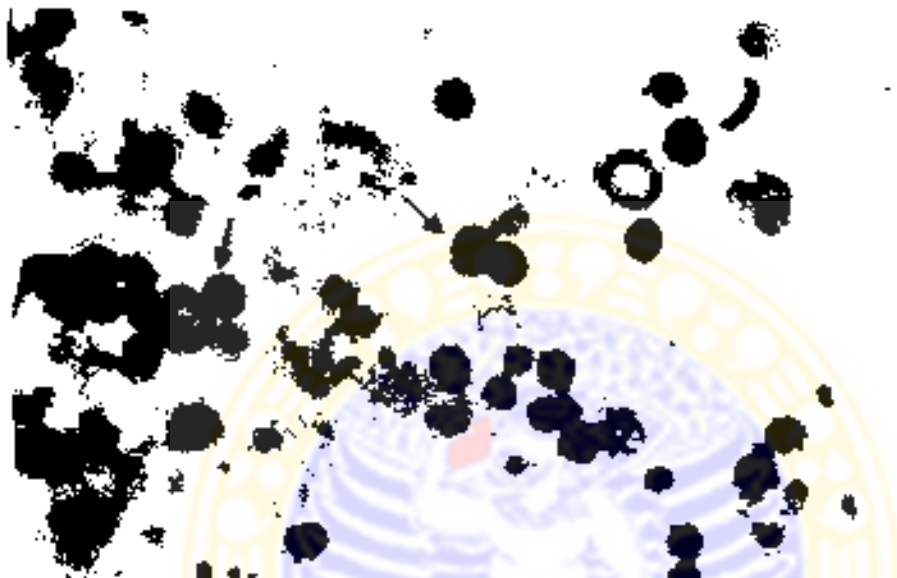
Dari 15476 orang donor darah di Unit Transfusi Darah Cabang Palang Merah Indonesia (UTDC PMI) Padang tahun 2003 ditemukan anti-VHC positif sebanyak 163 (1.05 %) orang. Sebanyak 40 orang di antaranya yang tergolong menderita hepatitis-C kronik dengan kriteria anti-VHC positif dan RNA-VHC positif setelah 6 bulan dari pemeriksaan anti-VHC positif yang pertama, serta memenuhi syarat lainnya diambil untuk penelitian ini.

Di bawah ini terlihat gambar mengenai pewarnaan sel-T CD4+ secara immunohistokimia dengan menggunakan CD4 Ab-3 pada penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol.



Gambar 5.1 : Gambaran sel-T CD4+ di dalam darah kelompok kontrol

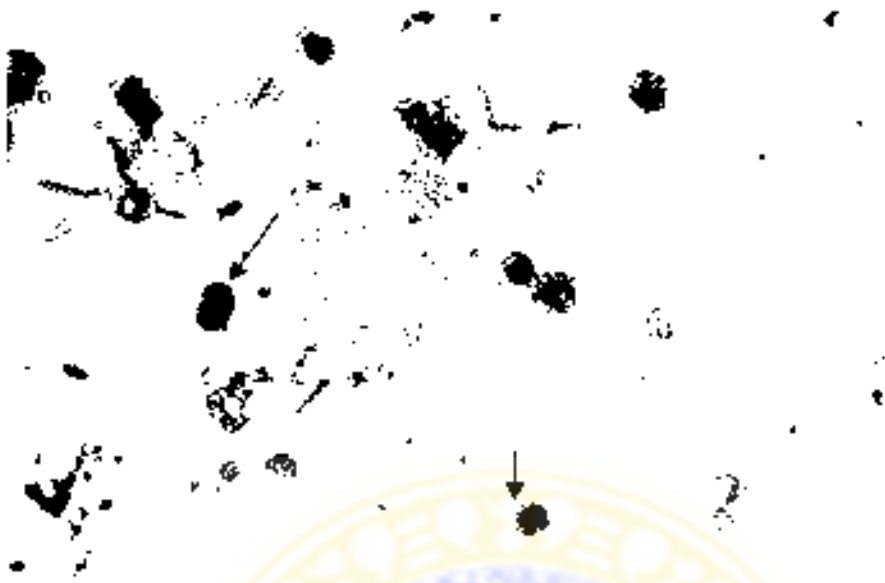
Sel- T CD4⁺ terlihat berwarna coklat kekuningan sedangkan sel limfosit lainnya tidak berwarna atau abu-abu. Terlihat di dalam darah kelompok kontrol (normal) jumlah dari sel ini tidak banyak (Gambar 5.1). Sedangkan pada penderita hepatitis C kronik di dalam darahnya banyak terdapat sel- T CD4⁺ (Gambar 5.2).



Gambar 5.2: Gambaran sel- T CD4⁺ di dalam darah penderita hepatitis C kronik

Pewarnaan sel- T CD8 di dalam darah penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol dilakukan dengan cara imunohistokimia dengan memakai *mouse monoclonal antibody* (CD4 Ab 3). Sel- T CD8⁺ nantinya terlihat berwarna coklat kekuningan, sedangkan sel limfosit lainnya tidak berwarna atau warna abu-abu.

Pada kelompok kontrol di dalam darahnya terlihat tidak begitu banyak didapatkan sel- T CD8⁺ (Gambar 5.3). Sedangkan pada penderita hepatitis C kronik terdapat jumlah sel- T CD8⁺ yang meningkat di dalam darah (5.4).



Gambar 5.3 : Gambaran sel- T CD8 $^{+}$ di dalam darah kelompok kontrol



Gambar 5.4 : Gambaran sel- T CD8 $^{+}$ di dalam darah penderita hepatitis C kronik

Hasil analisis statistik penelitian dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5.1 Data Karakteristik penderita hepatitis-C kronik dan kelompok kontrol

No	Karakteristik	Kelompok Hepatitis-C kronik	Kelompok Kontrol sehat	P
1	Umur (tahun) (Mean \pm SD)	26.20 \pm 6.23	28.70 \pm 1.9	
2.	Kelamin - Pria - Wanita	37 orang 3 orang	23 orang 17 orang	
3.	Anti-VHC	+ (40 orang)	(-)	
4.	RNA-VHC	+ (40 orang)	tidak diperiksa	
5.	GOT (U/L) (Mean \pm SD)	37.37 \pm 23.28	14.45 \pm 3.09	0.000
6.	GPT (U/L) (Mean \pm SD)	36.75 \pm 20.47	14.78 \pm 2.91	0.000

Dari tabel 5.1 dapat diketahui data karakteristik tentang umur, pada penelitian ini umur penderita hepatitis-C kronik dengan nilai rerata 26.20 \pm 6.23 tahun dan dari 40 penderita ini terdiri dari 3 orang perempuan dan pria sebanyak 37 orang. Semua yang ikut penelitian dengan anti-VHC positif dan RNA-VHC positif. Dari hasil pemeriksaan anti-VHC dari penderita hepatitis C kronik didapatkan titer antibodi anti-VHC dalam darah penderita tersebut dengan nilai rerata 1.417 \pm 1.017, dan kelompok kontrol sehat dengan anti-VHC negatif.

Tabel 5.2 Distribusi umur dan jenis kelamin penderita hepatitis C kronik

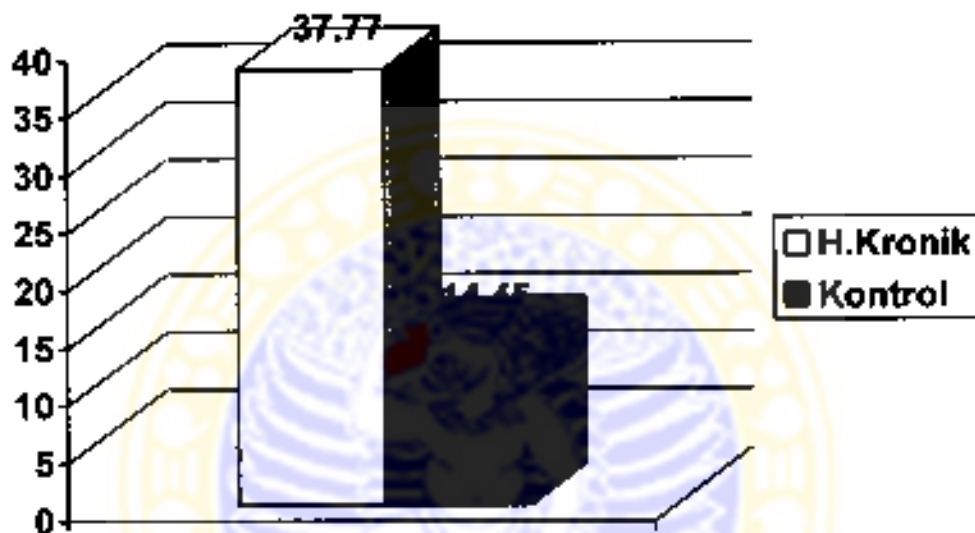
Kelompok umur (tahun)	Laki-laki (%)	Perempuan (%)
17 - 20	6 (15%)	1 (2.5%)
21 - 25	13 (27.5%)	2 (5%)
26 - 30	9 (22.5%)	-
31 - 35	4 (10%)	-
36 - 40	5 (12.5%)	-

Pada tabel 5.2 tampak distribusi umur penderita hepatitis C kronik yang paling banyak berkisar pada umur antara 21 - 25 tahun (27.5%) dan jenis kelamin yang terbanyak adalah pria sebanyak 37 orang (92.5%).

Tabel 5.3 Rerata kadar GOT pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kelompok kontrol

	Hepatitis-C kronik (Mean ± SD)	Kontrol (Mean ± SD)	P
Kadar GOT (U/L)	37.77 ± 23.28	14.45 ± 3.088	P = 0.000

Dari tabel 5.3 didapatkan kadar GOT rerata pada penderita hepatitis C kronik berkisar antara 37.77 ± 23.28 U/L, sedangkan pada kelompok kontrol dengan rerata 14.45 ± 3.088 U/L.



Gambar 5.5 : Kadar GOT (U/L) pada penderita hepatitis-C kronik dan kontrol

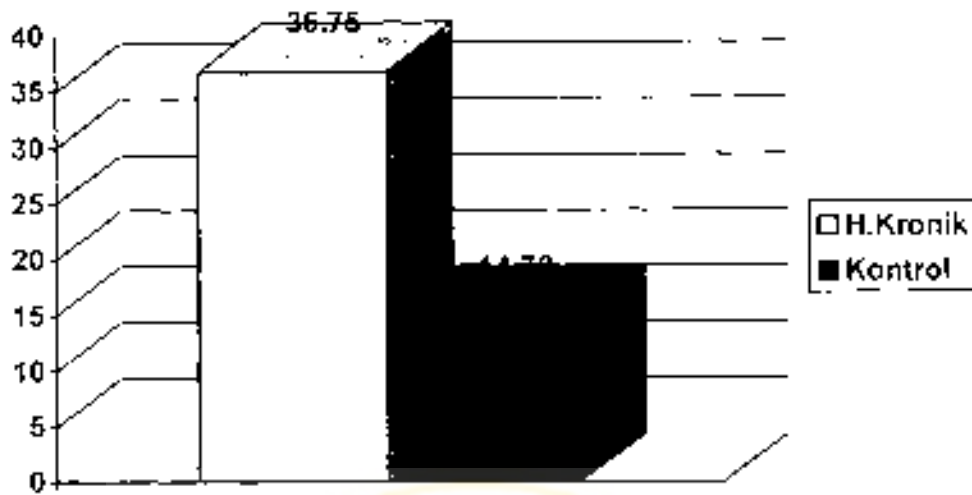
Pada diagram (Gambar 5.5) jelas terlihat bahwa terdapat peningkatan kadar GOT dengan perbedaan yang sangat bermakna dengan uji-t ($p = 0.000$) dari kadar GOT darah antara penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 5.4 Rerata kadar GPT pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kelompok kontrol

	Hepatitis-C kronik (Mean ± SD)	Kontrol (Mean ± SD)	P
Kadar GPT (U/L)	36.75 ± 20.47	14.78 ± 2.91	0.000

Dari tabel 5.4 dapat disimpulkan bahwa kadar enzim GPT di dalam darah penderita hepatitis-C kronik dengan kadar rerata berkisar 36.75 ± 20.47 U/L, sedangkan pada kelompok kontrol sehat didapatkan kadar GPT rerata berkisar 14.78 ± 2.91 U/L.

Pada diagram (Gambar 5.6) terlihat dengan jelas perbedaan yang sangat bermakna dengan memakai uji-t ($p = 0.000$) dari kadar GPT darah penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kadar GPT darah pada kelompok kontrol.

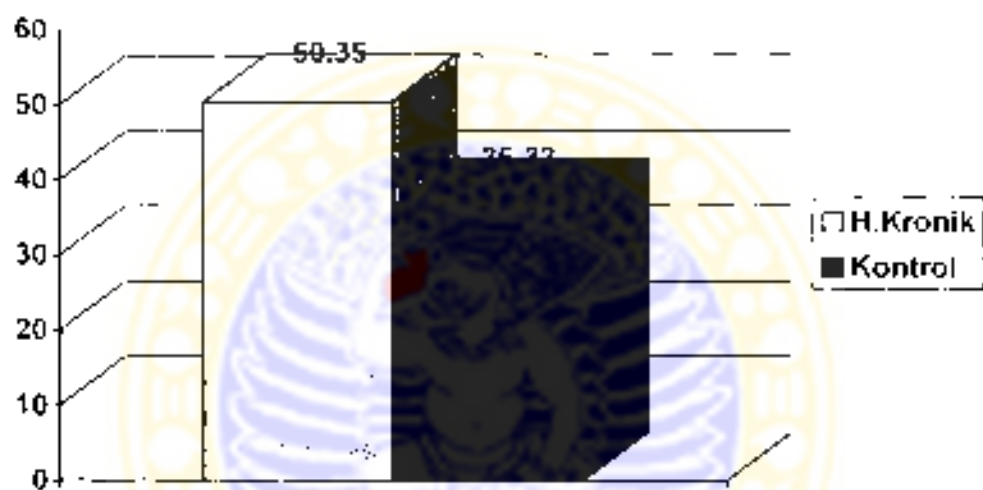


Gambar 5.6 : Kadar GPT (U/L) pada penderita hepatitis-C kronik dan kontrol

Tabel 5.5 Ekspresi sel-TCDA+ pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol

kontrol	Hepatitis-C Kronik		P
	(Mean ± SD)	(Mean ± SD)	
Sel-TCDA+ (%)	50.35 ± 3.18	36.33 ± 1.40	P = 0.000

Dari tabel 5.5 dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan sel T CD4⁺ pada penderita hepatitis C kronik dengan nilai rerata berkisar 50,35 ± 3,18 %, sedangkan pada kelompok kontrol sehat didapatkan jumlah sel-TCID4⁺ terdapat dalam batas normal (35 % - 45 %) dengan nilai rerata berkisar 36,33 ± 1,403 %



Gambar 5.7 : Ekspresi sel-T CD4⁺ (%) pada penderita hepatitis-C kronik dan kontrol

Dari diagram (Gambar 5.7) dapat dilihat terdapat peningkatan jumlah sel T CD4⁺ dengan perbedaan yang bermakna pada uji-t ($p = 0,000$) dari hasil perhitungan sel-TCID4⁺ yang terdapat di dalam darah antara penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 5.6 Ekspresi sel-TC₈⁺ pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol

	Hepatitis-C kronik (Mean ± SD)	Kontrol (Mean ± SD)	P
Sel-TC₈⁺ (%)	59.37 ± 3.52	35.73 ± 2.60	P = 0.000

Dari tabel 5.6 dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan dari sel-T CD₈⁺ pada penderita hepatitis-C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Didapatkan jumlah sel-TC₈⁺ di dalam darah penderita hepatitis C kronik dengan nilai rerata berkisar sekitar 59.37 ± 3.52 % dan pada kelompok kontrol terdapat jumlah sel-TC₈⁺ dalam batas normal (30 %- 40 %) dengan nilai rerata berkisar 35.73 ± 2.60 %.



Gambar 5.8 : Ekspresi sel-TCD8+ (%) pada penderita hepatitis-C kronik dan kontrol

Dari gambar 5.8 dapat dilihat dengan jelas peningkatan jumlah sel-TCD8+ dengan perbedaan yang bermakna ($P = 0.000$) dengan uji-t dari jumlah sel-T CD8+ antara penderita hepatitis-C kronik dengan kelompok kontrol sehat.

Tabel 5.7 Korelasi antara kadar GOT dan GPT terhadap ekspresi CD4+ dan CD8+ pada penderita hepatitis-C kronik

	Sel-T CD4+	Sig	Sel-T CD8+	Sig
GOT	-0.033	0.839	0.100	0.539
GPT	-0.069	0.671	-0.213	0.188

Dari tabel 5.7 terlihat adanya korelasi negatif antara kadar enzim GOT terhadap ekspresi sel-T CD4+ (-0.033), berarti pola hubungan antara kadar GOT dengan ekspresi

CD4+ adanya kecenderungan semakin meningkat kadar GOT semakin menurun ekspresi CD4+ atau sebaliknya. dan terhadap sel-T CD8+ terdapat korelasi positif (0.100), berarti pola hubungan antara kadar GOT dengan ekspresi CD8+ adanya kecenderungan semakin meningkat kadar GOT semakin meningkat ekspresi CD8+ Selanjutnya terdapat korelasi negatif antara kadar GPT terhadap ekspresi CD4+ (-0.069), berarti pola hubungan antara kadar GPT dengan ekspresi CD4+ adanya kecenderungan semakin meningkat kadar GPT semakin menurun ekspresi CD4+ atau sebaliknya dan terhadap CD8+ terdapat korelasi negatif (-0.213), berarti pola hubungan antara kadar GPT dengan ekspresi CD8+ adanya kecenderungan semakin meningkat kadar GPT semakin menurun ekspresi CD8+ atau sebaliknya..

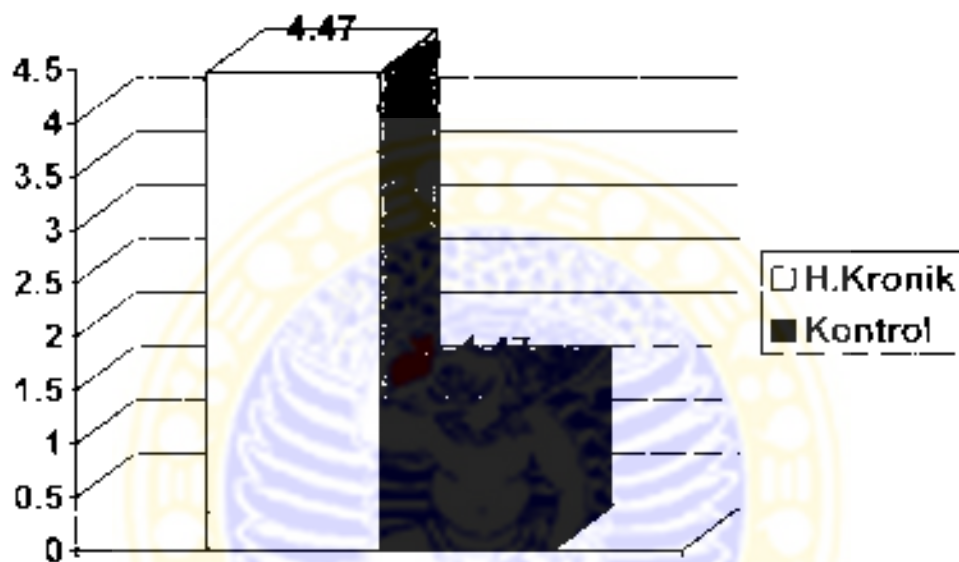
Tabel 5.8 Rerata kadar IFN- γ pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol

	Hepatitis-C Kronik (Mean \pm SD)	Kontrol (Mean \pm SD)	P
IFN- γ (pg/ml)	4.47 \pm 1.47	0.84 \pm 0.2	P = 0.000

Pada tabel 5.8 dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan kadar IFN- γ pada penderita hepatitis-C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan nilai rerata 4.47 \pm 1.47 pg/ml. Sedangkan pada kelompok kontrol pada orang sehat kadar

dari IFN- γ adalah normal (< 1.5 pg/ml), dari hasil pemeriksaan didapatkan kadar IFN- γ rerata berkisar 0.84 ± 0.2 pg/ml.

Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 5.5, terdapat peningkatan kadar IFN- γ dengan perbedaan yang bermakna ($p = 0.000$) dengan uji-t antara kadar IFN- γ di dalam darah penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 5.9 : Kadar IFN γ (pg/ml) pada penderita hepatitis-C kronik dan kontrol

Pada gambar 5.9 dapat dilihat peningkatan kadar IFN- γ dengan perbedaan yang bermakna ($p = 0.000$) dari kadar IFN- γ di dalam darah, antara penderita hepatitis-C kronik dengan kelompok kontrol dengan menggunakan uji-t.

Dari tabel 5.9 dapat dilihat bahwa kadar IL-1 β di dalam darah penderita hepatitis-C kronik meningkat dengan nilai rerata 2.69 ± 0.54 pg/ml, dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat kadar IL-1 β di dalam darah tidak terdeteksi. Kadar IL-2 &

dalam darah penderita hepatitis C kronik meningkat dengan nilai rerata berkisar 15.59 ± 14.11 pg/ml, sedangkan pada kelompok kontrol sehat di dalam darah tidak terdeteksi. Kadar IL-10 di dalam darah penderita hepatitis C kronik juga meningkat didapatkan dengan nilai rerata berkisar 15.2 ± 2.22 pg/ml, sedangkan pada kelompok kontrol sehat di dalam darah tidak terdeteksi.

Tabel 5. 9 Kadar IL-1 β , IL-2, IL-10 dan TNF- α pada penderita hepatitis-C kronik dibanding kontrol

Kadar sitokin (pg/ml)	Hepatitis-C kronik (Mean \pm SD)	Kelompok kontrol
IL-1 β	2.69 \pm 0.54	Tidak terdeteksi
IL-2	15.59 \pm 14.11	Tidak terdeteksi
IL-10	15.2 \pm 2.22	Tidak terdeteksi
TNF- α	22.03 \pm 3.72	Tidak terdeteksi

Kadar TNF- α di dalam darah penderita hepatitis C kronik meningkat dengan nilai rerata berkisar 22.03 ± 3.72 (pg/ml), dan pada kelompok kontrol sehat di dalam darahnya tidak dapat dideteksi.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap enzim transaminase

Hasil penelitian yang didapatkan dari penderita hepatitis C kronik menunjukkan aktivitas enzim GOT meningkat sebanyak 15 orang (38 %) dan kadar GOT normal sebanyak 25 orang (62 %), sedangkan kadar enzim GPT meningkat sebanyak 17 orang (43 %), dan sebagian lagi berada dalam kadar normal sebanyak 23 orang (57 %). Pengaruh infeksi VHC kronik terhadap enzim GOT pada penderita hepatitis C kronik dibandingkan dengan kontrol sehat berbeda secara bermagna ($p < 0.000$), sedangkan terhadap enzim GPT juga berbeda secara bermagna ($p < 0.000$).

Peneliti lain melaporkan bahwa pada penderita hepatitis C kronik terdapat kadar enzim GPT serum dalam batas normal berkisar 25 % - 40 % (Marcellin *et al*, 1997; Inglesby *et al*, 1999). Juga dilaporkan oleh peneliti lain bahwa di antara penderita hepatitis C kronik kadar aminotransferase serum bervariasi setiap saat, lebih kurang 1/3 dari penderita mempunyai kadar GPT serum berada dalam batas normal (Barrera *et al*, 1995; Conry-Cantilena *et al*, 1996). Biasanya peningkatan kadar enzim GPT di dalam darah tidak begitu tinggi pada penderita hepatitis C kronik, hanya sekitar 25% dari penderita dengan kadar GPT serum yang konsentrasinya lebih dari 2 kali nilai normal dan jarang sekali peningkatannya lebih dari 10 kali nilai normal. Hanya terdapat sedikit korelasi di antara konsentrasi aminotransferase di dalam darah dengan gambaran histologi sel hati (Haber *et al*, 1995; McCormick, 1996).

Menurut hasil penelitian Haber *et al* (1995) dari 95 orang penderita hepatitis C kronik ternyata tidak terdapat adanya korelasi antara gambaran histologi sel hati terhadap kadar GPT serum, kecuali hanya terlihat pada penderita dengan kadar GPT yang tinggi yaitu lebih dari 10 kali nilai normal dan tanda peningkatan transaminase tersebut dihubungkan dengan inflamasi periportal dan nekrosis hati. Rata-rata kadar aminotransferase serum secara signifikan lebih rendah di antara penderita hepatitis C kronik yang persisten dari pada penderita hepatitis C kronik aktif.

Alasan mengapa beberapa penderita terjadi peningkatan kadar GPT dan sebagian lagi berada dalam batas normal, hal ini belum diketahui secara pasti. Beberapa pendapat mengemukakan dengan alasan yang dihubungkan dengan keadaan sebagai berikut:

- 1) Konsentrasi RNA-VHC yang ada di dalam darah tidak berhubungan dengan kadar GPT darah (Peignoux, 1994).
- 2) Sebuah laporan kasus mengenai donor darah dengan anti-VHC positif sedangkan kadar GPT di dalam darah normal, hal ini terjadi pada penderita dengan umur yang lebih tua dan lebih sering pada wanita dari pada kadar GPT yang abnormal (Shakil *et al*, 1995).
- 3) Hasil penelitian dari Jepang mengemukakan bahwa penderita yang terinfeksi VHC dengan kadar enzim GPT darah normal, hal ini lebih mungkin terjadi pada penderita yang mempunyai genetik HLA-DR 13 dari pada peningkatan kadar GPT (42 % : 4 %) (Kuzushita *et al*, 1996).

Pada penderita yang terinfeksi VHC kronik dengan konsentrasi enzim GPT di dalam darah normal, biasanya menunjukkan gejala klinis yang asimtomatik. Pada infeksi akut VHC kadar amino transaminase di dalam darah berfluktuasi, dimana konsentrasi GPT

di dalam serum berada dalam batas normal sampai 40% dari semua kasus. Sedangkan apabila terdapat kadar GPT serum yang normal pada penderita setelah infeksi akut, hal ini tidak berarti bahwa mereka tersebut telah sembuh (Haydon *et al*, 1998). Penderita dengan kadar GPT yang normal hampir selalu memperlihatkan gambaran histologi sel hati sebagai inflamasi kronik meskipun derajat kerusakan tersebut minimal atau sedang. Hal tersebut juga dapat memperkuat dugaan bahwa GPT serum merupakan petanda yang akurat terhadap respons pengobatan dengan interferon (Shakil *et al*, 1995; Conry- Cantilena *et al*, 1996; Marcellin *et al*, 1996). Pada penelitian ini terdapat adanya korelasi negatif antara kadar GOT dengan ekspresi CD4⁺ dan korelasi positif terhadap CD8⁺. Sedangkan kadar GPT mempunyai korelasi negatif dengan ekspresi CD4⁺ dan berkorelasi negatif terhadap CD8⁺.

6.2 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap sel-TC_H4⁺

Hasil penelitian yang didapatkan menunjukkan terjadi peningkatan jumlah sel-T CD4⁺ pada penderita hepatitis C kronik. Ini menunjukkan bahwa telah terjadi aktivasi sel-Th1 CD4⁺ karena virus hepatitis C telah diproses oleh sel APC (makrofag dan sel *Kupffer* di dalam hati) menjadi peptida, dan peptida ini membentuk suatu ikatan kompleks dengan MHC kelas II, yang secara bersama dimunculkan ke permukaan sel APC sehingga dikenal oleh sel-T CD4⁺. Aktivasi sel-T CD4⁺ juga disebabkan oleh adanya IL-12 yang dihasilkan oleh APC (Sypek *et al*, 1993). Kemampuan dari *T cell receptor* (TCR) adalah untuk satu ikatan kompleks peptida-MHC kelas II, aktivasi sel-Th apakah akan berkembang menjadi sel-Th1 atau sel-Th2. Sel-Th1 menghasilkan IL-2, TNF- α , dan IFN- γ (Ramsay, Ruby & Ramshaw, 1993), yang kemudian akan merangsang perkembangan dari sel NK dan CTL. CD8⁺.

Sel-Th2 menghasilkan IL-4, IL-5 dan IL-10, yang merangsang pembentukan antibodi spesifik terhadap virus yang dihasilkan oleh sel B (Doherty, Allan & Eichelberger, 1992). Sitokin Th2 juga mengatur produksi sitokin Th1, aktivitas CTL, ekspresi MHC, dan derajat kemampuan presentasi antigen oleh makrofag, sel *Kupffer* dan sel hati yang terinfeksi (Abbas *et al*, 1996).

Dari hasil penelitian Doherty *et al* (1992) terjadi peningkatan jumlah sel-T CD4⁺ oleh karena stimulasi APC untuk berdiferensiasi menjadi Th2. Sel-Th2 akan menghasilkan sitokin IL-4, IL-5, dan IL-10 yang akan merangsang perkembangan dari sel-B untuk membentuk antibodi yang spesifik terhadap VHC. Peneliti lain juga mendapatkan bahwa adanya sel-T CD4⁺ yang predominan di daerah portal pada penderita hepatitis C kronik. Peningkatan sel-T CD4⁺ juga terdapat pada penderita hepatitis C kronik yang menjalani transplantasi hati (Carucci *et al*, 1997; Rosen dan Hinrich, 1999).

Menurut hasil penelitian dari Sohue *et al* (2001) melaporkan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel-T CD4⁺ di darah perifer dan jaringan hati penderita hepatitis C kronik.

Respons karakteristik dari VHC- spesifik sel-T adalah dari sel-T CD4⁺ dan sel-T CD8⁺ pada penderita hepatitis C kronik, telah banyak penelitian mengenai hal ini, karena mereka percaya bahwa kedua sel-T tersebut mempunyai peranan penting dalam patogenesis kerusakan hati dan klirens terhadap virus (Koziel, 1997).

Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa terjadi peningkatan jumlah sel-T CD4⁺ di dalam darah perifer penderita hepatitis C kronik, sehingga hipotesis pertama dari penelitian ini diterima.

3.3 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap sel-TCDS+

Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel-T CD8⁺ meningkat pada penderita hepatitis C kronik. Hal ini menunjukkan telah terjadi aktivasi sel-Th1 yang menghasilkan sitokin IFN- γ . Hasil penelitian dari Bertolotti *et al* pada tahun 1997 mendapatkan bahwa mayoritas sel-T yang diisolasi dari hati penderita yang terinfeksi VHC kronik adalah sel-Th1, yang menghasilkan IFN- γ dan tidak IL-4 atau IL-5. Mereka juga konsisten dengan peranan sel-Th1 sebagai penyebab dalam kerusakan sel hati kronik.

Teraktivasinya sel-Th1 akan menghasilkan sitokin IFN- γ yang akan menstimulasi sel NK dan sel-T CD8⁺. IFN- γ juga akan mengakibatkan peningkatan ekspresi dari molekul MHC kelas I pada sel hati dan sel saluran empedu (Ballardini *et al*, 1995).

Kompleks antigen peptida – molekul MHC kelas I pada permukaan sel hati akan dikenal oleh sel spesifik virus yaitu CTLs (sel-T CD8⁺) , yang kemudian akan melisis sel hati yang terinfeksi VHC. Hal ini diperkuat oleh suatu penemuan bahwa peningkatan ekspresi MHC kelas I berhubungan dengan beratnya penyakit hati (Mossier *et al*, 1994).

Walaupun respons dari sel-T CD8⁺ pada penderita hepatitis C kronik adalah kuat , poliklonal dan multispesifik, namun belum dapat membersihkan VHC dari sel hati penderita tersebut. Peneliti lain juga melaporkan bahwa terjadi peningkatan secara predominan dari sel-T CD4⁺ di daerah portal dan sel-T CD8⁺ di dalam lobus hati, hal ini menyatakan secara tidak langsung bahwa kedua sel tersebut mengakibatkan kerusakan sel hati. Pada observasi selanjutnya mereka mendapatkan adanya hubungan dengan peningkatan enzim GPT dan dengan beratnya kerusakan sel hati secara

histologis, bahwa beberapa penemuan tersebut meperkuat pendapat bahwa sel-T memegang peranan penting terhadap patogenesis penyakit hati (Koziel *et al.*, 1992).

Pada pengobatan penderita hepatitis-C kronik peningkatan ekspresi dari CD4⁺ dan CD8⁺ dapat dipakai sebagai *follow up* keberhasilan terhadap respons interferon, karena tujuan pengobatan dengan interferon adalah peningkatan aktivasi terhadap sel-T. Apabila selama pengobatan dengan interferon tidak terjadi peningkatan dari CD4⁺ dan CD8⁺ dari sebelumnya menandakan tidak ada respons dan berarti pengobatan gagal.

Dari hasil penelitian didapatkan peningkatan jumlah sel-T CD8⁺ di dalam darah penderita hepatitis C kronik, sehingga pada penelitian ini hipotesis pertama terbukti dan hipotesis pertama dari penelitian ini dapat diterima.

6.4 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap kadar IL-1 β

Dari hasil penelitian didapatkan peningkatan kadar IL-1 β pada penderita hepatitis C kronik, dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat bahwa pada orang sehat sitokin ini tidak terdeteksi.

Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya infeksi kronik oleh VHC akan mengaktivasi sel APC untuk menghasilkan sitokin IL-1 β pada waktu kontak dengan antigen-MHC kelas II. Sitokin ini sangat penting dalam respons imun karena mempunyai kemampuan untuk meningkatkan ekspresi berbagai molekul adesi seperti reseptor IFN- γ dan protein MHC kelas II pada permukaan sel APC, meningkatkan efisiensi sel APC untuk mengikat antigen dan aktivasi sel-Th (Oppenheim dan Ruscetti, 1997).

Diketahui bahwa IL-1 β yang diproduksi oleh makrofag yang akan merangsang ekspresi reseptor IL-2 pada permukaan limfosit T sehingga limfosit T tersebut dapat

memberikan respons terhadap IL-2, dan juga memicu pembentukan IL-2 sehingga sel-T berproliferasi dan berdiferensiasi lebih lanjut (Abbas *et al.*, 2000; Oppenheim *et al.*, 1991).

Interleukin-1 juga memberikan rangsangan terhadap sel-B sehingga terjadi proliferasi dan diferensiasi dari sel-B yang disusul dengan produksi antibodi. Stimulasi IL-1 pada sel pre-B mengakibatkan ekspresi *secretory immunoglobulin (sIg)* pada permukaan sel. Karena sel-B sendiri mampu memproduksi IL-1, maka IL-1 diduga berperan sebagai sinyal untuk fungsi autoregulasi pada sel-B.

Efek IL-1 memberikan dampak yang luas, baik dalam proses fisiologis maupun proses imunologis serta akibat produksi IL-1 berlebihan dapat menyebabkan kerusakan jaringan, dapat diduga bahwa ada suatu mekanisme untuk pengendaliannya. Beberapa hormone dan protein yang diproduksi sebagai respons umpan balik untuk mengendalikan produksi IL-1 yang berlebihan, di antaranya kortikosteroid, protein antagonis reseptor IL-1 yang diproduksi oleh monosit dan beberapa jenis substansi lain (Male *et al.*, 1996).

Peneliti lain juga mengemukakan bahwa terjadi peningkatan sekresi IL-1 β setelah terinfeksi oleh virus hepatitis C (Paul, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian pada penderita hepatitis C kronik, telah terjadi peningkatan kadar IL-1 β di dalam darah akibat infeksi kronik VHC. Hal ini menandakan adanya pengaruh dari virus hepatitis C terhadap sel imunokompeten. Hipotesis pada penelitian ini terbukti, sehingga hipotesis kedua diterima

Menurut hasil penelitian dari Bertolotti *et al* pada tahun 1997 menemukan bahwa sel-T yang paling banyak terdapat di hati pada penderita hepatitis C kronik adalah sel-Th1 dan mereka juga menyatakan secara konsisten bahwa sel-Th1 mempunyai peranan penting untuk terjadinya kerusakan hati kronik.

Berdasarkan hasil penelitian ini terjadi peningkatan kadar IL-2 di dalam darah penderita hepatitis C kronik dengan menggunakan metoda *cross sectional* , terlihat bahwa adanya pengaruh infeksi kronik terhadap sel imunokompeten dan hipotesis kedua terbukti, sehingga hipotesis kedua diterima.

6.6 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap IL-10

Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa kadar IL-10 terdeteksi meningkat di dalam darah penderita hepatitis C kronik, sedangkan pada kontrol sehat tidak terdeteksi kadar IL-10 di dalamdarahnya. Hal ini disebabkan teraktivasinya sel-T CD4+ oleh *antigen-presenting cells* (APC) untuk berdiferensiasi menjadi sel-Th2. Sel-Th2 akan mensekresi IL-4, IL-5 dan IL-10, yang merangsangperkembangan *virus-specific antibody* yang dihasilkan oleh sel B (Doherty *et al*, 1992). Peningkatan kadar IL-10 di dalam darah perifer dan jaringan hati dari penderita hepatitis C kronik, juga telah dilaporkan oleh Sobue *et al* (2001) yang didapat dari hasil penelitiannya.

Beberapa sitokin yang dihasilkan oleh sel-Th2 juga akan menurunkan produksi sitokin oleh sel-Th1, aktivitas dari sel-T CD8+ (CTL), ekspresi dari MHC, dan derajat presentasi oleh makrofag, sel *Kupffer* dan sel hati yang terinfeksi VHC (Abbas *et al*, 1996). Pada hasil penelitian ini ternyata IL-10 tidak menekan aktivasi dari sel-Th1, terbukti dari penelitian ini bahwa terjadi peningkatan kadar sitokin IL-2, TNF- α , dan IFN- γ yang disekresi oleh sel-Th1.

Sel-Th1 juga dapat membantu aktivasi sel B tetapi bila jumlah sel-Th1 banyak, maka hal itu mengakibatkan supresi terhadap sel-Th2. Produk sel-Th1 dan sel-Th2 saling menghambat fungsi diferensiasi dan fungsi efektor masing-masingnya, misalnya IFN- γ secara selektif menghambat proliferasi sel-Th2, sedangkan IL-10 menghambat sintesis sitokin sel-Th1. Adanya regulasi silang ini dapat menjelaskan fenomena adanya bias yang kuat ke arah respons ke arah sel-Th1 atau sel-Th2 pada berbagai jenis infeksi. Sel-Th1 cenderung berperan pada infeksi mikroba intraseluler, sedangkan mikroba ekstraseluler di atasi dengan kombinasi sitokin Th1-Th2 (Mosman and Suhash, 1996).

Peneliti lain mengemukakan hasil observasi mendukung terhadap hipotesis bahwa adanya keseimbangan antara respons sel-Th1 dan sel-Th2 pada fase awal dari infeksi akut yang akan menentukan akibat dari infeksi VHC tersebut. Hal ini secara empirik didukung oleh bukti bahwa penderita pada fase permulaan terjadi respons yang kuat dari proliferasi sel-T terhadap berbagai antigen dari VHC, yang dibuktikan dengan meningkatnya produksi IFN- γ oleh sel-Th1, hal ini adalah mungkin untuk dapat mengeliminasi virus dan sembuh dari hepatitis C akut (Abbas *et al.*, 1996).

Adanya perbedaan pendapat yang diperoleh oleh peneliti lain membuktikan bahwa terjadi respons yang kuat sel-Th2 pada kebanyakan penderita hepatitis C akut yang berkembang menjadi infeksi kronik (Lechmann *et al.*, 1996; Gerlach *et al.*, 1999; Takaki *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian ini telah terjadi peningkatan kadar IL-10 pada penderita hepatitis C kronik dengan menggunakan pendekatan metoda *cross sectional*, hal ini menandakan bahwa telah terjadi perubahan sel imunokompeten akibat infeksi

kronik virus hepatitis C, sehingga hasil penelitian ini terbukti dan hipotesis kedua diterima.

6.7 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap TNF- α

Dari hasil penelitian didapatkan kadar TNF- α meningkat di dalam darah penderita hepatitis C kronik, sedangkan pada kelompok kontrol kadar TNF- α tidak terdeteksi. Hal ini menunjukkan bahwa teraktivasinya sel imuno kompeten yang menghasilkan sitokin TNF- α . Sitokin TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel. Termasuk makrofag, sel-T, sel B, astrisit dan sel *Kupffer*. Pembentukan sitokin ini terjadi sebagai respons terhadap virus VHC dan sitokin (IL-1, IL-2, IFN- γ), kompleks imun dan lain-lain (Male *et al*, 1996). TNF- α terbukti juga merupakan modulator respons imun kuat yang meperantara induksi molekul adhesi, sitokin lain dan aktivasi neutrofil.

Ada 2 jenis reseptor TNF yang dapat mengikat TNF- α dan TNF- β dengan afinitas yang kuat. Reseptor TNF terlibat dalam sistem imun dan khususnya dalam kontrol apoptosis. Suatu penelitian dari kultur sel-T telah memperlihatkan bahwa protein core VHC dapat berinteraksi di daerah lymphotoxin β -reseptor (LT β R), *tumour necrosis factor receptor* (TNFR-1) (Chen *et al*, 1997; Matsumoto *et al*, 1997; Zhu *et al*, 1998) dan Fas (Hahn *et al*, 2000). Peningkatan sensitifitas untuk terjadinya apoptosis ini terjadi setelah stimulasi oleh *lymphotoxin - $\alpha\beta$* kompleks bersama-sama dengan IFN- γ (Chen *et al*, 1997).

Semenjak diketahui bahwa VHC dapat menginfeksi sel limfosit, virus tersebut akan meningkatkan sensitifitas virus untuk mempengaruhi stimulus apoptosis sel dan fungsi imun. Pada infeksi kronik VHC sedikit sekali terdapat sel spesifik -VHC (CTLs) di dalam darah perifer, yang dapat menyebabkan kematian abnormal dari

CTL. Dengan demikian sinyal pada LTB₄ dan TNFR1 adalah penting untuk *microenvironment* yang menimbulkan interaksi antara limfosit dengan APC dan sel B untuk migrasi dan diferensiasi dalam pembentukan antibodi. Gangguan dari fungsi tersebut akan menginterferensi mengeliminasi dan netralisasi virus. Dengan demikian *core* protein VHC mempunyai peranan sebagai kunci dari imunomodulasi dan itulah satu faktor yang dapat meningkatkan infeksi persisten dari VHC (Pavio and Lai, 2003). Dari hasil penelitian memberikan sokongan terhadap hipotesa bahwa protein *core* dari VHC adalah *a pro-apoptotic activity* dengan cara mempengaruhi sinyal pada TNFR (Ray *et al.*, 1997). Dengan demikian sel-T yang terinfeksi oleh VHC akan menurunkan ambang apoptosis oleh protein *core* VHC dengan cara merusak aktivasi sel-T tersebut dan fungsi sitotoksik, sehingga terjadi infeksi yang persisten.

Peningkatan kadar TNF- α didapatkan pada kebanyakan penderita hepatitis C kronik tetapi tidak terjadi peningkatan klinens terhadap VHC yang menginfeksi sel hepatosit. Penelitiannya dilakukan pada penderita hepatoma, yang memperlihatkan terjadinya replikasi VHC dan menandakan adanya resisten yang kuat terhadap TNF- α (Frese *et al.*, 2003).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut terjadi peningkatan kadar TNF- α pada penderita hepatitis C kronik dengan menggunakan metoda *cross sectional*, dengan demikian telah terjadi aktivasi TNF- α sebagai akibat infeksi VHC.

6.8 Pengaruh infeksi virus hepatitis C kronik terhadap IFN- γ

Dari hasil penelitian didapatkan kadar IFN- γ meningkat di dalam darah penderita hepatitis C kronik, hasil ini sangat bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol

($p = 0,00$). Hal ini merupakan petunjuk bahwa pada penderita hepatitis C kronik telah terjadi aktivasi dari sel-Th1 sebagai penghasil IFN- γ

Sel-T CD4⁺ diaktivasi oleh pengenalan epitop virus yang dipresentasikan oleh MHC kelas II pada permukaan sel APC (Murray *et al*, 1992). Sel-T CD4⁺ juga teraktivasi oleh adanya IL-12 yang dihasilkan oleh sel APC tersebut (Sypek *et al*, 1993). Sel CD4⁺ yang teraktivasi apakah akan berkembang menjadi sel-Th1 atau sel-Th2. Sel-Th1 menghasilkan IL-2, TNF- α , dan IFN- γ yang kemudian merangsang perkembangan sel NK dan sel CD8⁺ CTLs (Zinkernagel *et al*, 1993). Hal ini telah dibuktikan pula oleh beberapa peneliti lain, seperti yang dilaporkan bahwa terjadi peningkatan sel natural killer limfosit T (NKT) di dalam hati yang teraktivasi oleh glikoprotein dari VHC antigen. Sel yang teraktivasi ini akan menghasilkan IFN- γ dan IL-2 yang mempunyai efek sebagai antivirus dan merangsang perkembangan respons imun spesifik untuk melawan sel yang terinfeksi VHC (Matsuura *et al*, 2000; Gumpertz *et al*, 2000; Kennedy *et al*, 2000).

Dengan terjadinya aktivasi dari sel NKT juga menunjukkan pertambahan dari Fas ligand (Fas L.) sebagai *mediated-cytotoxicity* yang penting pada penyakit inflamasi hati (Cui *et al*, 1997). Aktivasi dari sel NKT yang berfungsi sebagai sitotoksik juga terjadi oleh stimulasi IL-12 yang dihasilkan oleh sel *Kupffer* sebagai APC (Diepolder *et al*, 1998).

Dari hasil penelitian Bertolotti *et al* (1997) menemukan bahwa mayoritas dari sel-T yang diisolasinya dari hati penderita hepatitis C kronik adalah sel-Th1 yang menghasilkan IFN- γ dan juga memperkuat dugaan bahwa sel-Th1 berperan sebagai penyebab kerusakan sel hati kronik. IFN- γ juga akan meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I pada sel hepatosit dan sel saluran empedu. Kompleks antigen peptida

VHC dan MHC kelas I pada permukaan sel hati yang terinfeksi oleh VHC akan dikenal oleh sel-TCID8+ (CTLs) dan akan melisiskan sel yang terinfeksi tersebut (Ballardini *et al.*, 1995). Hal ini diperkuat oleh penemuan Mossier *et al.* (1994) bahwa didapatkan peningkatan ekspresi MHC kelas I yang mempunyai korelasi dengan beratnya penyakit hati.

Berdasarkan laporan hasil penelitian di atas bahwa terjadi peningkatan kadar INF- γ pada penderita hepatitis C kronik dengan mempergunakan pendekatan *cross sectional*, hal ini menunjukkan telah terjadi aktivasi dari sel imunokompeten sebagai penghasil sitokin INF- γ akibat infeksi kronis oleh virus hepatitis C.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisis hasil penelitian dan pembahasannya, dapat dibuat kesimpulan:

1. Terjadi peningkatan ekspresi sel-TCID4⁺ dan sel-TCID8⁺ pada penderita hepatitis C kronik, yang mempunyai peranan sangat penting terhadap imunopatogenesis hepatitis-C kronik.
2. Terjadi peningkatan kadar sitokin IL-1 β pada penderita hepatitis-C kronik yang berperan pada imunopatogenesis hepatitis-C kronik
3. Terjadi peningkatan kadar IL-2 pada penderita hepatitis-C kronik yang berperan sebagai imunomodulator sangat penting pada imunopatogenesis hepatitis-C kronik.
4. Terjadi peningkatan kadar IL-10 pada penderita hepatitis-C kronik, dan tidak mengakibatkan penekanan terhadap sekresi sitokin yang dihasilkan oleh sel-TH1.
5. Terjadi peningkatan kadar TNF- α pada penderita hepatitis-C kronik yang berperan pada apoptosis sehingga terlibat dalam imunopatogenesis hepatitis C kronik
6. Terjadi peningkatan kadar IFN- γ pada penderita hepatitis C kronik sebagai imunomodulator yang sangat berperan pada imunopatogenesis hepatitis C kronik.
7. Pada penelitian ini terdapat peningkatan ekspresi dari sel-TCID4⁺ dan sel-TCID8⁺ serta peningkatan kadar sitokin yang dihasilkan oleh sel imunokompeten, namun infeksi VHC terus berlanjut menjadi kronik, terlihat ketidak mampuan respons imun untuk mengatasi infeksi VHC.

7.2 Saran

Dianjurkan untuk melakukan penelitian biologi molekuler yang lebih lanjut mengenai keterlibatan gen yang lain seperti *IFN regulatory factor 7* (IRF-7) pada hepatitis-C kronik, yaitu gen yang berperan terhadap respons interferon pada pengobatan hepatitis-C kronik



DAFTAR PUSTAKA

- Adinolfi LE, Giordano MG, Andreana A, 2001. Hepatic fibrosis plays a central role in pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. *Br J Haematol* 113: 590.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A, 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-93.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, 2000. Immunity to microbes. In: *Cellular and molecular immunology*, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, pp 743-62.
- Agnello V, Ahel G, Knight GB, Muchmore E, 1998. Detection of widespread
- Aizaki H, Saito A, Kusakawa I, 1996. Mother to child transmission of a hepatitis C virus variant with an insertional mutation in its hypervariable region. *J Hepatology* 25: 608-13.
- Akatsuka T, Donets M, Scaglione L, 1993. B cell epitope of the hepatitis C virus nucleocapsid protein determined by human monospecific antibodies. *Hepatology* 18: 503-510.
- Akbar N, Basuki B, Mulyanto, Garabrant DH, Sulaiman A, Noer HMS et al, 1997. Ethnicity, socio-economic status, transfusions and risk of hepatitis B and hepatitis C infection. *J Gastroenterol & hepatol* 12: 752-57.
- Akbar N, 2001. Pengelolaan praktis hepatitis virus akut dan kronik. *J Med Kedokteran* 2 : 60-65.
- Albert A and Bartolotti F, 1999, Hepatitis C , In: (Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J Eds) *Clinical hepatology*, 2nd ed. Oxford University Press, pp: 903-22.

- Alter MJ and Sampliner RE, 1989. Hepatitis C and miles to go before we sleep. *N Engl J Med* 321: 1538-40.
- Alberti A, and Benvegnu L, 2003. Management hepatitis C. *J Hepatology* 38 (S1): S104-S118.
- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH. 1972. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen positive donors. *Ann Intern Med* 77: 691-9.
- Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Morritsugu. 1975. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lanset* I: 838-841.
- Alter MJ, 1995. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 15: 5-14.
- Alter MJ, 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26 : 62S-5S.
- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, 1999. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 341: 556-562.
- Amirudin R, Akil HAM, Akahane Y, Suzuki H, 1991. Hepatitis B and C virus infection in Ujung Pandang. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl 3): 184-88.
- Anonymous, 1997. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology* 26 (Suppl 1): 2S-10S.
- Anonymous, 1998. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 47 (RR-19): 1-39.
- Anonymous, 2000. Quantikine: Human IL-1 α , IL-2 immunoassay.
- Anonymous, 2004. Bender MedSystems: Human IL-1, IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α ELISA: version 2.

- Ballardini G, Groff P, Pontisso P. 1995. Hepatitis C virus (HCV) genotype: tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A, B, C and intercellular adhesion-1 molecules. J of Clinical Investigation 95: 2067-75.**
- Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG. 1995. Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. Hepatol 21: 639.**
- Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. 1998. Hepatitis C virus structural protein assemble into viruslike particles in insect cells. J Virol 72: 255-324.**
- Beld M, Penning M, van Putten M. 1999. Low levels of hepatitis C virus RNA in serum, plasma, and peripheral blood mononuclear cells of injecting drug users during long antibody-undetectable periods before seroconversion. Blood 94: 1183.**
- Beld M, Habibuw MR, Rebers SP, Boom R, Reesink HW. 2000. Evaluation of automated RNA-extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool-screening systems. Transfusion 40: 575-579.**
- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. 1995. CD1 recognition by mouse NK1.1 lymphocytes. Science 268: 863-5.**
- Bellanti JA. 1993. Mekanisme imunitas terhadap penyakit virus. Dalam: Immunologi III . Yogyakarta, Gajah Mada University Press; 304-28.**
- Bertoletti A, D'Ellios MM, Boni C. 1997. Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infection. Gastroenterology 112: 193-9.**

- Bhattacharjee V, Prescott I.E, Pike J, 1995. Use of NS4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1,2,3,4,5, and 6. *J Gen Virol* 76: 1737-48.
- Bioulac-Sage P, Le BB and Balaband C, 1999. Liver and biliary tract histology In (Bicher J, Berhamou JP, Mc Intyre N, Rizzeto M and Rodes J, eds). Oxford Textbook of clinical Hepatology 2nd ed, Oxford University Press, pp 1-5.
- Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, Gowans EJ, 1994. Detection and distribution of hepatitis C specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 20: 553-7.
- Blight K and Gowans E. 1995. In situ hybridisation and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products. *Viral Hepatitis Reviews* 1: 143-55.
- Boudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Thiers V, 1993. Lack of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus seronegative woman: a prospective study with hepatitis C virus RNA testing. *Hepatology* 17: 772- 7.
- Bradley DW, Krawczynski K, Spelbring J, Humphrey C, Cook EH, 1991. Hepatitis C virus: buoyant density of the factor VIII derived isolate in sucrose. *J Med Virol* 34: 206-208.
- Bradley DW, Beach MJ, Purdy MA, 1993. Molecular characterization of hepatitis C and E viruses. *Arch Virol* 7 (Suppl): 1-14.
- Bresters D, Cuypers HT, Reesink HW, Schaasberg WP, Van der Poel CL, Mauser-Bunschoten EP et al, 1992. Enhanced sensitivity of second generation ELISA for antibody to hepatitis C virus. *Vox Sang* 62: 213-217.

- Breesters D, Mauser-Bunschoten EP, Reesing HW, 1993. Sexual transmission of hepatitis C virus. *Lancet* 342: 210-11.
- Brown EA, Okayama H, Lemon SM, 1994. In vivo and in vitro replication, expression, processing, and assembly of hepatitis C virus: Summary of a speciality session. In: (Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, Eds). *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, pp 104-105.
- Rudihusodo U, Ali Sulaiman H, Nurul Akbar H, Lesmana LAWaspodo AS, Noer HIMS et al. 1991. Seroepidemiology of HBV and HCV infection in Jakarta, Indonesia. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl 3): 196-201.
- Bukh J, PurcellRH & Miller RH, 1993. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 8234-8.
- Bukh J, Purcell RH, and Miller RH, 1994. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 8239-43.
- Camps J, CordobaJ, Esteban JJ, 1993. Pathophysiology of chronic hepatitis C. In: (Miguet JP and Dhumeaux D, eds). *Progress in hepatology'93*. Paris: Jhon Libbey Eurotext, pp63-8.
- Candotti D, Temple J, Sarkodie F, Allain JP, 2003. Frequent recovery and broad genotype 2 diversity characterize hepatitis C infection in Ghana, West Africa. *J Virol* 77: 7914-23.
- Carneiro MAS, Martins RMB, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, CardosoDDP, et al, 2001. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patient in central

- Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 : 765-769.
- Carucci P, Gane EJ, Riordan S. 1997. Hepatitis C virus-specific T helper cell responses in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatology* 26 A: 145.
- Cerino A and Mondelli Mondelli Mu. 1991. Identification of an immunodominant B cell epitope on the hepatitis C virus non-structural region defined by human monoclonal antibodies. *J Immunol* 147: 2692-2696.
- Cerny A and Chisari FV. 1994 Immunological aspects of HCV infection. *Intervirol* 37: 119-125.
- Chan SW, McOmish F, Holmes EC. 1992. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 73: 1131-41.
- Chang J, Yang SH, Cho YG, Hwang SB, Hahn YS, Sung YC. 1998. Hepatitis C virus core from two different genotypes has an oncogenic potential but is not sufficient for transforming primary rat embryo fibroblasts in cooperation with the H-ras oncogene. *J Virol* 72: 3060-3065.
- Chapel H, Haecney M. 1993. *Essentials of clinical immunology*. Ed^{3th}. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp: 246-247.
- Chen CH, Sheu JC, Wang JT. 1994. Genotypes of hepatitis C virus in chronic liver disease in Taiwan. *J of Med Virol* 44: 234-6.
- Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. 1997. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J. Virol* 71: 9471-26.

- Cho SH, Yoon JL, Chang JE, Ahn BM, Lee CH, Lee JI, 1993. Genomic typing of hepatitis C viruses from Korean patients : implications of genome variation in the E2/NS1 region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 196: 780-8.
- Chou QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M, 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C et al, 1991. Genetic organisation and diversity of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2451-2455.
- Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS, 1995. Association of hepatitis C virus particle with immunoglobulin : a mechanism for persistent infection *J Gen Virol* 76: 2337-2341.
- Chopra S, 2001. Characteristics of the hepatitis C virus. Up To Date www.uptodate.com (800) 998-6374; (781) 237-4788.
- Chopra S, 2001. Clinical features and natural history of hepatitis C virus infection. Yang diakses dari Up to Date www.uptodate.com (800) 998-6374; (781) 237-4788
- Chopra S, 2001. Diagnostic approach to hepatitis C virus infection. Yang diakses dari Up to Date www.uptodate.com (800) 998-6374; (781) 237-4788.
- Chopra S, 2005. Hepatitis C virus infection in patients with normal serum aminotransferases. Up TO Date. <http://www.uptodate.com>
- Clarke B, 1997. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 78: 2397-2410.

- Conry-Cantilena L, Hollinger, Van Raden M, Gibble J, 1996. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 334: 1691-6.
- Cui J, Shin T, Kawano T, 1997. Requirement for α 14 NKT cells in IL-12 mediated rejection of tumors. *Science* 278: 1623-6.
- Cuthbert JA, 1994. Hepatitis C: progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 7: 502-532.
- De Francesco R, Nedderman P, Tomei L, Steinkuhler C, Gallinari P and Folgori A, 2000. Biochemical and immunology properties of non-structural protein of the hepatitis C virus: implication for development of antiviral agents and vaccines. *Semin liver* 20: 69-83.
- Del Porto P, Puntoriero G, Scotta C, Nicosia A, Piccolella E, 2000. High prevalence of hypervariable region 1-specific and cross-reactive CD4+ T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN- α treatment. *Virology* 269: 313-324.
- De Vries RRP, 1994. The cellular immune response and its regulation. In: *Immunology*. Dutch Foundation for Postgraduate Courses in Indonesia. Surabaya Airlangga University Press: 13-20.
- Di Biscegli AM, Bacon BR, 1999. The unmet challenges of hepatitis C. *Scientific American* 281: 58-63.
- Dienstag JL, Isselbacher KJ, 1994. Acute hepatitis. In: (Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Eds). *Harrison's principle of internal medicine*. 13th Edition. Volume 2. New York: Mc Graw-Hill, Inc, pp, 1459-73.

- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, 1995. Possible mechanism involving T lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346: 1006-1007.
- Diepolder HM, Hoffmann RM, Gerlach JT, Zachoval R, Jung MC, Pape GR, 1998. Immunopathogenesis of HCV infection. *Current Studies in Hematology and Blood Transfusion* 62: 135-51.
- Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, 1992. Roles of ab and gd T cell subsets in viral immunity. *Annual Review of Immunology* 10: 123-51.
- Doi H, Yoon S, Homma M and Hotta H, 1994. Identification of hepatitis C virus subtype- 3b (HCV-3b) among Japanese patients with liver diseases using highly efficient primers for reverse transcription-polymerase chain reaction. *Microbiol and Immunol* 38: 159-63.
- Drazan KE, 2000. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transplantation* 6: 396-406.
- Enomoto N, Takada A, Nakao T and Date T, 1990. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 170: 1021-5.
- Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, 1996. Mutation in the non-structural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334: 77-81.
- Everhart JE, Stolar M, Hoofnagle JH, 1997. Management of hepatitis C: a national survey of gastroenterologists and hepatologists. *Hepatology* 26: 785-825.
- Farci P, Alter HJ, Wang D et al, 1991. A long term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New Engl J of Med* 325: 98-104.

- Farci P, Bukh J and Purcell RH, 1997. The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Semin Immunopathol* 19: 5-26.
- Farci P, Munoz SJ, Shimoda A, 1999. Experimental transmission of hepatitis C virus-associated fulminant hepatitis to a chimpanzee. *J Infect Dis* 179: 1007-1011.
- Farci P, Shimoda A, Colana A, 2000. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 288: 339-44.
- Farci P, Alter HJ, Wang D, 2003. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New Engl J of Med* 325: 98-104.
- Fattovich G, Giustina G, Degos F, 1997. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: A retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 112: 463.
- Feinston SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV, 1975. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New Engl J of Med* 292: 787-70
- Feinstone SM, Mihalik KB, Kaminura T, Alter HJ, London WT, Purcell RH, 1983. Inactivation of hepatitis B virus and Non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infection and immunity* 41: 816-821.
- Forns X, Purcell RH, Bukh J, 1999. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* 7 : 402-409.
- Forns X, Bukh J, Purcell RH, 2002. The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* 37: 684-695.
- Fox SI, 1999. Liver, gallbladder and pancreas. In *human physiology* 6th ed. Boston: McGraw-Hill, pp. 580-585.

- Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, 2000, the role of parenteral antichistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 355: 887-891.
- Frese M, Barth K, Kaul A, Lohmann V, Schwarzle V, Bartenschlager, 2003. Hepatitis C Virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *J Gen Virol* 84: 1253-1259.
- Ganong WF, 2001. Liver & Biliary system. In *Review of medical physiology*, 20th ed. New York: Lange Medical Book: Mc Graw Hill Medical Publishing Division, 483-487.
- Garcia-Suarez J, Burgaleta C, Hernanz N, 2000. HCV-associated thrombocytopenia: Clinical characteristics and platelet response after recombinant alpha2b-interferon therapy (In process Citation). *Br J Hematol* 110: 98.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, 1999. Recurrence of hepatitis C virus after loss virus specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117: 933-41.
- Goodman ZD and Ishak KG, 1995. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Seminars in liver disease*, 15: 70-81.
- Gongora DVN, 1998. Marcadores sorológicos da infecção pelo vírus da hepatite C em trabalhadores e pacientes da de diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 585-586.
- Gordon SC, Ptel AH, Kulesza GW, Barnes RE, Silverman AL, 1992. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *American J Gastroenterol* 87: 1849-51.

- Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinston SM, and Rice CM, 1993. A second Hepatitis C virus - encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10583-10587.
- Gray H, 1995. **The liver**. In *anatomy descriptive and logical*. London: Paragon Book Service, pp 625-27.
- Gumperz JF, Roy C, Makowska A, 2000. Murine CD11d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12: 211-21.
- Haber MM, West AB, Haber AD, 1995. Relationship of aminotransferase to liver histological status in chronic hepatitis C. *AM J Gastroenterol* 90: 1250.
- Hadiwandowo S, Tsuda F, Okamoto H, 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: 182-6.
- Hagiwara H, Hayashi N, Mita E, 1993. Quantitative analysis of hepatitis C virus RNA in serum during interferon alfa therapy. *Gastroenterol* 104: 877-83.
- Hahn CS, Cho YG, Kang BS, Lester LM, Hahn YS, 2001. The HCV core protein acts as a positive regulator of fas-mediated apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line. *J Virol* 276: 127-37.
- Han JH, Shyamala V, Richman KH, Brauer MJ, Irvine B, Urdea MS et al, 1991. Characterization of terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1711-1715.
- Handojo I, 2003. Respons imun. Dalam: *Pengantar imunologi dasar*. Airlangga University Press: 1-9.

- Hasan A, 1990. **Prevalensi hepatitis C pada penyakit hati menahun. Naskah lengkap symposium hepatitis C, suatu perkembangan baru hepatitis non-A, non-B.** Surabaya, hal: 45-52.
- Haydon GH, Jarvis I.M, Blair CS, 1998. **Clinical significance of intrahepatic hepatitis C virus levels in patients with chronic HCV infection.** Gut 42: 570.
- He Y, Yan W, Coito C, Li Y, Gale M, Katze MG. 2003. **The regulation of hepatitis C (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins.** J Gen Virol 84: 535-543.
- Hillman RS & Ault KA, 2002. **Lymphopenia and immune deficiency.** In: *Hematology in clinical practice eds^{3th}*. New York, Mc Gran-Hill, pp: 232-39.
- Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N et al, 1993. **Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative non-structural precursor protein of hepatitis C virus.** J Virol 67: 4665-4675.
- Hollinger FB. 1991. **Non-A, Non-B hepatitis viruses.** In: (Hollinger FB, Purcell RH, Robinson WS, Gerin JL, Tichurst J, Eds). *Viral hepatitis. Biological and clinical features, specific diagnosis and prophylaxis.* Second edition. New York: Raven Press, pp. 139-157.
- Hotta H, Doi H, Hayashi T, 1994. **Analysis of the core and E1 envelope region sequences of a novel variant of hepatitis C virus obtained in Indonesia.** Archives of virol 136: 53-62.
- Houghton M, Han J, Kuo G, Choo QL, Weiner AJ, 1993. **Hepatitis C virus structure and molecular virology.** In: (Zuckerman AJ, Thomas HC, Eds). *viral hepatitis. Scientific basis and Clinical management.* Edinburg: Churchill Livingstone, pp. 229- 40

- Houghton M, Choo QL, Kuo G, Ralston R, Selby M, Weiner A et al. 1994. The hepatitis C virus: Genetic organization, persistence, and vaccine strategies. In (Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, eds). *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, pp 33-37.
- Houghton M, Selby M, Weiner A, Choo Q-L. 1994. Hepatitis C virus structure, protein products and processing of the polyprotein precursor. In: (Reesing HW, Ed). *Hepatitis C virus*. *Curr Stud Hematol Blood Transf*, 61: 1-11.
- Inglesby TV, Rai R, Astemborski J. 1999. A prospective, community-based evaluation of liver enzymes in individuals with hepatitis C after drug use. *Hepatology* 29: 590.
- Irving WL, Neal KR, Underwood JCE, Simmonds PN, James V. 1994. Trent regional hepatitis C virus study group: Chronic hepatitis in United Kingdom blood donor infected with hepatitis C virus. *BMJ* 308: 695-96.
- Jacobson IM. 2001. Managing chronic hepatitis C virus infection. *Hospital Physician*: 34-41.
- Janeway CA. 1993. How the immune system recognizes invaders. *Scientific American* .269: 41-47.
- Jones AL and Schmucker DL. 1999. Electron microscopy of the liver. In (Bircher J, BenhamouJP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J, eds). *Clinical hepatology*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, pp 23-31.
- Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. 1995. Glands associated with the digestive tract. In *basic histology*, 8th ed. Appleton & Lange, pp 306-319.

- Kaito M, Wanatabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M *et al*, 1994. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscope study. *J Gen Virol* 75: 1755-1760.
- Kao JH, Chen PJ, Wang JT, 1996. Superinfection by homotypic virus in hepatitis C virus carriers: studies on patients with post-transfusion hepatitis. *J Med Virol* 50: 303-308.
- Kaneko S, Unoura M, Takeuchi M, Terski S, Ogino H, Matsushita E *et al*, 1994. The role of hepatitis C virus in hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirol* 37 : 108-13.
- Kaneko YB, Harada M, Kawanto T, 2000. Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin-4 an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J of Experimental Med*, 191: 105-14.
- Karohl C, Manfro RC, Senger MB, Thome FS, Gonçalves LFS, Rigatto M *et al*. 1995. Prevalencia de anticorpos antivírus da hepatite C em pacientes em hemodialise crônica de Porto Alegre. *J Bras Nefrol* 17: 40-46.
- Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, 1990. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 9524-8.
- Kennedy J, Vicari AP, Saylir V, 2000. A molecular analysis of NKT cells: identification of class-restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukocyte Biol* 67: 725-34.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y *et al*, 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and

- hepatocellular carcinoma: Analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12: 671-75.
- Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Nakano Y, Furuta S, Nishioka K et al, 1991. Hepatitis C in hospital employees with needlestick injuries. *Ann Intern Med* 115: 367-69.
- Koff RS, 1993. Viral hepatitis. In: (Schiff I. and Schiff ER, Eds). *Disease of the liver*, Volume 1, Seventh edition. Philadelphia: JB. Lippincott Company, pp. 508-509, 513.
- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. 2002. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 62 (suppl 1): 29-37.
- Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, 1992. Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* 149: 3339-44.
- Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, 1995. HLA class I-restricted Cytotoxic lymphocytes specific for hepatitis C virus: identification of multiple epitopes and characterization of patterns of cytokine release. *J Clin Invest* 96: 2311-2321
- Koziel MJ, 1997. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Viral Hep* 4 (Suppl 2): 31-34.
- Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, 1992. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 103: 622-9.
- Kresno SB, 2001. Respons imun pada infeksi. Dalam: *Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium*, ed 4. Jakarta. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: 161-84.

- Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH et al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244 : 362-364.
- Kurstak E. 1993. *Viral hepatitis C, Current status and issues*. New York: Springer-Verlag Wien, pp. 181-184.
- Kusumobroto H. 1990. Prevalensi hepatitis B dan C pada penderita sirosis hati dan karsinoma hati. Suatu studi pendahuluan. Abstrak Komunikasi ilmiah antar cabang. Komprensi Kerja Nasional PGJ. PPHI dan PEGJ. Surakarta.
- Kuzushita N, Hayashi N, Katayama K. 1996. Increased frequency of HLA DR13 in hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *J Med Virol*; 48: 1.
- Lai m, 2002. Hepatitis C's interferon resistance mechanism discovered. Diakses dari <http://www.hindotc.org/news/lai.html>.
- Lanford RE and Bigger C. 2002. Advances in model systems for hepatitis C virus research. *Virology* 293: 1-9
- Lanier L. 1991. Cells of the immune response: Leukocytes and mononuclear phagocytes. In (Stites DP and Terr AI, eds): *Basic and clinical immunology 7th ed*, Norwalk Connecticut. Appleton & Lange: 61-72.
- Lauer GM and Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 345 : 41-52.
- Lechmann M, Ihlenfeldt HG, Braunschweiger J, 1996. T- and B-cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-hepatitis C virus-positive blood donors without viremia. *Hepatology* 24: 790-5.

- Lechner F, Wong DK, Dunbar PR. 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191: 1499-1512.
- Lindi JK and Hyde GM. 2003. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J* 79: 307-312.
- Lin C, Lindenbach BD, Pragai B, Meccourt DW, Rice CM. 1994. Processing of the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 68: 5063-73.
- Lino S. 2002. Natural history of hepatitis B and C virus infection. *Oncology (Suppl 1)*: 18-23.
- Lohmann V, Koch JC, Bartenschlager R. 1996. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J Hepatol* 24 (suppl.2): 11-19.
- Loza AM, Junco JM, Troche JMR. 2001. Pathogenesis of hepatitis C virus infection. *Rev Invest Clin* 53 : 561-568.
- Lyard P, Grossi C. 1996. Cells involved in the immune response. In: (Roitt I, Brostoff and Male D, eds). *Immunology* 4th ed. London, Mosby Co, 2.1-2.14.
- Major ME & Feinston SM. 1997. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 25: 1527-38.
- Male D, Cook A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. 1991. Cytokines and chemokines. In: *Advanced immunology*, 3rd ed. London, Mosby Co, pp 10.1-10.14.
- Marcellin P, Levy S, Erlinger S. 1995. Therapy of hepatitis C: Patients with normal aminotransferase levels. *J Hepatol* 26 (suppl 1): 133 S.
- Marcellin P, Levy S, Benhamou JP, Erlinger S. 1996. Management of the asymptomatic HCV carrier with normal ALT levels. *Viral Hepatitis Rev* 2: 277.

- Marsetyawan HNES, 2000. **Sitokin**. Kuliah Defisiensi Biomol & Imunolgi, TPPD Fak. Kedokteran Universitas Gajah Mada
- Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, VanArsdale T, Hwang SB, Jeng KS et al, 1997. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol* 71: 1301-09.
- Matsuura A, Kinouchi M, Chen HZ. 2000. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK1 cells expressing distinct V alpha 14 chains. *J Immunol* 164: 3140-8.
- Merican I, Sherlock S, McIntyre N. 1993. Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med* 86: 119.
- McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA. 1996. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. IN: (Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, editors). *Viral hepatitis and liver disease. Proceedings of IX Triennial International Symposium on viral hepatitis and liver disease. Rome, Italy. Turin: Edizioni Minerva Medica* 1997: 267-70.
- McCormick SE, Goodman Zd, Maydonovitch CL, Sjogren MH, 1996. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV-RNA titer in patients with hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 91: 1516.
- Miller JFAP. 1976. Cellular interaction in immune responses. *Seminar in Hematology* 16: 283-92.
- Minutello MA, Pileri P, Unutmaz D. 1993. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease : intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of

- hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J of Experimental Medicine* 178: 17-25.
- Miro S, Zubir N, Julius, 2003. HBsAg and antiHCV on blood donors in Padang for four years. *Actamedica Indonesia, Kongres PAPDI XIII Manado*: 58.
- Miyamoto Y, Okamoto H, Sato K, Tanaka T, Mishiro S, 1992. Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 73: 715-718.
- Mizushima H, Hijikata H, Asabe SI, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K, 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 product with different C termini. *J Virol* 68: 6215-22.
- Mondelli MU, Cerino A, Meola A, Nicosia A, 2003. Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1 ? Implication for immune responses. *J Biosci* 28: 305-10.
- Moore KW, Cirra AO, Malefyt RW, Viera P, Mosmann, 1993. Interleukin -10. *Ann. rev. Immunol.* 11: 165-190.
- Moradpour D, Cerny A, Heim MH, Blum HE, 2001. Hepatitis C: an update. *Swiss Med WKLY* 131: 291-298.
- Moretta L, Ciccone F, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A, 1994. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, receptors. *Advances in Immunology*, 55: 341-58.
- Mori S, Kato N, Yagyu A, 1992. A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 183: 334-42.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y, 1998. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 4: 1065.

- Mosmann R and Subash S, 1996. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-46.
- Mossier JF, Scoazze JY, Marcellin P, Degott C, Benahmou JP, Feldmann G, 1994. Expression of cytokine-dependent immune adhesion molecules by hepatocytes. *Gastroenterology* 107: 1457-68.
- Muljono DH, Raharja H, Soemarto W, Hasan HA, Mulyanto, Soewignyo S, 1993. Profil serologis virus hepatitis B dan virus hepatitis C di RSUD Dr Soetomo Surabaya. *AMI XXI (Suppl. 3):* 389-400.
- Mulyanto, Soewignyo S, Gunawan S, Sumarsidi D, Redhip, Suparyatno JB et al. 1993. Anti-HCV pada individu sehat di beberapa kota di Indonesia. *AMI XXV (Suppl5):* 990-97.
- Murray JS, Pfeiffer C, Madri J, Bottomly K, 1992. Major histocompatibility (MHC) control of CD4 cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell mediated responses in mice of distinct MHC genotype. *European J Immunol* 22: 559-65.
- Nagayama R, Miyake K, Tsuda F, Okamoda H, 1994. IgM antibody to hepatitis C virus core peptide (CP14) for monitoring activity of liver disease in patients with acute or chronic hepatitis c. *J Med Virol* 42:311-317.
- Naghettini AV, Daher RR, Martins RMB, Dolcs J, Vanderborght B, Yoshida CFT et al, 1997. Soroprevalencia do virus da hepatite C na populacao em dialise de Goiania . *GO Rev Soc Bras Med Trop* 30: 113-117.
- Natov S and Pereira B JG, 2005. Diagnosis of hepatitis C virus infection in patients on dialysis. UpTo Date. [http://www Up TO Date](http://www.UpTODate),

- Ni J, Hembrador E, Bisceglie AMD, Jacobson IM, Talal AH, Butera D et al, 2003. Accumulation of B lymphocytes with a naïve, resting phenotype in a subset of hepatitis C patients. *J Immunol* 170: 3429-3439.
- Nouri-Aria KT, Sallie R, Mizokami M, Portmann BC, Williams R, 1995. Intrahepatic expression of hepatitis C virus antigens in chronic liver disease. *J Pathol* 175: 77-83.
- Nousbaum JB, Stanislas P, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Brechot C, 1995. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Annals of Internal Medicine* 122: 161-8.
- Ogata S, Fujii MN, Ku Y, Yoon S, Hotta H, 2002. Comparative sequence analysis of core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol*: 3625-3630.
- Oka H, Kurioka N, Kim K, Kuroki T, Mizoguchi Y, 1990. Prospective study of early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology* 12: 680-7.
- Okamoto H, Kojima M, Okada SI, Yoshisawa H, Izuka H, Tanaka T et al, 1992. Genetic drift of hepatitis C virus during an 8,2 year infection in a chimpanzee: variability and stability. *Virology* 190: 894-899.
- Omata M and Kato N, 1994. Recent advances in hepatitis C virus research. *J Gastroenterol* 29: 377-82.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltinek CR, 1991. Cytokines. In: (Stites DP and Terr AI, eds) *Basic and clinical immunology*, 7th ed, Norwalk Connecticut, Appleton & Lange: 78-100.

- Oppenheim JJ and Ruscetti FW, 1997. Cytokines. In: (Stites DP, Terr AL, Farslow TG, eds) *Medical immunology*. 9th ed, Prentice-Hall International Inc, Appleton & Lange; 147-160.
- Parslow TG, 1997. The immune response. In: (Stites DP, Terr AL, Parslow TG). *Medical immunology*. Ninth edition. USA: Appleton & Lange. pp 63-73.
- Pavio N and Lai MMC, 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 28: 287-304.
- Pawlotsky JM, 2002. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36 (Suppl 1): 565- 571.
- Peignoux M, Marcellin M, Gournay P, 1994. Detection and quantitation of serum HCV-RNA by branched DNA amplification in anti-HVC positive blood donors. *J Hepatol*; 20): 676.
- Picciotto A, Icardi GC, Bardellini E, Borro P, Borzone S, Pirreddu M, Sinelli N, Pezzano D, Orone L, Di Giacomo C, Marinucci G, Celle G, 1995. Detection of anti-HCV IgM antibodies in patients with chronic hepatitis C treated with interferon. *Eur J Gastroenterol & Hepatol* 7:623-625.
- Puoti M, Zonaro A, Ravaggi A, Marin MO, Castelnuovo F, Cariani E, 1992. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 16: 877-81.
- Raharja H, 1990. *Hepatitis B, gastroenterologi-hepatologi*. Ed, Jakarta: Infomedika, hlm 276-253.
- Ramsay AJ, Ruby J, Ramshaw IA, 1993. A case for cytokines as effector molecules in the resolution of virus infection. *Immunol Today* 14: 155-7.

- Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R, 1996. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 70: 4438-43.
- Rehermann B. 1996. Immunopathogenesis of viral hepatitis. In (Manns MP, eds). *Liver and gastrointestinal immunology*, 10. London: Bailliere Tindall, pp. 482-96.
- Roitt IM. 2003. Produksi sel-sel efektor. Dalam imunologi (terjemahan), edisi 8 . Jakarta: Widya Medika. hlm. 163-82.
- Romagnani S, 1994. Th1 and Th2 subsets of CD4+ T Lymphocytes. *Scientific American Science and Medicine* 270: 68-77.
- Rosalki SB and McIntyre N, 1999. Biochemical investigations in the management of liver disease. In: (Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J, eds) *Clinical hepatology*. Oxford: Oxford University Press, pp 505-521.
- Rosen HR, Hinrich DJ, 1999. Association of multispecific CD4+ response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology* 117: 926-32.
- Rossini A, Gazzola GB, Ravaggi A, 1995. Long-term follow-up of and infectivity in blood donors with hepatitis C antibodies and persistently normal alanine aminotransferase levels. *Transfusion* 35: 108.
- Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, Giostra E, Malc PJ, Mentha G et al, 2000. Hepatocyte steatosis is acytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol* 33: 106-115. 106-115.
- Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T, 1997. Sensitization to Fas-mediated apoptosis is by hepatitis C virus core protein. *Virology* 229: 68-76.

- Rumi M, Del Ninno E, Parravicini M, 1996. A prospective, randomised trial comparing lymphoblastoid to recombinant interferon alpha 2a as therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology* 24: 1366-70.
- Sage PB, Bail BL, Balabaud C. 1999. Liver and biliary-tract histology. In (Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J, eds). *Clinical Hepatology*. 2nd ed. Oxford: Oxford Medical Publication. pp. 13-21.
- Saldanha J and Minor PH. 1996. Incidence of hepatitis C virus RNA in anti-HCV negative plasma pools and blood products. *Vox Sanguinis* 70: 232-4.
- Santolini E, Migliaccio G, La Monica N, 1994. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68: 3631-3641.
- Sasaki F, Tanaka J, Moriya T, Katayama K, Hiraoka M, Ohishi K et al. 1996. Very low incidence rates of community-acquired hepatitis C virus infection in company employees, long-term inpatients, and blood donors in Japan. *J Epidemiol* 6: 198-203.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Filocamo G, Acali S et al. 2002. The human scavenger receptor class B type 1 is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21: 5017-5025.
- Schneeberger PM, Keur I, van der Vliet W, van Hock K, Boswijk H, van Loon AM et al. 1998. Hepatitis C virus infection in dialysis units in the Netherlands: a national survey by serological and molecular methods. *J Klin Microbiol* 36: 1711-1715.
- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. 1996. The risk of transfusion-transmitted viral infection. *N Engl J Med* 334: 1685-90.

- Shakil AO, Cantelina C, Alter C. 1995. Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: Clinical, biochemical, virologic and histologic features. The hepatitis C Study Group. *Ann Intern Med*; 123: 330.
- Shields PL, Morland CM, Salmon M, Clin S, Hubacher SG, and Adams DH, 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C infected liver. *J of Immunol*, 163: 6236-43.
- Shimizu YK, Hijikata M, Iwamoto A. 1994. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *J Virol* 68: 1494-1500.
- Shimotohno K, Hirowatari Y, Komuda Y, Kato N, Hijikata M, 1995. Processing of the hepatitis C virus precursor protein. *J Hepatol* 22 (suppl.1): 87-92.
- Silini E, Bono E, Cividini A. 1995. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 21: 285-90.
- Silvia AE, Hosen B, Boyle RW, Fang CT, Shindo M, Waggoner JG et al. 1994. Diagnosis of chronic hepatitis C: Comparison of immunoassays and polymerase chain reaction. *Am J Gastroenterol* 89: 493-496.
- Simmonds P, Rose KA, Graham S et al, 1993. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS4 region of hepatitis C virus: use of type-specific peptides to serologically differentiate with HCV type 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol* 31: 1493-1503.

- Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, 1993. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74: 2391-9.
- Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H et al, 2001. Th1/Th2 profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 36: 544-51.
- Soetjipto, Handajani R, Lusida MI, Darmadi S, Adi P, Soemarto et al, 1996. Differential prevalence of hepatitis C virus subtypes in healthy blood donors, patient on maintenance hemodialysis, and patients with hepatocellular carcinoma in Surabaya, Indonesia. *J Clin Microbiol* 34: 2875-2880.
- Soetjipto, 1997. Tinjauan segi biologimolekuler virus hepatitis C. (Putra ST, ed) *Biologi molekuler kedokteran* .Ed I, Surabaya: University Press. hlm 10-18.
- Soeliadi HW, Adenan H, Nurdjanah N, 1993. Penelitian seroepidemiologi hepatitis virus B (VHB) dan virus hepatitis C (VHC) di Yogyakarta. *AMI XXV (Suppl 5): 998- 1005.*
- Soemahardjo S, Soelciman BH, Widjaya A, Muljanto, 1983. Tes faal hati.Ed I, Bandung :Alumni, hlm 1-64.
- Soemohardjo S, Gunawan S, Mulyanto, Sumarsidi D, Boediyono M, 1990. Anti-VHC pada penderita penyakit hati di Mataram (penelitian pendahuluan). *Konkernas PPHI, PGI dan PEGI*. Surakarta.
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Sceff LB, 2004. Dianosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 39: 1147-71.
- Sulaiman HA, Budihusodo U, Noer S, 1990. Infeksi virus hepatitis C pada donor darah dan penyakit hati di Indonesia. In: (Soemarto R, Setiahudi I, Muljono DH,

- Probohocsodo Y, eds). Naskah lengkap symposium hepatitis C, suatu perkembangan baru hepatitis non-A, non-B. Surabaya. hal: 17-27.
- Sulaiman HA, Noer HMS, Endardjo S, Hoyeranda E, 1991. The prevalence of antibody to hepatitis C virus (anti-HCV) in patients with acute and chronic liver diseases in Jakarta, Indonesia. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl. 3): 179-83.
- Sullivan DE, Gerber MA, 1994. Conservation of hepatitis C virus 5' untranslated sequences in hepatocellular carcinoma and surrounding liver. *Hepatology* 19: 551-53.
- Sung H, Shimodaira S, Doughty AL, Picchio GR, Can H, Yen TSB et al. 2002. Establishment of B-Cell lymphoma lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J of Virol* : 2134-2146.
- Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, 1995. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J of Gen Virol* 76: 53-61.
- Sypek JP, Chung CL, Mayor SHE, 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Experimental Med* 177: 1797-802.
- Takaki A, Wiese M, Macrtens G, 2000. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nature Med* 6: 578-82.
- Takashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S, 1992. p²⁰ protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 191: 431-434.

- Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S, 1992. p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 191: 431-434.
- Tao QM, Wang Y, Wang H, Chen WR, Sun Y, Meng Q et al. 1991. Seroepidemiology Of HCV and HBV infection in Northern China. *Gastroenterol Jpn* 26 (Suppl. 3): 156-58.
- Tarao K, Rino Y, Ohkawa S, Shimizu A, Tamai S, Miyakawa K et al. 1999. Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patient with hepatitis C virus-associated cirrhosis. *American Cancer Society*: 589-95.
- Thomas HC. 1993. Immunologic aspects of liver disease. In (Schiff L, and Schiff ER, Eds). *Disease of the liver*. Volume 1. Seventh edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Co. pp 644-45.
- Timan IS, Latu J, Aulia D, Moeslichan S, 1993. Hepatitis C among blood donors in Jakarta. *South Asia J Trop Med Public Health* 24 (Suppl 1): 278-79.
- Tokars JL, Miller ER, Alter MJ, 1995. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States. *ASAIO J* 1998: 98-107.
- Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, Co RL, 1995. Clinical outcome after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med* 332: 1463.
- Toyonaga T, Hino O, Sugai S. 1994. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gama in the liver. *Proceeding of the National Academy of sciences of the USA* 91: 614-8.

- Triwibowo, 1993. Anti-HIV, Anti-hvc, Syphilis, HbsAg serologic test among high-risk group and blood donors in Yogyakarta, Indonesia. *South Asian J Trop Med Public Health* 24 (suppl 1): 275-77.
- Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, 1993. A multicenter study of viral hepatitis in United States hemophilic population. *Blood* 81: 412-8.
- Tsuji T and Chisari FV, 1994. Cellular immune responses to hepatitis viruses: Summary of a specialty session. In (Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T, Eds). *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo, Berlin: Springer-Verlag, pp 153-154.
- Vanderborgh BOM, Rouzere C, Ginuino CF, Maertens G, van Heuverswyn H, Yoshida FT, 1995. High prevalence of hepatitis C infection among Brazilian hemodialysis patients in Rio de Janeiro: a one-year follow-up study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 75-79.
- Van der Poel CL, Cuypers HTM, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, di Nello R, 1991. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 337: 317
- Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, 1994. Hepatitis C six years on. *Lancet* 344: 1475-1479.
- Varaklioti A, Vassilaki N, Georgopoulou U, Manromara P, 2002. Alternate translation occurs within the core coding region of the the Study of Liver Disease hepatitis C viral genome. *J Biol Chem* 277: 17713-17721.
- Velazquez rF, Rodriguez M, Navasques CA, Einarcs A, Perez R, Sotorrios NG, 2003. Prospective analysis of risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. In: *Hepatology*, vol 37: 1132-9.

- Villa F, Ferreti I, DePalma M. 1991. HVC RNA in serum asymptomatic blood donors involved in post transfusion hepatitis. *J of Hepatol* 13: 853.
- Youg M, Lang T, Frosner G. 1999. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection children hwo underwent cardiac surgery before the implementation of blood donor screening. *N Engl J Med* 341: 866-70.
- Walewski JJ., Keller TR, Stump DD, Branch AD. 2001. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame . *RNA* 7: 710-721.
- Walsh K and Alexander GJM, 2001. Update on chronic viral hepatitis. *Postgrad American Association Med J* 77: 498-505.
- Wang Y, Tao QM, Zhao HY, Tsuda F, Nagayama R, Yamamoto K et al. 1994. Hepatitis C virus RNA and antibodies among blood donors in Beijing. *J Hepatol* 21: 634-40.
- Watanabe J, Matsumoto C, Fujimura K, Nagayama R, Yamamoto K, Tanaka T et al. 1993. Predictive value of screening test for persistent hepatitis C virus infection evidenced by viraemia-japanese experience. *Sang* 65: 199-203.
- Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson J, Hall JE, Mason T, Saracco G et al. 1992. Immune selection of hepatitis C virus (VHC) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3468-3472.
- Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL et al. 1995. Persistent hepatitis C infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92: 2755- 2759.

- WHO Report, 1999. Global surveillance and control of hepatitis C. *J of Viral Hepatitis* 6: 35-7.
- Wibawa IDN, 1992. Seroprevalence of antibody to hepatitis C virus (anti-HCV) in Denpasar, Indonesia. Abstract. Proceeding of 9th Asian Pacific Congress of Gastroenterology & 6th Asian-Pacific Congress of digestive endoscopy. Bangkok, Thailand. p: 204-319.
- Xu Z, Choh J, Yen TSB, Lu W, Strohecker A, Govindarajan Set al. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J* 20: 3840-3848.
- Yamada N, Tanihara K, Mizokami M, 1994. Full-length sequence of genome of hepatitis C virus type 3a; comparative study with different genotypes. *J General Virol* 75: 3279-84.
- Yoo BJ, Spate RR, Genballe AP, Selby M, Houghton M, Han JH, 1992. 5' end-dependent translation initiation of hepatitis C viral RNA and the presence of putative positive and negative translation control elements within the 5' untranslated region. *Virology* 191: 889-99.
- Yoshikura H, Hijikata M, Shimizu Y, 1994. Some aspect of hepatitis C virus: A Review and hypothesis. In: (Nishioka H, Suzuki H, Mishiro S, Oda T eds). *Viral hepatitis and liver disease*. Tokyo: Springer-Verlag, pp 101-103.
- Yoshikura H, Hijikata M, Nakajima N, Shimizu YK, 1996. Replikation of hepatitis C virus. *J Viral Hep* 3: 3-10.
- Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kato T et al, 2000. Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: Frequent involvement of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 181: 1920-28.

Zinkernagel RM, Moskophidis D, Kundig T, Oehen S, Pircher HP, Hengartner H. 1993. Effector T cell induction and T cell memory versus peripheral deletion of T cells. *Immunological Reviews* 131: 198-223.

Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C et al, 1998. Hepatitis C Virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 72: 3691-97.



LAMPIRAN



SURAT REKOMENDASI KOMITE ETIK

No. 10 / KE / 03 / II / 2004

Bersama ini Komite Etik Perjan RS M Djamil Padang memberikan rekomendasi kepada dr. Ellyza Nasrul SpPK(K) untuk melakukan penelitian di bidang Patologi Klinik dengan judul:

Pengaruh infeksi virus hepatitis-C terhadap sel imunokompeten pada penderita hepatitis-C kronik

Yang akan dilaksanakan di Bagian Patologi Klinik Perjan RS M Djamil Padang.

Demikianlah surat rekomendasi ini diberikan untuk dapat dimanfaatkan sebagaimana mestinya.



Padang, 16 Januari 2004

Komite Etik Perjan RS M Djamil Padang

Ketua,

**Prof. Dr. Julius SpPD-KGEH
NIP : 130 202 146**

SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Rismawati Yaswir, Sp PK (K)

Jabatan : Kepala Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas
Andalas Padang

Menerangkan bahwa :

Nama : Ellyza Nasrul

Pekerjaan : Mahasiswa S.1 Jurusan Ilmu Kedokteran

Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

Telah melakukan penelitian mengenai SGOT, SGPT, anti-VHC, CD4+, CD8+, IL-1 β ,
IL-2, IL-10, TNF- α dan IFN- γ untuk disertasi yang berjudul PENGARUH INFEKSI
VIRUS HEPATITIS-C TERHADAP SEL IMUNOKOMPETEN PADA PENDEKITA
HEPATITIS-C KRONIK.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 20 Januari 2005

Kepala Bagian Patologi Klinik

F. Kedokteran Universitas Andalas

Dr. Rismawati Yaswir SpPK (K)

NIP: 130 797 467

SURAT MELAKUKAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD

Jabatan : Ketua Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas
Airlangga Surabaya

Menerangkan bahwa :

Nama : Ellyza Nasrul

Pekerjaan : Mahasiswa S3 Jurusan Ilmu Kedokteran
Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya

Telah melakukan pemeriksaan RNA-VHC kualitatif dengan PCR di laboratorium TDRC Universitas Airlangga pada plasma penderita hepatitis C kronik, dalam rangka penelitian disertasi yang berjudul: PENGARUH INFEKSI VIRUS HEPATITIS C TERHADAP SEL IMUNOKOMPETEN PADA PENDERITA HEPATITIS C KRONIK.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 20 Desember 2004

Kepala Bagian Biokimia

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Soetjipto, dr, MS, PhD
NIP: 130 687 606

PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

Saya yang bertanda tangan Di bawahini:

Nama :

Alamat :

menyatakan setuju untuk diikutkan sebagai sampel dalam penelitian:

**" EKSPRESI CD4 DAN CD8 SERTA KADAR IL-1 β , IL-2, IL-10, TNF- α ,
INF- γ PADA IMUNOPATOGENESIS HEPATITIS-C KRONIK"**

dan bersedia diambil darahnya sesuai dengan protokol penelitian.

Dengan ini menyatakan bahwa kami telah secara sadar diberi tahu tujuan dan risiko penelitian.

Padang,

Saya yang menyatakan

(.....)

Tanda tangan dan nama terang

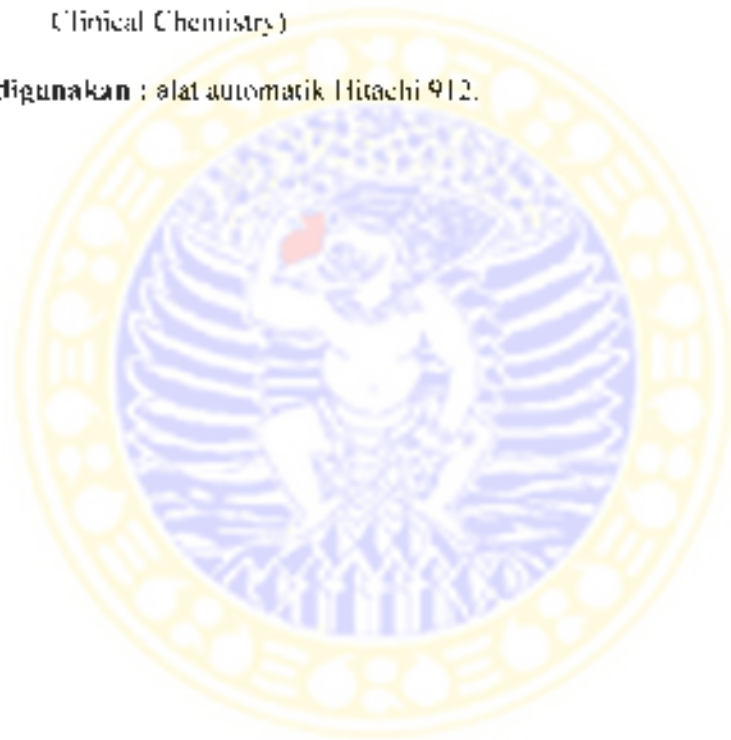
Lampiran Ia**PEMERIKSAAN ENZIM TRANSAMINASE**

Metoda: Metoda kinetik untuk pengukuran aktivitas GOT dan GPT berdasarkan rekomendasi Expert Panel of the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry).

Reagen: yang digunakan dari Roche ; GOT cat no 816337, dan GPT cat no 816442.

Prinsip kerja: Metode kinetik untuk pengukuran aktivitas GOT dan GPT berdasarkan rekomendasi Expert Panel of the IFCC (International Federation of Clinical Chemistry)

Alat yang digunakan : alat otomatis Hitachi 912.



Lampiran 1b**Hasil pemeriksaan GOT pada penderita hepatitis C dan kelompok kontrol**

No	Umur	Seks	GOT(U/L) Pend.hepatitis C Kronik	Umur	Seks	GOT(U/L) Kelompok kontrol
1	20	P	32	29	P	15
2	29	L	21	31	L	17
3	19	L	29	30	P	11
4	32	L	41	28	L	15
5	22	L	45	29	L	9
6	20	L	17	30	L	12
7	21	L	17	32	L	17
8	22	L	20	31	L	20
9	20	L	13	28	P	19
10	23	L	24	30	P	14
11	36	L	17	27	L	11
12	21	L	38	28	L	15
13	40	L	73	26	L	10
14	21	P	38	30	L	16
15	22	L	33	31	P	11
16	37	L	22	29	P	17
17	28	L	31	28	L	11
18	19	L	26	31	L	20
19	18	L	19	33	P	18
20	24	L	81	28	L	10
21	34	L	48	29	L	15
22	40	L	89	28	L	17
23	29	L	34	25	L	16
24	31	L	13	30	L	14
25	29	L	21	27	P	12
26	30	L	19	29	L	18
27	27	L	20	27	L	17
28	23	L	76	26	L	15
29	23	P	45	31	P	15
30	28	L	43	28	P	11
31	39	L	64	25	L	18
32	21	L	26	27	L	10
33	27	L	36	30	L	9
34	19	L	14	28	L	15
35	25	L	82	26	L	16
36	31	L	54	28	L	10
37	22	L	68	29	P	11
38	28	L	37	27	L	17
39	25	L	22	31	L	14
0	23	L	19	28	L	15

Lampiran 1c
Hasil pemeriksaan GPT pada penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol

No. sampel	Umur	Seks	GPT (U/L) Pend. Hepatitis C kronik	Umur	Seks	GPT (U/L) Kelompok kontrol
1	20	P	58	29	P	13
2	29	L	21	31	P	14
3	19	L	37	30	P	9
4	32	L	64	28	L	12
5	22	L	50	29	L	11
6	20	L	14	30	L	15
7	21	L	18	32	L	20
8	22	L	32	31	L	18
9	20	L	17	28	P	16
10	23	L	19	30	P	17
11	36	L	18	27	L	12
12	21	L	73	28	L	13
13	40	L	67	26	L	12
14	21	P	38	30	L	14
15	22	L	26	31	P	13
16	37	L	15	29	P	15
17	28	L	53	28	L	15
18	19	L	19	31	L	18
19	18	L	15	33	P	15
20	24	L	42	28	L	12
21	34	L	47	29	L	13
22	40	L	92	28	L	19
23	29	L	68	25	L	18
24	31	L	17	30	L	13
25	29	L	26	27	P	15
26	30	L	19	29	L	20
27	27	L	32	27	L	15
28	23	L	70	26	L	12
29	23	P	24	31	P	18
30	28	L	26	28	P	13
31	39	L	53	25	L	16
32	21	L	20	27	L	13
33	27	L	23	30	L	12
34	19	L	13	28	L	13
35	25	L	50	26	L	20
36	31	L	54	28	L	11
37	22	L	57	29	P	14
38	28	L	35	27	L	15
39	25	L	25	31	L	10
40	23	L	23	28	L	20

Lampiran 2a**PEMERIKSAAN ANTI-VHC**

Metoda: yang dipakai adalah metoda ELISA

Reagen: yang dipakai dari Human anti-HCV Elisa dengan nomor kit 51250, merupakan tes EIA generasi ketiga

Prinsip kerja:

Deteksi anti-VHC pada sampel dengan mempergunakan sistim *sandwich* indirek, menggunakan antigen rekombinan VHC (NS3, NS5) dan peptida sintesis (core, NS4).

Pada langkah pertama, antibodi Ig G anti-VHC dari spesimen (kalau ada) akan berikatan dengan dengan protein VHC yang melapisi permukaan mikrotiter *Well*. Kemudian diinkubasi sehingga terbentuk ikatan kompleks antigen-antiVHC yang dilabel pada fase padat. Setelah inkubasi, komponen spesimen yang tidak diikat dikeluarkan dengan cara pencucian.

Pada inkubasi kedua ditambahkan *conjugate HRP Ig-Gi antihuman*, yang akan mengikat antibodi Ig G anti-VHC dari sampel penderita pada permukaan dan membentuk kompleks *Sandwich*. Komponen yang tidak diikat dikeluarkan dengan cara pencucian.

Pada langkah inkubasi ketiga, ditambahkan substrat yang terdiri dari H₂O₂ dan kromogen TMB yang menghasilkan warna biru. Intensitas warna dikorelasikan terhadap kadar antibodi anti-VHC dalam sampel. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan asam sulfurik yang merubah warna biru menjadi kuning. Absorpsi intensitas warnanya diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm.

PERSIAPAN REAGEN:

Sebelum dikerjakan semua sampel dan reagen dikeluarkan dari tempat penyimpanan dan dibiarkan sampai mencapai suhu kamar.

1. Larutan kerja konjugat (WCON)

Larutkan 1 bagian konjugat (con) + 20 bagian konjugat diluent (C-Dil)

Misal: 50 ul con + 1000 ul C-Dil, setiap well diisi dengan 100 ul campuran tersebut.

Harus disiapkan setiap akan melakukan pemeriksaan.

2. Larutan kerja pencuci

Larutkan 1 bagian *wash solution* (WS) + 19 bagian air murni (akuades)

Misal: 50 ul WS + 950 ul akuades, dibutuhkan campuran ini 2,5 ul untuk setiap well

3. Larutan kerja substrat

Campur SA + SB dengan volume yang sama banyak, campuran ini dibutuhkan 100 ul untuk setiap well.

4. Sampel

Sampel yang diperlukan bisa dari serum atau plasma (EDTA, heparin, oksalat).

1 bagian sampel + 20 bagian sampel diluent (dil), campuran ini dibutuhkan 100 ul untuk setiap wells.

PROSEDUR PEMERIKSAAN:**Langkah 1:**

1. Pipet ke dalam semua well dari larutan yang telah dipersiapkan, kecuali larutan kerja konjugat (WCON).

100 ul kontrol negatif yang sudah dilarutkan ke B1 / C1

100 ul kontrol positif yang sudah dilarutkan ke D1 / E1 / F1

- 100 ul sampel yang sudah dilarutkan ke well yang lain. Campur lebih kurang 15 detik.
2. Tutup permukaan *well* dengan *adhesive film*
 3. Inkubasi pada suhu 37^o C selama 60 menit. Siapkan larutan kerja conyugat (WCON)
 4. Cuci sebanyak 6 kali.

Langkah II:

1. Pipet 100 ul WCON ke dalam semua *well*, kecuali A1. campur lebih kurang 15 detik.
2. Tutup permukaan *well* dengan *adhesive film*
3. Inkubasi pada suhu 37^oC selama 30 menit
4. Cuci sebanyak 6 kali.

Langkah III:

1. Pipet ke dalam semua *wells*. termasuk A1: 50 ul SA dan 50 ul SB, campur lebih kurang 10 detik.
2. Inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit, *wells* dan campur hati-hati. hindarkan dari cahaya.
3. Tambahkan 100 ul *stop solution* ke dalam semua
4. Baca dalam 30 menit pada panjang gelombang 450 nm dengan *Elisa reader*

Interpretasi hasil:

Anti-VHC dianggap positif bila nilai absorbansinya di atas nilai *cut off* yaitu :

0,2 x (rata-rata kontrol positif + kontrol negatif).

Lampiran 2b

Hasil pemeriksaan anti-VHC dan RNA-VHC Pada penderita hepatitis C kronik

No. sampel	Titer anti-VHC (ELISA)	RNA-VHC kualitatif (PCR)
1	1.132	+
2	1.076	+
3	0.765	+
4	0.815	+
5	0.812	+
6	0.691	+
7	2.822	+
8	2.406	+
9	2.768	+
10	0.949	+
11	0.443	+
12	1.442	+
13	1.713	+
14	3.000	+
15	1.703	+
16	0.290	+
17	3.000	+
18	0.246	+
19	0.321	+
20	3.000	+
21	0.480	+
22	2.737	+
23	2.713	+
24	0.238	+
25	0.320	+
26	0.320	+
27	0.282	+
28	3.000	+
29	1.576	+
30	2.171	+
31	0.452	+
32	2.948	+
33	0.728	+
34	0.419	+
35	2.818	+
36	2.473	+
37	0.774	+
38	1.224	+
39	1.117	+
40	0.986	+

Lampiran 3a**PEMERIKSAAN SEL-TCD4+ DAN SEL-TCD8+****1. PEMISAHAN SEL LIMFOSIT**

1. Diambil 2,5 ml sampel darah heparin + 2.5 ml NaCl fisiologis, dicampur.

Kemudian dimasukkan secara hati-hati ke dalam tabung yang sudah berisi 5 ml larutan fikol. Akan terjadi 2 lapisan, bagian atas terdiri dari lapisan darah sedangkan bagian bawah terdiri dari lapisan fikol yang bening.

2. Disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, sehingga eritrosit akan turun kebawah dan di atas lapisan eritrosit ini terlihat lapisan putih yang merupakan endapan dari sel limfosit, sedangkan di atas endapan putih ini adalah larutan fikol.
3. Ambil secara hati-hati endapan putih tersebut dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung lain yang bersih. Kemudian disentrifus selama selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm.
4. Pindahkan endapan ketabung plastik dan ditambah dengan cairan fisiologis secukupnya untuk pencucian, lalu disentrifus lagi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15-20 menit, larutan di atas endapan dibuang dan ditambah lagi dengan cairan fisiologis secukupnya, kemudian disentrifus lagi. Dilakukan sebanyak dua kali.
5. Siapkan kaca objek yang sudah diolesi dengan larutan entelan dalam keadaan kering. Teteskan endapan yang tadi keatas kaca objek tersebut satu tetes sebanyak dua buah, satu tetes untuk pemeriksaan sel-T CD4+ dan satu tetes lagi untuk pemeriksaan sel-T CD8+.
6. Biarkan selama 12-24 jam pada suhu kamar sampai seduan tersebut menjadi kering.

7. Fiksasi dalam larutan aseton selama 10 menit dalam keadaan tertutup.

II. PEWARNAAN SEL-T CD4+ DAN SEL-T CD8+

Kit reagen yang digunakan digunakan dikeluarkan oleh *Ultra Vision Detection System* dari USA.

Untuk pemeriksaan sel-T CD4+ dipakai CD4 Ab-3 (Clone RIV6) dari *Mouse monoclonal antibody*.

Untuk pemeriksaan sel-T CD8+ dipakai CD8 Ab-1 (Clone C8/144B) dari *Mouse monoclonal antibody*.

Cara kerja:

1. Sel limfosit yang telah difiksasi dengan aseton tersebut selanjutnya dicuci dalam bufer PBS selama 5 menit.
2. Sediaan diinkubasi dengan meneteskan hydrogen peroksida block selama 10 – 15 menit, sediaan diletakkan di atas tisu basah.
3. Setelah itu dicuci lagi dalam buffer PBS selama 2 kali lima menit.
4. Teteskan ultra V block dan inkubasi selama 5 menit, juga dalam suasana lembab.
5. Cuci di dalam buffer PBS selama 2 kali lima menit.
6. Teteskan *Primary antibody* dan inkubasi selama 60 menit
Primary antibody : - 50 ul CD4 + 2450 ul buffer PBS
- 50 ul CD8 + 2450 ul buffer PBS
7. Cuci dalam buffer PBS selama 2 kali lima menit
8. Teteskan *Biotinylated goat anti-mouse* dan inkubasi selama 10 menit
9. Cuci dalam buffer PBS selama 2 kali lima menit.
10. Teteskan *Streptavidin peroxidase* dan inkubasi selama 10 menit.

11. Cuci dalam buffer PBS selama 2 kali lima menit.
12. Teteskan 1 tetes *APC chromagen* ke dalam 1000 ul *APC substrat* dan campur dengan baik. Teteskan campuran tersebut di atas sediaan dan inkubasi selama 5-20 menit.
13. Kemudian dilakukan *counterstain* dengan hematoksin selama 1 – 2 menit, lalu cuci secara hati-hati air mengalir.
14. Sediaan dikeringkan, kemudian ditutup dengan kaca penutup yang telah diolesi dengan entelan.
15. Selanjutnya di hitung Di bawah mikroskop Olympus dengan pembesaran 100 kali. Terlihat sel-T CD4+ atau sel-T CD8+ bewarna kuning kecoklatan, sedangkan sel limfosit lain tidak berwarna.

III. PENGHITUNGAN JUMLAH SEL-TCD4+ DAN SEL-TCD8+

Digunakan mikroskop merek Olympus BH 2 Japan, dengan memakai lensa objektif 100 kali .

Dihitung jumlah sel-T CD4+ atau sel-T CD8+ dalam 100 sel limfosit, dalam satuan %.

Barga normal dalam darah untuk sel-T CD4+ : 35 – 45 %, sedangkan untuk sel-T CD8+ : 30 - 40 %

Lampiran 3b
Hasil penghitungan sel-TCD4+ di dalam darah penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol

No. sampel	Sel-TCD4+ (%) Penderita hepatitis C	Sel-TCD4+ (%) Kelompok kontrol
1	51	36
2	59	35
3	49	37
4	48	31
5	53	33
6	45	37
7	49	40
8	44	35
9	51	32
10	47	34
11	52	31
12	53	33
13	45	32
14	53	34
15	49	34
16	50	38
17	52	40
18	47	35
19	52	37
20	50	34
21	51	37
22	50	33
23	46	39
24	52	33
25	48	34
26	47	34
27	56	33
28	45	35
29	51	38
30	50	36
31	54	39
32	49	39
33	51	37
34	52	38
35	49	34
36	53	37
37	54	36
38	52	37
39	54	35
40	51	36

Lampiran 3c**Hasil hitung sel-TCDS+ di darah pend. hepatitis C kronik dan kelompok kontrol**

No. sampel	Sel-T CD8+ (%) Penderita hepatitis C kronik	Sel-TCDS (%) Kelompok kontrol
1	49	39
2	50	36
3	54	38
4	49	31
5	58	33
6	57	37
7	59	40
8	57	35
9	60	32
10	61	34
11	59	31
12	62	33
13	59	32
14	62	34
15	63	34
16	61	38
17	59	40
18	59	35
19	62	37
20	63	34
21	60	37
22	59	33
23	58	39
24	61	33
25	60	34
26	59	34
27	62	33
28	59	35
29	63	38
30	59	36
31	62	39
32	59	39
33	63	37
34	64	38
35	59	34
36	61	37
37	62	37
38	60	36
39	60	37
40	62	40

Lampiran 4a**PEMERIKSAAN INTERLEUKIN-1 β (IL-1 β)****Reagen:**

Keluaran *Bender MedSystem* produksi dari Austria Eropa , yaitu human IL-1 β
ELISA: BMS 224/2.

Metoda: *Double Antibodi Sandwich Elisa*

Prinsip kerja:

Antibodi anti IL-1 β dilekatkan atau yang melapisi *microwells*, kemudian IL-1 β yang terdapat dalam sampel atau standar akan berikatan dengan antibodi tersebut. Kemudian ditambahkan antibodi *Biotin-conyugat* IL-1 β dan ini akan mengikat IL-1 β yang terikat dengan antibodi yang melapisi *microwells* tadi. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan antibodi *Biotin conyugat* dibuang selama proses pencucian, kemudian ditambahkan *Streptavidin-HRP* yang akan berikatan dengan antibodi *Biotin-conyugat* IL-1 β . Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Streptavidin-HRP* dipisahkan dan dibuang selama proses pencucian, kemudian ditambahkan larutan substrat reaktif dengan HRP, sehingga terbentuk warna yang sesuai dengan kadar IL-1 β yang ada dalam sampel. Reaksi akan dihentikan dengan penambahan asam dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *Elisa reader*. Kurva standar dibuat dari 7 larutan standar IL-1 β dan konsentrasi IL-1 β sampel ditentukan.

Prosedur kerja:

1. Campur semua reagen dengan teliti tanpa berbuih sebelum dipakai.
2. Cuci *microwells* 2 kali dengan lebih kurang 300 ul buffer pencuci memakai alat pencuci.

3. Tambahkan 100 ul sampel diluent pada setiap sumur untuk *blank wells*.
4. Tambahkan 50 ul sampel diluent untuk *sample wells*
5. Tambahkan 50 ul sampel kemasing-masing sumur berikutnya
6. Tambahkan 50 ul biotin conyugat kesemua sumur termasuk *blank wells*
7. Ditutup dengan plate cover dan diinkubasi pada suhu kamar (18°C – 25°C) selama 2 jam.
8. Buka tutup sumur dan dilakukan pencucian sebanyak 3 kali.
9. Tambahkan 100 ul *Streptavidin-HRP* kesemua sumur termasuk *blank wells*
10. Ditutup lagi dan inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. setelah ini dicuci sebanyak 3 kali.
11. Tambahkan dan campur 100 ul larutan TMB substrat pad semua sumur, inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, hindari terkena cahaya langsung.
12. Hentikan reaksi enzim dengan menambahkan 100 ul *stop solution* kesemua sumur termasuk *blank well*.
13. Tentukan masing masing absorbansi dari sumu-sumur tersebut pada panjang gelombang 450 nm dengan memakai *ELISA reader*.
14. Pada keadaan normal pada laki-laki dan perempuan IL-1 β tidak terdeteksi di dalam darahnya.

Lampiran 4b

Hasil sekresi IL-1 β pada penderita hepatitis C kronik

No. sampel	Konsentrasi IL-1 β pada panjang gelombang 450 nm Penderita hepatitis C kronik (ng/ml)
1	1.9
2	2.2
3	2.7
4	2.9
5	2.3
6	3.4
7	2.6
8	2.8
9	2.1
10	2.9
11	2.4
12	2.4
13	1.7
14	3.6
15	2.9
16	2.7
17	3.7
18	2.7
19	1.8
20	2.1
21	3.9
22	4.0
23	2.3
24	2.0
25	2.2
26	2.3
27	2.9
28	2.0
29	2.8
30	2.7
31	2.9
32	2.8
33	2.6
34	2.7
35	3.0
36	3.1
37	2.8
38	2.9
39	2.8
40	3.1

Lampiran 5a**PEMERIKSAAN INTER LEUKIN 2 (IL-2)****Reagen :**

Keluaran *Bender MedSystem* produksi dari Austria Eropa, yaitu human IL-2 ELISA HMS 221.

Metoda : *Double antibody Sandwich Elisa*

Prinsip kerja :

Antibodi anti IL-2 dilekatkan atau melapisi *microwells*, IL-2 yang terdapat dalam sampel atau standar akan berikatan dengan antibodi yang melapisi *microwells* tersebut. Kemudian ditambahkan antibodi biotin-conyugat IL-2 dan akan berikatan dengan IL-2 yang ditangkap antibodi yang melapisi *microwells* tadi. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan antibodi biotin-conyugat dibuang selama proses pencucian, setelah itu ditambah dengan Streptavidin-HRP yang akan berikatan dengan antibodi biotin-conyugat IL-2. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dibuang selama proses pencucian dan ditambahkan substrat reaktif dengan HRP sehingga terbentuk warna yang sesuai dengan kadar IL-2 yang ada dalam sampel. Reaksi akan dihentikan dengan penambahan asam dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *Elisa reader*. Kurva standar dibuat dari 7 larutan standar IL-2 dan konsentrasi IL-2 sampel ditentukan.

Prosedur kerja :

1. Persiapan reagen segera sebelum dipakai dan campur tanpa berbusa.

2. Cuci microwells 2 kali dengan lebih kurang 300 ul buffer pencuci dengan alat pencuci, kelebihan larutan pencucian dibuang dan tidak dikeringkan segera digunakan dalam waktu tidak lebih dari 15 menit.
3. Tambahkan 100 ul sampel diluent kesemua sumur standar (7 buah sumur), kemudian tambahkan 100 ul larutan standar IL-2.
4. Tambahkan 100 ul sampel diluent pada *blank well*.
5. Tambahkan 100 ul sampel kesumur berikutnya
6. Tambahkan 50 ul bioti-conyugat kesemua sumur termasuk *blank well*, tutup dengan penutup dan inkubasi pada suhu kamar selama 2 jam yang diletakkan di atas rotator dengan kecepatan 200 rpm.
7. Cuci sebanyak 4 kali dengan alat pencuci.
8. Tambahkan 100 ul larutan Streptavidin kesemua sumur dan ditutup, inkubasi di atas rotator dengan kecepatan 200 rpm pada suhu kamar selama 1 jam.
9. Cuci sebanyak 4 kali, kemudian tambahkan 100 ul substrat TMB kesemua sumur, inkubasi di atas rotator dengan kecepatan 200 rpm pada suhu kamar selama 10 – 20 menit. Hindari terkena sinar matahari.
10. Hentikan reaksi kimia dengan penambahan *stop solution* sebanyak 100 ul pada kesemua sumur.
11. Segera baca hasilnya dengan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 450 nm.
12. Pada orang sehat kadar IL-2 di dalam darah tidak terdeteksi.

Lampiran 5b

Hasil sekresi IL-2 pada penderita hepatitis C kronik

No. sampel	Konsentrasi IL-2 pada panjang gelombang 450 nm Penderita hepatitis C kronik (pg/ml)
1	0.3
2	19.5
3	7.0
4	7.0
5	8.2
6	7.8
7	15.7
8	66.5
9	15.7
10	62.8
11	4.5
12	0.3
13	9.9
14	19.9
15	7.4
16	10.3
17	1.6
18	1.6
19	2.8
20	9.1
21	12.8
22	39.5
23	4.5
24	14.1
25	17.4
26	12.4
27	32.4
28	15.3
29	18.6
30	22.4
31	13.7
32	18.6
33	11.6
34	29.1
35	8.2
36	13.7
37	14.5
38	16.6
39	13.7
40	16.6

Lampiran 6a**PEMERIKSAAN INTERLEUKIN 10 (IL-10)****Reagen:**

Keluaran Bender Med System produksi dari Austria Eropa, yaitu human IL-10

ELISA: BMS 215/21

Metoda: *Double Antibodi Sandwich Elisa*

Prinsip kerja:

Antibodi anti IL-10 dilekatkan atau melapisi *microwells*, kemudian IL-10 yang terdapat dalam sampel atau standar akan berikatan dengan antibodi tersebut. Ditambahkan antibodi *biotin-conyugat IL-10* dan ini akan mengikat IL-10 yang terikat dengan antibodi yang melapisi *microwells* tadi. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan antibodi *biotin-conyugat* dibuang selama proses pencucian, kemudian ditambahkan *Streptavidin-HRP* yang akan berikatan dengan antibodi *biotin-conyugat* IL-10. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Streptavidin-HRP* dipisahkan dan dibuang selama proses pencucian. Kemudian ditambahkan larutan substrat reaktif dengan HRP kemasing-masing *wells* sehingga terbentuk warna yang sesuai dengan kadar IL-10 yang terdapat dalam sampel. Reaksi ini dihentikan dengan penambahan asam dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan *Elisa reader*. Kurva standar dibuat dari 7 larutan standar IL-10 dan konsentrasi IL-10 dari sampel ditentukan.

Prosedur kerja:

1. Campur semua reagen dengan teliti tanpa berbuih sebelum dipakai.

2. Cuci *microwells* 2 kali dengan lebih kurang 300 ul buffer pencuci dengan memakai alat pencuci dan dibuangkan sisa buffer pencuci dengan cara membalikkan *microwells* di atas kertas tisu. Tidak boleh kering dan harus dipergunakan tidak boleh lebih dari 15 menit.
3. Tambahkan 100 ul Assay Buffer kesemua standar *wells*.
4. Pipet 100 ul larutan IL-10 standar ke dalam *well* A1 dan A2 lalu dipindahkan 100 ul campuran ini ke *well* B1 dan B2. Teruskan prosedur ini sebanyak 5 kali dan dibuang 100 ul larutan campuran tersebut pada *well* terakhir.
5. Tambahkan 100 ul Assay buffer pada blank *wells*.
6. Tambahkan 50 ul Assay buffer pada sampel *wells*.
7. Tambahkan 50 ul larutan Biotin-conjugat kesemua *wells* termasuk blank *wells* dan ditutup dengan *plate cover* dan inkubasi pada suhu kamar (18°C - 25°C) di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm selama 2 jam.
8. Tambahkan 100 ul Streptavidin-HRP kesemua *wells* termasuk blank *wells*. Tutup dan inkubasi di atas rotator dengan kecepatan 200 rpm selama 1 jam.
9. Lakukan pencucian sebanyak 3 kali dan tambahkan 100 ul TMB substrat kesemua *wells* termasuk blank *wells*. Inkubasi selama 10 menit di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar. Hindari terkena sinar matahari secara langsung.
10. Hentikan reaksi enzim ini dengan menambahkan 100 ul stop solution kesemua *wells*
11. Baca absorbansi dari masing-masing *well* pada panjang gelombang 450 nm memakai *Elisa reader*. Tentukan absorbansi sampel dan standar dari IL-10.
12. Pada orang sehat kadar IL-10 di dalam darah tidak terdeteksi.

Lampiran 6 h

Hasil sekresi IL-10 pada penderita hepatitis C kronik

No. sampel	Konsentrasi IL-10 pada panjang gelombang 450 nm Penderita hepatitis C kronik (pg/ml)
1	9.1
2	11.9
3	9.8
4	9.5
5	8.7
6	8.3
7	15.0
8	8.7
9	7.8
10	10.2
11	10.2
12	12.0
13	8.5
14	8.7
15	15.2
16	6.3
17	8.3
18	8.5
19	9.1
20	10.7
21	10.7
22	7.6
23	12.6
24	11.5
25	8.3
26	9.7
27	8.5
28	7.6
29	8.9
30	8.0
31	12.0
32	7.8
33	8.7
34	8.5
35	8.5
36	9.1
37	14.1
38	14.0
39	12.9
40	12.9

Lampiran 7a**PEMERIKSAAN TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA (TNF- α)****Reagen:**

Keluaran *Bender MedSystem* produksi dari Austria Eropah, yaitu human TNF- α *ELISA* BMS 223/3CE.

Metoda: *double Antibodi Sandwich Elisa*

Prinsip kerja:

Suatu antibodi poliklonal TNF- α yang melapisi *microwells*, kemudian TNF- α yang terdapat dalam sampel atau standar akan berikatan dengan antibodi yang melapisi *microwells*. Suatu antibodi monoklonal *Biotin-conyugat TNF- α* ditambahkan akan mengikat TNF- α yang ditangkap oleh antibodi yang terikat pad *microwells* tadi. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Biotin-conyugat TNF- α* dibuang selama proses pencucian. *Streptavidin -HRP* ditambahkan dan mengikat *Biotin-conyugat TNF- α* . setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Streptavidin-HRP* dibuang selama pencucian, kemudian ditambahkan larutan substrat reaktif dengan HRP pada semua *microwells* sehingga terbentuk warna dalm perbandingan yang sesuai dengan kadar TNF- α dalam sampel. Reaksi dihentikan dengan penambahan asam dan absorbansi diukur pad panjang gelombang 450 nm dengan *Elisa reader*. Kurva standar dibuat dari tujuh larutan standar TNF- α dan konsentrasi TNF- α sampel ditentukan.

Prosedur kerja:

1. Campur semua reagen dengan teliti tanpa berbuih sebelum dipakai.

2. Tentukan jumlah *microwells* yang akan digunakan termasuk *blank wells* dan *standard wells*.
3. Cuci *microwells* tersebut dengan lebih kurang 300 ul larutan bufer pencuci sebanyak 2 kali, lalu buang sisa pencucian tersebut dengan cara membalikkan *microwells* tersebut di atas kertas tisu dan segera digunakan untuk pemeriksaan.
4. Tambahkan 100 ul sampel *diluent* kesemua *standard wells*, Pipet 100 ul TNF- α larutan standar ke *well* A1 dan A2, campurkan kemudian dipipet lagi sebanyak 100 ul kemudian di transfer ke *well* B1 dan B2. lanjutkan prosedur ini sebanyak 5 kali dan pada *well* terakhir dibuang 100 ul larutan campuran (*well* G1 dan G2)
5. Tambahkan 100 ul sampel *diluent* pada *blank well*.
6. Tambahkan 50 ul sampel *diluent* pada *sample wells*
7. Tambahkan 50 ul (masing-masing sampel) ke *sample wells*.
8. Tambahkan 50 ul *Biotin-conyugat* kesemua *wells* termasuk *blank wells*, tutup dengan *plate cover* dan inkubasi pada suhu kamar selama 2 jam di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm. Lakukan pencucian sebanyak 4 kali .
9. Tambahkan 100 ul larutan *Streptavidin-HRP* kesemua *wells*, tutup dan inkubasi selama 1 jam di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian dilakukan pencucian sebanyak 4 kali.
10. Tambahkan 100 ul larutan TMB substrat kesemua *wells*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 10 – 20- menit di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm.
11. Hentikan reaksi enzim dengan penambahan 100 ul stop solution kesemua *wells*.
12. Hasil absorbansi dari sampel dan standar dari TNF- α segera dibaca dengan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 450 nm.
13. Pada orang sehat kadar dari TNF- α di dalam darah tidak terdeteksi.

Lampiran 7b

Hasil sekresi TNF- α pada penderit hepatitis C kronik

No. sample	Konsentrasi TNF- α pada panjang gelombang 450 nm Penderita hepatitis C kronik (pg/ml)
1	16.2
2	19.4
3	28.1
4	24.0
5	20.8
6	21.9
7	21.2
8	17.1
9	18.3
10	23.3
11	21.2
12	20.4
13	12.9
14	22.9
15	20.6
16	16.3
17	25.0
18	23.3
19	18.8
20	20.0
21	27.1
22	18.5
23	25.4
24	17.5
25	21.7
26	23.6
27	28.1
28	21.5
29	19.0
30	21.3
31	25.0
32	30.9
33	24.8
34	20.6
35	23.6
36	20.6
37	23.6
38	27.8
39	24.5
40	24.5

Lampiran 8a**PEMERIKSAAN INTERFERON GAMA (IFN- γ)**

Reagen: Reagen yang digunakan dari *Bender MedSystem* produksi Austria Erupah, yaitu human IFN- γ BMS 228.

Metoda: *Double Antibodi Sandwich Elisa.*

Prinsip Kerja:

Suatu antibodi monoklonal anti- IFN- γ yang melapisi *microwells*, IFN- γ yang terdapat dalam sampel atau standar akan mengikat antibodi yang melapisi *microwells* tersebut. Suatu antibodi monoklonal *Biotin-conyugat anti- IFN- γ* ditambahkan dan akan berikatan dengan IFN- γ yang telah berikatan dengan antibodi dari *microwells*. Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Biotin-conyugat* dipisahkan dan dibuang selama pencucian. *Streptavidin-HRP* ditambahkan dan akan berikatan dengan *Biotin-conyugat anti-IFN- γ* . Setelah inkubasi bagian yang tidak terikat dengan *Streptavidin-HRP* dipisahkan dan dibuang selama proses pencucian, kemudian ditambahkan larutan substrat reaktif dengan HRP. Terjadi warna yang sesuai dengan kadar IFN- γ yang ada dalam sampel, reaksi enzim dihentikan dengan penambahan asam dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan memakai *Elisa reader*. Kurva standar dibuat dari tujuh larutan standar IFN- γ dan konsentrasi IFN- γ dari sampel ditentukan.

Prosedur kerja:

1. Campur semua reagen dengan teliti tanpa berbuih sebelum dipakai.
2. Tentukan jumlah *microwells* yang akan dipergunakan, untuk standar dan *blank*.
3. Cuci *microwells* tersebut sebanyak dua kali dengan lebih kurang 300 ul bufer pencuci, setelah itu dibuang cairan pencuci dan diletakkan terbalik di atas kertas

- tisu dan tidak dibiarkan kering. Harus digunakan dalam waktu tidak lebih dari 15 menit.
4. Tambahkan 100 ul *sample diluent* kesemua standar *microwells*, tambahkan 100 ul larutan standar IFN- γ ke *microwell* A1 dan A2, lalu transfer 100 ul ke *microwell* B1 dan B2. Ujukkan prosedur ini sebanyak 5 kali sampai *microwell* G1 dan G2, pada *microwell* terakhir dibuang 100 ul.
 5. Tambahkan 100 ul *sample diluent* pada *blank microwell*.
 6. Tambahkan 50 ul *sample diluent* pada *sample microwell*.
 7. Tambahkan 50 ul masing-masing sampel yang akan diperiksa ke *microwell* berikutnya.
 8. Tambahkan *Biotin-conyugat* sebanyak 50 ul kesemua *microwells*, tutup dengan *plate cover* dan inkubasi pada suhu kamar di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm selama 2 jam. Setelah itu dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan alat pencucian.
 9. Tambahkan 100 ul *Streptavidin-HRP* pada kesemua *microwells* kemudian ditutup dan inkubasi pada suhu kamar di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm selama 1 jam. Setelah ini dilakukan pencucian sebanyak 3 kali.
 10. Tambahka 100 ul larutan TMB substrat ke semua *microwells*, inkubasi pad suhu kamar di atas rotator dengan kecepatan 100 rpm selama 5 – 20 menit. Hindari terkena sinar matahari secara langsung.
 11. Hentikan reaksi enzim dengan menambahkan 100 ul larutan *stop solution* kesemua *microwells*. Hasil segera dibaca dengan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 450 nm, tentukan absorbansi sampel dan standar dari IFN- γ .
 12. Pada orang sehat kadar IFN- γ di dalam darah kurang dari 1,5 pg/ml.

Lampiran 8b

Hasil sekresi IFN- γ pada penderita hepatitis C kronik dan kelompok kontrol

No. sampel	Konsentrasi IFN- γ pada λ 450 nm Penderita hepatitis C kronik (pg/ml)	Konsentrasi IFN- γ pada λ 450 nm Kelompok kontrol (pg/ml)
1	4.0	0.9
2	3.3	0.7
3	3.7	1.0
4	4.0	1.1
5	3.7	0.8
6	3.3	1.2
7	3.3	0.6
8	5.4	0.9
9	6.6	1.2
10	3.7	0.9
11	4.4	0.8
12	3.3	0.9
13	3.0	0.7
14	2.0	0.6
15	4.7	1.0
16	4.9	0.8
17	9.5	0.9
18	4.0	0.6
19	4.4	0.8
20	2.8	0.7
21	3.2	0.7
22	4.9	1.3
23	3.4	1.0
24	3.9	0.8
25	5.0	0.6
26	6.4	0.5
27	4.1	0.9
28	3.2	0.8
29	4.6	0.8
30	3.2	0.7
31	3.3	0.7
32	4.4	0.8
33	7.4	0.8
34	6.8	0.9
35	6.9	0.5
36	4.8	1.3
37	4.8	0.9
38	4.5	0.7
39	4.2	1.0
40	5.8	0.9

Tabel Induk penderita hepatitis-C kronik.

No	umur	seks	ALT mg/l	AST mg/l	CD4+ %	CD8+ %	IL-1β pg/ml	IL-2 pg/ml	IL-10 pg/ml	TNF-α pg/ml	IFN-γ pg/ml
1	20	P	47	58	51	49	1.9	0.3	9.1	16.2	4.3
2	29	L	21	21	59	50	2.2	19.5	11.9	19.4	3.3
3	19	L	29	37	49	54	2.7	7.0	9.8	28.1	3.7
4	32	L	58	64	48	49	2.9	7.0	9.5	24.0	4.0
5	22	L	45	50	53	58	2.3	8.2	8.7	20.8	3.7
6	20	L	17	14	45	57	3.4	7.8	8.3	21.9	3.3
7	21	L	17	18	49	59	2.6	15.7	15.0	21.2	3.3
8	22	L	20	32	44	57	2.8	66.5	8.7	17.1	5.4
9	20	L	13	17	51	60	2.1	15.7	7.8	18.3	6.6
10	23	L	24	19	47	61	2.9	62.8	10.2	23.3	3.7
11	36	L	17	18	52	59	2.4	4.5	10.2	21.2	4.4
12	21	L	58	73	53	62	2.4	0.3	12.0	20.4	3.3
13	40	L	73	67	45	59	1.7	9.9	8.5	12.9	3.0
14	21	P	38	38	53	62	3.6	19.9	8.7	22.9	2.0
15	22	L	33	26	49	63	2.9	7.4	15.2	20.6	4.7
16	37	L	22	15	50	61	2.7	10.3	6.3	16.3	4.9
17	28	L	31	53	52	59	3.7	1.6	8.3	25.0	9.5
18	19	L	26	19	47	59	2.7	1.6	8.5	23.3	4.0
19	18	L	19	15	52	62	1.8	2.8	9.1	18.8	4.4
20	24	L	81	42	50	63	2.1	9.1	10.7	20.0	2.8
21	34	L	48	47	51	60	3.9	12.8	10.7	27.1	3.2
22	40	L	89	92	50	59	4.0	39.5	7.6	18.5	4.9
23	29	L	34	68	46	58	2.3	4.5	12.6	25.4	3.4
24	31	L	13	17	52	61	2.0	14.1	11.5	17.5	3.9
25	29	L	21	26	48	60	2.2	17.4	8.3	21.7	5.0
26	30	L	19	19	47	59	2.3	12.4	9.7	23.6	6.4
27	27	L	20	32	56	62	2.9	32.4	8.5	28.1	4.1
28	23	L	76	70	45	59	2.0	15.3	7.6	21.0	3.2
29	23	P	45	44	51	63	2.8	18.6	8.9	19.0	4.6
30	28	L	43	46	50	59	2.7	22.4	8.0	21.3	3.2
31	39	L	64	53	54	62	2.9	13.7	12.0	25.0	3.3
32	21	L	26	20	49	59	2.8	18.6	7.8	30.9	4.4
33	27	L	36	23	51	63	2.6	11.6	8.7	24.8	7.4
34	19	L	14	13	52	64	2.6	29.1	8.5	20.6	6.8
35	25	L	82	50	49	59	2.7	8.2	8.5	23.6	6.9
36	31	L	98	54	53	61	3.1	13.7	9.1	20.6	4.8
37	22	L	68	57	54	62	2.8	14.5	14.1	23.3	4.8
38	28	L	37	35	52	60	2.9	16.6	14.0	27.8	4.5
39	25	L	22	25	54	60	2.8	13.7	12.9	24.5	4.2
40	23	L	19	23	51	62	3.1	16.6	12.9	24.5	5.8

Tabel Induk Kelompok Kontrol Sehat

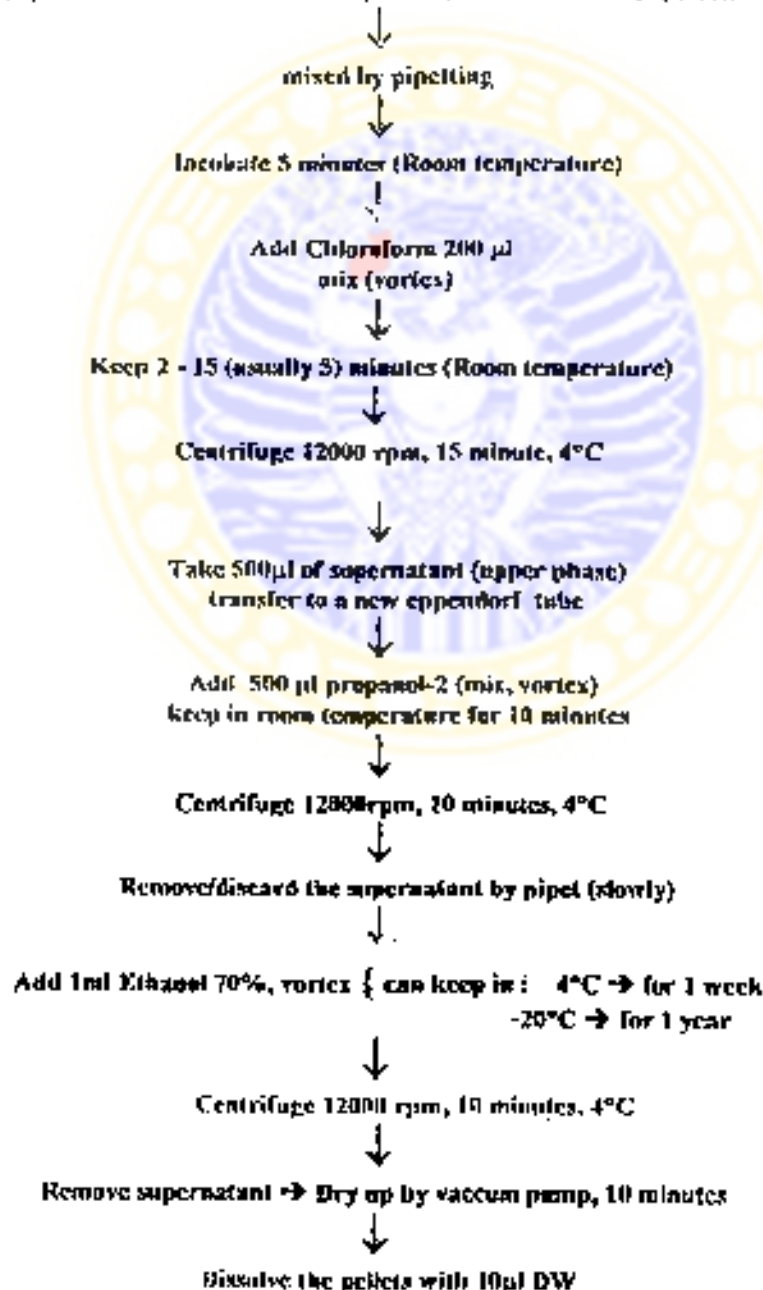
No	Umur	Seks	GOT U/L	GPT U/L	CD4+ %	CD8+ %	IFN- γ pg/ml
1	29	P	15	13	36	39	0.9
2	31	L	17	14	35	36	0.7
3	30	P	11	9	37	38	1.0
4	28	L	15	12	36	31	1.1
5	29	L	9	11	38	33	0.8
6	30	L	12	15	39	37	1.2
7	32	L	17	20	35	40	0.6
8	31	L	20	18	33	35	0.9
9	28	P	19	16	41	32	1.2
10	30	P	14	17	37	34	0.9
11	27	L	11	12	35	31	0.8
12	28	L	15	13	37	33	0.9
13	26	L	10	12	35	32	0.7
14	30	L	16	14	37	34	0.6
15	31	P	11	13	35	34	1.0
16	29	P	17	15	36	38	0.8
17	28	L	11	15	38	40	0.9
18	31	L	20	18	37	35	0.6
19	33	P	18	15	35	37	0.8
20	28	L	10	12	36	34	0.7
21	29	L	15	13	38	37	0.7
22	28	L	17	19	35	33	1.3
23	25	L	16	18	37	39	1.0
24	30	L	14	13	35	33	0.8
25	27	P	12	15	36	34	0.6
26	29	L	18	20	36	34	0.5
27	27	L	17	15	37	33	0.9
28	26	L	15	12	37	35	0.8
29	31	P	15	18	36	38	0.8
30	28	P	11	13	38	36	0.7
31	25	L	18	16	39	39	0.7
32	27	L	10	13	39	39	0.8
33	30	L	9	12	37	37	0.8
34	28	L	15	13	38	38	0.9
35	26	L	16	20	34	34	0.5
36	28	L	15	18	37	37	1.3
37	29	P	11	14	36	37	0.9
38	27	L	17	15	37	36	0.7
39	31	L	14	10	35	37	1.0
40	28	L	15	20	36	40	0.9

Lampiran II

**PROTOCOL FOR RT-PCR TO DETECT
OF HCV IN PLASMA**

1. RNA EXTRACTION Using Trizol Solution

Negative control	Positive control	Sample sera
18µl DW	10µl Φ Control	60µl Serum
240µl DW	240µl DW	190µl DW
+	+	+
750µl Trizol	750µl Trizol	750µl Trizol

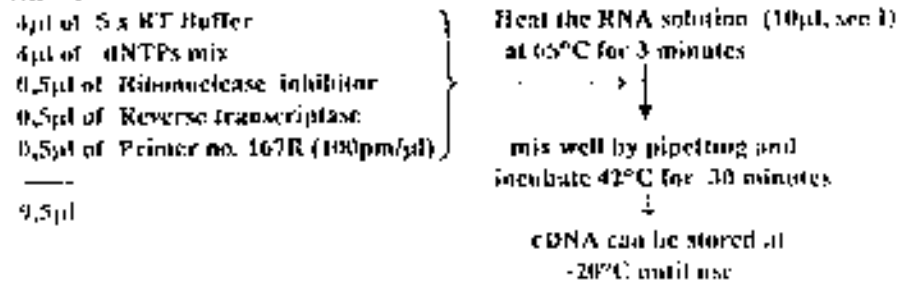


PROTOCOL FOR RT-PCR TO DETECT OF HCV IN SERA (NS5B REGION)

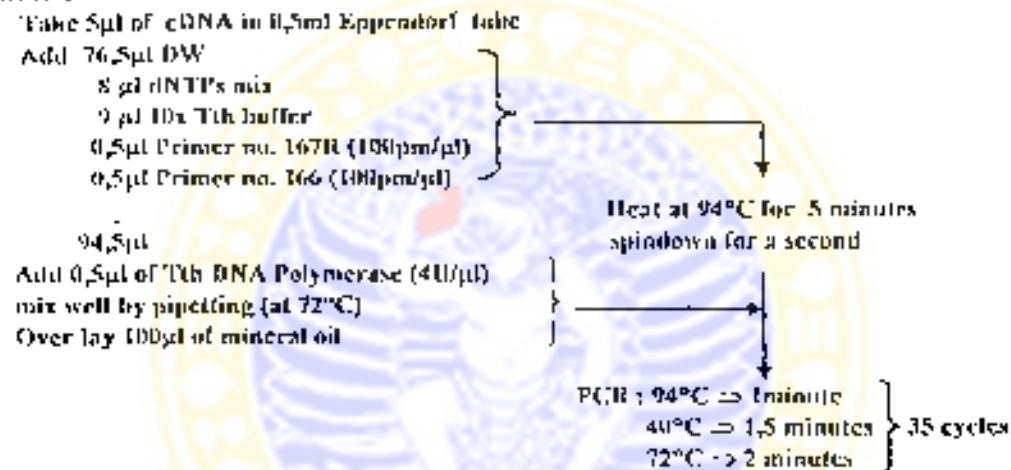
I. RNA EXTRACTION :

Using Trizol solution

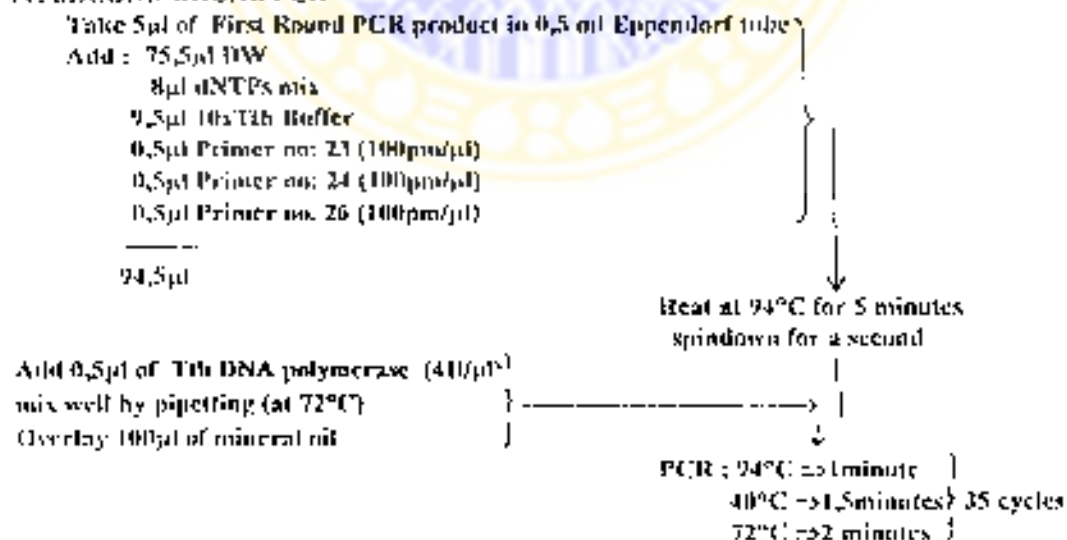
II. REVERSE TRANSCRIPTION TO PRODUCE cDNA



III. FIRST ROUND PCR :



IV. SECOND ROUND PCR



PROTOCOL FOR RT-PCR TO DETECT OF HCV IN SERA (5'UTR REGION → KOBE)

I. RNA EXTRACTION

Using Trizol solution

II. REVERSE TRANSCRIPTION TO PRODUCE cDNA

4 μ l of 5 x RT Buffer 4 μ l of dNTPs mix 0,5 μ l of Ribonuclease inhibitor 0,5 μ l of Reverse transcriptase 0,5 μ l of Primer UTR 2 (50 pmol/ μ l) <hr style="width: 50%; margin-left: 0;"/> 9,5 μ l	}	Heat the RNA solution (10 μ l, see I) at 65°C for 3 minutes ↓ mix well by pipetting and incubate 37°C for 60 minutes ↓ cDNA can be stored at -20°C until use
--	---	---

III. FIRST ROUND PCR :

Take 10 μ l of cDNA in 0,5 ml Eppendorf tube Add 76,5 μ l DW 8 μ l dNTPs mix 9 μ l 10x Tth buffer 0,5 μ l Primer UTR 1 (50 pmol/ μ l) 0,5 μ l Primer UTR 2 (50 pmol/ μ l) <hr style="width: 50%; margin-left: 0;"/> 94,5 μ l Add 0,5 μ l of Tth DNA Polymerase (4U/ μ l) mix well by pipetting (at 72°C) Overlay 100 μ l of mineral oil	}	Heat at 94°C for 5 minutes spindown for a second ↓ PCR : 94°C \Rightarrow 1 minute 50°C \Rightarrow 1,5 minutes 72°C \Rightarrow 2 minutes } 35 cycles
--	---	--

IV. SECOND ROUND PCR

Take 5 μ l of First Round PCR product in 0,5 ml Eppendorf tube Add : 76 μ l DW 8 μ l dNTPs mix 9,5 μ l 10x Tth Buffer 0,5 μ l Primer UTR 3 (50 pmol/ μ l) 0,5 μ l Primer UTR 4 (50 pmol/ μ l) <hr style="width: 50%; margin-left: 0;"/> 94,5 μ l Add 0,5 μ l of Tth DNA polymerase (4U/ μ l) mix well by pipetting (at 72°C) Overlay 100 μ l of mineral oil	}	Heat at 94°C for 5 minutes spindown for a second ↓ PCR : 94°C \Rightarrow 1 minute 50°C \Rightarrow 1,5 minutes 72°C \Rightarrow 2 minutes } 35 cycles
--	---	--

Agarose Gel Electrophoresis :

Prepare 2% agarose minigel in 0,5xTBE
Containing Ethidium Bromide (final concentration 1µg/ml)

For Gel : 8 wells : 20cc 0,5xTBE ⇔ 0,4g agarose ⇔ ethidium bromide 2µl
17 wells : 40cc 0,5xTBE ⇔ 0,8g agarose ⇔ ethidium bromide 4µl



Take 10µl of the 2nd PCR product in a tube

↓
| ←——— add 1,5µl of DPD-glycerol solution
| mix and spin down
↓

Take 10µl and apply to an agarose gel for (marker : 2µl)
EAP in the buffer system of 0,5xTBE



Take a photograph



Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Umur Penderita	40	18	40	26.20	6.227
Anti VHC penderita	40	238	3.000	1.41675	1.017192
OT penderita	40	13	99	37.77	23.275
PT penderita	40	13	92	36.75	20.467
CD4 penderita	40	44	59	50.35	3.175
CD8 penderita	40	49	64	58.37	3.521
IL1 beta penderita	40	1.7	4.0	2.690	.5420
IL2 penderita	40	.3	66.5	15.590	14.1102
IL10 penderita	40	6.3	15.2	9.960	2.2239
TNF alfa penderita	40	12.9	30.9	22.033	3.7216
IFN gama penderita	40	2.0	9.5	4.470	1.4569
Umur kontrol	40	25	33	29.70	1.897
OT kontrol	40	9	20	14.45	3.088
PT kontrol	40	9	20	14.78	2.913
CD4 kontrol	40	33	41	36.33	1.403
CD8 kontrol	40	31	40	35.73	2.592
IFN kontrol	40	.5	1.3	.842	.1960
Valid N (listwise)	40				

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Umur Penderita	.171	40	.005	.910	40	.004
OT penderita	.171	40	.005	.850	40	.000
PT penderita	.200	40	.000	.896	40	.001
CD4 penderita	.106	40	.200(*)	.973	40	.456
CD8 penderita	.258	40	.000	.803	40	.000
IFN gama penderita	.160	40	.012	.894	40	.001
Umur kontrol	.144	40	.036	.968	40	.305
OT kontrol	.171	40	.005	.942	40	.040
PT kontrol	.154	40	.018	.943	40	.042
CD4 kontrol	.167	40	.007	.904	40	.003
CD8 kontrol	.147	40	.029	.951	40	.084

IFN kontrol	.160	40	.012	.945	40	.052
* This is a lower bound of the true significance.						
a Lilliefors Significance Correction						

T-Test

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Umur	penderita	40	26.20	6.227	.985
	Kontrol	40	28.70	1.897	.300
OT	penderita	40	37.78	23.275	3.680
	Kontrol	40	14.45	3.088	.488
PT	penderita	40	38.75	20.487	3.238
	Kontrol	40	14.78	2.913	.461
CD4	penderita	40	50.35	3.175	.502
	Kontrol	40	36.33	1.403	.222
CD8	penderita	40	59.38	3.521	.557
	Kontrol	40	35.73	2.582	.410
IFN gama	penderita	40	4.470	1.4668	.2319
	Kontrol	40	.842	.1960	.0310

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Umur Penderita	Equal variances assumed	41.930	.000	-2.429	78	.017	-2.500	1.029	-4.549	-.451
	Equal variances not assumed			-2.429	46.179	.019	-2.500	1.029	-4.572	-.428
OT penderita	Equal variances assumed	46.592	.000	6.283	78	.000	23.325	3.712	15.934	30.718

	Equal variances not assumed			6.283	40.373	.000	23.325	3.712	15.824	30.826
PT penderita	Equal variances assumed	81.751	.000	6.723	78	.000	21.975	3.269	15.467	28.483
	Equal variances not assumed			6.723	40.580	.000	21.975	3.269	15.371	28.579
CD4 penderita	Equal variances assumed	17.467	.000	25.555	78	.000	14.025	.549	12.932	15.118
	Equal variances not assumed			25.555	53.674	.000	14.025	.549	12.925	15.125
CD8 penderita	Equal variances assumed	.067	.797	34.215	78	.000	23.650	.691	22.274	25.026
	Equal variances not assumed			34.215	71.676	.000	23.650	.691	22.272	25.026
IFN gamma penderita	Equal variances assumed	34.588	.000	15.502	78	.000	3.6275	.2340	3.1616	4.0934
	Equal variances not assumed			15.502	40.382	.000	3.6275	.2340	3.1547	4.1003

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Umur	penderita	40	33.21	1328.50
	kontrol	40	47.79	1911.50
	Total	80		
OT	penderita	40	57.80	2304.00
	kontrol	40	23.40	936.00

	Total	80		
PT	penderita	40	57.18	2287.00
	kontrol	40	23.83	953.00
	Total	80		
CD4	penderita	40	60.50	2420.00
	kontrol	40	20.50	820.00
	Total	80		
CD8	penderita	40	60.50	2420.00
	kontrol	40	20.50	820.00
	Total	80		
IFN gama	penderita	40	60.50	2420.00
	kontrol	40	20.50	820.00
	Total	80		

Test Statistics^a

	Umur Penderita	OT penderita	PT penderita	CD4 penderita	CD8 penderita	IFN gama penderita
Mann-Whitney U	508.500	118.000	133.000	.000	.000	.000
Wilcoxon W	1328.500	938.000	953.000	820.000	820.000	820.000
Z	-2.817	-6.594	-6.433	-7.734	-7.720	-7.714
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005	.000	.000	.000	.000	.000

^a Grouping Variable: Kelompok

Correlations

		OT	CD4	CD8
OT	Pearson Correlation	1	-.033	.100
	Sig. (2-tailed)	.	.839	.539
	N	40	40	40
CD4	Pearson Correlation	-.033	1	.103
	Sig. (2-tailed)	.839	.	.528
	N	40	40	40
CD8	Pearson Correlation	.100	.103	1
	Sig. (2-tailed)	.539	.528	.
	N	40	40	40

Correlations

Correlations

		PT	CD4	CD8
PT	Pearson Correlation	1	-.069	.213
	Sig. (2-tailed)	.	.671	.188
	N	40	40	40
CD4	Pearson Correlation	-.069	1	.103
	Sig. (2-tailed)	.671	.	.528
	N	40	40	40
CD8	Pearson Correlation	-.213	.103	1
	Sig. (2-tailed)	.188	.528	.
	N	40	40	40