

TESIS

**GENOTIPE DAN SUBTIPE VIRUS HEPATITIS B
PADA PENDONOR DARAH
DENGAN HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) POSITIF
DI JAYAPURA, PROVINSI PAPUA, INDONESIA**

TKD 19/06

1/10/09

9



VICTOR EKA NUGRAHAPUTRA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**GENOTIPE DAN SUBTIPE VIRUS HEPATITIS B
PADA PENDONOR DARAH
DENGAN *HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN* (HBsAg) POSITIF
DI JAYAPURA, PROVINSI PAPUA, INDONESIA**

TESIS

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

Oleh :

**VICTOR EKA NUGRAHAPUTRA
NIM 090315197M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 16 Desember 2005**

Lembar pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 16 DESEMBER 2005**

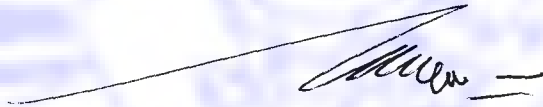
Oleh :

Pembimbing Ketua



**Maria Lucia Inge Lusida, dr, MKes, SpMK, PhD
NIP 131 569 394**

Pembimbing



**Dr Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK
NIP 131 406 054**

Mengetahui :

**Ketua Program Studi
Program Magister Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD
NIP 130 541 984**

Telah diuji pada

Tanggal 16 Desember 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof Soetjipto, dr, MS, PhD

Anggota : 1. Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD

2. Maria Lucia Inge Lusida, dr, MKes, SpMK, PhD

3. Dr Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK

4. Marijam Purwanta, Dra Apt, MSc

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas terselesaikannya tesis ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Maria Lucia Inge Lusida, dr, MKes, SpMK, PhD, Pembimbing Ketua dan anggota Panitia Penguji Tesis, yang dengan penuh ketekunan dan kesabaran membimbing dan mengarahkan saya dalam mendalami bidang biologi molekuler dan dalam menyelesaikan tesis ini, juga atas dorongan dan motivasi yang diberikan kepada saya di tengah keberhasilan dan hambatan.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr Ni Made Mertaniasih, dr, MS, SpMK, Pembimbing dan anggota Panitia Penguji Tesis, atas bimbingan dan asupan yang berharga demi kesempurnaan penulisan tesis ini, juga atas semangat yang diberikan kepada saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-setingginya saya sampaikan kepada :

♣ J.P. Solossa¹, Gubernur Provinsi Papua; B. Kambuaya, Drs, MBA, Rektor Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua; dan F.A. Wospakrik, Ir, MSc, mantan Rektor Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, atas kesempatan dan dukungan finansial yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Magister ini.

¹ Bapak J.P. Solossa meninggal dunia tiga hari setelah diujikannya tesis ini, yaitu pada tanggal 19 Desember 2005 di Jayapura. Kiranya pengabdian beliau membawa kemajuan bagi pembangunan masyarakat Papua.

- ♣ Paulina Watofa, dr, SpR, selaku Ketua Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Magister ini dan untuk turut merintis pengembangan Laboratorium Mikrobiologi Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua; serta selaku Direktur Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Provinsi Papua, atas diijinkannya saya melakukan pengambilan spesimen darah di Unit Transfusi Darah (UTD) Palang Merah Indonesia (PMI) Cabang Jayapura, Provinsi Papua.
- ♣ Dominggus Mandacan, Drs, Bupati Manokwari, Provinsi Irian Jaya Barat; Henri Sembiring, drg, Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Manokwari, Provinsi Irian Jaya Barat; dan Bernard Kambuaya, AMP, mantan Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Manokwari, Provinsi Irian Jaya Barat, atas diijinkannya saya untuk turut mengembangkan Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, dengan menempuh pendidikan Program Magister ini, meskipun saya masih berstatus sebagai Pegawai Negeri Sipil Daerah Kabupaten Manokwari, Provinsi Irian Jaya Barat.
- ♣ Decky Kawab, SH, *caretaker* Bupati Teluk Bintuni, Provinsi Irian Jaya Barat; Alfons Manibuy, drg, *caretaker* Wakil Bupati Teluk Bintuni, Provinsi Irian Jaya Barat; rekan-rekan sekerja di Dinas Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial Kabupaten Teluk Bintuni, Provinsi Irian Jaya Barat; para kepala suku dalam Lembaga Musyawarah Adat Masyarakat Teiuk Bintuni; dan seluruh masyarakat Kabupaten Teluk Bintuni, Provinsi Irian

Jaya Barat, yang telah memahami visi saya untuk mengembangkan dunia pendidikan kedokteran di Papua. Mengemban amanah sebagai Kepala Dinas Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial Kabupaten Teluk Bintuni, Provinsi Irian Jaya Barat, adalah suatu kepercayaan besar yang diberikan kepada saya yang sama penting dan mulianya dengan misi saya di dunia pendidikan kedokteran di Papua. Kiranya Kabupaten Teluk Bintuni semakin maju dengan segala potensi yang dianugerahkan Tuhan bagi daerah ini.

- ♣ Reginald H. Hutabarat, dr, MKes, Kepala UTD PMI Cabang Jayapura, Provinsi Papua, atas diijinkannya saya melakukan pengambilan spesimen darah dari para pendonor darah untuk penelitian ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-setingginya juga saya sampaikan kepada :

- ♣ Prof Dr Med H. Puruhito, dr, SpBTKV, Rektor Universitas Airlangga Surabaya; Prof Dr Muhammad Amin, dr, SpP, Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya; Prof Dr Laba Mahaputra, drh, MSc, Asisten Direktur Bidang Akademik Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya; dan Dr Sunarjo, dr, MS, MSc, Asisten Direktur Bidang Administrasi Umum Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Magister ini.
- ♣ Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD, Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya dan anggota Panitia Penguji Tesis; Prof Soetjipto, dr, MS, PhD, mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Magister

pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya dan Ketua Panitia Penguji Tesis; serta Dr Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK, Ketua Minat Studi Mikrobiologi, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya, atas bimbingan dan perhatian yang diberikan kepada saya selama saya menempuh pendidikan Program Magister dan selama penyelesaian tesis.

- ♣ Prof Dr Yoes Prijatna Dachlan, dr, MSc, Ketua *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan yang luas yang diberikan kepada saya untuk memanfaatkan fasilitas yang ada untuk melakukan ekstraksi, amplifikasi dan sekuensing DNA.
- ♣ Prof Dr H.M.S. Wiyadi, dr, SpTHT (K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; dan Eddy Mudihardi, dr, MS, SpMK, Kepala Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menempuh pendidikan Program Magister ini.
- ♣ Prof Soetjipto, dr, MS, PhD, selaku Ketua Kelompok Studi Hepatitis TDC Universitas Airlangga Surabaya, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti beberapa kegiatannya; dan selaku Ketua *Basic Research* TDC Universitas Airlangga Surabaya, atas kemurahan hatinya dengan memberikan keringanan biaya pemeriksaan sampel penelitian.
- ♣ Prof Purnomo Suryohudoyo, dr, guru besar Biokimia pada Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, atas kuliahnya tentang biologi molekuler yang menjadi dasar keilmuan yang diaplikasikan dalam penelitian ini.

- ♣ Prof Hak Hotta, MD, PhD, dari *Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Kobe University*, Jepang, atas kesempatan tatap muka dan diskusi yang membuka wawasan ilmiah saya dan menjadi dorongan tersendiri bagi saya untuk semakin menekuni penelitian biologi molekuler terkait dengan virus hepatitis B ini.
- ♣ Prof Hartmut Kühn, MD, DSci, dari *Institute of Biochemistry, University Clinics Charité, Humboldt University*, Berlin, Jerman, atas kuliahnya tentang *molecular medicine* yang menarik saya untuk menekuni bidang biologi molekuler ini.
- ♣ Marijam Purwanta, Dra Apt, MSc, staf pengajar pada Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan anggota Panitia Penguji Tesis, atas kuliahnya tentang *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, *polymerase chain reaction (PCR)* dan elektroforesis yang sangat bermanfaat untuk penelitian ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada :

- ♣ Bernardus Sandjaja, dr, peneliti pada Laboratorium Kesehatan Masyarakat Jayapura, Provinsi Papua, atas beberapa tulisannya yang menjadi bagian daftar pustaka penelitian ini.
- ♣ Deddi Ekaputra Rangan, dr, mantan staf pengajar pada Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, yang sekarang menjabat sebagai Direktur Rumah Sakit "Dharma Ibu" Ternate, Provinsi Maluku Utara, yang kehadirannya pada waktu yang tepat telah memberikan keberanian kepada saya untuk melakukan suatu penelitian dengan menggunakan sampel dari Jayapura.

- ♣ Yusak Alfrets Porotuo, dr, staf pengajar Farmakologi pada Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, atas bantuannya dalam memantau tahapan pengambilan, penyimpanan dan pengiriman spesimen serum untuk penelitian ini.
- ♣ Dr Kuntaman, dr, MS, SpMK; Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK; Bambang Susilo, dr, MKes, SpMK; Rebekah J. Setiabudi, dr, Msi; dan Juniastuti, dr, MKes, staf pengajar pada Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya; serta Rahardjo, dr, staf pengajar pada Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, yang telah mendukung kelancaran penelitian ini dengan menjadi penghubung Surabaya-Jayapura dalam berbagai kesempatan mengajar di Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua.
- ♣ Ibu Koen Poedjiati dan Sdr. Mochamad Amin, SSi, para teknisi pada Laboratorium Hepatitis TDC Universitas Airlangga Surabaya, yang telah membagikan ilmu dan keterampilannya selama saya melakukan ekstraksi, amplifikasi dan sekuensing DNA.
- ♣ Agnes Supraptiwi Rahayu, dr, MKes, staf pengajar Ilmu Faal pada Program Pendidikan Dokter Universitas Cenderawasih Jayapura, Provinsi Papua, yang dengan kerelaannya telah membantu dalam berbagai kesempatan.
- ♣ Panitia Seminar Nasional ke-XVII Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI) di Pekanbaru, Riau, yang telah memungkinkan hasil penelitian ini dipresentasikan dan dimasukkan sebagai prosiding seminar.

- ♣ Rosmelati Situmeang, drh, MKes, staf pada Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya, atas diijinkannya saya menggunakan *Thermal Cyclor GeneAmp PCR System 9700* (Perkin Elmer) milik Pusvetma untuk *labeling*.
- ♣ Sdr. Kusnanto, Sdri. Erla Ismurtini, Sdri. Fitrie Iriani, Sdri. Nurul Asmawati, Sdri. Sudarni, Sdr. Herman Wandy, Sdr. Herman Suddin dan Sdr. Ibnu Sarkoro, para teknisi dan staf pada UTD PMI Cabang Jayapura, Provinsi Papua, yang di tengah tugas rutusnya yang padat masih dapat meluangkan waktu untuk melakukan pengambilan dan penyimpanan spesimen darah.
- ♣ Bapak Bertus L., Sdri. Yuli dan Sdri. Budi, pimpinan dan para teknisi pada Laboratorium Klinik Utama "Pacar" Surabaya, yang telah membantu dalam pemeriksaan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) dengan metode ELISA.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga juga saya sampaikan kepada keempat puluh tiga pendonor darah di UTD PMI Cabang Jayapura, Provinsi Papua - yang namanya tidak dimungkinkan untuk dituliskan pada halaman ini terkait pertimbangan etis - yang bersedia mengikuti penelitian ini dengan menyediakan spesimen darahnya untuk dipakai dalam penelitian.

Ucapan terima kasih saya haturkan kepada ayahanda Pitojo Akimas - yang tidak sempat melihat putranya menyelesaikan pendidikan Program Magister ini - dan ibunda Retnojati, atas bimbingan, didikan dan doanya selama ini. Terima kasih untuk istriku Situt Retnowati, SSos, yang telah mendampingi dalam suka dan duka. Pendidikan Program Magister ini kiranya memacu semangat belajar kedua anakku, Andreas Kevin Christovian dan Shevira Feby Christavia.

Yang terakhir tetapi yang terutama, ucapan syukur aku panjatkan kepada Yesus Kristus, Tuhan dan Juru Selamatku, yang telah mengutusku ke Bumi Cenderawasih untuk menjalankan mandat kultural yang telah ditetapkan bagiku sejak dalam kekekalan. Kiranya hasil penelitian untuk tesis ini menjadi ibadah yang sejati dan persembahan yang harum bagi kemuliaan nama-Nya dan membawa kesejahteraan bagi umat manusia, khususnya bagi masyarakat Papua.

RINGKASAN

**GENOTIPE DAN SUBTIPE VIRUS HEPATITIS B
PADA PENDONOR DARAH
DENGAN HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) POSITIF
DI JAYAPURA, PROVINSI PAPUA, INDONESIA**

Pada tahun 2000, *Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C* menyatakan bahwa Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B sedang sampai tinggi. Angka pengidap virus hepatitis B di antara pendonor darah sukarela di sebelas kota besar di Indonesia berkisar antara 2,1%-9,5%, sementara itu di Jayapura, Provinsi Papua, angka tersebut pernah mencapai 17,5%. Pada saat ini, delapan genotipe dan sembilan sub tipe virus hepatitis B telah teridentifikasi di seluruh dunia. Baik genotipe maupun sub tipe virus hepatitis B memperlihatkan perbedaan dalam distribusi geografis, karakteristik klinik dan virologik serta dapat memberikan informasi historik tentang pola migrasi nenek moyang penduduk setempat. Data epidemiologi molekuler yang tersedia saat ini tentang pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Jayapura bersumber dari beberapa penelitian yang dilakukan dengan menggunakan spesimen serum yang diambil pada waktu lebih dari satu dekade yang lalu dengan jumlah sampel terbatas. Hal ini berarti bahwa gambaran terkini tentang pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Jayapura, khususnya pada kelompok pendonor darah, belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura.

Sampel serum diperoleh dari pendonor darah di Unit Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Jayapura dari bulan September 2004 sampai Januari 2005. Sampel serum diuji saring untuk deteksi HBsAg dengan metode *immuno chromatography* dan selanjutnya dilakukan penentuan HBsAg dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay*. Pada sampel serum dengan HBsAg positif ditentukan genotipe dan sub tipe virus hepatitis B. DNA virus hepatitis B diekstraksi dari 60 µl sampel serum menggunakan DNAzol Reagent (Invitrogen). Amplifikasi bagian dari gen S dilakukan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan *primer sense* P7 (5'-GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC-3; posisi 256-278) dan *primer antisense* P8 (5'-CGG TAW AAA GGG ACT CAM GAT-3'; posisi 796-776). Jika amplifikasi PCR *first-round* ini negatif, PCR *second-round* dilakukan menggunakan *primer sense* HBS1 (5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'; posisi 455-474) dan *primer antisense* HBS2 (5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3'; posisi 713-694). Kondisi siklus untuk kedua *round* PCR adalah 40 siklus pada 94°C selama 1 menit, 55°C selama 1 menit dan 72°C selama 2 menit. Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis menggunakan gel agarose 2% yang telah diwarnai dengan ethidium bromide. Produk PCR dipurifikasi menggunakan QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), selanjutnya di-*label* menggunakan Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) dan disekuens

menggunakan ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Sekuens nukleotida virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura dibandingkan dengan sekuens nukleotida virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank). Genotipe virus hepatitis B ditentukan berdasarkan persentase homologi lebih dari 96% pada level gen S menggunakan perangkat lunak komputer Genetyx-Mac version 10.1.2 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Jepang). Pohon filogenetik direkonstruksi menggunakan *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA) *clustering*. Sekuens nukleotida virus hepatitis B dikonversi menjadi sekuens asam amino dan dilakukan *multiple alignment*. Subtipe virus hepatitis B ditentukan dengan analisis substitusi asam amino pada posisi 122, 127, 134, 159, 160 dan 177 pada gen S.

Empat puluh tiga (4,6%) dari 925 pendonor darah memperlihatkan HBsAg positif, dengan rentang usia 18,0-47,7 tahun, dan rata-rata usia 29,7 tahun (laki-laki:perempuan = 42:1). Tiga puluh enam (83,7%) dari 43 sampel berasal dari pendonor darah asli Papua, sedangkan sisanya berasal dari non Papua. DNA virus hepatitis B terdeteksi pada 40 (93,0%) dari 43 sampel; 17 (42,5%) dari 40 sampel pada PCR *first-round* dan 23 (57,5%) sampel lainnya pada PCR *second-round*. Pada 27 (62,5%) dari 40 sekuens nukleotida sampel dilakukan penentuan genotipe dan subtipe virus hepatitis B. Dua puluh tiga (85,2%) dari 27 isolat termasuk genotipe C, 2 (7,4%) isolat termasuk genotipe B dan 2 (7,4%) isolat termasuk genotipe D. Subtipe *adr* (85,2% dari 27 isolat) merupakan subtipe virus hepatitis B predominan, diikuti subtipe *adw2* (7,4%) dan subtipe *ayw2* (7,4%). Semua subtipe *adr* termasuk dalam genotipe C, demikian pula semua subtipe *adw2* dalam genotipe B dan semua subtipe *ayw2* dalam genotipe D. Tiga belas (56,5%) dari 23 isolat subtipe *adr* tidak memiliki determinan *q*, sedangkan 10 (43,5%) isolat lainnya memiliki determinan *q*. Berdasarkan analisis filogenetik sebagian gen S, 20 (87,0%) dari 23 isolat virus hepatitis B C/*adr* pada penelitian ini membentuk satu *cluster* terpisah, 1 (4,3%) isolat dalam *cluster* Melanesia dan Polinesia serta 2 (8,7%) isolat dalam *cluster* Jepang, Korea dan Cina.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa virus hepatitis B genotipe C predominan pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura. Hasil ini mirip dengan hasil penelitian sebelumnya dan menguatkan fakta bahwa virus hepatitis B genotipe C predominan di bagian paling timur Indonesia. Penelitian ini juga memperlihatkan bahwa virus hepatitis B subtipe *adr* predominan. Tiga observasi sebelumnya pada murid Sekolah Dasar etnis Papua, pendonor darah dan penduduk dewasa asli Papua di Jayapura juga memperlihatkan pola yang sama. Hasil penelitian ini menegaskan kembali fakta bahwa Jayapura berada dalam zona *adr*. Pada tahun 1997, Mulyanto *et al.* menyatakan bahwa nenek moyang penduduk bagian paling timur Indonesia yang terinfeksi virus hepatitis B subtipe *adr* tampaknya datang dari Melanesia di mana subtipe *adr* banyak ditemukan. Isolat virus hepatitis B dari *New Caledonia* (Melanesia) dan *French Polynesia* (Polinesia) termasuk dalam subtipe *adrq*-. Menariknya, hasil penelitian ini justru memperlihatkan bahwa 43,5% isolat virus hepatitis B subtipe *adr* di Jayapura memiliki determinan *q* seperti isolat dari Jepang, Korea, Cina, Vietnam, Myanmar dan Thailand. Temuan ini membuka pemikiran baru yang masih perlu dikaji lebih jauh

tentang adanya pola migrasi tambahan dari nenek moyang penduduk asli Papua. Hasil analisis filogenetik pada penelitian ini dapat menjadi pendorong untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kekerabatan isolat virus hepatitis B *C/adr* dari Jayapura dengan isolat subgrup C1 dari Asia Tenggara serta dengan isolat dari populasi Aborigin di Australia.

Sebagai kesimpulan, hasil penelitian ini menguatkan temuan sebelumnya bahwa Jayapura termasuk dalam zona *C/adr*. Namun, dengan teridentifikasinya subtipe *adrq+* terungkap fakta bahwa virus hepatitis B *C/adr* di Jayapura tidak hanya dikaitkan dengan virus hepatitis B *C/adr* dari Melanesia dan Polinesia, seperti diasumsikan selama beberapa tahun terakhir. Penelitian lebih jauh diperlukan untuk mengklarifikasi karakteristik *cluster* virus hepatitis B *C/adr* dari Jayapura yang terpisah, baik dari *cluster* Melanesia dan Polinesia maupun dari *cluster* Jepang, Korea dan Cina.

SUMMARY**HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES AND SUBTYPES
AMONG HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg)-POSITIVE
BLOOD DONORS IN JAYAPURA, PAPUA PROVINCE, INDONESIA**

In the year 2000, Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C stated that Indonesia had a moderate to high endemicity of hepatitis B. Hepatitis B virus (HBV) carrier rate among voluntary blood donors in eleven large cities in Indonesia ranges from 2.1% to 9.5%, while in Jayapura, Papua Province, it may reach 17.5%. To date, eight genotypes and nine subtypes of HBV have been identified worldwide. Both HBV genotypes and subtypes differ with each other in geographical distribution, clinical and virological characteristics, and can also provide historical information on the migration pattern of the ancestor of local population. The available molecular epidemiological data on HBV genotypes and subtypes pattern in Jayapura were obtained from several studies with limited samples conducted more than a decade ago. This indicates that a most current picture on HBV genotypes and subtypes pattern in Jayapura, particularly those in blood donors, is still unknown.

The objective of this study was to identify HBV genotypes and subtypes pattern among Hepatitis B surface Antigen (HBsAg)-positive blood donors in Jayapura.

Serum samples were taken from blood donors visited Blood Transfusion Unit, Indonesian Red Cross, Jayapura, from September 2004 to January 2005. Serum samples were screened for HBsAg detection using immunochromatography method and then were subjected to HBsAg determination using enzyme-linked immunosorbent assay method. Those with HBsAg-positive were subjected to HBV genotype and subtype determination. HBV DNA was extracted from 60 µl serum samples using DNAzol Reagent (Invitrogen). The amplification of part of the S gene was performed using polymerase chain reaction (PCR) with sense primer P7 (5'-GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC-3'; positions 256-278) and antisense primer P8 (5'-CGG TAW AAA GGG ACT CAM GAT-3'; positions 796-776). If this first-round PCR amplification was negative, second-round PCR was carried out using sense primer HBS1 (5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'; positions 455-474) and antisense primer HBS2 (5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3'; positions 713-694). The cycle condition for both PCR rounds were 40 cycles in 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes. Amplification products were visualized on 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and then labelled using Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and sequenced by means of ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). HBV nucleotide sequences of blood donors in Jayapura were compared to those from international DNA data bank (DDBJ/EMBL/GenBank). HBV genotype was determined based on the homologous percentage more than 96% in the S gene level using computer software Genetyx-Mac version 10.1.2 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan). Phylogenetic tree was reconstructed by Unweighted Pair

Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) clustering. HBV nucleotide sequences were converted into amino acid ones and multiple aligned. HBV subtype was determined using analysis of amino acid substitutions at positions 122, 127, 134, 159, 160, and 177 in the S gene.

Forty-three (4.6%) of 925 blood donors were HBsAg-positive, with age ranging from 18.0-47.7 years, and average age of 29.7 years (male:female = 42:1). Thirty-six (83.7%) of 43 samples were obtained from native Papuan and the rest were from non-native Papuan. HBV DNA was detected in 40 (93.0%) of 43 samples; 17 (42.5%) of 40 samples at first-round PCR and 23 (57.5%) others at second-round PCR. Twenty-seven (62.5%) of 40 samples' nucleotide sequences were subjected to HBV genotype and subtype determination. This study showed that 23 (85.2%) of 27 isolates tested belonged to genotype C, 2 (7.4%) to genotype B, and 2 (7.4%) to genotype D. Subtype *adr* (85.2% of 27 isolates) was found to be the predominant HBV subtype, followed by *adw2* (7.4%) and *ayw2* (7.4%). All of subtype *adr* were included in genotype C, as all of *adw2* in genotype B and *ayw2* in genotype D. Thirteen (56.5%) of 23 isolates of subtype *adr* had no *q* determinant, while 10 (43.5%) others had *q* determinant. Based on phylogenetic analysis of part of the S gene, 20 (87.0%) of 23 isolates of HBV C/*adr* in this study formed a distinct cluster, 1 (4.3%) belonged to the Melanesian and Polynesian cluster and 2 (8.7%) to the Japanese, Korean and Chinese cluster.

This study showed that HBV genotype C was predominant among HBsAg-positive blood donors in Jayapura. This result was similar with previous study and confirmed the fact that HBV genotype C was predominant in the easternmost part of Indonesia. This study also found that HBV subtype *adr* is predominant. The three previous observations on Papuan elementary school children, blood donors and adult population of native Papuan in Jayapura also showed the same pattern. This study confirmed the fact that Jayapura was within the *adr*-zone. In the year 1997, Mulyanto *et al.* stated that the ancestor of the inhabitants of the easternmost part of Indonesia who were infected with HBV subtype *adr* most likely came from Melanesia, where subtype *adr* is largely found. HBV isolates from New Caledonia (Melanesia) and French Polynesia (Polynesia) were classified into subtype *adrq*-. Interestingly, this study showed that 43.5% of HBV isolates subtype *adr* in Jayapura did have *q* determinant as those found from Japan, Korea, China, Vietnam, Myanmar, and Thailand. This finding disclosed a new insight that deserved further investigation on the presence of additional migration pattern of the ancestor of native Papuan. Phylogenetic analysis results in this study should be a drive for conducting further studies on the genetic relatedness of HBV C/*adr* isolates from Jayapura with subgroup C1 isolates from southeast Asia and with Australian Aborigin isolates.

In conclusion, this study confirmed previous findings that Jayapura belonged to C/*adr*-zone. However, the identification of subtype *adrq*+ disclosed the fact that HBV C/*adr* in Jayapura related not only to HBV C/*adr* from Melanesia and Polynesia as assumed during the last several years. Further studies were needed to clarify the characteristics of cluster of HBV C/*adr* from Jayapura, which was separated from the Melanesian and Polynesian cluster, and from the Japanese, Korean and Chinese cluster.

ABSTRACT**HEPATITIS B VIRUS GENOTYPES AND SUBTYPES
AMONG HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg)-POSITIVE
BLOOD DONORS IN JAYAPURA, PAPUA PROVINCE, INDONESIA**

Eight genotypes and nine subtypes of hepatitis B virus (HBV) have been identified worldwide. Both HBV genotypes and subtypes differ with each other in geographical distribution, clinical as well as virological characteristics, and can also provide historical information on the migration pattern of the ancestor of local population. We carried out DNA extraction, amplification with polymerase chain reaction and sequencing of serum samples of Hepatitis B surface Antigen-positive blood donors in Jayapura, Papua Province, Indonesia. The 27 obtained nucleotide sequences were compared with HBV nucleotide sequences from international DNA data bank for genotype determination. HBV subtype were determined using analysis of amino acid substitutions at positions 122, 127, 134, 159, 160, and 177 in the S gene. Twenty-three (85.2%) of 27 isolates tested belonged to genotype C, 2 (7.4%) to genotype B, and 2 (7.4%) to genotype D. Subtype *adr* (85.2% of 27 isolates) was found to be the predominant HBV subtype, followed by *adw2* (7.4%) and *ayw2* (7.4%). All of subtype *adr* were included in genotype C, as all of *adw2* in genotype B and *ayw2* in genotype D. Thirteen (56.5%) of 23 isolates of subtype *adr* had no *q* determinant as those found from Melanesia and Polynesia. Interestingly, 10 (43.5%) others had *q* determinant as those found from Japan, Korea, and China. This study confirmed previous findings that Jayapura belonged to C/*adr*-zone. However, the identification of subtype *adrq+* disclosed the fact that HBV C/*adr* in Jayapura related not only to HBV C/*adr* from Melanesia and Polynesia as assumed during the last several years. Based on phylogenetic analysis of part of the S gene, 20 (87.0%) of 23 isolates of HBV C/*adr* in this study belonged to a distinct cluster, which was separated from the Melanesian and Polynesian cluster, and from the Japanese, Korean and Chinese cluster.

Keywords : genotypes, subtypes, hepatitis B virus, HBsAg-positive blood donors, Papuan, Indonesia.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xiv
Summary	xvii
Abstract	xix
Daftar Isi	xx
Daftar Tabel	xxiii
Daftar Gambar	xxiv
Daftar Lampiran	xxvi
Daftar Singkatan	xxvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6

	Halaman
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Hepatitis Karena Virus dan Historisnya	7
2.2 Virus Hepatitis B	7
2.3 Replikasi Virus Hepatitis B	12
2.4 Patogenesis dan Aspek Klinik Hepatitis B	15
2.5 Gambaran Serologik Hepatitis B	20
2.6 Terapi Antivirus terhadap Hepatitis B	23
2.7 Epidemiologi dan Prevensi Hepatitis B	28
2.8 Transmisi Hepatitis B	30
2.9 Subtipe Virus Hepatitis B	32
2.10 Genotipe Virus Hepatitis B	34
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN	37
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	39
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	39
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	39
4.2.1 Populasi	39
4.2.2 Sampel	39
4.2.3 Kriteria sampel	40
4.2.4 Teknik pengambilan dan jumlah sampel	40
4.3 Definisi Operasional Variabel	40
4.4 Bahan Penelitian	43
4.4.1 Pengambilan spesimen darah	43
4.4.2 Uji saring HBsAg dengan metode <i>immuno-chromatography</i>	43
4.4.3 Penentuan HBsAg dengan metode ELISA	43
4.4.4 Ekstraksi DNA	44
4.4.5 Amplifikasi DNA	44
4.4.6 Purifikasi produk PCR	46
4.4.7 <i>Labeling</i>	46
4.4.8 Purifikasi pro sekuensing DNA	47

	Halaman
4.4.9 Sekuensing DNA	47
4.5 Instrumen Penelitian	48
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	49
4.6.1 Lokasi penelitian	49
4.6.2 Waktu penelitian	50
4.7 Prosedur Penelitian	50
4.7.1 Pengambilan spesimen darah	50
4.7.2 Uji saring HBsAg dengan metode <i>immuno-chromatography</i>	51
4.7.3 Penyimpanan dan pengiriman spesimen serum	52
4.7.4 Penentuan HBsAg dengan metode ELISA	52
4.7.5 Ekstraksi DNA	54
4.7.6 Amplifikasi DNA	56
4.7.7 Purifikasi produk PCR	58
4.7.8 <i>Labeling</i>	60
4.7.9 Purifikasi pro sekuensing DNA	61
4.7.10 Sekuensing DNA	62
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	63
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	66
5.1 Data Penelitian	66
5.2 Analisis Hasil Penelitian	69
BAB 6 PEMBAHASAN	76
BAB 7 PENUTUP	87
7.1 Kesimpulan	87
7.2 Saran	88
Daftar Pustaka	90
Lampiran	95

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 : Hasil uji serologis dalam empat tahapan infeksi virus hepatitis B	22
Tabel 2.2 : Tingkat endemisitas hepatitis B	29
Tabel 2.3 : Asam amino yang menentukan determinan HBsAg ...	33
Tabel 2.4 : Hubungan antara genotipe dan subtipe virus hepatitis B serta distribusi geografisnya	35
Tabel 5.1 : Pola genotipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan sebarannya menurut kelompok etnis	69
Tabel 5.2 : Pola subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan sebarannya menurut kelompok etnis ...	73
Tabel 5.3 : Determinan <i>q</i> pada virus hepatitis B subtipe <i>adr</i> pada pendonor darah di Jayapura	74
Tabel 5.4 : Sekuens nukleotida pada asam amino posisi tertentu terkait dengan penentuan subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura	75

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Organisasi genomik virus hepatitis B	8
Gambar 2.2 : Ukuran setiap segmen pada genom virus hepatitis B .	9
Gambar 2.3 : Struktur protein permukaan virus hepatitis B	10
Gambar 2.4 : Gambaran mikroskop elektron tiga morfologi virus hepatitis B	11
Gambar 2.5 : Siklus hidup virus hepadna	13
Gambar 2.6 : Empat transkrip mRNA pada genom virus hepatitis B .	14
Gambar 2.7 : Manifestasi infeksi virus hepatitis B berdasarkan umur pada saat mendapatkan infeksi	17
Gambar 2.8 : Gambaran serologik infeksi virus hepatitis B akut	21
Gambar 2.9 : Gambaran serologik infeksi virus hepatitis B kronik ...	22
Gambar 2.10 : Skematik <i>domain</i> polimerase virus hepatitis B	26
Gambar 2.11 : Distribusi geografik infeksi virus hepatitis B kronik ...	29
Gambar 3.1 : Bagan kerangka konseptual penelitian	38
Gambar 4.1 : Bagan alur penelitian	65
Gambar 5.1 : Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 01UC-11UC	67
Gambar 5.2 : Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 12UC-22UC	67
Gambar 5.3 : Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 23UC-33UC	68
Gambar 5.4 : Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 34UC-43UC	68

Gambar 5.5 : Pohon filogenetik atau dendrogram berdasarkan sekuens nukleotida 500-703 pada gen S berbagai genotipe virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura dan bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank) 71

Gambar 5.6 : *Multiple alignment* pada sekuens asam amino 116-183 pada gen S berbagai genotipe dari sub tipe virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura dan bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank) 72

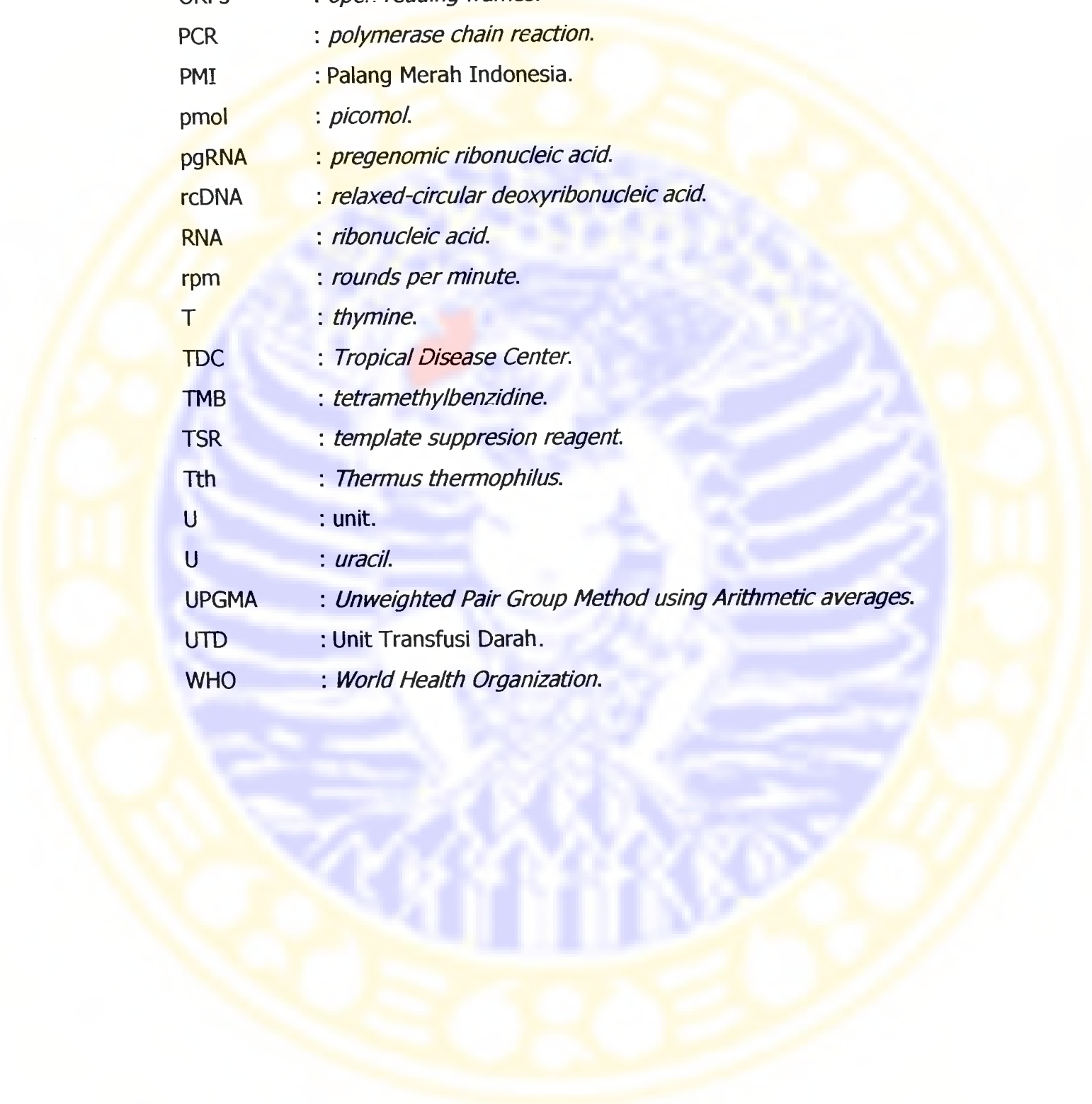


DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Lembar persetujuan mengikuti penelitian (<i>informed consent</i>)	95
Lampiran 2 : Lembar persetujuan tindakan medik	96
Lampiran 3 : Referensi sekuens nukleotida dan asam amino virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank)	97
Lampiran 4 : Data pendonor darah di Jayapura yang dipakai sebagai sampel penelitian	101
Lampiran 5 : Hasil penentuan HBsAg dengan metode ELISA pada pendonor darah di Jayapura	102
Lampiran 6 : Deteksi DNA virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan kualitas <i>electropherogram</i>	103
Lampiran 7 : Persentase homologi sekuens nukleotida virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura terhadap sekuens nukleotida virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank)	105
Lampiran 8 : Sekuens nukleotida pada asam amino posisi tertentu terkait dengan penentuan subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura	106
Lampiran 9 : Pendonor darah dan positivitas HBsAg di UTD PMI Cabang Jayapura tahun 2002-2004	107
Lampiran 10 : Kode basa nukleotida	108
Lampiran 11 : Tabel kodon	109
Lampiran 12 : Kode asam amino	110
Lampiran 13 : Keterangan kelaikan etik	111
Lampiran 14 : <i>Electropherogram</i> virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura	112

DAFTAR SINGKATAN

A	: adenine.
bp	: base pairs.
C	: Celsius.
C	: cytosine.
cccDNA	: covalently closed circular deoxyribonucleic acid.
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention.
DDBJ	: DNA Data Bank of Japan.
DNA	: deoxyribonucleic acid.
dNTP	: deoxynucleoside triphosphates.
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid.
EIA	: enzyme immuno assay.
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay.
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory.
G	: guanine.
HBcAg	: Hepatitis B core Antigen.
HBeAg	: Hepatitis B e Antigen.
HBIG	: Hepatitis B immune globulin.
HBsAg	: Hepatitis B surface Antigen.
IFN- α	: interferon-alfa.
IgG	: immunoglobulin G.
IgM	: immunoglobulin M.
kb	: kilo bases.
kDa	: kilo Dalton.
kg	: kilogram.
mg	: miligram.
ml	: mililiter.
mM	: milimolar.
μ g	: mikrogram.
μ l	: mikroliter.
mRNA	: messenger ribonucleic acid.



ng	: nanogram.
nm	: nanometer.
ORFs	: <i>open reading frames</i> .
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i> .
PMI	: Palang Merah Indonesia.
pmol	: <i>picomol</i> .
pgRNA	: <i>pregenomic ribonucleic acid</i> .
rcDNA	: <i>relaxed-circular deoxyribonucleic acid</i> .
RNA	: <i>ribonucleic acid</i> .
rpm	: <i>rounds per minute</i> .
T	: <i>thymine</i> .
TDC	: <i>Tropical Disease Center</i> .
TMB	: <i>tetramethylbenzidine</i> .
TSR	: <i>template suppression reagent</i> .
Tth	: <i>Thermus thermophilus</i> .
U	: unit.
U	: <i>uracil</i> .
UPGMA	: <i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i> .
UTD	: Unit Transfusi Darah.
WHO	: <i>World Health Organization</i> .

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepatitis B merupakan suatu masalah kesehatan masyarakat global yang serius. Sekitar dua milyar penduduk dunia telah terinfeksi virus hepatitis B (*World Health Organization (WHO), 2000*). Infeksi virus hepatitis B dikaitkan dengan spektrum klinis yang luas, mulai dari status pengidap asimtomatik, hepatitis B akut dan hepatitis fulminan hingga berbagai bentuk infeksi kronik termasuk hepatitis B kronik, sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler (*Kao et al., 2002*). Lebih dari 350 juta orang diperkirakan menjadi pengidap virus hepatitis B (*Zuckerman, 1999*) dan seperempat di antaranya dapat berkembang menjadi hepatitis B kronik aktif (*Brooks et al., 2004*).

Area dengan tingkat endemisitas hepatitis B rendah termasuk Amerika Utara, Eropa Barat dan Australia yang kurang dari 2% populasinya adalah pengidap. Sedangkan area dengan tingkat endemisitas hepatitis B tinggi termasuk Asia Tenggara, Cina dan Afrika yang lebih dari 8% populasinya adalah pengidap (*Lee, 1997*).

Pada tahun 2000, *Core Working Party for Asia-Pacific Consensus on Hepatitis B and C* menyatakan Indonesia memiliki tingkat endemisitas hepatitis B sedang sampai tinggi (*Khan et al., 2004*). Angka pengidap di antara pendonor darah sukarela di sebelas kota besar di Indonesia berkisar



antara 2,1%-9,5%, bahkan di Jayapura, Provinsi Papua, lebih tinggi (Sastrosoewignjo *et al.*, 1991). Pemeriksaan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) menggunakan metode *Reversed Passive Hemagglutination* pada 217 pendonor darah sukarela yang diambil secara *proportional random sampling* dari 891 pendonor darah yang terdaftar di Dinas Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Jayapura tahun 1975-1977 memperlihatkan angka pengidap sebesar 17,5% (Sandjaya, 1979).

Tiga modus transmisi hepatitis B adalah secara parenteral atau perkutan, melalui hubungan seksual, dan secara vertikal dari ibu kepada bayinya selama periode perinatal (Levinson & Jawetz, 2003; dan Hou *et al.*, 2005). Pada area dengan tingkat endemisitas hepatitis B tinggi, modus transmisi dominan adalah secara vertikal dari ibu kepada bayinya dan secara horisontal pada anak-anak (Lee, 1997; dan Brooks *et al.*, 2004). Sekitar 80%-90% bayi yang terinfeksi selama tahun pertama kehidupannya dan sekitar 30%-50% anak-anak yang terinfeksi saat berumur satu sampai empat tahun akan mengarah pada infeksi virus hepatitis B kronik (*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2003c). Sebagian besar di antaranya akan menjadi pengidap seumur hidup (Zuckerman, 1999) tanpa memberikan gejala penyakit, sehingga disebut sebagai pengidap asimtomatik (Kao *et al.*, 2002). Para pendonor darah dengan HBsAg positif merupakan kelompok pengidap asimtomatik virus hepatitis B.

Salah satu sistem klasifikasi virus hepatitis B didasarkan pada divergensi 8% atau lebih sekuens nukleotida keseluruhan genom virus hepatitis B (Okamoto *et al.*, 1988). Pada saat ini, delapan genotipe virus hepatitis B yang

diberi tanda A hingga H telah teridentifikasi di seluruh dunia (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1994; Stuyver *et al.*, 2000; dan Arauz-Ruiz *et al.*, 2002). Genotipe virus hepatitis B memperlihatkan distribusi yang berbeda secara geografis (Magnius & Norder, 1995). Prevalensi berbagai genotipe virus hepatitis B di suatu area geografi merefleksikan pola migrasi tertentu (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Sistem klasifikasi lainnya didasarkan pada HBsAg yang memiliki determinan *a* yang bersifat umum serta dua pasang variasi alelik determinan sub tipe yang bersifat *mutually exclusive*, yaitu *d* atau *y* dan *w* atau *r*. Kombinasi di antara determinan-determinan tersebut menghasilkan empat sub tipe mayor HBsAg, yaitu *adw*, *adr*, *ayw* dan *ayr*. Sub tipe HBsAg juga memperlihatkan distribusi yang berbeda secara geografis dan dapat memberikan informasi historik tentang migrasi nenek moyang penduduk setempat (Okamoto *et al.*, 1988). Baik genotipe maupun sub tipe virus hepatitis B dapat memperlihatkan perbedaan dalam karakteristik virologik dan karakteristik klinik (Kao, 2002).

Pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di suatu area geografi dapat diamati pada berbagai kelompok populasi, termasuk antara lain populasi pendonor darah (Kao *et al.*, 2002; Moriya *et al.*, 2002; dan Lusida *et al.*, 2003); penderita hepatitis B akut; penderita penyakit hati kronik seperti hepatitis B kronik, sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler; pasien hemodialisis (Lusida *et al.*, 2003), serta pengguna obat-obatan secara intra-vena (Swenson *et al.*, 2001). Pendonor darah dengan HBsAg positif merupakan kelompok populasi yang memiliki peran penting pada rantai trans-

misi virus hepatitis B dalam suatu populasi.

Pada berbagai penelitian yang telah dilakukan selama ini oleh Mulyanto *et al.* pada tahun 1990 dan 1997; Sandjaya *et al.* pada tahun 1990; dan Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991, dilaporkan mengenai genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Jayapura, dan diteliti spesimen serum yang diambil pada waktu tiga belas sampai lima belas tahun yang lalu. Meskipun pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B tampaknya dipertahankan pada masing-masing pulau (Sastrosoewignjo *et al.*, 1991), namun kemungkinan pergeseran pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B akibat peningkatan mobilitas penduduk dan perubahan komposisi demografi perlu dicermati. Dengan demikian, perlu diketahui gambaran terkini tentang pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Jayapura, khususnya pada kelompok pendonor darah. Di samping itu, pada sebagian penelitian seperti halnya penelitian Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991, khususnya yang berkaitan dengan genotipe virus hepatitis B di Jayapura, dilakukan pada sejumlah sampel yang terbatas. Dengan demikian, hasil penelitian yang dilaporkan belum memberikan gambaran yang representatif tentang pola genotipe virus hepatitis B di Jayapura.

Selama ini, di Unit Transfusi Darah (UTD) Palang Merah Indonesia (PMI) Cabang Jayapura, secara rutin dilakukan uji saring HBsAg pada pendonor darah guna mencegah transmisi virus hepatitis B pada populasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pola genotipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia ?
2. Bagaimana pola subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola genotipe dan subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola genotipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.
2. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola subtipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini akan memberikan informasi epidemiologi molekuler terkini tentang pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.
2. Hasil penelitian ini akan melengkapi peta distribusi genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Indonesia, khususnya daerah bagian timur Indonesia.
3. Hasil penelitian ini secara tidak langsung dapat memberikan informasi tambahan kepada para klinisi mengenai aspek biologi molekuler virus hepatitis B dalam kaitannya dengan aspek klinis infeksi virus hepatitis B di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, untuk meningkatkan mutu penanganan penderita.

BAB 2

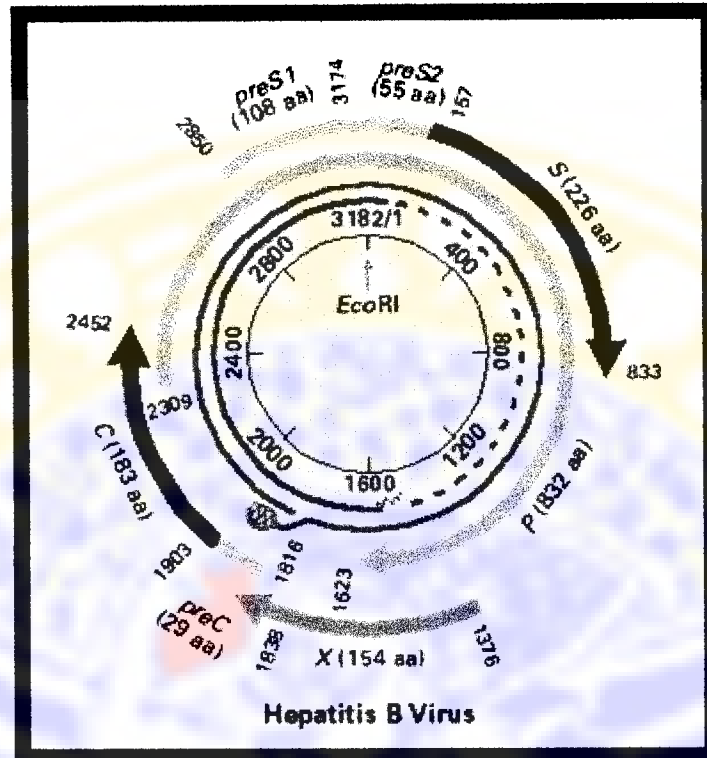
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hepatitis Karena Virus dan Historisnya

Hepatitis karena virus merupakan penyakit kuno yang pertama kali dipaparkan pada abad ke-lima sebelum Masehi. Sejak saat itu, epidemi penyakit kuning telah banyak dilaporkan. Wabah hepatitis yang ditularkan melalui darah pertama kali dikenali terjadi di Bremen, Jerman, pada tahun 1883, di antara para pelaut yang mendapat vaksin cacar. Pada tahun 1947, Mac Callum dan Bauer memperkenalkan istilah hepatitis A untuk hepatitis infeksius dan hepatitis B untuk hepatitis serum. Terminologi ini diadopsi oleh WHO pada tahun 1973, untuk membedakan dua agen infeksius dari hepatitis. Setelah penemuan antigen Australia dalam serum oleh Blumberg *et al.* pada tahun 1965, virus hepatitis B teridentifikasi dan dikarakterisasi. Saat ini, antigen Australia dikenal sebagai HBsAg dan dikaitkan dengan infeksi virus hepatitis B, baik akut maupun kronik. Berbagai penemuan pada akhir abad ke-dua puluh telah mengarah pada pertumbuhan informasi tentang virus hepatitis B (Horvat & Tegtmeier, 2003).

2.2 Virus Hepatitis B

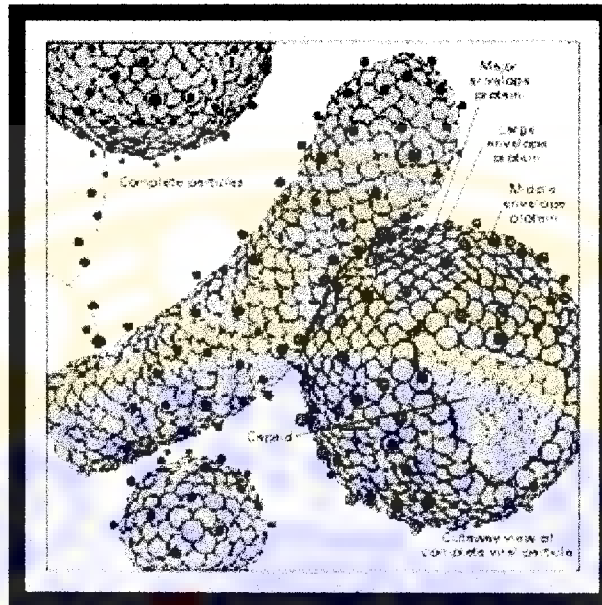
Virus hepatitis B adalah sebuah virus *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang merupakan prototipe dari famili *Hepadnaviridae*. Virion virus hepatitis B berdiameter 42 nanometer (nm), ber-*envelope*, dengan nukleokapsid ikosa-



Gambar 2.2 Ukuran setiap segmen pada genom virus hepatitis B.

DNA virus hepatitis B adalah utas ganda sebagian (lingkaran merah dan biru). Utas yang utuh (lingkaran biru) menyandi tujuh protein dari empat ORFs yang tumpang tindih (permukaan [S], *core* [C], polimerase [P] dan gen X [X]), yang diperlihatkan sebagai panah yang besar dan tiga regio lainnya yaitu pre-C, pre-S1 dan pre-S2. Ukuran asam amino (aa) dari setiap segmen diperlihatkan di dalam kurung (Lee, 1997).

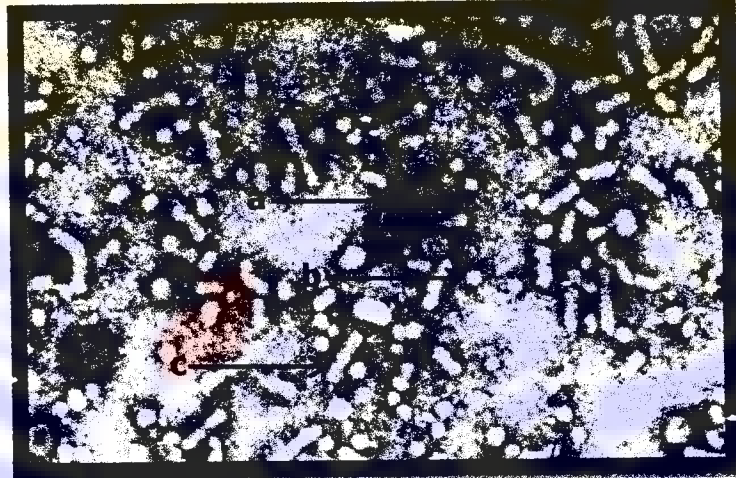
Envelope virus hepatitis B mengandung protein yang disebut antigen permukaan (HBsAg) (Levinson & Jawetz, 2003) yang terdiri dari tiga polipeptida. Protein yang kecil disandi oleh regio S dari gen S dan terdiri dari 226 polipeptida asam amino (24 kilo Dalton (kDa)) dan bentukan glikosilasinya (27 kDa). Protein yang sedang disandi oleh regio pre-S2 dan S dari gen S dan mengandung sebuah tempat glikosilasi tambahan pada regio pre-S2. Polipeptida yang besar mengandung 389-400 asam amino yang disandi oleh regio pre-S1, pre-S2 dan S dari gen S, namun umumnya kehilangan tempat glikosilasi pre-S2 (Horvat & Tegtmeyer, 2003).



Gambar 2.3 Struktur protein permukaan virus hepatitis B. Diperlihatkan tiga macam protein permukaan, yaitu protein *envelope* kecil (*major/small*), sedang (*middle*) dan besar (*large*) (Lee, 1997).

Pemeriksaan ultrastruktur dari partikel yang diamati pada serum penderita dengan infeksi virus hepatitis B memperlihatkan tiga morfologi yang berbeda dalam proporsi yang bervariasi. Bentuk yang jumlahnya paling banyak (10^4 – 10^6) adalah partikel kecil, pleomorfik, sferis dan non infeksius memiliki diameter berukuran 17-25 nm. Partikel ini terutama mengandung sekuens yang menyandi regio S. Densitas yang rendah dari partikel ini merefleksikan adanya lipid yang diduga berasal dari membran sel. Bentuk tubular atau filamen bervariasi panjangnya, namun memiliki diameter kurang lebih sama dengan bentuk sferis. Sebagian besar bentuk tubular mengandung polipeptida berukuran kecil dan sedang. Partikel yang ke-tiga, virion hepatitis B yang lengkap, merupakan sebuah partikel kompleks berselubung ganda dengan diameter berkisar 40-48 nm. Dinamakan sesuai dengan penemunya, David Dane, partikel Dane terdiri dari sebuah *envelope*

yang mengandung lipid yang menyelubungi sebuah *core* di bagian dalam yang padat elektron. *Envelope* virus hepatitis B yang mengandung lipid tersebut juga mengandung semua produk gen S (Horvat & Tegtmeier, 2003).



Gambar 2.4 Gambaran mikroskop elektron tiga morfologi virus hepatitis B. Diperlihatkan (a) virion utuh, (b) partikel sferis dan (c) partikel filamentosa virus hepatitis B [pembesaran 64.000 kali] (Lee, 1997).

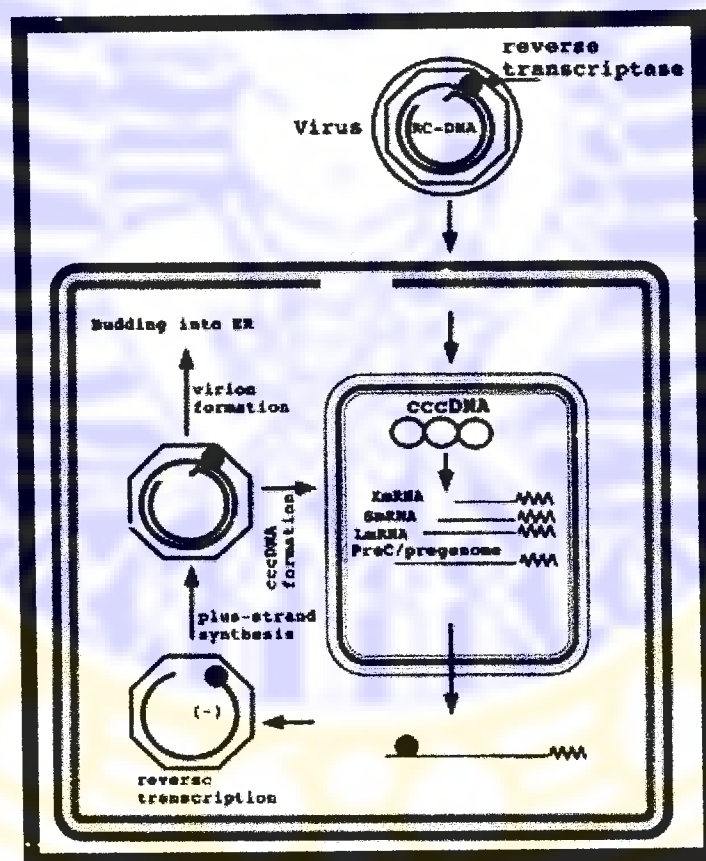
HBeAg dan HBcAg memiliki spesifisitas antigenik yang berbeda. Protein *core* merupakan sebuah polipeptida dengan ukuran molekuler 22 kDa yang disandi oleh gen C dari virus hepatitis B. Sekuens *precore* dalam gen C menyandi sebuah polipeptida dengan spesifisitas HBeAg. Lekukan proteolitik dari protein *core* menghasilkan bentukan HBeAg yang memiliki ukuran molekuler berkisar 17 kDa. HBeAg dapat bersirkulasi bebas dalam darah sebagai sebuah protein terlarut atau dapat berikatan dengan albumin, α_1 -antitripsin atau imunoglobulin. HBeAg merupakan petanda yang terpercaya untuk menunjukkan adanya virion yang utuh dan juga untuk infektivitas (Horvat & Tegtmeier, 2003). HBeAg juga merupakan indikator transmisibilitas yang penting (Levinson & Jawetz, 2003).

Stabilitas HBsAg tidak selalu seiring dengan stabilitas agen infeksiusnya. Namun demikian, keduanya stabil pada temperatur $-20^{\circ}\text{Celsius}$ (C) selama lebih dari dua puluh tahun. Virus hepatitis B juga stabil pada temperatur 37°C selama enam puluh menit dan tetap viabel setelah dikeringkan dan disimpan pada temperatur 25°C selama sedikitnya satu minggu. Virus hepatitis B, namun bukan HBsAg, sensitif terhadap temperatur yang lebih tinggi, misalnya temperatur 100°C selama satu menit atau terhadap periode inkubasi yang lebih lama, misalnya temperatur 60°C selama sepuluh jam. HBsAg stabil pada pH 2,4 sampai dengan enam jam, namun infektivitas virus hepatitis B menjadi hilang. Sodium hipoklorit 0,5% merusak antigenisitas dalam tiga menit pada konsentrasi protein yang rendah, namun untuk spesimen serum yang tidak diencerkan memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi, misalnya 5%. HBsAg tidak dirusak oleh iradiasi sinar ultraviolet pada plasma atau produk darah lainnya (Brooks *et al.*, 2004).

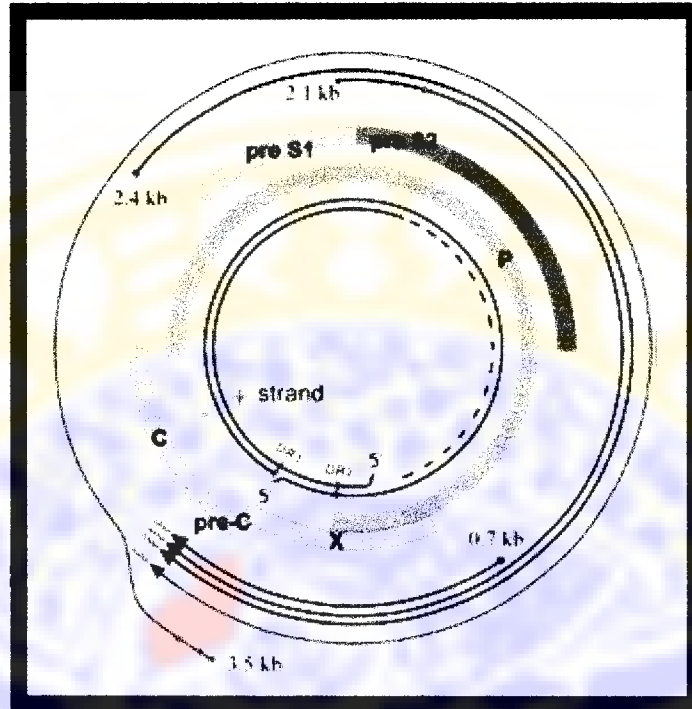
2.3 Replikasi Virus Hepatitis B

Setelah virus hepatitis B berikatan dengan hepatosit, maka virion masuk dan mengalami *uncoated*. Ketika virus hepatitis B menginfeksi sel, genom yang semula *relaxed-circular deoxyribonucleic acid* (rcDNA) diubah menjadi *covalently closed circular deoxyribonucleic acid* (cccDNA) yang berbentuk *supercoiled*. cccDNA bertindak sebagai cetakan bagi transkripsi *pregenomic ribonucleic acid* (pgRNA) dan *messenger ribonucleic acid* (mRNA) (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

Dalam 24 jam setelah infeksi, konversi rcDNA menjadi cccDNA dapat dideteksi di hati. cccDNA hanya terakumulasi di nukleus dan hal ini diperlukan untuk keberhasilan inisiasi replikasi virus hepatitis B. pgRNA yang ditranskripsikan dari cccDNA dalam nukleus bergerak ke sitoplasma sel yang terinfeksi. Dalam sitoplasma, pgRNA bertindak sebagai cetakan untuk enzim *reverse transcriptase* atau polimerase dan untuk protein *core*. Polimerase mengubah pgRNA menjadi sebuah molekul DNA sirkuler yang baru. Pada awal infeksi, genom yang baru tersintesis bersirkulasi kembali ke nukleus untuk menambah dan mempertahankan jumlah cccDNA (Horvat & Tegtmeyer, 2003).



Gambar 2.5 Siklus hidup virus hepatitis. Sebuah nukleokapsid dapat menjadi virion yang lengkap setelah mengalami *budding* ke dalam retikulum endoplasmik (ER) atau bermigrasi ke nukleus untuk meningkatkan jumlah cccDNA (Seeger & Mason, 2000).



Gambar 2.6 Empat transkrip mRNA pada genom virus hepatitis B. Berbagai transkrip mRNA yang ditranskripsikan dari cetakan cccDNA, masing-masing dengan panjang 3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb dan 0,7 kb (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Setiap nukleotida dari genom virus hepatitis B berada pada regio penyandi dan lebih dari separuh genom ditranslasikan pada lebih dari satu ORFs. Empat transkrip mRNA terlibat dalam translasi berbagai protein virus hepatitis B. Berbagai transkrip mRNA ini ditranskripsikan dari regio *promoter* yang berbeda pada cetakan cccDNA. Transkrip mRNA yang terpanjang (3,5 *kilo bases* (kb)) bertindak sebagai cetakan pgRNA dan juga translasi protein *precore* (HBeAg), protein *core* (HBcAg) dan protein polimerase (Horvat & Tegtmeyer, 2003) yang mempunyai aktivitas yang tergantung DNA dan *ribonucleic acid* (RNA) (Levinson & Jawetz, 2003). Transkrip dengan panjang 2,4 kb menyandi protein pre-S1 (39 kDa), protein pre-S2 (33 kDa) dan protein S (24 kDa) yang juga dikenal sebagai HBsAg. Transkrip mRNA yang

ke-tiga (2,1 kb) menyandi protein pre-S2 dan protein S. Transkrip mRNA yang terakhir (0,7 kb) menyandi protein X (Horvat & Tegtmeyer, 2003) yang merupakan sebuah aktivator transkripsi RNA virus (Levinson & Jawetz, 2003).

Virion yang lengkap dihasilkan melalui transkripsi RNA menjadi sebuah molekul DNA sirkuler. Transkrip RNA yang terpanjang (3,5 kb) dan protein polimerase dikemas dalam partikel *core* dan enzim *reverse transcriptase* mensintesis sebuah genom DNA virus baru. Partikel ini dikemas ke dalam protein permukaan virus hepatitis B pada retikulum endoplasmik dan selanjutnya dikeluarkan dari sel sebagai virion yang utuh. Protein permukaan virus hepatitis B juga bisa dikeluarkan dari sel sebagai partikel sferis dan filamentosa tanpa genom virus hepatitis B atau protein *core* (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

Replikasi DNA virus hepatitis B oleh *reverse transcriptase* adalah unik untuk virus-virus DNA pada manusia. Mekanisme ini juga ditemukan pada virus hepadna non-primata dan virus mosaik kol, yang memiliki homologi sekuens nukleotida dengan virus hepatitis B, yang akhirnya menimbulkan dugaan bahwa virus-virus tersebut berelasi secara evolusi (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

2.4 Patogenesis dan Aspek Klinik Hepatitis B

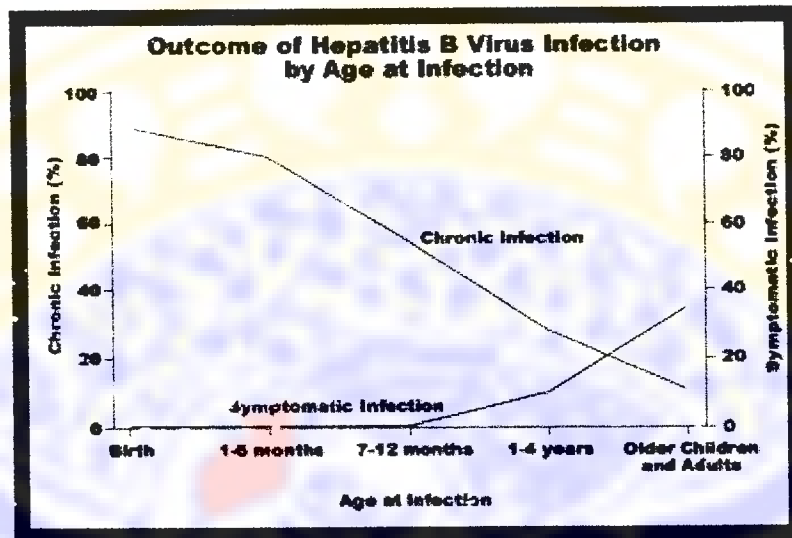
Hepatitis B merupakan penyakit sistemik yang menyerang hati (Brooks *et al.*, 2004). Spesifisitas virus hepatitis B pada hepatosit didasarkan pada dua hal, yaitu reseptor spesifik yang berada di membran sel hepatosit dan faktor transkripsi yang hanya ditemukan pada hepatosit yang meningkatkan sintesis

mRNA virus. Setelah masuk ke dalam darah, virus akan menginfeksi hepatosit dan antigen virus akan dipaparkan pada permukaan sel. Sistem imun tubuh yang menyerang antigen virus pada hepatosit yang terinfeksi adalah sel T sitotoksik yang mengakibatkan inflamasi dan nekrosis. Patogenesis hepatitis B kemungkinan terjadi sebagai akibat jejas imun yang diperantarai sel, karena virus hepatitis B sendiri tidak menyebabkan efek sitopatik. Kompleks antigen-antibodi ini menyebabkan beberapa gejala awal, seperti artralgia, artritis dan urtikaria serta beberapa komplikasi pada hepatitis B kronik termasuk glomerulonefritis kompleks imun dan vaskulitis (Levinson & Jawetz, 2003).

Periode inkubasi infeksi virus hepatitis B akut berkisar antara enam minggu sampai enam bulan. Sebagian besar penderita yang terinfeksi virus hepatitis B tidak memperlihatkan gejala sehingga disebut sebagai infeksi asimtomatik atau subklinis (Horvat & Tegtmeier, 2003) dan dapat menjadi pengidap. Sebagian besar pengidap adalah pengidap seumur hidup, beberapa di antaranya akan terbebas dari virus dalam jangka waktu yang berbeda-beda (Zuckerman, 1999) dan seperempatnya berkembang menjadi hepatitis B kronik aktif (Brooks *et al.*, 2004).

Penderita lainnya yang terinfeksi virus hepatitis B dapat bermanifestasi dengan gejala menjadi hepatitis B akut, baik dengan ikterus yang disebut sebagai hepatitis ikterik pada 25%-35% penderita maupun tanpa ikterus yang disebut sebagai hepatitis anikterik. Penderita hepatitis B akut dapat sembuh sempurna, berkembang menjadi hepatitis fulminan yang mengarah pada kematian atau menjadi infeksi kronik (Horvat & Tegtmeier, 2003). Determinan yang menentukan seorang penderita akan sembuh dari infeksi atau menjadi

pengidap adalah adekuasi respons sel T sitotoksik (Levinson & Jawetz, 2003).



Gambar 2.7 Manifestasi infeksi virus hepatitis B berdasarkan umur pada saat mendapatkan infeksi.

Sistem imun yang belum kompeten menyebabkan bayi dan anak-anak yang terinfeksi virus hepatitis B hanya sebagian kecil yang memberikan gejala dan sebagian besar mengarah pada infeksi kronik (CDC, 2003c).

Manifestasi infeksi virus hepatitis B bervariasi, yang secara substansial tergantung pada umur saat mendapatkan infeksi. Pada anak-anak berumur kurang dari lima tahun, kurang dari 5% infeksi virus hepatitis B akut bersifat simtomatik. Infeksi kronik terjadi pada sekitar 80%-90% bayi yang terinfeksi selama tahun pertama kehidupannya dan pada sekitar 30%-50% anak-anak yang terinfeksi saat berumur satu sampai empat tahun. Sebagai perbandingan, 30%-50% penderita dewasa dengan infeksi virus hepatitis B akut bersifat simtomatik, namun hanya 2%-10% yang berkembang menjadi infeksi kronik (CDC, 2003c). Hal tersebut dikaitkan dengan sistem imun bayi dan anak-anak yang kurang kompeten dibandingkan individu dewasa. Pengidap yang memperoleh infeksi virus hepatitis B pada saat neonatal

dikaitkan dengan risiko yang tinggi untuk timbulnya karsinoma hepatoseluler (Levinson & Jawetz, 2003).

Penderita yang masih menunjukkan HBsAg positif setelah enam bulan pasca paparan dinyatakan mengalami infeksi virus hepatitis B kronik yang dapat mengarah menjadi pengidap virus hepatitis B. Lima puluh persen penderita hepatitis B kronik aktif yang berat berkembang menjadi sirosis hepatis setelah empat tahun dan 30% penderita hepatitis B kronik aktif yang moderat berkembang menjadi sirosis hepatis setelah enam tahun. Karsinoma hepatoseluler berkembang dari 0,5% penderita hepatitis B kronik dan dari 2,4% penderita sirosis hepatis (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

Genom virus hepatitis B tidak memiliki onkogen. Karsinoma hepatoseluler tampaknya timbul sebagai akibat regenerasi seluler yang persisten sebagai upaya untuk menggantikan hepatosit yang mati. Transformasi keganasan juga dapat timbul sebagai akibat mutagenesis insersional yang terjadi ketika genom virus hepatitis B berintegrasi ke dalam DNA hepatosit. Integrasi DNA virus hepatitis B tersebut dapat mengaktifkan onkogen seluler yang mengarah pada hilangnya kendali pertumbuhan. Keberadaan DNA virus hepatitis B terutama pada sitoplasma hepatosit yang terinfeksi secara persisten dan hanya sebagian kecil DNA virus hepatitis B yang terintegrasi ke dalam DNA sel (Levinson & Jawetz, 2003).

Imunitas jangka panjang terjadi setelah infeksi alami dan diperantarai oleh antibodi humoral terhadap HBsAg. Anti-HBs bersifat protektif, karena anti-HBs terikat pada permukaan antigen virion dan mencegahnya berinteraksi dengan reseptor pada hepatosit. Anti-HBs menetralkan infektivitas

virus hepatitis B. Sebaliknya, anti-HBc tidak bersifat protektif, karena antigen *core* berada di dalam virion, sehingga antibodi tidak dapat berinteraksi dengan antigen *core* (Levinson & Jawetz, 2003).

Berbagai mutasi pada regio *precore* genom virus hepatitis B telah diamati pada penderita dengan infeksi virus hepatitis B kronik. Yang paling sering ditemukan adalah substitusi nukleotida *guanine* (G) dengan *adenine* (A) posisi 1896 pada kodon 28. Mutasi ini mengubah UGG untuk triptofan menjadi UAG yaitu sebuah *premature stop codon* sehingga disebut sebagai mutasi *precore stop codon*. Mutasi ini mencegah translasi protein *precore* dan meniadakan produksi HBeAg (Kao, 2002). Mutasi ini dapat berkontribusi dalam patogenesis hepatitis B kronik dan hepatitis fulminan (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

Mutasi ini juga dikaitkan dengan variabilitas nukleotida posisi 1858 pada kodon 15 yang membentuk prolin, yaitu nukleotida *thymine* (T) pada CCT atau *cytosine* (C) pada CCC (Lindh *et al.*, 1997). Genotipe B, C dan D memiliki nukleotida T pada posisi 1858 yang membuat pasangan tidak stabil dengan nukleotida G pada posisi 1896 pada *pgRNA stem loop* di *encapsidation signal*. Mutasi nukleotida A pada posisi 1896 akan menstabilkan struktur *stem* dengan membuat pasangan nukleotida T-A (Kao, 2002).

Sebaliknya, genotipe A (Kao, 2002), sebagian genotipe C (Lindh *et al.*, 1997) dan sebagian genotipe F (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002) memiliki nukleotida C pada posisi 1858 yang membuat pasangan nukleotida C-G dengan nukleotida G pada posisi 1896 pada virus hepatitis B *wild type*. Mutasi nukleotida A pada posisi 1896 akan merusak pasangan stabil ini. Mutasi

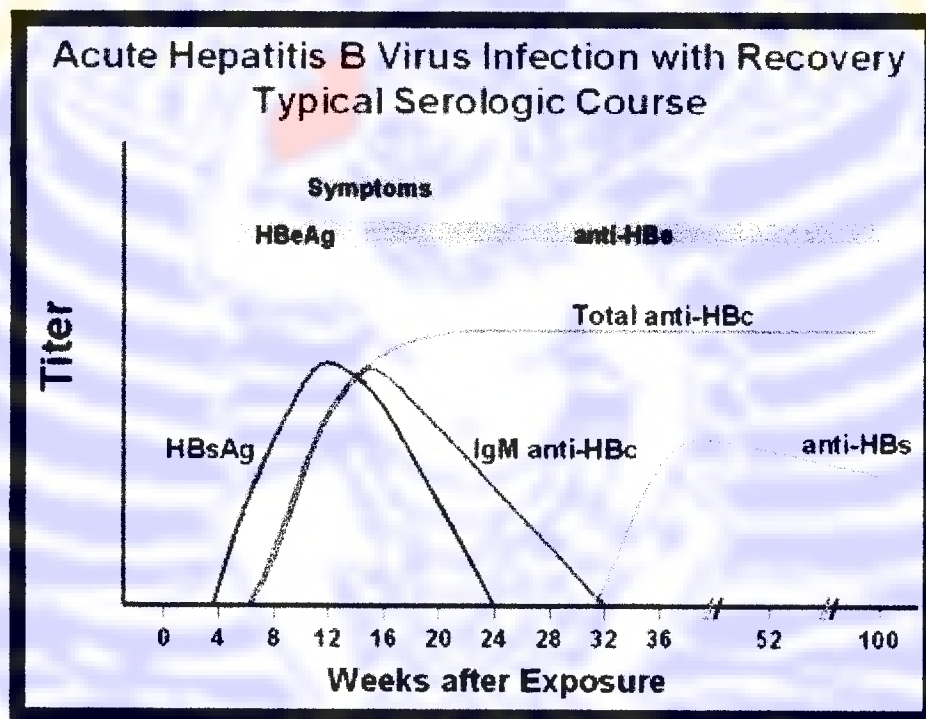
precore stop codon tidak akan terjadi kecuali pada kombinasi dengan mutasi lainnya dari nukleotida C menjadi T pada posisi 1858 (Kao, 2002). Mutasi ini dapat terjadi pada genotipe A melalui substitusi nukleotida C dengan *uracil* (U) pada posisi 1858, selanjutnya diikuti substitusi nukleotida G dengan A pada posisi 1896, yang akan menstabilkan pasangan basa pada *stem* (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

2.5 Gambaran Serologik Hepatitis B

Petanda serologik dari infeksi virus hepatitis B bervariasi tergantung apakah infeksi tersebut akut atau kronik. Petanda serologik yang pertama kali muncul mengikuti infeksi akut adalah HBsAg, yang dapat dideteksi satu sampai dua minggu pasca paparan dengan virus hepatitis B. Pada individu yang sembuh, HBsAg tidak terdeteksi lagi dalam serum rata-rata sekitar tiga bulan pasca paparan. HBeAg pada umumnya terdeteksi pada penderita dengan infeksi akut. Keberadaan HBeAg dalam serum dikaitkan dengan titer virus hepatitis B yang lebih tinggi dan infektivitas yang lebih besar (CDC, 2003a).

Diagnosis infeksi virus hepatitis B akut dapat ditegakkan berdasarkan terdeteksinya *immunoglobulin M* (IgM) anti-HBc dalam serum, yang pada umumnya terdeteksi pada saat onset klinis dan menurun sampai level yang tidak terdeteksi dalam enam bulan. *Immunoglobulin G* (IgG) anti-HBc menetap dan dipakai sebagai petanda infeksi masa lampau. Anti-HBs terdeteksi selama masa pemulihan setelah hilangnya HBsAg pada penderita

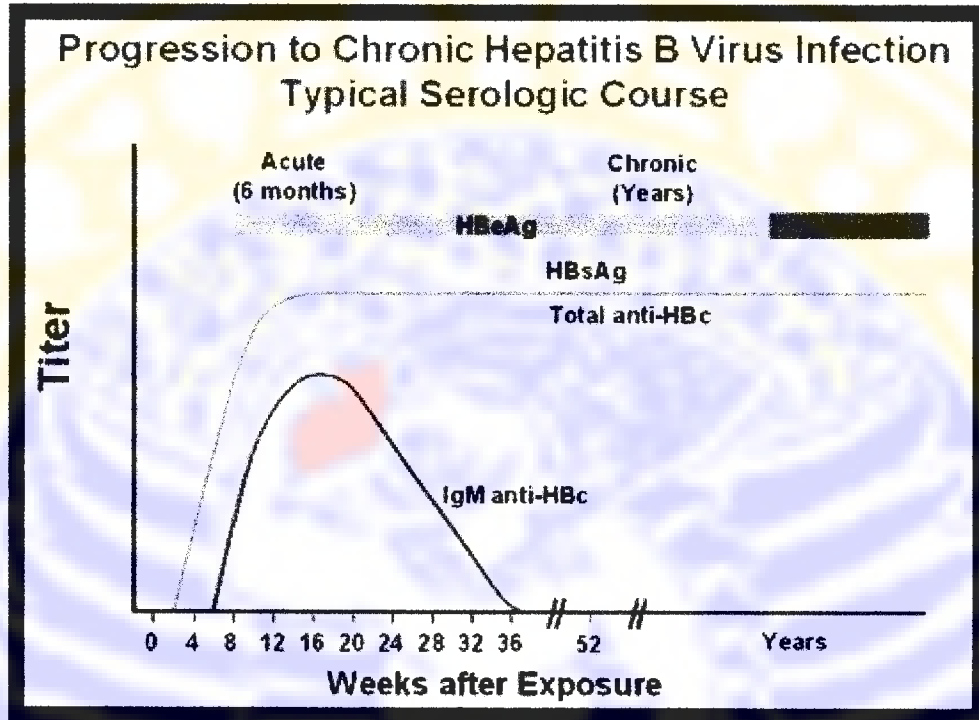
yang tidak berkembang ke arah infeksi kronik. Keberadaan anti-HBs yang mengikuti infeksi akut pada umumnya mengindikasikan kesembuhan dan imunitas terhadap reinfeksi (CDC, 2003a). Periode beberapa minggu ketika HBsAg menghilang namun anti-HBs belum terdeteksi dinamakan *window phase*. Pada periode ini, IgM anti-HBc selalu positif dan dapat dipakai untuk menegakkan diagnosis (Levinson & Jawetz, 2003).



Gambar 2.8 Gambaran serologik infeksi virus hepatitis B akut. Terjadinya infeksi virus hepatitis B akut dapat diketahui dengan terdeteksinya HBsAg dan IgM anti-HBc (CDC, 2003a).

Keberadaan HBsAg selama enam bulan atau lebih umumnya mengindikasikan adanya infeksi kronik. Pada penderita dengan infeksi virus hepatitis B kronik, baik HBsAg maupun IgG anti-HBc terdeteksi dalam jangka waktu yang lama, bahkan seumur hidup. Hasil pemeriksaan yang menunjukkan IgM anti-HBc negatif bersama dengan HBsAg positif pada

spesimen serum tunggal biasanya mengindikasikan sebuah infeksi virus hepatitis B kronik (CDC, 2003b).



Gambar 2.9 Gambaran serologik infeksi virus hepatitis B kronik. Terjadinya infeksi virus hepatitis B kronik dapat diketahui dengan terdeteksinya HBsAg yang menetap setelah enam bulan pasca paparan dan IgG anti-HBc (CDC, 2003b).

Tabel 2.1 Hasil uji serologis dalam empat tahapan infeksi virus hepatitis B (Levinson & Jawetz, 2003).

Petanda Serologik	Infeksi Akut	Window Phase	Sembuh Sempurna	Pengidap
HBsAg	Positif	Negatif	Negatif	Positif
Anti-HBs	Negatif	Negatif	Positif	Negatif
Anti-HBc *	Positif	Positif	Positif	Positif

Keterangan :

- * IgM anti-HBc ditemukan pada tahapan akut, sedangkan IgG anti-HBc ditemukan pada tahapan berikutnya.
- Penerima vaksin hepatitis B menunjukkan anti-HBs positif namun anti-HBc negatif, karena imunogen dalam vaksin adalah HBsAg yang dimurnikan.

Pada pengidap, keberadaan HBeAg dapat dipakai sebagai indikator transmisi (Levinson & Jawetz, 2003). Penderita dengan HBeAg positif lebih mudah mentransmisikan hepatitis B, baik secara seksual, perkutan maupun secara perinatal (Horvat & Tegtmeyer, 2003). Timbulnya anti-HBe mengindikasikan transmisi yang rendah (Levinson & Jawetz, 2003). Spesimen dengan HBeAg positif juga berarti mengandung konsentrasi DNA virus hepatitis B yang tinggi, sebaliknya spesimen dengan anti-HBe positif berarti jumlah virion hepatitis B secara bermakna telah berkurang. Serokonversi HBeAg menjadi anti-HBe dengan hilangnya DNA virus hepatitis B merupakan tujuan yang diinginkan dari terapi hepatitis B dengan obat antivirus seperti interferon. Serokonversi tersebut juga merupakan tanda prognostik yang baik, baik pada penderita yang terinfeksi secara akut maupun pada pengidap (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

2.6 Terapi Antivirus terhadap Hepatitis B



Intervensi terapeutik ditujukan untuk menginterupsi progresi ke arah berkembangnya sirosis hepatis, dekompensasi hepatis dan karsinoma hepatoseluler. Tujuan akhir penanganan penderita adalah supresi replikasi virus hepatitis B dan remisi penyakit hati. Pada saat ini, hanya interferon-alfa (IFN- α) serta lamivudine dan adefovir dipivoxil yang diterima untuk pengobatan infeksi virus hepatitis B kronik (Karayiannis, 2003).

Berbagai obat yang saat ini tersedia untuk mengatasi infeksi virus hepatitis B kronik dapat dibagi dalam dua kelompok utama. Yang pertama

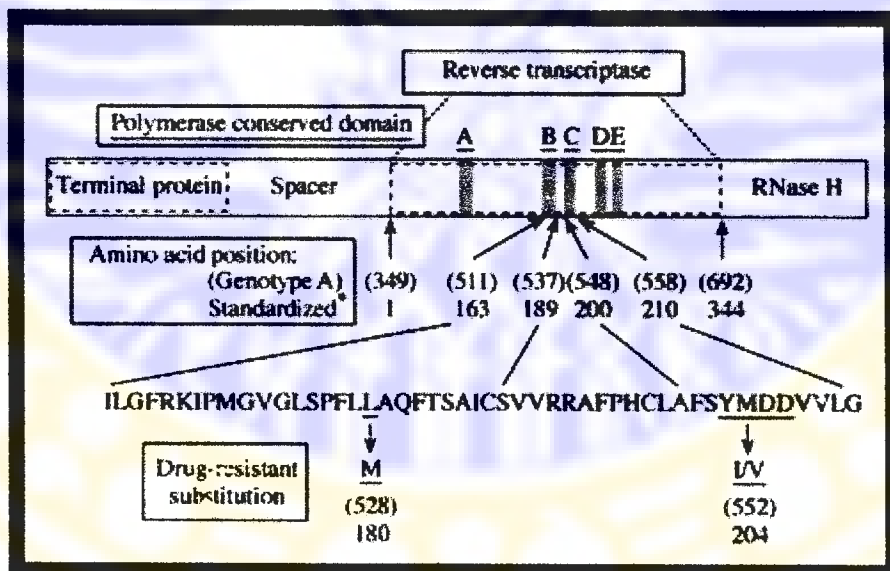
adalah imunomodulator, termasuk IFN- α dan thymosin α 1. Imunomodulator bekerja dengan meningkatkan aktivitas sel T sitotoksik untuk melisis hepatosit yang terinfeksi dan dengan menstimulasi produksi sitokin untuk mengendalikan replikasi virus. Sedangkan yang ke-dua adalah analog nukleosida, termasuk lamivudine, adefovir dipivoxil, entecavir, emtricitabine, β -L-2-deoxythymidine dan famciclovir. Analog nukleosida bekerja dengan mensupresi replikasi virus hepatitis B pada level sintesis DNA dan terdapat bukti juga dapat meningkatkan *immune clearance* dari hepatosit yang terinfeksi (Karayiannis, 2003).

Berbagai polimerase virus hepadna termasuk polimerase DNA yang tergantung DNA dan RNA, RNase H dan *protein priming* memainkan peranan penting dalam replikasi genom virus hepadna. *Reverse transcriptase* virus merupakan target yang baik untuk menghambat replikasi virus hepadna. Beberapa *nucleoside reverse transcriptase inhibitor* bekerja melalui mekanisme ini (Kamiya, 2003). Analog nukleosida adalah obat yang disintesis secara kimiawi yang mampu menyerupai nukleosida alami. Analog nukleosida akan bergabung dengan DNA virus hepatitis B yang baru disintesis dan menyebabkan terminasi, sehingga menghambat replikasi virus. Beberapa di antaranya secara kompetitif menginhibisi polimerase virus yang tergantung DNA dan aktivitas *reverse transcriptase*. Agar hal ini dapat terjadi, analog nukleosida harus difosforilasi dalam sel menjadi triphosphate. Analog nukleosida dapat diproduksi dalam konfigurasi D- yang alami ataupun dalam konfigurasi L- yang tidak alami, yang sering disebut sebagai enansiomer. Polimerase virus hepatitis B memiliki kecenderungan dengan enansiomer

berkonfigurasi L- daripada D-. Enansiomer berkonfigurasi L- memiliki aktivitas antiviral yang sebanding dan kadang-kadang lebih besar daripada enansiomer berkonfigurasi D-, bersifat kurang toksik dan memiliki stabilitas metabolik yang lebih besar. Tahapan dalam siklus hidup virus hepatitis B yang diinhibisi oleh analog nukleosida termasuk sintesis utas DNA plus dan minus, amplifikasi dan pengisian jumlah cccDNA dalam nukleus hepatosit dari partikel *core* yang belum ber-*envelope* dan pembentukan cccDNA pada sel-sel yang baru terinfeksi (Karayiannis, 2003).

Lamivudine, juga dikenal sebagai 3TC atau Epivir, adalah L-enansiomer dari deoxycytidine analog 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. Lamivudine dimetabolisme dalam hepatosit menjadi triphosphate yang aktif. Triphosphate ini akan bekerja menterminasi sintesis DNA virus dan menghambat secara kompetitif *reverse transcriptase* virus. Lamivudine efektif baik terhadap virus *wild-type* maupun terhadap virus yang mengalami varian pada regio *promoter precore* dan *core*. Terdapat bukti bahwa pengobatan dengan lamivudine dapat mengatasi rendahnya respons sel T sitotoksik yang terjadi pada penderita yang terinfeksi virus hepatitis B secara kronik. Lamivudine diberikan secara oral dan dosis yang direkomendasikan untuk dewasa adalah 100 miligram (mg)/hari, sedangkan untuk anak-anak adalah 1 mg/kilogram (kg) berat badan/hari dan dapat ditingkatkan hingga 100 mg/hari. Durasi pengobatan adalah satu tahun pada penderita yang HBeAg negatif dan dapat diperpanjang lebih dari satu tahun pada penderita yang anti-HBe positif (Karayiannis, 2003).

Pengobatan jangka panjang dengan menggunakan lamivudine terbukti efektif untuk mensupresi replikasi virus (Karayiannis, 2003). Berbagai studi klinis mengenai pengobatan lamivudine pada infeksi virus hepatitis B kronik memperlihatkan bahwa terapi jangka pendek tidak cukup untuk memusnahkan virus, namun terapi jangka panjang dikaitkan dengan peningkatan timbulnya galur virus hepatitis B yang resisten terhadap lamivudine (Kamiya, 2003). Timbulnya mutan yang resisten terhadap lamivudine seiring dengan lamanya pengobatan (Karayiannis, 2003). Efikasi lamivudine dibatasi oleh adanya mutasi motif YMDD (tirosin-metionin-aspartat-aspartat) pada regio *reverse transcriptase*. Berdasarkan sebuah studi prospektif jangka panjang yang dilakukan di Asia, peluang terjadinya mutasi YMDD adalah 14% pada tahun pertama, 38% pada tahun ke-dua, 57% pada tahun ke-tiga dan 67% pada tahun ke-empat (Yuen *et al.*, 2004).



Gambar 2.10 Skematik *domain* polimerase virus hepatitis B.

Domain reverse transcriptase berlokasi di tengah. Karena posisi asam amino dari *conserved motif* bervariasi antar genotipe virus hepatitis B, maka dibuat sebuah sistem penomoran asam amino yang terstandarisasi. Substitusi asam amino dari galur virus hepatitis B yang resisten terhadap lamivudine juga diperlihatkan (Kamiya, 2003).

Polimerase dibagi dalam empat *domain*, tiga *domain* di antaranya bersifat fungsional, yaitu *terminal protein* yang berfungsi untuk *DNA priming*, *reverse transcriptase* dan RNase H yang berfungsi untuk mendegradasi pgRNA. Regio *spacer* yang belum diketahui fungsinya terletak di antara *domain terminal protein* dan *domain reverse transcriptase*. Regio *reverse transcriptase* sedikitnya terdiri dari lima *subdomain*, yaitu A-E, yang secara spasial terpisah namun terkait erat dengan fungsi normal protein (Karayiannis, 2003).

Polimerase virus hepatitis B, seperti halnya polimerase yang bergantung RNA lainnya, mengandung motif YMDD yang karakteristik pada *catalytic site*, yang berada pada *subdomain* C. Substitusi asam amino yang paling umum dikaitkan dengan resistensi lamivudine terjadi pada *subdomain* B dan C. Hal ini terjadi sebagai akibat mutasi titik pada sekuens nukleotida yang akan mempengaruhi kodon terkait. Substitusi asam amino yang mempengaruhi resistensi obat predominan mengenai motif YMDD, di mana metionin pada posisi 552 diganti baik oleh valin (YVDD) maupun oleh isoleusin (YIDD) (Karayiannis, 2003).

Mutasi utama ini hampir selalu dikaitkan dengan mutasi kedua pada *subdomain* B, substitusi leusin dengan metionin pada posisi 528 (L528M). Sistem penomoran tersebut berdasarkan penomoran asam amino pada genotipe A. Pada sistem penomoran yang baru yang distandardisasi untuk semua genotipe, asam amino dari setiap *domain* polimerase diberi nomor secara terpisah. Dengan demikian, penomoran mutasi M552V/I menjadi rtM204V/I dan mutasi L528M menjadi rtL180M (Karayiannis, 2003).

Virus hepatitis B yang memiliki kedua mutasi ini memperlihatkan resistensi silang, baik terhadap lamivudine maupun terhadap famciclovir (Kamiya, 2003). Mutasi YMDD menyebabkan reduksi afinitas lamivudine pada *domain reverse transcriptase*, dan perubahan asam aminonya mempengaruhi susunan spasial yang tepat yang diperlukan untuk fungsi yang optimum selama katalisis (Karayiannis, 2003).

2.7 Epidemiologi dan Prevensi Hepatitis B

Hepatitis B merupakan salah satu dari beberapa penyakit utama manusia dan merupakan masalah kesehatan masyarakat global yang serius. Sekitar dua milyar orang (WHO, 2000) yang mencakup lebih dari sepertiga penduduk dunia telah terinfeksi virus hepatitis B. Lebih dari 350 juta orang di antaranya menjadi pengidap virus hepatitis B (Zuckerman, 1999) yang sebagian besar berada di Asia atau Afrika (Horvat & Tegtmeier, 2003). Sekitar seperempat dari pengidap tersebut berkembang menjadi hepatitis B kronik aktif. Di seluruh dunia, sekitar satu juta kematian terjadi setiap tahunnya karena sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler yang berkaitan dengan infeksi virus hepatitis B (Brooks *et al.*, 2004).

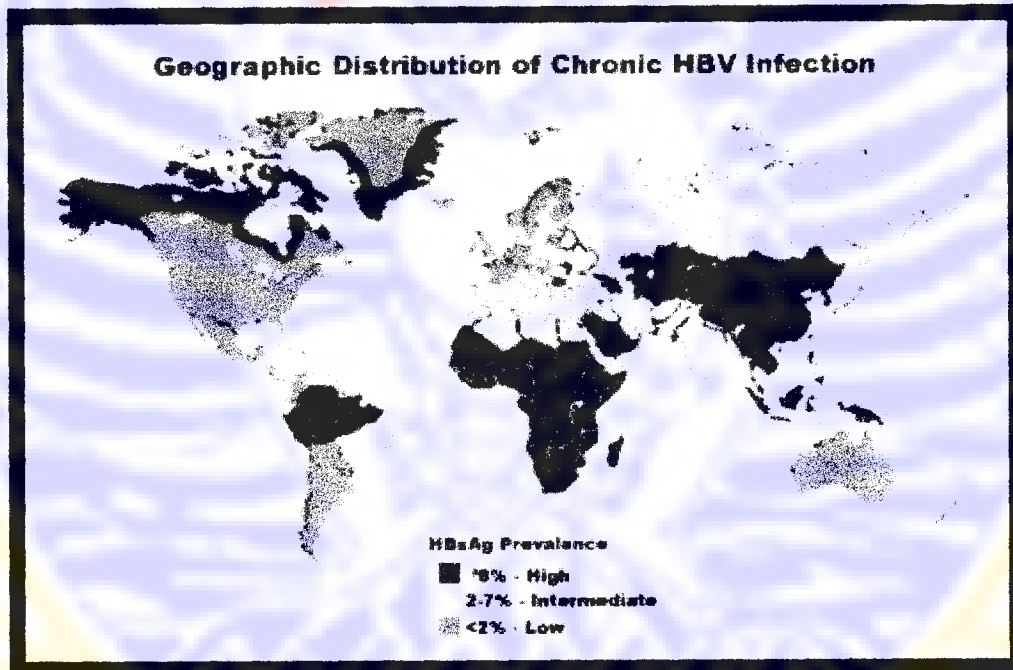
Persentase pengidap virus hepatitis B pada populasi mulai kurang dari 2% di area dengan tingkat endemisitas rendah hingga lebih dari 8% sampai 20% di area dengan tingkat endemisitas tinggi (Kordi & Wallace, 2004). Di berbagai negara, angka pengidap virus hepatitis B berkaitan dengan modus transmisi yang predominan dan umur pada saat mendapatkan infeksi (Horvat & Tegtmeier, 2003).

Tabel 2.2 Tingkat endemisitas hepatitis B (Kordi & Wallace, 2004).

Tingkat Endemisitas	Persentase Pengidap di Populasi	Umur pada Saat Mendapatkan Infeksi
Tinggi	> 8	Sebagian besar pada periode perinatal dan anak-anak
Sedang	2-8	Anak-anak dan dewasa
Rendah	< 2	Sebagian besar dewasa muda dan dewasa berisiko tinggi

Keterangan :

- ♣ Asia Tenggara, Cina dan Afrika termasuk area dengan endemisitas tinggi.
- ♣ Amerika Utara, Eropa Barat dan Australia termasuk area dengan endemisitas rendah.



Gambar 2.11 Distribusi geografik infeksi virus hepatitis B kronik. Setiap area di wilayah suatu negara dapat memperlihatkan prevalensi HBsAg yang bervariasi (CDC, 2003d).

Area dengan tingkat endemisitas rendah termasuk Amerika Utara, Eropa Barat dan Australia yang sebagian kecil populasinya adalah pengidap sebagai akibat transmisi horisontal di antara penduduk dewasa mudanya. Sedangkan area dengan tingkat endemisitas tinggi termasuk Asia Tenggara,

Cina dan Afrika yang lebih dari 8% populasinya adalah pengidap, baik sebagai akibat transmisi vertikal maupun transmisi horisontal dari satu anak ke anak lainnya (Lee, 1997).

Salah satu upaya prevensi hepatitis B adalah melalui pemberian vaksin dan atau *Hepatitis B immune globulin* (HBIG). Vaksin mengandung HBsAg yang diproduksi ragi melalui teknik rekombinan DNA. Vaksin sangat efektif untuk mencegah hepatitis B dan memiliki sedikit efek samping. HBIG mengandung anti-HBs dengan titer yang tinggi, karena diperoleh dari penderita yang telah sembuh dari hepatitis B. HBIG digunakan untuk memberikan proteksi pasif yang cepat kepada individu yang terpapar darah yang mengandung HBsAg. Vaksin hepatitis B dan HBIG dapat diberikan secara bersamaan dalam kasus-kasus tertentu sebagai imunisasi pasif-aktif untuk memberikan proteksi segera dan jangka panjang (Levinson & Jawetz, 2003).

2.8 Transmisi Hepatitis B

Virus hepatitis B ditransmisikan melalui paparan transkutan atau permukosal terhadap darah atau cairan tubuh individu yang mengalami infeksi virus hepatitis B akut atau kronik. Konsentrasi tertinggi virus hepatitis B berada di darah, sementara itu konsentrasi sedang berada di semen, cairan vagina dan saliva (CDC, 2003e). Tiga modus transmisi hepatitis B adalah melalui darah, hubungan seksual dan secara vertikal dari ibu kepada bayinya selama periode perinatal (Levinson & Jawetz, 2003; dan Hou *et al.*, 2005). Di

daerah endemik hepatitis B seperti Asia dan Afrika, modus transmisi yang predominan adalah secara vertikal dan secara horisontal pada anak-anak. Sedangkan di daerah non endemik, transmisi hepatitis B terutama terjadi secara parenteral dan seksual pada remaja dan dewasa (Brooks *et al.*, 2004).

Pengguna obat-obatan secara intravena dan penerima transfusi darah, termasuk pasien hemodialisis merupakan kelompok risiko tinggi (Levinson & Jawetz, 2003). Risiko transmisi hepatitis B melalui transfusi darah telah berkurang secara drastis dengan diterapkannya uji saring HBsAg secara rutin untuk semua darah donor (Brooks *et al.*, 2004). Pemakaian metode uji saring HBsAg dengan sensitivitas yang semakin meningkat telah menurunkan terjadinya hepatitis B akibat transfusi darah di Inggris menjadi 1:50.000-170.000 dan di Amerika Serikat menjadi 1:63.000. Namun demikian, secara teoritis transmisi hepatitis B masih mungkin terjadi apabila pendonor darah sedang berada pada *window phase*. Hasil negatif palsu juga bisa terjadi apabila pendonor darah merupakan pengidap dengan level HBsAg rendah, sehingga HBsAg tidak terdeteksi oleh metode uji saring dengan tingkat sensitivitas tertentu (Regan *et al.*, 2000).

Virus ber-*envelope* seperti halnya virus hepatitis B lebih sensitif terhadap lingkungan daripada virus tidak ber-*envelope*, sehingga lebih efisien bila ditransmisikan melalui kontak erat, termasuk hubungan seksual (Levinson & Jawetz, 2003), baik heteroseksual maupun homoseksual. Risiko transmisi perinatal kepada bayi sebesar 90% jika ibunya HBeAg positif dan 10% jika ibunya HBsAg positif namun HBeAg negatif (Horvat & Tegtmeyer, 2003).

HBsAg juga dapat dideteksi dengan konsentrasi rendah pada cairan tubuh lainnya, termasuk air mata, keringat, urine, feses, air susu ibu, cairan serebrospinal dan cairan sinovial. Namun, berbagai cairan tubuh tersebut tidak dikaitkan dengan transmisi hepatitis B (CDC, 2003e).

2.9 Subtipe Virus Hepatitis B

Pada tahun 1971, Le Bouvier memaparkan dua determinan subtipe yang bersifat *mutually exclusive*, yaitu *d* dan *y*. Determinan subtipe ini berada di protein permukaan bersama dengan determinan antigenik umum *a* yang telah dipaparkan sebelumnya oleh Levene dan Blumberg pada tahun 1969. Determinan subtipe lainnya, *w* dan *r*, dipaparkan oleh Bancroft *et al.* pada tahun 1972, yang juga menyatakan bahwa setiap galur virus hepatitis B dapat dikarakterisasi ke dalam empat subtipe mayor, yaitu *adw*, *adr*, *ayw* atau *ayr* (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Pada tahun 1975, Couroucé *et al.* memperkenalkan subdeterminan *w* (*w1-w4*), sehingga dikenal subtipe *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4* dan *adr*. Pada tahun yang sama, Magnius *et al.* mengidentifikasi determinan *q* (Magnius & Norder, 1995). Pada awalnya, determinan *q* dinyatakan terdapat pada semua subtipe kecuali *adw4*, namun kemudian diketahui tidak terdapat pada subtipe *adr* di regio Pasifik (Kramvis *et al.*, 2005). Pembagian subtipe *adr* menjadi subdivisi *q*-positif dan *q*-negatif yang diperkenalkan oleh Couroucé-Pauty *et al.* pada tahun 1978 menambah kompleksitas subtipe virus hepatitis B. Pada saat ini, telah dikenal sembilan subtipe, yaitu *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* dan *adrq+* (Magnius & Norder, 1995).

Determinan subtype diekspresikan melalui substitusi sebuah asam amino dengan arginin menunjukkan *y*. Pada posisi 160, substitusi dengan lisin menunjukkan *w*, sedangkan substitusi dengan arginin menunjukkan *r*. Substitusi asam amino tersebut terjadi sebagai akibat mutasi titik, yang mengubah asam amino 122 dan atau 160 dari lisin menjadi arginin atau sebaliknya (Okamoto *et al.*, 1988). Reaktivitas determinan subtype lainnya telah dipetakan pada posisi asam amino 127, 134, 159 (Kramvis *et al.*, 2005) serta 158, 159, 177 dan 178 (Norder *et al.*, 1994).

Tabel 2.3 Asam amino yang menentukan determinan HBsAg (Norder *et al.*, 1994; dan Kramvis *et al.*, 2005).

Posisi	Asam Amino	Spesifisitas
122	Lisin	<i>d</i>
	Arginin	<i>y</i>
127	Prolin	<i>w1</i> * / <i>w2</i>
	Treonin	<i>w3</i>
	Leusin	<i>w4</i>
134	Tirosin	<i>ayw2</i> / <i>ayw3</i>
	Fenilalanin	<i>ayw1</i> / <i>ayw4</i> / <i>adw2</i> / <i>adw4</i>
158	Leusin	<i>adw4q-</i>
159	Alanin	<i>ayw1</i>
	Valin	<i>adrq-</i>
160	Lisin	<i>w</i>
	Arginin	<i>r</i>
177	Alanin	<i>adrq-</i>
178	Glutamin	<i>adw4q-</i>

Keterangan :

- * Reaktivitas *w1* juga memerlukan asam amino Arg¹²², Phe¹³⁴ dan atau Ala¹⁵⁹.
- Subtipe *adrq-* memerlukan substitusi dengan asam amino Val¹⁵⁹ dan atau Ala¹⁷⁷.
- Subtipe *adw4q-* memerlukan substitusi dengan asam amino Leu¹⁵⁸ dan atau Gln¹⁷⁸.

Penentuan sub tipe virus hepatitis B telah digunakan untuk tujuan epidemiologi (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002) dan antropologi (Mulyanto *et al.*, 1997). Sub tipe virus hepatitis B memperlihatkan distribusi yang berbeda secara geografis dan dapat memberikan informasi historik tentang migrasi nenek moyang penduduk setempat yang membawa sub tipe virus hepatitis B tertentu (Okamoto *et al.*, 1988). Dalam beberapa kasus, penentuan sub tipe virus hepatitis B juga dipergunakan untuk melacak rantai infeksi nosokomial atau untuk menemukan korelasi antara penyakit dan sub tipe tertentu. Dalam dekade terakhir, penentuan sub tipe secara bertahap digantikan oleh penentuan genotipe (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002).

Penentuan sub tipe virus hepatitis B dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, yaitu (1) *enzyme immunoassay* (EIA) dengan menggunakan antibodi monoklonal (Swenson *et al.*, 2001) dan (2) sekuensing yang dilanjutkan dengan menganalisis substitusi asam amino pada posisi tertentu pada gen S (Liu *et al.*, 2002).

2.10 Genotipe Virus Hepatitis B

Pengklasifikasian sub tipe virus hepatitis B yang lebih dahulu dikenal dapat dilengkapi atau digantikan dengan pengklasifikasian berbagai galur virus hepatitis B ke dalam sub grup genetik. Penentuan genotipe ini ditentukan berdasarkan divergensi 8% atau lebih sekuens nukleotida keseluruhan genom virus hepatitis B. Terpecahnya nukleotida pada keseluruhan genom memungkinkan penentuan genotipe dilakukan dengan sekuensing hanya

beberapa ratus nukleotida DNA virus hepatitis B (Okamoto *et al.*, 1988). Pada level gen S, genotipe virus hepatitis B dapat ditentukan berdasarkan divergensi 4% atau lebih (Magnius & Norder, 1995) dengan hasil yang konsisten dengan sekuensing pada keseluruhan genom virus hepatitis B (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997). Pada saat ini, delapan genotipe virus hepatitis B yang diberi tanda A hingga H telah teridentifikasi di seluruh dunia (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1994; Stuyver *et al.*, 2000; dan Arauz-Ruiz *et al.*, 2002).

Tabel 2.4 Hubungan antara genotipe dan subtipe virus hepatitis B serta distribusi geografisnya (Arauz-Ruiz *et al.*, 2002; Kao, 2002; dan Kramvis *et al.*, 2005).

Genotipe	Subtipe Terkait	Area Geografi
A	<i>adw2, ayw1</i>	Eropa Utara dan Barat, Amerika Serikat, Afrika Tengah
B	<i>adw2</i> <i>ayw1</i> <i>adr*</i>	Indonesia, Cina, Jepang Indonesia, Vietnam, Filipina, Brazil, Asia Tenggara Venezuela
C	<i>adrq+</i> <i>adrq-</i> <i>adw2</i> <i>ayr</i> <i>ayw3</i>	Korea, Cina, Jepang Polinesia Asia Timur, Jepang, Filipina Vietnam Aborigin (Australia)
D	<i>ayw2, ayw3</i>	Mediteran, India, Eropa Timur, Uni Soviet, Afrika Tengah, Timur dan Barat
E	<i>ayw4</i>	Afrika Barat
F	<i>adw4q-</i> , <i>adw2*</i> , <i>ayw4*</i>	Amerika Tengah dan Selatan, Polinesia
G	<i>adw2</i>	Perancis, Amerika Serikat
H	<i>adw4</i>	Nikaragua, Meksiko, Kalifornia

Keterangan :

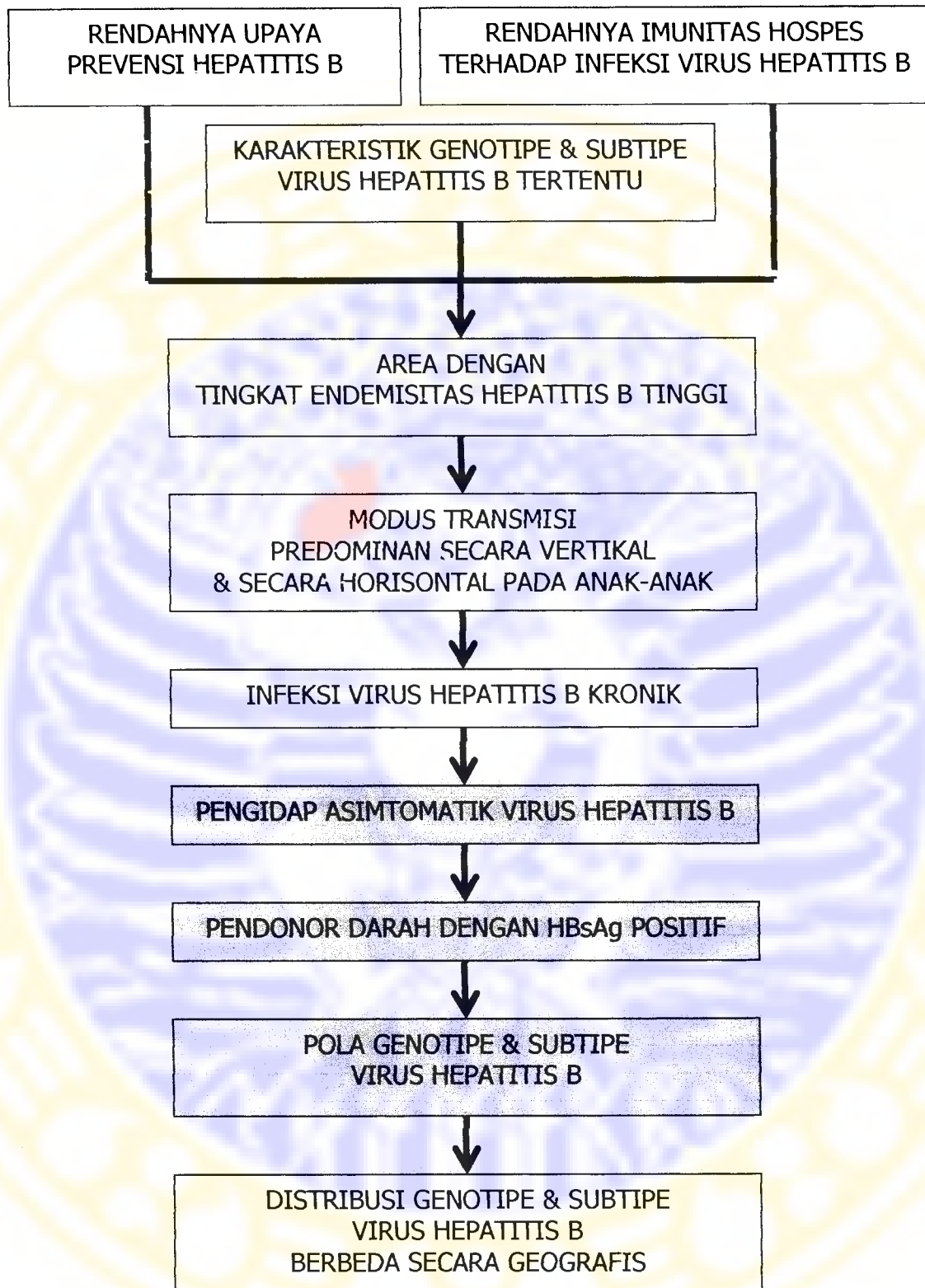
* * jarang ditemukan.

Genotipe virus hepatitis B juga memperlihatkan distribusi yang berbeda secara geografis (Magnius & Norder, 1995). Prevalensi berbagai genotipe virus hepatitis B di suatu area geografi dapat merefleksikan pola migrasi tertentu (Kidd-Ljunggren *et al.*, 2002). Setiap genotipe virus hepatitis B memperlihatkan perbedaan dalam karakteristik virologik, karakteristik klinik dan status serologik (Kao, 2002; dan Kidd-Ljunggren *et al.*, 2004). Sebagai contoh, mutasi *precore stop codon* lebih sering terjadi pada virus hepatitis B genotipe B daripada genotipe C. Manifestasi klinis dan respons terhadap terapi antivirus lebih buruk pada penderita yang terinfeksi virus hepatitis B genotipe C daripada genotipe B (Kao, 2002).

Penentuan genotipe virus hepatitis B dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, yaitu (1) sekuensing yang dilanjutkan dengan perbandingan homologi (analisis filogenetik), (2) *polymerase chain reaction* (PCR) *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), (3) PCR dengan *primer* spesifik-genotipe (Kao, 2002), (4) *reverse-phase hybridization line probe assay* (LiPA) (Blitz *et al.*, 1998; dan Swenson *et al.*, 2001) dan (5) *serologic genotyping assay, enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap epitop pre-S2 yang spesifik-genotipe (Usuda *et al.*, 1999; dan Moriya *et al.*, 2002).

BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN**

Tingginya tingkat endemisitas hepatitis B di suatu area geografi dipengaruhi oleh rendahnya upaya prevensi antara lain melalui pemberian vaksin hepatitis B kepada kelompok sasaran, rendahnya status imunitas hospes terhadap infeksi virus hepatitis B dan karakteristik genotipe dan sub tipe virus hepatitis B tertentu. Pada area dengan tingkat endemisitas hepatitis B yang tinggi, modus transmisi yang predominan adalah secara vertikal dari ibu kepada bayinya dan secara horisontal pada anak-anak (Lee, 1997; dan Brooks *et al.*, 2004). Sekitar 80%-90% bayi yang terinfeksi selama tahun pertama kehidupannya dan sekitar 30%-50% anak-anak yang terinfeksi saat berumur satu sampai empat tahun akan mengarah pada infeksi virus hepatitis B kronik (CDC, 2003c). Sebagian besar di antaranya akan menjadi pengidap seumur hidup (Zuckerman, 1999) tanpa memberikan gejala penyakit, sehingga disebut sebagai pengidap asimtomatik (Kao *et al.*, 2002). Pendonor darah dengan HBsAg positif merupakan kelompok pengidap asimtomatik virus hepatitis B. Pemeriksaan serum pada pendonor darah dengan HBsAg positif di suatu area geografi dapat memberikan gambaran pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B. Virus hepatitis B memiliki distribusi genotipe dan sub tipe yang berbeda secara geografis (Magnius & Norder, 1995).



Gambar 3.1 Bagan kerangka konseptual penelitian.
Bagian yang diteliti pada penelitian ini ditandai dengan

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional deskriptif (Friedman, 1993). Penelitian ini mendeskripsikan secara faktual pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.

Ditinjau dari aspek waktu pengumpulan data, penelitian ini termasuk rancangan penelitian *cross sectional*. Ditinjau dari ada atau tidak adanya perlakuan, penelitian ini termasuk rancangan penelitian *expost facto*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah seluruh pendonor darah di Unit Transfusi Darah (UTD) Palang Merah Indonesia (PMI) Cabang Jayapura.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah pendonor darah dengan HBsAg positif dari populasi pendonor darah di UTD PMI Cabang Jayapura.

4.2.3 Kriteria sampel

Kriteria inklusi sampel adalah pendonor darah dengan HBsAg positif di UTD PMI Cabang Jayapura pada periode pengambilan sampel, yang bersedia mengikuti penelitian dan menandatangani Lembar Persetujuan Mengikuti Penelitian (*Informed Consent*) (lihat Lampiran 1) dan Lembar Persetujuan Tindakan Medik (lihat Lampiran 2).

Kriteria eksklusi sampel adalah pendonor darah dengan HBsAg positif di UTD PMI Cabang Jayapura pada periode pengambilan sampel yang menolak mengikuti penelitian dan menolak menandatangani Lembar Persetujuan Mengikuti Penelitian (*Informed Consent*) dan Lembar Persetujuan Tindakan Medik.

4.2.4 Teknik pengambilan dan jumlah sampel

Pengambilan sampel menggunakan salah satu teknik *non random sampling*, yaitu *quota sampling*.

Sampel penelitian dianggap cukup bila telah mencapai jumlah 40-50 sampel.

4.3 Definisi Operasional Variabel

1. Genotipe virus hepatitis B adalah pengklasifikasian virus hepatitis B ke dalam delapan genotipe, yaitu A, B, C, D, E, F, G dan H (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1994; Stuyver *et al.*, 2000; dan Arauz-Ruiz *et al.*,

2002). Genotipe virus hepatitis B juga dapat ditentukan berdasarkan divergensi 4% atau lebih pada level gen S dari genom virus hepatitis B (Magnius & Norder, 1995). Penentuan genotipe dapat dilakukan dengan sekuensing hanya beberapa ratus nukleotida pada gen S genom virus hepatitis B (Okamoto *et al.*, 1988) dengan hasil yang konsisten dengan sekuensing pada keseluruhan genom virus hepatitis B (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997). Dalam penelitian ini, penentuan genotipe didasarkan pada persentase homologi lebih dari 96% yang diperhitungkan dari sekuens 411 nukleotida pada genotipe A, B, D dan 420 nukleotida pada genotipe C, E, F, G, H untuk produk PCR *first-round* serta 204 nukleotida pada genotipe A-H untuk produk PCR *second-round*.

2. Subtipe virus hepatitis B adalah pengklasifikasian virus hepatitis B ke dalam sembilan subtipe, yaitu *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* dan *adrq+* (Magnius & Norder, 1995). Dalam penelitian ini, subtipe virus hepatitis B ditentukan berdasarkan substitusi asam amino 122, 127, 134, 158, 159, 160, 177 dan 178 pada level gen S (Okamoto *et al.*, 1988; Norder *et al.*, 1994; dan Kramvis *et al.*, 2005).
3. Pendonor darah adalah orang yang memberikan darahnya melalui pelayanan yang dilakukan oleh UTD PMI Cabang Jayapura. Pendonor darah meliputi pendonor darah sukarela dan pengganti. Pendonor darah sukarela adalah pendonor darah yang menyumbangkan darahnya tanpa berkaitan dengan suatu kasus darurat medis tertentu, dilakukan dengan sukarela atas kemauan sendiri tanpa maksud untuk mendapatkan imbalan jasa atau bersifat tidak komersial. Pendonor darah pengganti adalah

pendonor darah yang memberikan darahnya berkaitan dengan suatu kasus darurat medis tertentu. Pendonor darah pengganti meliputi pendonor darah pengganti keluarga dan komersial. Pendonor darah pengganti keluarga adalah pendonor darah pengganti yang berasal dari keluarga, teman atau tetangga penderita yang membutuhkan darah, yang melakukan donor darah tanpa maksud untuk mendapatkan imbalan jasa atau bersifat tidak komersial. Pendonor darah pengganti komersial adalah pendonor darah pengganti yang melakukan donor darah untuk maksud mendapatkan imbalan jasa atau bersifat komersial.

4. Uji saring HBsAg adalah uji saring untuk deteksi HBsAg dengan metode kualitatif yang secara rutin digunakan di UTD PMI Cabang Jayapura, yaitu metode *immunochromatography*. Batas sensitivitas analitik uji ini adalah sampai 1,0 nanogram (ng) HBsAg/mililiter (ml) (*Program for Appropriate Technology in Health*, 2003). Penentuan HBsAg dilanjutkan dengan metode ELISA yang dapat mendeteksi HBsAg sampai 0,1 ng/ml (Horvat & Tegtmeier, 2003).
5. Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, adalah area geografi yang mencakup wilayah administrasi Kabupaten Jayapura dan Kotamadya Jayapura yang berada di Provinsi Papua, Indonesia.
6. Kelompok etnis adalah pengelompokkan pendonor darah yang spesimen serumnya dipakai dalam penelitian ini berdasarkan etnis dengan menelusurinya sampai satu generasi ke atas melalui wawancara. Dalam penelitian ini, etnis pendonor darah digolongkan menjadi dua kelompok, yaitu etnis Papua dan etnis non Papua. Pendonor darah yang kedua orang

tuanya berasal dari berbagai suku asli di Papua dimasukkan ke dalam kelompok etnis Papua, sedangkan pendonor darah dengan kondisi etnis yang lain dimasukkan ke dalam kelompok etnis non Papua.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Pengambilan spesimen darah

1. Spuit steril 5 ml.
2. Kapas alkohol.
3. Masker.
4. Sarung tangan.
5. Tabung eppendorf 1,5 ml steril.
6. Label.
7. Parafilm.
8. Lembar isian data, Lembar Persetujuan Mengikuti Penelitian (*Informed Consent*) dan Lembar Persetujuan Tindakan Medik.

4.4.2 Uji saring HBsAg dengan metode *immunochromatography*

1. Spesimen serum.
2. entebe HBsAg Strip (Laboratorium Hepatika, Mataram, Indonesia).

4.4.3 Penentuan HBsAg dengan metode ELISA

1. Spesimen serum.

2. Hepalisa HBsAg (Indec Diagnostics, Jakarta, Indonesia).
3. *Yellow tips*.

4.4.4 Ekstraksi DNA

1. Spesimen serum.
2. Kontrol positif.
3. Kontrol negatif (akuadestilata).
4. DNAzol Reagent (Invitrogen).
5. Etanol absolut.
6. Etanol 75%.
7. Akuadestilata.
8. *Yellow* dan *blue tips* steril.
9. Tabung eppendorf 1,5 ml steril.
10. *Plastic wrap*.

4.4.5 Amplifikasi DNA

A. Amplifikasi DNA dengan PCR :

1. Hasil ekstraksi DNA.
2. *Primers* untuk PCR *first-round* mengamplifikasi 541 *base pairs* (bp) pada gen S (Lusida *et al.*, 2003) :

♣ *Sense* : P7 (5'-GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC-3')

pada posisi 256-278; 100 *picomol* (pmol)/mikroliter (μ l).

♣ *Anti sense* : P8 (5'-CGG TAW^[A/T] AAA GGG ACT CAM^[A/C] GAT-3')
pada posisi 796-776; 100 pmol/ μ l.

Primers untuk PCR *second-round* mengamplifikasi 259 bp pada gen S
(Lusida *et al.*, 2003) :

♣ *Sense* : HBS1 (5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3')
pada posisi 455-474; 100 pmol/ μ l.

♣ *Anti sense* : HBS2 (5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3')
pada posisi 713-694; 100 pmol/ μ l.

3. *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTP) 10 milimolar (mM) (Takara Shuzo Co., Ltd., Jepang).
4. *Thermus thermophilus* (Tth) DNA polymerase 2 unit (U)/ μ l (Toyobo Co., Ltd., Jepang).
5. *Mineral oil* (Sigma Chemical Co., Amerika Serikat).
6. Akuadestilata.
7. *Yellow* dan *blue tips* steril.
8. Tabung eppendorf 0,5 ml dan 1,5 ml steril.

B. Deteksi produk PCR dengan elektroforesis :

1. Produk PCR.
2. Gel agarose (biasa) 2% dengan ethidium bromide 10 mg/ml.
3. *TBE buffer* 0,5x.
4. *Loading buffer* (promphenol blue dan glycerol).
5. Marker 4 ϕ X174 /*Hae* III digest 0,02 mikrogram (μ g)/ μ l (Wako, Nippon Gene, Jepang).

6. Parafilm.
7. Film polaroid.

4.4.6 Purifikasi produk PCR

A. Purifikasi produk PCR :

1. Produk PCR.
2. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).
3. *Yellow* dan *blue tips* steril.
4. Tabung eppendorf 1,5 ml steril.

B. Deteksi hasil purifikasi produk PCR dengan elektroforesis :

1. Hasil purifikasi produk PCR.
2. Gel agarose (biasa) 2% dengan ethidium bromide 10 mg/ml.
3. *TBE buffer* 0,5x.
4. *Loading buffer* (bromphenol blue dan glycerol).
5. Marker 4 ϕ X174 / *Hae* III digest 0,02 μ g/ μ l (Wako, Nippon Gene, Jepang).
6. Akuadestilata.
7. Parafilm.
8. Film polaroid.

4.4.7 Labeling

1. Hasil purifikasi produk PCR.

2. *Primers sense* (P7 untuk produk PCR *first-round* dan HBS1 untuk produk PCR *second-round*) 1 pmol/ μ l.
3. Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Amerika Serikat).
4. Akuadestilata.
5. *Yellow tips* steril.
6. *Microtube* 200 μ l steril.

4.4.8 Purifikasi pro sekuensing DNA

1. *Sequencing mixture*.
2. *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) 125 mM.
3. Etanol absolut.
4. Etanol 70%.
5. *Yellow tips* steril.
6. Tabung eppendorf 1,5 ml steril.
7. *Plastic wrap*.
8. *Aluminium foil*.

4.4.9 Sekuensing DNA

1. *Pellet* DNA kering.
2. *Template suppresion reagent* (TSR) (Applied Biosystems, Amerika Serikat).
3. *Yellow tips* steril.
4. *Microfuge* steril.

4.5 Instrumen penelitian

1. *Thermal Cycler* :
 - ♣ Untuk amplifikasi DNA : PJ 2000 (Perkin Elmer).
 - ♣ Untuk *labeling* : GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).
GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer).
2. ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) yang dilengkapi perangkat komputer dan *printer*.
3. *Microcentrifuge* : High Speed Micro Refrigerated Centrifuge MRX-150 (Tomy).
4. *Freezer* :
 - ♣ PMI : Multiflow DR 3200 [-20°C] (Daichi).
 - ♣ TDC : Ultra Low [-80°C dan -30°C] (Sanyo).
5. Transilluminator UVP Chromato-vue Model NTM-20 dengan kamera polaroid Mamiya RB67 Pro SD 45 mm.
6. *Biosafety Cabinet* : Bio Clean Bench MCV-16BSF (Sanyo).
7. *Waterbath* : Thermo Supplier EZL-80 (Taitec).
8. *Hot air oven* : Thermotec Sterilizer ST-450 (Sibata).
9. Mikropipet 20 µl, 200 µl dan 1.000 µl.
10. *Spin-down machine* : Millipore.
11. Vorteks : Genie-2; TME-21 Test Tube Mixer (Advantec).
12. *Refrigerator* : SR-33M (Sanyo); MR-087W (Mitsubishi).
13. Pompa vakum.
14. *ELISA reader* : Humareader Single.

15. *Plate washing equipment* : Humawash.
16. Inkubator dengan temperatur 37°C.
17. *Reaction plate* dan penutup berwarna gelap.
18. *Absorbent pad*.
19. *Electrophoresis gel apparatus* : Mupid (Advance Co. Ltd.).
20. *Tray* dan *comb* untuk pembuatan gel agarose.
21. Timbangan analitik.
22. Tabung Erlenmeyer.
23. Gelas ukur.
24. *Microwave* (Sanyo).
25. Tabung reaksi.
26. Pinset.
27. Pengukur waktu.
28. Rak tabung eppendorf.
29. Kontainer berisi sodium hipoklorit 5%.
30. *Ice box* dan *ice pack*.
31. Komputer dengan perangkat lunak Genetyx-Mac version 10.1.2 (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Jepang).

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Pengambilan spesimen darah dari pendonor darah dilaksanakan di UTD PMI Cabang Jayapura. Penentuan HBsAg dengan metode ELISA dilaksanakan di sebuah laboratorium swasta di Surabaya. Sedangkan ekstraksi, amplifikasi

dan sekuensing DNA dilaksanakan di Laboratorium Hepatitis *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya.

4.6.2 Waktu penelitian

Pengambilan spesimen darah dari pendonor darah dilaksanakan dari bulan September 2004 sampai dengan bulan Januari 2005. Sedangkan ekstraksi, amplifikasi dan sekuensing DNA dilaksanakan dari bulan Juni 2005 sampai dengan bulan Oktober 2005.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengambilan spesimen darah

1. Setiap pendonor darah diberikan penjelasan tentang tujuan penelitian dan prosedur tindakan medik yang akan dilakukan. Setiap pendonor darah yang bersedia dimintakan persetujuannya dengan menandatangani sendiri atau diwakili Lembar Persetujuan Mengikuti Penelitian (*Informed Consent*) dan Lembar Persetujuan Tindakan Medik, yang juga ditandatangani oleh seorang saksi. Lembar isian data pendonor darah dilengkapi.
2. Darah diambil secara aseptik melalui *vena cubiti* sebanyak 5 ml dengan menggunakan spuit steril 5 ml.
3. Spuit diberi label. Sementara menunggu hasil uji saring HBsAg yang dikerjakan secara rutin di UTD PMI Cabang Jayapura (lihat Prosedur 4.7.2), spuit diletakkan pada posisi vertikal dengan ujung jarum spuit di bawah.

4. Bila hasil uji saring memperlihatkan HBsAg positif, maka darah dalam spuit diendapkan dengan cara didiamkan pada posisi vertikal sampai serum terpisah dan tampak jernih.
5. Serum diambil dengan menggunakan spuit steril lainnya melalui bagian pangkal spuit berisi serum dan di-*aliquot* ke dalam tiga buah tabung eppendorf 1,5 ml steril masing-masing sebanyak kurang lebih 1 ml.
6. Tabung eppendorf ditutup rapat dan dilapisi parafilm serta diberi label kode spesimen, selanjutnya disimpan (lihat Prosedur 4.7.3).

4.7.2 Uji saring HBsAg dengan metode *immuno chromatography*

1. Uji saring HBsAg dilakukan dengan metode *immuno chromatography* menggunakan entebe HBsAg Strip (Laboratorium Hepatika, Mataram, Indonesia).
2. Spesimen serum sebanyak 100 μ l ditempatkan pada sebuah tabung reaksi.
3. Ujung *strip* dimasukkan pada spesimen serum.
4. Dalam 10 menit, hasil uji dibaca. Hasil uji dinyatakan positif, apabila tampak dua garis merah pada *strip*. Hasil uji dinyatakan negatif, apabila hanya tampak garis merah kontrol pada *strip*. Hasil uji dinyatakan tidak valid, apabila tidak tampak garis merah kontrol atau tidak tampak kedua garis merah pada *strip* atau pembacaan hasil uji dilakukan setelah 10 menit.

4.7.3 Penyimpanan dan pengiriman spesimen serum

1. Spesimen serum disimpan dalam *freezer* pada temperatur -20°C sampai dilakukannya pengiriman ke Surabaya.
2. Pengiriman dilakukan dengan menempatkan tabung eppendorf berisi spesimen serum pada rak tabung eppendorf, selanjutnya dimasukkan dalam sebuah *ice box* yang diberi *ice pack* secukupnya.
3. Pengiriman spesimen serum dari Jayapura ke Surabaya dilakukan via udara dalam waktu kurang dari enam jam dengan dilengkapi Surat Keterangan Layak Terbang.
4. Spesimen serum disimpan dalam *freezer* pada temperatur -80°C di Laboratorium Hepatitis TDC Universitas Airlangga Surabaya sampai dilakukannya tahapan penelitian selanjutnya.

4.7.4 Penentuan HBsAg dengan metode ELISA

1. Penentuan HBsAg dilakukan dengan metode ELISA menggunakan Hepalisa HBsAg (Indec Diagnostics, Jakarta, Indonesia).
2. Semua reagen dan spesimen serum ditempatkan pada temperatur ruangan sebelum pemeriksaan dilakukan.
3. Spesimen serum masing-masing sebanyak $50\ \mu\text{l}$ dimasukkan ke dalam sebuah *well* yang sudah dilapisi dengan anti-HBs. Kontrol positif masing-masing sebanyak $50\ \mu\text{l}$ dimasukkan ke dalam 2 *well* dan kontrol negatif

masing-masing sebanyak 50 μ l dimasukkan ke dalam 3 *well*. Dua *well* dibiarkan dalam keadaan kosong dan diperlakukan sebagai *blank*.

4. Larutan Anti-HBs•Peroxidase sebanyak 50 μ l ditambahkan ke dalam masing-masing *well*, kecuali 2 *well* sebagai *blank*.
5. Dicampur secara perlahan dengan menggoyang *reaction plate* selama kurang lebih 20 detik.
6. *Reaction plate* ditutup dengan rapat menggunakan *adhesive slip*.
7. Diinkubasi dalam inkubator selama 80 menit pada temperatur 37°C.
8. *Adhesive slip* dilepaskan dan dilakukan pencucian dengan menggunakan *washing solution D concentrate* yang telah didilusi dengan akuadestilata dengan perbandingan 1:20. Pencucian dilakukan dengan menambahkan sedikitnya 0,5 ml larutan pencuci yang merendam setiap *well* selama 30 detik. Pencucian diulang sebanyak 5 kali siklus.
9. Sisa cairan dalam *well* dikeringkan dengan membalikkan *reaction plate* dan mengetukkannya secara berulang dan perlahan di atas *absorbent pad*.
10. *Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution A* dan *TMB substrate solution B* dicampur dengan perbandingan yang sama sejumlah volume yang diperlukan. Campuran tersebut sebanyak 100 μ l ditambahkan ke dalam masing-masing *well* termasuk 2 *well* sebagai *blank*. Campur secara perlahan.
11. *Reaction plate* ditutup dengan penutup berwarna gelap dan diinkubasi selama 30 menit pada temperatur ruangan.
12. H₂SO₄ 2N sebanyak 100 μ l ditambahkan ke dalam masing-masing *well* termasuk 2 *well* sebagai *blank*.

13. *Absorbance* masing-masing kontrol dan spesimen ditentukan dengan menggunakan *ELISA reader* (Humareader Single) pada panjang gelombang 450/650 nm.
14. Rata-rata *absorbance* kontrol positif ditentukan, yang nilainya harus sama dengan atau lebih besar dari 0,6. Rata-rata *absorbance* kontrol negatif ditentukan, yang nilainya harus sama dengan atau lebih kecil dari 0,1. Selisih nilai rata-rata *absorbance* kontrol positif dan nilai rata-rata *absorbance* kontrol negatif dihitung, yang nilainya harus sama dengan atau lebih besar dari 0,5. Apabila nilai-nilai yang didapat sebaliknya, maka uji dianggap tidak valid dan harus diulang. Uji juga dianggap tidak valid dan harus diulang apabila warna cairan dalam 2 *well* sebagai *blank* bukan tidak berwarna atau kuning muda.
15. *Cut-off value* ditentukan dengan menambahkan nilai rata-rata *absorbance* kontrol negatif dengan 0,025. Spesimen yang nilai *absorbance*-nya lebih kecil dari *cut-off value* dinyatakan non reaktif dan dianggap HBsAg negatif. Sedangkan spesimen yang nilai *absorbance*-nya sama dengan atau lebih besar dari *cut-off value* dinyatakan *initially reactive*. Spesimen diuji ulang sebelum dilakukan interpretasi. Apabila hasilnya masih reaktif, maka dinyatakan *repeatably reactive* dan dianggap HBsAg positif.

4.7.5 Ekstraksi DNA

1. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan DNAzol Reagent (Invitrogen).

2. Spesimen serum, kontrol positif dan kontrol negatif masing-masing sebanyak 60 μ l ditempatkan pada sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril dan ditambahkan DNAzol Reagent sebanyak 600 μ l.
3. Kedua bahan dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet.
4. Disentrifus dengan kecepatan 12.000 *rounds per minute* (rpm) selama 10 menit pada temperatur 4°C.
5. Supernatan sebanyak 540 μ l diaspirasi dan dipindahkan ke dalam sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril yang baru.
6. Etanol absolut sebanyak 540 μ l ditambahkan ke dalam tabung, kemudian dibolak-balik sebanyak 6 kali.
7. Diinkubasi selama 20 menit pada temperatur ruangan.
8. Disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada temperatur 4°C.
9. Supernatan diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer berisi sodium hipoklorit 5%.
10. Etanol 75% sebanyak 1.000 μ l ditambahkan ke dalam tabung, dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet, kemudian dibolak-balik sebanyak 6 kali.
11. Diinkubasi selama 3 menit pada temperatur ruangan.
12. Disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada temperatur 4°C.
13. Supernatan diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer berisi sodium hipoklorit 5%.

14. Tabung berisi *pellet* DNA dalam keadaan terbuka dibungkus dengan *plastic wrap* dan dikeringkan menggunakan pompa vakum selama 10 menit.
15. *Pellet* DNA kering disuspensikan dengan akuadestilata sebanyak 20 μl , kemudian di-*spin down*.

4.7.6 Amplifikasi DNA

A. Amplifikasi DNA dengan PCR :

1. *Reaction mixture* dibuat dalam sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril dengan komposisi :
 - ♣ dNTP 10 mM sebanyak 8 μl .
 - ♣ *Primer* P7 100 pmol/ μl sebanyak 0,5 μl .
 - ♣ *Primer* P8 100 pmol/ μl sebanyak 0,5 μl .
 - ♣ *Reaction buffer* 10x sebanyak 9 μl .
 - ♣ Akuadestilata ditambahkan hingga volume total mencapai 89 μl .Di-vorteks dan di-*spin down*.
2. Hasil ekstraksi DNA sebanyak 10 μl ditempatkan pada sebuah tabung eppendorf 0,5 ml steril dan ditambahkan *reaction mixture* sebanyak 89 μl , dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet dan di-*spin down*.
3. Dimasukkan ke dalam blok dan *Thermal Cycler* PJ 2000 (Perkin Elmer) dijalankan:
 - ♣ selama 5 menit pada temperatur 94°C.
 - ♣ pada temperatur 72°C : tabung di-*spin down* dan ditambahkan Tth DNA polymerase (Toyobo Co., Ltd., Jepang) sebanyak 1 μl , dicampur

dengan hati-hati menggunakan mikropipet, selanjutnya ditambahkan *mineral oil* sebanyak 100 μl .

4. PCR *first-round* dijalankan sebanyak 40 siklus dengan tahapan setiap siklusnya sebagai berikut :

- ♣ *Denaturation* : selama 1 menit pada temperatur 94°C.
- ♣ *Annealing* : selama 1 menit pada temperatur 55°C.
- ♣ *Extension* : selama 2 menit pada temperatur 72°C.

5. Selanjutnya dilakukan deteksi produk PCR *first-round* dengan elektroforesis (lihat B).

6. Apabila hasil deteksi produk PCR *first-round* negatif, maka dilakukan PCR *second-round* dengan prosedur dan kondisi siklus yang sama seperti PCR *first-round*. Komposisi *reaction mixture*-nya adalah sebagai berikut :

- ♣ dNTP 10 mM sebanyak 8 μl .
- ♣ *Primer* HBS1 100 pmol/ μl sebanyak 0,5 μl .
- ♣ *Primer* HBS2 100 pmol/ μl sebanyak 0,5 μl .
- ♣ *Reaction buffer* 10x sebanyak 9,25 μl .
- ♣ Akuadestilata ditambahkan hingga volume total mencapai 91,5 μl .

Produk PCR *first-round* yang digunakan sebanyak 7,5 μl , Tth DNA polymerase sebanyak 1 μl dan *mineral oil* sebanyak 100 μl . Selanjutnya produk PCR *second-round* dideteksi dengan elektroforesis (lihat B).

7. Produk PCR *first-round* atau *second-round* yang terdeteksi positif dengan elektroforesis dilakukan purifikasi produk PCR (lihat Prosedur 4.7.7).

B. Deteksi produk PCR dengan elektroforesis :

1. Gel agarose (biasa) 2% yang mengandung etnidium bromide diletakkan dalam *electrophoresis gel apparatus* dan ditambahkan *TBE buffer* 0,5x hingga gel terendam seluruhnya.
2. Marker 4 ϕ X174 / *Hae* III digest yang telah dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 3 μ l diaplikasikan ke dalam gel.
3. Produk PCR sebanyak 10 μ l diambil dari bawah lapisan *mineral oil* dan dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet dengan *loading buffer* sebanyak 1,5 μ l yang telah diteteskan di atas parafilm. Selanjutnya diaplikasikan ke dalam gel tanpa interval.
4. *Electrophoresis gel apparatus* ditutup dan dijalankan pada 100 volt dari kutub negatif ke kutub positif sampai warna biru terletak di antara dua garis pada ujung gel.
5. Dilihat di bawah sinar ultraviolet menggunakan Transilluminator UVP Chromato-vue Model NTM-20 dan didokumentasikan dengan kamera polaroid Mamiya RB67 Pro SD 45 mm.

4.7.7 Purifikasi produk PCR

A. Purifikasi produk PCR :

1. Purifikasi produk PCR dilakukan dengan QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).
2. *Buffer PB* sebanyak 500 μ l ditambahkan ke dalam sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril berisi produk PCR sebanyak 100 μ l beserta *mineral oil*-nya, selanjutnya di-vorteks.

3. Sebuah *spin column* steril ditempatkan pada sebuah *collection tube* 2 ml steril.
4. Seluruh campuran (item 2) dimasukkan ke dalam *spin column*, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
5. Cairan dalam *collection tube* dibuang ke dalam kontainer dan *collection tube* digunakan kembali untuk *spin column* yang sama.
6. *Buffer PE* (yang telah ditambah etanol absolut) sebanyak 750 μ l ditambahkan ke dalam *spin column*, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
7. Cairan dalam *collection tube* dibuang ke dalam kontainer dan *collection tube* digunakan kembali untuk *spin column* yang sama.
8. Disentrifus pada kecepatan 15.000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* beserta isinya dibuang ke dalam kontainer.
9. *Spin column* ditempatkan pada sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril.
10. *Buffer EB* sebanyak 30 μ l ditambahkan langsung di bagian tengah membran pada *spin column*.
11. Diinkubasi selama 1 menit pada temperatur ruangan, selanjutnya disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
12. *Spin column* dibuang ke dalam kontainer, sedangkan tabung eppendorf berisi hasil purifikasi produk PCR ditutup.
13. Selanjutnya dilakukan deteksi hasil purifikasi produk PCR dengan elektroforesis (lihat B). Hasil purifikasi produk PCR yang terdeteksi positif dengan elektroforesis dilakukan *labeling* (lihat Prosedur 4.7.8).

B. Deteksi hasil purifikasi produk PCR dengan elektroforesis :

1. Gel agarose (biasa) 2% yang mengandung ethidium bromide diletakkan dalam *electrophoresis gel apparatus* dan ditambahkan *TBE buffer* 0,5x hingga gel terendam seluruhnya.
2. Marker 4 ϕ X174 / *Hae* III digest yang telah dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 3 μ l diaplikasikan ke dalam gel.
3. Hasil purifikasi produk PCR sebanyak 2 μ l diambil dan dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet dengan *loading buffer* sebanyak 1,5 μ l dan akuadestilata sebanyak 5 μ l yang telah diteteskan di atas parafilm, selanjutnya diaplikasikan ke dalam gel tanpa interval.
4. *Electrophoresis gel apparatus* ditutup dan dijalankan pada 100 volt dari kutub negatif ke kutub positif sampai warna biru terletak di antara dua garis pada ujung gel.
5. Dilihat di bawah sinar ultraviolet menggunakan Transilluminator UVP Chromato-vue Model NTM-20 dan didokumentasikan dengan kamera polaroid Mamiya RB67 Pro SD 45 mm.

4.7.8 Labeling

1. *Labeling* dilakukan dengan menggunakan Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Amerika Serikat).
2. *Sequencing mixture* dibuat dalam sebuah *microtube* 200 μ l steril dengan komposisi :
 - ♣ *Sequencing buffer* 5x sebanyak 2 μ l.

- ♣ *Primer P7* (untuk hasil purifikasi produk PCR *first-round*) dan *primer* HBS1 (untuk hasil purifikasi produk PCR *second-round*) 1 pmol/ μ l sebanyak 3,2 μ l.
 - ♣ *Ready reaction mix* sebanyak 4 μ l.
 - ♣ Hasil purifikasi produk PCR dengan volume tergantung konsentrasi DNA.
 - ♣ Akuadestilata ditambahkan hingga volume total mencapai 20 μ l.
3. Di-vorteks dan di-*spin down*, selanjutnya ditempatkan pada blok dan dimasukkan ke dalam *Thermal Cycler* GeneAmp PCR System 2400 atau 9700 (Perkin Elmer).
 4. *Thermal Cycler* diatur hingga mencapai temperatur 96°C dan dijalankan selama 1 menit. PCR dijalankan sebanyak 25 siklus dengan tahapan setiap siklusnya sebagai berikut :
 - ♣ *Denaturation* : selama 30 detik pada temperatur 96°C.
 - ♣ *Annealing* : selama 15 detik pada temperatur 50°C.
 - ♣ *Extension* : selama 4 menit pada temperatur 60°C.Setelah siklus selesai, didinginkan hingga temperatur 4°C.

4.7.9 Purifikasi pro sekuensing DNA

1. Purifikasi pro sekuensing DNA dilakukan dengan presipitasi etanol/EDTA.
2. *Microtube* berisi 20 μ l *sequencing mixture* dikeluarkan dari *Thermal Cycler* dan di-*spin down*, selanjutnya diaspirasi dan dipindahkan ke dalam sebuah tabung eppendorf 1,5 ml steril.

3. EDTA 125 mM sebanyak 5 μ l dan etanol absolut sebanyak 60 μ l ditambahkan ke dalam tabung, selanjutnya dicampur dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 4 kali.
4. Diinkubasi selama 15 menit pada temperatur ruangan.
5. Disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm selama 30 menit pada temperatur 4°C.
6. Supernatan diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer.
7. Etanol 70% sebanyak 60 μ l ditambahkan dengan hati-hati.
8. Disentrifus dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 4°C.
9. Supernatan diaspirasi dengan hati-hati dan dibuang ke dalam kontainer.
10. Tabung berisi *pellet* DNA dalam keadaan terbuka dibungkus dengan *plastic wrap* dan dikeringkan menggunakan pompa vakum selama 15 menit.
11. *Pellet* DNA kering dapat disimpan pada temperatur 4°C setelah tabung ditutup rapat dan dibungkus *aluminium foil*.

4.7.10 Sekuensing DNA

1. Sekuensing DNA dilakukan dengan menggunakan ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).
2. TSR (Applied Biosystems, Amerika Serikat) sebanyak 25 μ l ditambahkan pada tabung berisi *pellet* DNA kering.
3. Di-vorteks dan selanjutnya dipanaskan pada temperatur 95°C selama 5 menit.

4. Diinkubasi dalam es selama 10 menit dan selanjutnya di-*spin down*.
5. Diaspirasi dan dipindahkan ke dalam sebuah *microfuge* steril.
6. Dijalankan pada ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Electropherogram - sebagai hasil sekuensing DNA - yang kualitasnya baik akan diolah lebih lanjut. Dengan menggunakan perangkat lunak komputer Genetyx-Mac version 10.1.2, sekuens nukleotida virus hepatitis B sampel penelitian dibandingkan dengan sekuens nukleotida virus hepatitis B yang diperoleh dari bank data DNA internasional (*DNA Data Bank of Japan (DDBJ)/European Molecular Biology Laboratory (EMBL)/GenBank*) dengan nomor akses untuk setiap genotipe adalah sebagai berikut (lihat Lampiran 3) :

- ♣ Genotipe A : S50225.
- ♣ Genotipe B : D00330.
- ♣ Genotipe C : X75656.
- ♣ Genotipe D : M32138.
- ♣ Genotipe E : X75664.
- ♣ Genotipe F : X69798.
- ♣ Genotipe G : AF160501.
- ♣ Genotipe H : AY090454.

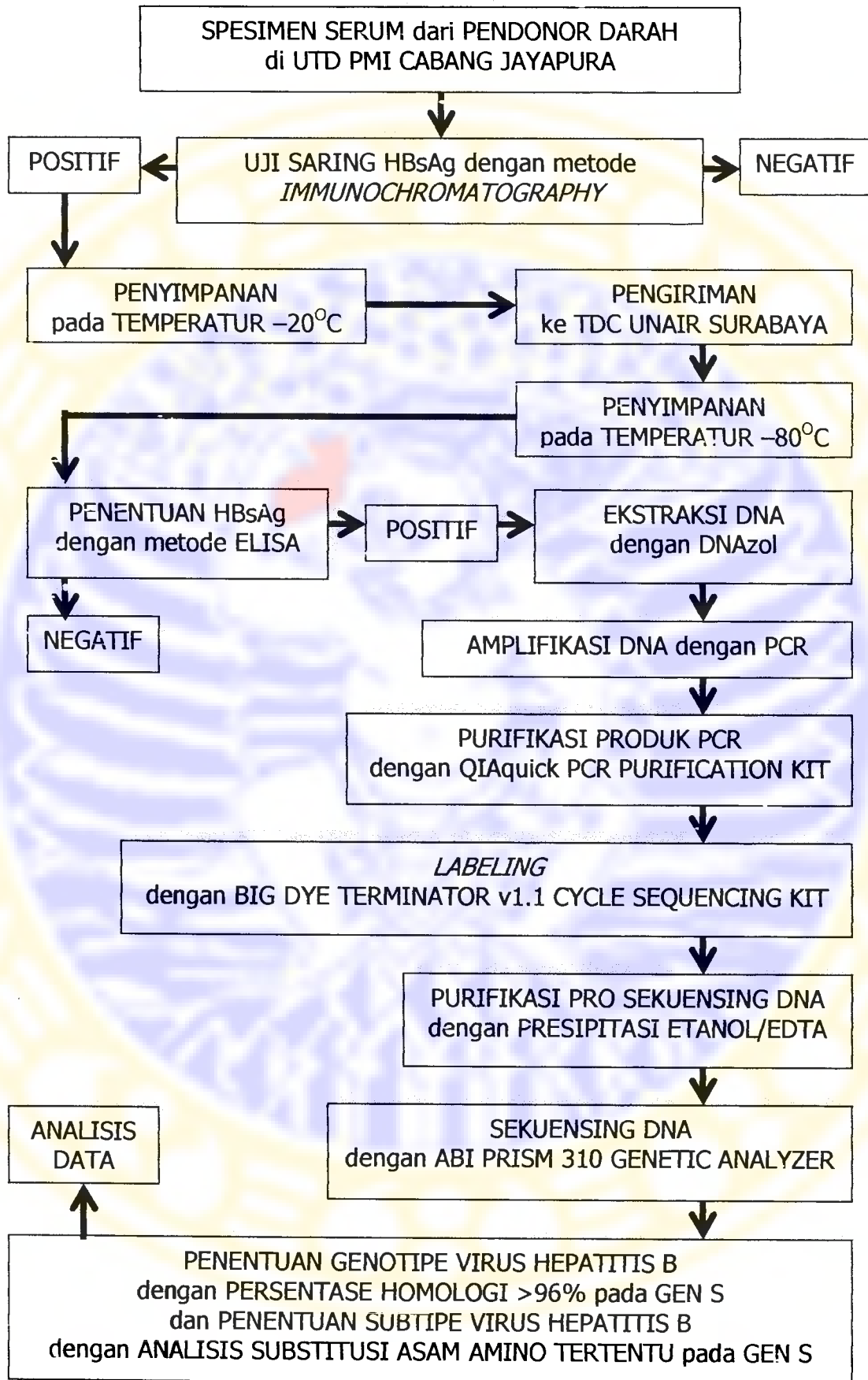
Persentase homologi sekuens nukleotida sampel penelitian dengan sekuens nukleotida virus hepatitis B dari genotipe tertentu yang lebih dari 96,0% menunjukkan genotipe virus hepatitis B pada sampel penelitian.

Analisis filogenetik dilakukan dengan metode fenetik dengan mengkalkulasi kemiripan sekuens nukleotida. Selanjutnya, dendrogram atau pohon filogenetik direkonstruksi dengan *clustering algorithm* menggunakan *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages* (UPGMA) *clustering* memakai perangkat lunak komputer Genetyx-Mac version 10.1.2. Beberapa sekuens nukleotida virus hepatitis B lainnya yang diperoleh dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank) juga ditambahkan dengan nomor akses sebagai berikut (lihat Lampiran 3) :

- ♣ Genotipe A : X51970.
- ♣ Genotipe B : D23678, D00329.
- ♣ Genotipe C : L08805, AY123041, X01587, V00867, X14193, M54892, X75665.
- ♣ Genotipe D : J02203.
- ♣ Genotipe E : X75657.
- ♣ Genotipe F : X75658.
- ♣ Genotipe H : AY090460.

Sekuens nukleotida sampel penelitian dikonversi menjadi asam amino dan dilakukan *multiple alignment*. Penentuan sub tipe virus hepatitis B dilakukan dengan menganalisis substitusi asam amino 122, 127, 134, 158, 159, 160, 177 dan 178 pada gen S.

Data-data hasil penelitian lainnya diolah, disajikan dan dianalisis dengan statistik deskriptif.



Gambar 4.1 Bagan alur penelitian.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

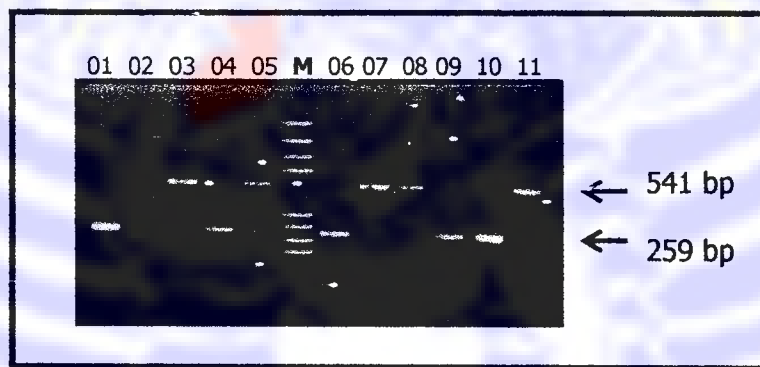
5.1 Data Penelitian

Uji saring HBsAg dengan metode *immunochemistry* dilakukan terhadap 925 spesimen serum yang berasal dari pendonor darah di UTD PMI Cabang Jayapura. Empat puluh tiga (4,6%) dari 925 spesimen serum tersebut memenuhi kriteria inklusi sampel untuk tahapan selanjutnya sebagai sampel penelitian.

Empat puluh dua (97,7%) dari 43 sampel berasal dari pendonor darah laki-laki dan 1 (2,3%) sampel dari pendonor darah perempuan, dengan rentang usia 18,0-47,7 tahun, dan rata-rata usia 29,7 tahun. Tiga puluh enam (83,7%) dari 43 sampel berasal dari pendonor darah dengan etnis Papua dan 7 (16,3%) sampel dari pendonor darah dengan etnis non Papua. Tiga puluh (69,8%) dari 43 sampel berasal dari pendonor darah pengganti keluarga, 7 (16,3%) sampel dari pendonor darah sukarela dan 6 (13,9%) sampel dari pendonor darah pengganti komersial (lihat Lampiran 4).

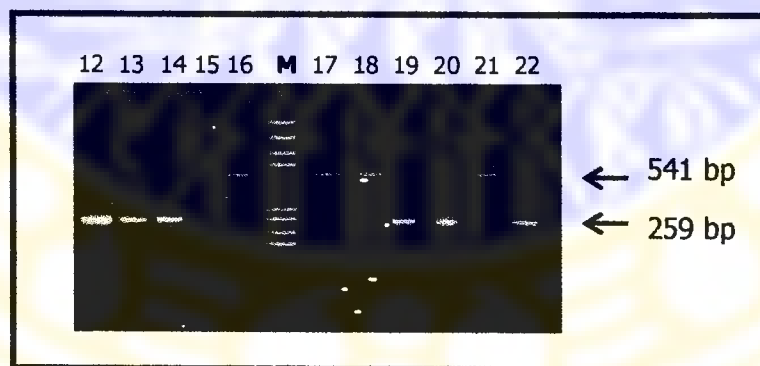
Pada penentuan HBsAg dengan metode ELISA, semua sampel memperlihatkan nilai *absorbance* yang lebih besar daripada *cut-off value* (lihat Lampiran 5). Dengan demikian, semua sampel yang dinyatakan HBsAg positif dengan metode *immunochemistry* juga dinyatakan HBsAg positif atau *repeatably reactive* dengan metode ELISA.

DNA virus hepatitis B terdeteksi pada 40 (93,0%) dari 43 sampel, sedangkan 3 (7,0%) sampel lainnya (nomor 02UC, 15UC dan 34UC) tidak terdeteksi. Tujuh belas (42,5%) dari 40 sampel terdeteksi DNA virus hepatitis B pada PCR *first-round* dengan *primers* P7-P8 menghasilkan pita DNA 541 bp, sedangkan 23 (57,5%) sampel lainnya terdeteksi pada PCR *second-round* dengan *primers* HBS1-HBS2 menghasilkan pita DNA 259 bp (lihat Lampiran 6).



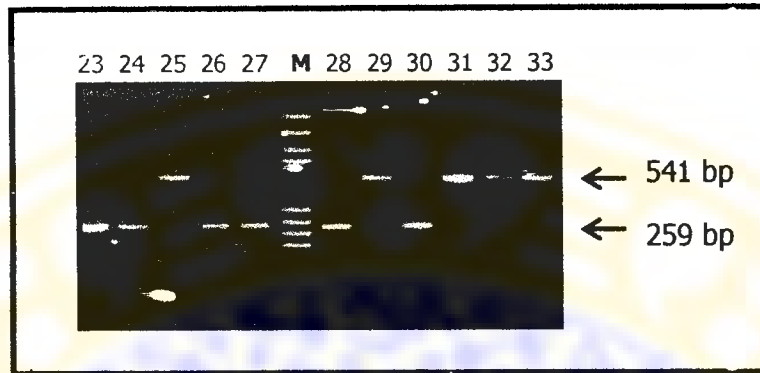
Gambar 5.1 Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 01UC-11UC.

Sampel nomor 03UC, 05UC, 07UC, 08UC dan 11UC positif pada PCR *first-round* (pita DNA pada 541 bp). Sampel nomor 01UC, 04UC, 06UC, 09UC dan 10UC positif pada PCR *second-round* (pita DNA pada 259 bp). Sampel nomor 02UC negatif. M : *marker* pita DNA.



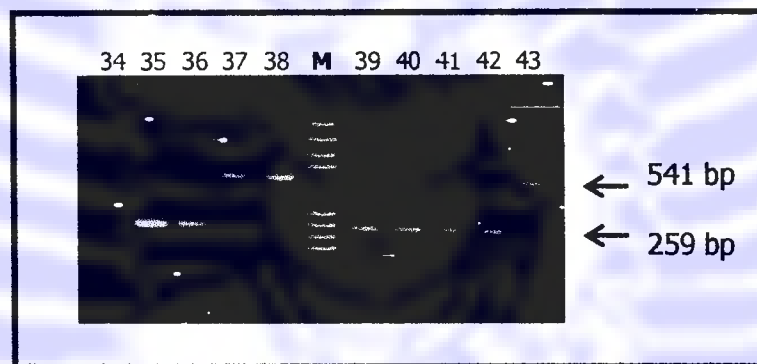
Gambar 5.2 Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 12UC-22UC.

Sampel nomor 16UC, 17UC, 18UC dan 21UC positif pada PCR *first-round* (pita DNA pada 541 bp). Sampel nomor 12UC, 13UC, 14UC, 19UC, 20UC dan 22UC positif pada PCR *second-round* (pita DNA pada 259 bp). Sampel nomor 15UC negatif. M : *marker* pita DNA.



Gambar 5.3 Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 23UC-33UC.

Sampel nomor 25UC, 29UC, 31UC, 32UC dan 33UC positif pada PCR *first-round* (pita DNA pada 541 bp). Sampel nomor 23UC, 24UC, 26UC, 27UC, 28UC dan 30UC positif pada PCR *second-round* (pita DNA pada 259 bp). M : *marker* pita DNA.



Gambar 5.4 Hasil elektroforesis DNA virus hepatitis B sampel nomor 34UC-43UC.

Sampel nomor 37UC, 38UC dan 43UC positif pada PCR *first-round* (pita DNA pada 541 bp). Sampel nomor 35UC, 36UC, 39UC, 40UC, 41UC dan 42UC positif pada PCR *second-round* (pita DNA pada 259 bp). Sampel nomor 34UC negatif. M : *marker* pita DNA.

Sekuensing DNA dilakukan terhadap keempat puluh sampel. Tiga belas (32,5%) dari 40 sampel (nomor 04UC, 09UC, 10UC, 12UC, 24UC, 26UC, 27UC, 28UC, 30UC, 36UC, 40UC, 41UC dan 42UC) memperlihatkan kualitas *electropherogram* yang *noise*, sehingga tidak diikuti dalam tahapan analisis selanjutnya (lihat Lampiran 6). Oleh karena limitasi waktu dan dana penelitian, maka tidak dilakukan pengulangan prosedur untuk mendapatkan kualitas *electropherogram* yang lebih baik pada ketiga belas sampel tersebut.

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Sekuens nukleotida dari 27 sampel dibandingkan dengan sekuens nukleotida virus hepatitis B yang diperoleh dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank).

Tabel 5.1 Pola genotipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan sebarannya menurut kelompok etnis.

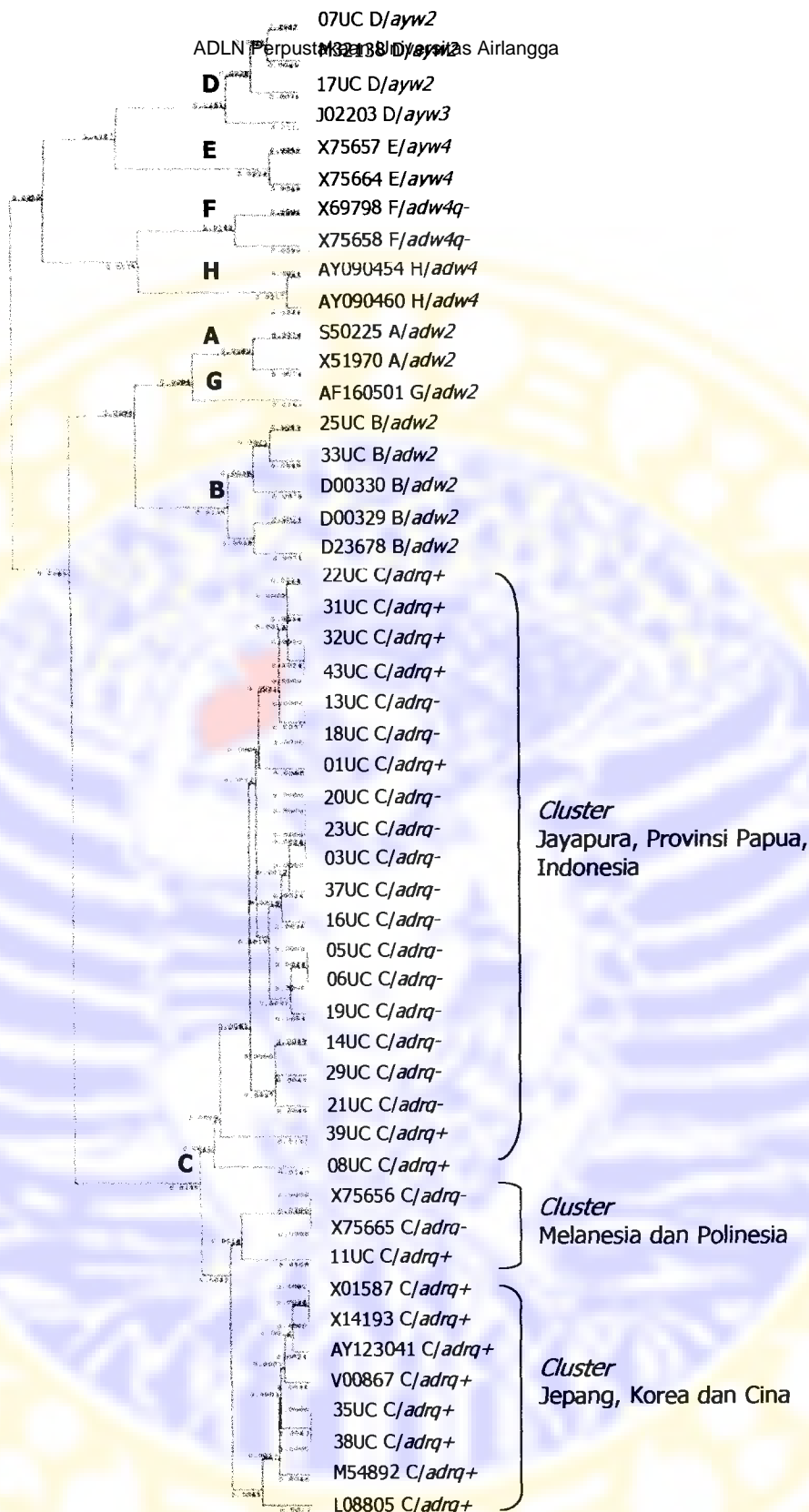
Genotipe	Kelompok Etnis		Jumlah Sampel
	Papua	Non Papua	
B	1 (4,3%)	1 (25,0%)	2 (7,4%)
C	22 (95,7%)	1 (25,0%)	23 (85,2%)
D	0	2 (50,0%)	2 (7,4%)
Total	23 (100,0%)	4 (100,0%)	27 (100,0%)

Hasil penelitian ini (lihat Tabel 5.1) memperlihatkan bahwa 23 (85,2%) dari 27 sampel termasuk genotipe C, 2 (7,4%) sampel termasuk genotipe B dan 2 (7,4%) termasuk genotipe D. Pada genotipe B, C dan D, homologi terendah masing-masing sebesar 98,1%, 96,7% dan 97,1%, sedangkan homologi tertinggi masing-masing sebesar 98,5%, 99,0% dan 98,3% (lihat Lampiran 7). Untuk sekuens nukleotida yang berasal dari produk PCR *first-round* dengan pita DNA pada 541 bp, persentase homologi diperhitungkan dari sekuens 411 nukleotida yaitu pada nukleotida 322-742 untuk genotipe B dan D serta sekuens 420 nukleotida yaitu pada nukleotida 322-751 untuk genotipe C. Sedangkan untuk sekuens nukleotida yang berasal dari produk PCR *second-round* dengan pita DNA pada 259 bp, persentase homologi

diperhitungkan dari sekuens 204 nukleotida yaitu pada nukleotida 500-703 untuk genotipe B, C dan D.

Dendrogram pada Gambar 5.5 memperlihatkan bahwa 2 sampel (nomor 25UC dan 33UC) berada dalam genotipe B, 2 (nomor 07UC dan 17UC) sampel dalam genotipe D dan 23 sampel lainnya dalam genotipe C. Analisis filogenetik (lihat Gambar 5.5) berdasarkan sebagian gen S mengelompokkan isolat virus hepatitis B genotipe C pada pendonor darah di Jayapura ke dalam tiga *cluster*, yaitu 20 (87,0%) dari 23 isolat dalam *cluster* pertama, 1 (4,3%) isolat (nomor 11UC) dalam *cluster* kedua bersama isolat dari Melanesia dan Polinesia serta 2 (8,7%) isolat (nomor 35UC dan 38UC) dalam *cluster* ketiga bersama isolat dari Jepang, Korea dan Cina.

Multiple alignment pada sekuens asam amino 116-183 yang disandi oleh nukleotida 500-703 pada gen S virus hepatitis B, yaitu 27 sekuens dari pendonor darah di Jayapura dan 22 sekuens dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank) diperlihatkan pada Gambar 5.6. Pada virus hepatitis B B/*adw2*, 1 (50,0%) dari 2 sampel mengalami substitusi sedikitnya satu asam amino dibandingkan dengan sekuens asam amino rujukannya; sedangkan pada C/*adrq+*, C/*adrq-* dan D/*ayw2* masing-masing 4 (40,0%) dari 10 sampel, 13 (100,0%) dari 13 sampel dan 1 (50,0%) dari 2 sampel. Satu (10,0%) dari 10 sampel (nomor 39UC) C/*adrq+* dan 4 (30,1%) dari 13 sampel (nomor 14UC, 19UC, 21UC dan 29UC) C/*adrq-* mengalami dua substitusi asam amino dibandingkan dengan sekuens asam amino rujukannya. Pada kedua puluh tujuh sampel, 55 (80,9%) dari 68 asam amino yaitu pada sekuens asam amino 116-183 bersifat *conserved*, sedangkan 13



Gambar 5.5 Pohon filogenetik atau dendrogram berdasarkan sekuens nukleotida 500-703 pada gen S berbagai genotipe virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura dan bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank).

Dua puluh tujuh isolat virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura dan 22 isolat virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank) dianalisis secara filogenetik menggunakan UPGMA clustering. Kode UC menunjukkan isolat Jayapura.

(19,1%) asam amino lainnya yaitu pada sekuens asam amino 117, 122-123, 126, 134, 143, 153, 159-161, 168, 177 dan 180, mengalami substitusi dengan satu atau dua asam amino lainnya. Asam amino Ile¹²⁶ merupakan asam amino yang karakteristik pada genotipe C yang mensubstitusi asam amino Thr¹²⁶, kecuali pada sampel nomor 11UC.

Dengan menganalisis substitusi asam amino Lys¹²² dan Arg¹⁶⁰ untuk sub tipe *adr*; Lys¹²², Pro¹²⁷, Phe¹³⁴ dan Lys¹⁶⁰ untuk sub tipe *adw2*; serta Arg¹²², Pro¹²⁷, Tyr¹³⁴ dan Lys¹⁶⁰ untuk sub tipe *ayw2*; dapat diketahui bahwa 23 (85,2%) dari 27 sampel termasuk sub tipe *adr*, 2 (7,4%) sampel termasuk sub tipe *adw2* dan 2 (7,4%) sampel termasuk sub tipe *ayw2* (lihat Tabel 5.2). Semua sub tipe *adr* termasuk dalam genotipe C, demikian pula semua sub tipe *adw2* dalam genotipe B dan semua sub tipe *ayw2* dalam genotipe D. Satu sampel etnis Papua termasuk dalam B/*adw2* dan satu sampel etnis non Papua termasuk dalam C/*adr*.

Tabel 5.2 Pola sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan sebarannya menurut kelompok etnis.

Sub tipe	Kelompok Etnis		Jumlah Sampel
	Papua	Non Papua	
<i>adw2</i>	1 (4,3%)	1 (25,0%)	2 (7,4%)
<i>adr</i>	22 (95,7%)	1 (25,0%)	23 (85,2%)
<i>ayw2</i>	0	2 (50,0%)	2 (7,4%)
Total	23 (100,0%)	4 (100,0%)	27 (100,0%)

Dengan menganalisis substitusi asam amino Ala¹⁵⁹ dengan Val¹⁵⁹ dan atau asam amino Val¹⁷⁷ dengan Ala¹⁷⁷ pada virus hepatitis B sub tipe *adr* dapat diketahui tidak adanya determinan *q*. Sejumlah virus hepatitis B sub tipe *adr*

dari pendonor darah di Jayapura memperlihatkan substitusi asam amino Val¹⁷⁷ dengan Ala¹⁷⁷, namun tidak ada substitusi asam amino pada posisi 159 (lihat Gambar 5.6). Hasil penelitian ini (lihat Tabel 5.3) memperlihatkan bahwa 13 (56,5%) dari 23 sampel virus hepatitis B subtipe *adr* tidak memiliki determinan *q*, sedangkan 10 (43,5%) sampel lainnya memiliki determinan *q*.

Tabel 5.3 Determinan *q* pada virus hepatitis B subtipe *adr* pada pendonor darah di Jayapura.

Determinan	Kelompok Etnis		Jumlah Sampel
	Papua	Non Papua	
<i>q+</i>	9 (40,9%)	1 (100,0%)	10 (43,5%)
<i>q-</i>	13 (59,1%)	0	13 (56,5%)
Total	22 (100,0%)	1 (100,0%)	23 (100,0%)

Pada sampel penelitian, substitusi asam amino pada posisi 160 yang menentukan determinan *w* atau *r* terjadi akibat mutasi titik tunggal yaitu transisi nukleotida A dengan G pada nukleotida 479, sehingga AAA untuk lisin menjadi AGA untuk arginin (lihat Tabel 5.4 dan Lampiran 8). Determinan *d* pada sampel penelitian ditentukan dengan asam amino posisi 122 yang memperlihatkan AAG pada subtipe *adr* dan AAA pada subtipe *adw2* untuk lisin. Substitusi dengan arginin menentukan determinan *y* pada sampel penelitian yang terjadi akibat dua sampai tiga mutasi titik sekaligus pada asam amino posisi 122. Pada nukleotida 364 terjadi transversasi nukleotida A dengan C yaitu AAG, AAA menjadi CGA, sedangkan pada nukleotida 365 dan 366 masing-masing terjadi transisi nukleotida A dengan G yaitu AAG, AAA menjadi CGA; dan nukleotida G dengan A yaitu AAG menjadi CGA.

Tabel 5.4 Sekuens nukleotida pada asam amino posisi tertentu terkait dengan penentuan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura.

Subtipe	Sekuens Nukleotida pada Asam Amino ke					
	122	127	134	159	160	177
<i>adrq+</i>	AAG (K)	-	-	GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)
<i>adrq-</i>	AAG (K)	-	-	GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)
<i>adw2</i>	AAA (K)	CCT (P)	TTT (F)	-	AAA (K)	-
<i>ayw2</i>	CGA (R)	CCT (P)	TAT (Y)	-	AAA (K)	-

Keterangan :

- ♣ A : alanin.
- ♣ F : fenilalanin.
- ♣ K : lisin.
- ♣ P : prolin.
- ♣ R : arginin.
- ♣ V : valin.
- ♣ Y : tirosin.

BAB 6

PEMBAHASAN

Pemilihan kelompok pendonor darah sebagai populasi dalam penelitian ini didasarkan pada pertimbangan limitasi waktu, tenaga dan dana penelitian serta kondisi daerah Jayapura, Provinsi Papua. Laporan Tahunan 2002-2004 UTD PMI Cabang Jayapura (lihat Lampiran 9) memperlihatkan bahwa 1,97%-4,88% dari sekitar 5.300-6.400 darah donor yang diterima dalam setahun adalah HBsAg positif (Asmunandar, 2002; Hutabarat, 2003; dan Hutabarat, 2004). Dengan demikian, pengambilan sampel penelitian pada pendonor darah di UTD PMI Cabang Jayapura memberikan peluang untuk menjangkit pengidap asimtomatik virus hepatitis B dalam jumlah yang dianggap cukup, yaitu 40-50 sampel dalam waktu relatif terbatas, yaitu sekitar 4-5 bulan.

Sekuensing keseluruhan genom virus yang dilanjutkan dengan analisis filogenetik merupakan standard baku penentuan genotipe virus hepatitis B (Kramvis *et al.*, 2005). Penentuan genotipe dapat dilakukan dengan sekuensing sebagian gen S virus hepatitis B (Okamoto *et al.*, 1988) dengan hasil yang konsisten dengan sekuensing pada keseluruhan genom virus (Arauz-Ruiz *et al.*, 1997). Metode ini relatif mahal, rumit dan memerlukan waktu yang lama. Namun, penelitian ini tidak melibatkan jumlah sampel dalam skala besar, sehingga metode ini dapat diaplikasikan pada penelitian ini. Metode lain yang lebih murah, lebih cepat dan lebih sederhana daripada sekuensing telah tersedia untuk penentuan genotipe virus hepatitis B dalam skala besar.

Penentuan subtipe virus hepatitis B dengan metode sekuensing dan analisis sekuens asam amino pada gen S, seperti yang dilakukan pada penelitian ini, memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode EIA. Metode sekuensing dapat membedakan subtipe *ayw1* dari *ayw2* pada isolat virus hepatitis B yang terdeteksi memiliki reaktivitas *ayw1* dan *ayw2* dengan metode EIA. Metode sekuensing juga dapat menjelaskan pola reaktivitas antibodi monoklonal atipikal yang mungkin timbul pada penentuan subtipe virus hepatitis B dengan metode EIA (Swenson *et al.*, 2001).

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa virus hepatitis B genotipe C predominan pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, diikuti dengan genotipe B dan genotipe D (lihat Tabel 5.1). Hasil ini mirip dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991, yang menyatakan bahwa semua dari 5 isolat virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura termasuk dalam genotipe C. Dilaporkan juga bahwa virus hepatitis B genotipe B, C dan D telah diisolasi dari berbagai kota lainnya di Indonesia, yaitu Jakarta, Padang, Manado, Bajawa dan Balikpapan. Pada tahun 2003, Lusida *et al.* melaporkan bahwa semua dari 54 isolat virus hepatitis B dari Surabaya, Provinsi Jawa Timur, termasuk dalam genotipe B; sedangkan genotipe D pernah teridentifikasi pada 2 isolat virus hepatitis B dari Jakarta (Sastrosoewignjo *et al.*, 1991). Pada penelitian Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991, tidak teridentifikasi adanya virus hepatitis B genotipe A atau E, demikian juga pada penelitian ini tidak teridentifikasi adanya virus hepatitis B genotipe A, E, F, G atau H pada isolat yang berasal dari Jayapura.

Kedelapan genotipe virus hepatitis B memperlihatkan distribusi yang berbeda secara geografis. Pada beberapa kasus, perbedaan distribusi genotipe virus hepatitis B dapat ditemukan juga di dalam satu negara, seperti pernah diobservasi di Cina, India dan Amerika Serikat. Distribusi genotipe virus hepatitis B dapat dipengaruhi oleh latar belakang etnis yang ada (Kramvis *et al.*, 2005). Indonesia adalah sebuah negara dengan lebih dari 300 kelompok etnis dan dikenal dengan semboyan nasionalnya *bhinneka tunggal ika*. Genotipe B tampaknya menjadi genotipe utama virus hepatitis B untuk daerah bagian barat Indonesia, sedangkan genotipe C untuk daerah bagian paling timur Indonesia, khususnya Provinsi Papua dan Provinsi Irian Jaya Barat, seperti yang dilaporkan oleh Nuraeny pada tahun 2005.

Dari laporan hasil penelitian Usuda *et al.* pada tahun 1999, ternyata walaupun Provinsi Papua dan Provinsi Irian Jaya Barat predominan virus hepatitis B genotipe C, namun berada dalam satu pulau dengan negara *Papua New Guinea* yang predominan genotipe B. Fenomena serupa juga dijumpai di Padang, Provinsi Sumatera Barat, yang predominan virus hepatitis B genotipe C, ternyata berada dalam satu pulau dengan Medan, Provinsi Sumatera Utara, dan Palembang, Provinsi Sumatera Selatan, yang predominan genotipe B (Nuraeny, 2005).

Pada laporan penelitian di Asia, virus hepatitis B genotipe B dan C secara epidemiologis prevalens di Asia. Virus hepatitis B genotipe B predominan di Indonesia, Vietnam dan Taiwan, sedangkan genotipe C predominan di Jepang, Korea, Cina, Thailand dan Myanmar (Kramvis *et al.*, 2005). Kedua genotipe virus hepatitis B ini telah diperbandingkan untuk berbagai

karakteristik klinik dan virologik. Virus hepatitis B genotipe C dikaitkan dengan tingkat positivitas HBeAg yang lebih tinggi, frekuensi mutasi *precore stop codon* yang lebih jarang (Kao, 2002) dan perjalanan penyakit yang lebih agresif daripada genotipe B (Chan *et al.*, 2003). Manifestasi klinis, baik sirosis hepatis maupun karsinoma hepatoseluler, lebih buruk pada penderita yang terinfeksi dengan virus hepatitis B genotipe C daripada genotipe B; demikian pula, virus hepatitis B genotipe C dikaitkan dengan respons yang lebih buruk terhadap terapi antivirus daripada genotipe B (Kao, 2002). Namun demikian, virus hepatitis B genotipe B di negara-negara Asia termasuk Indonesia (subgenotipe Ba, a untuk Asia) selain Jepang (subgenotipe Bj, j untuk Jepang), telah mengalami rekombinasi dengan genotipe C pada regio *precore* dan gen *core*. Rekombinasi ini meningkatkan kapasitas virus hepatitis B genotipe B untuk menginduksi penyakit yang lebih berat (Sugauchi *et al.*, 2002).

Huy *et al.* pada tahun 2004 menyatakan bahwa sedikitnya terdapat dua subgrup pada virus hepatitis B genotipe C, yaitu subgrup C1 isolat dari negara-negara di Asia Tenggara termasuk Vietnam, Myanmar dan Thailand dan subgrup C2 isolat dari negara-negara di Asia Timur Jauh termasuk Jepang, Korea dan Cina. Analisis filogenetik (lihat Gambar 5.5) berdasarkan sebagian gen S memperlihatkan bahwa 20 (87,0%) dari 23 isolat virus hepatitis B genotipe C dari Jayapura berada dalam satu *cluster* yang terpisah dari *cluster* Jepang, Korea dan Cina. Fenomena ini perlu dikonfirmasi dengan melakukan analisis filogenetik berdasarkan regio pre-S1 dan pre-S2 dari gen S atau keseluruhan genom virus dan mengikutsertakan isolat dari Vietnam,

Myanmar dan Thailand. Konfirmasi tersebut akan menegaskan apakah isolat virus hepatitis B genotipe C dari Jayapura memang tidak termasuk dalam subgrup C2 dan berada dalam satu *cluster* dengan subgrup C1.

Asam amino Ile¹²⁶ tampaknya merupakan asam amino yang karakteristik pada 22 (95,7%) dari 23 isolat virus hepatitis B genotipe C dari Jayapura, yang mensubstitusi asam amino Thr¹²⁶ pada ketujuh genotipe virus hepatitis B lainnya (lihat Gambar 5.6). Observasi ini mirip dengan pengamatan Sastrosoewignjo *et al.* pada tahun 1991 pada 20 (95,2%) dari 21 isolat virus hepatitis B genotipe C. Asam amino Ile¹²⁶ menandai salah satu dari dua alel determinan *a*, yaitu *t*, selain *i*, yang ditandai dengan asam amino Thr¹²⁶ (Kramvis *et al.*, 2005).

Norder *et al.* pada tahun 1994 mengobservasi bahwa bagian dari gen S, yaitu sekuens nukleotida 155-832 yang menyandi 226 asam amino merupakan bagian yang paling *conserved*, ketika seluruh regio penyandi dari genom virus hepatitis B diperbandingkan. Pada tingkat nukleotida, 555 (81,9%) dari 678 nukleotida pada gen S ini bersifat *conserved*. Analisis pada tingkat asam amino pada sebagian gen S menunjukkan bahwa 55 (80,9%) dari 68 asam amino yaitu pada sekuens 116-183 pada pendonor darah di Jayapura, juga bersifat *conserved*.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa virus hepatitis B sub tipe *adr* predominan pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, diikuti dengan sub tipe *adw2* dan sub tipe *ayw2* (lihat Tabel 5.2). Hasil ini mirip dengan observasi Sandjaya *et al.* pada tahun 1990 bahwa 10 (71,4%) dari 14 isolat virus hepatitis B yang berasal

dari murid Sekolah Dasar etnis Papua di Jayapura termasuk dalam sub tipe *adr*. Pada tahun 1991, Sastrosoewignjo *et al.* melaporkan bahwa 7 (50%) dari 14 isolat virus hepatitis B yang berasal dari pendonor darah di Jayapura termasuk dalam sub tipe *adr*. Sub tipe *adr* juga predominan (10 dari 13 isolat virus hepatitis B) pada penduduk dewasa asli Papua di Jayapura (Mulyanto *et al.*, 1990; dan Mulyanto *et al.*, 1997). Selain di berbagai kota di Provinsi Papua dan Provinsi Irian Jaya Barat, sub tipe *adr* juga predominan di Padang, Provinsi Sumatera Barat, dan cukup banyak teridentifikasi di Manado, Provinsi Sulawesi Utara (Mulyanto *et al.*, 1997).

Zona yang predominan sub tipe *adw* di Indonesia meliputi daerah Sumatera, Jawa, bagian selatan Kalimantan, Bali, Lombok, Ternate dan Morotai (Mulyanto *et al.*, 1997). Tujuh puluh tiga (94,0%) dari 78 isolat virus hepatitis B di Surabaya, Provinsi Jawa Timur, termasuk dalam sub tipe *adw2* (Lusida *et al.*, 2003). Zona yang predominan sub tipe *ayw* meliputi daerah bagian timur Nusa Tenggara dan Maluku, sedangkan zona campuran - di mana frekuensi sub tipe *adr*, *adw* dan *ayw* berimbang - meliputi daerah Kalimantan, Sulawesi dan Sumbawa (Mulyanto *et al.*, 1997). Sub tipe *ayr* tidak ditemukan dalam penelitian ini, demikian juga sub tipe ini jarang ditemukan di daerah lain di Indonesia (Mulyanto *et al.*, 1997) dan negara-negara lain di dunia, kecuali Vietnam (Kramvis *et al.*, 2005). Hasil penelitian ini menegaskan kembali peta distribusi sub tipe virus hepatitis B di daerah bagian timur Indonesia dan menguatkan fakta bahwa Jayapura berada dalam zona *adr*.

Semua virus hepatitis B sub tipe *adr* pada penelitian ini termasuk dalam genotipe C. Hal ini sesuai dengan pola hubungan genotipe dan sub tipe virus

hepatitis B (Kramvis *et al.*, 2005), meskipun dalam jumlah sedikit sub tipe *adr* dapat pula termasuk dalam genotipe B, seperti halnya isolat virus hepatitis B dari Venezuela (Blitz *et al.*, 1998). Semua virus hepatitis B sub tipe *adw2* pada penelitian ini termasuk dalam genotipe B. Namun pada penelitian yang lain, sub tipe *adw2* dapat pula ditemukan pada genotipe A, C, F atau G (Kramvis *et al.*, 2005). Semua virus hepatitis B sub tipe *ayw2* pada penelitian ini termasuk dalam genotipe D, sedangkan pada laporan penelitian lainnya, sub tipe *ayw2* dapat pula ditemukan pada genotipe A atau C (Kramvis *et al.*, 2005).

Determinan sub tipe *d* atau *y* dan *w* atau *r* ditentukan berdasarkan substitusi asam amino sebagai akibat mutasi titik tunggal nukleotida A dengan G pada posisi 365 atau 479, yang mengubah asam amino pada posisi 122 atau 160 dari lisin (AAG/AAA) menjadi arginin (AGG/AGA) (Okamoto *et al.*, 1988; dan Sastrosoewignjo *et al.*, 1991). Namun pada penelitian ini, determinan sub tipe *d* atau *y* tidak ditentukan hanya oleh mutasi titik tunggal yang melibatkan transisi nukleotida A dengan G pada posisi 365, tetapi ditentukan oleh dua sampai tiga mutasi titik sekaligus pada nukleotida posisi 364-366 yang juga melibatkan transversasi nukleotida A dengan C (lihat Tabel 5.4).

Sub tipe virus hepatitis B telah dipergunakan sebagai instrumen untuk mengetahui pola migrasi nenek moyang penduduk setempat pada suatu area geografi tertentu. Pada tahun 1997, Mulyanto *et al.* menyatakan bahwa nenek moyang penduduk bagian paling timur Indonesia yang terinfeksi virus hepatitis B sub tipe *adr* tampaknya datang dari Melanesia di mana sub tipe *adr* banyak ditemukan. Analisis substitusi asam amino tertentu pada posisi 159 dan atau 177 dari gen S mengklasifikasikan isolat virus hepatitis B dari *New*

Caledonia (Melanesia) dan *French Polynesia* (Polinesia) ke dalam sub tipe *adrq-* (Norder *et al.*, 1994). Menariknya, hasil penelitian ini justru memperlihatkan bahwa 10 (43,5%) dari 23 isolat virus hepatitis B sub tipe *adr* di Jayapura termasuk dalam sub tipe *adrq+* (lihat Tabel 5.3). Pada penelitian di Asia, virus hepatitis B sub tipe *adrq+* banyak ditemukan di Jepang, Korea, Cina (Kramvis *et al.*, 2005), Vietnam, Myanmar dan Thailand (Huy *et al.*, 2004). Temuan ini membuka pemikiran baru yang masih perlu dikaji lebih jauh tentang adanya pola migrasi tambahan dari nenek moyang penduduk asli Papua. Penentuan kekerabatan juga diperlukan untuk melihat apakah virus hepatitis B sub tipe *adrq+* pada isolat dari Jayapura memang memiliki kekerabatan dengan isolat dari Asia Tenggara, mengingat hanya 2 (20%) dari 10 isolat virus hepatitis B sub tipe *adrq+* dari Jayapura yang berada dalam *cluster* Asia Timur Jauh.

Pada semua dari 13 isolat virus hepatitis B sub tipe *adrq-* dari Jayapura, tidak menunjukkan adanya substitusi asam amino Ala¹⁵⁹ dengan Val¹⁵⁹ (lihat Gambar 5.6). Temuan ini berbeda dengan virus hepatitis B sub tipe *adrq-* dari Melanesia dan Polinesia yang menunjukkan adanya substitusi asam amino tersebut (Norder *et al.*, 1994). Analisis filogenetik (lihat Gambar 5.5) berdasarkan sebagian gen S memperlihatkan bahwa tidak ada isolat virus hepatitis B sub tipe *adrq-* dari Jayapura yang berada dalam *cluster* Melanesia dan Polinesia. Dengan demikian, virus hepatitis B sub tipe *adrq-* dari Jayapura tampaknya memiliki kekerabatan yang berbeda dengan virus hepatitis B dari Melanesia dan Polinesia, walaupun memiliki sub tipe yang sama.

Secara antropologis, etnis Papua sangat mirip dengan populasi Aborigin di Australia (Sandjaya *et al.*, 1990). Kedua daratan di mana kedua populasi ini berada pernah menjadi satu kontinen yang disebut sebagai kontinen Sahul, sebelum dipisahkan oleh Selat Torres pada 7.000 tahun yang lalu (Sugauchi *et al.*, 2001). Sugauchi *et al.* pada tahun 2001 mengidentifikasi *C/ayw3* pada sejumlah isolat virus hepatitis B dari populasi Aborigin di Australia. Menariknya, analisis filogenetik berdasarkan gen X dan gen *core* menunjukkan kekerabatan antara 2 isolat virus hepatitis B *C/ayw3* dari Aborigin Australia dengan 2 isolat virus hepatitis B *C/adrq-* dari Melanesia dan Polinesia. Bertitik tolak dari kemiripan etnis secara antropologis tersebut, maka perlu diteliti juga apakah isolat virus hepatitis B dari etnis Papua dan populasi Aborigin Australia memiliki kekerabatan, yang walaupun berbeda subtipe namun berada dalam genotipe yang sama.

Semua dari 13 isolat virus hepatitis B subtipe *adrq-* dari Jayapura berada satu *cluster* bersama dengan 7 (70,0%) dari 10 isolat subtipe *adrq+* dari Jayapura, yang terpisah dari *cluster* subtipe *adrq-* Melanesia dan Polinesia serta *cluster* subtipe *adrq+* Jepang, Korea dan Cina. Fenomena ini mendorong dilakukannya pengkajian lebih mendalam untuk mengetahui kemungkinan adanya sebuah subgrup yang lain atau sebuah varian baru virus hepatitis B genotipe C pada isolat dari Jayapura.

Peningkatan mobilitas penduduk dan perubahan komposisi demografi di Jayapura dalam beberapa tahun terakhir tampaknya belum menyebabkan pergeseran pola genotipe dan subtipe virus hepatitis B di Jayapura. Predominannya genotipe C dan subtipe *adr* pada isolat virus hepatitis B yang

diteliti menunjukkan gambaran yang sama dengan pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada beberapa penelitian yang pernah dilakukan menggunakan spesimen serum yang diambil lebih dari satu dasawarsa yang lalu (Mulyanto *et al.*, 1990; Sandjaya *et al.*, 1990; Sastrosoewignjo *et al.*, 1991; dan Mulyanto *et al.*, 1997). Pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di Jayapura ini tampaknya dipertahankan melalui modus transmisi virus hepatitis B secara vertikal dari ibu kepada bayinya selama periode perinatal yang merupakan modus transmisi utama pada daerah dengan tingkat endemisitas hepatitis B yang tinggi (Lee, 1997; dan Brooks *et al.*, 2004).

Meskipun demikian, di berbagai tempat, meningkatnya migrasi diyakini telah mulai menimbulkan erosi batas-batas distribusi genotipe dan sub tipe virus hepatitis B di dalam satu atau antar negara. Kramvis *et al.* pada tahun 2005, mendesak untuk segera dilakukannya penelitian mendalam pada beberapa populasi asli yang masih ada di dunia, termasuk pada populasi Khoi San dan Pygmy di Afrika, Aborigin di Australia, Inuit di Alaska dan Amerindian di Amerika Selatan. Untuk tujuan serupa, penelitian juga perlu dilakukan pada beberapa suku pedalaman di Papua, termasuk suku Asmat di Kabupaten Jayawijaya, Provinsi Papua dan suku Arfak di Kabupaten Manokwari, Provinsi Irian Jaya Barat; selain juga tujuh suku besar yaitu suku Irorutu, Sebyar, Soub, Sumuri, Moskona, Kuri dan Wamesa di Kabupaten Teluk Bintuni, Provinsi Irian Jaya Barat.

Pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah dengan HBsAg positif di Jayapura ini dapat mencerminkan pola genotipe dan sub tipe virus hepatitis B pada kelompok populasi lainnya. Dengan demikian,

karakteristik klinik dan virologik virus hepatitis B *C/adr* yang predominan pada pendonor darah di Jayapura dapat dipergunakan sebagai informasi tambahan dalam penanganan penderita yang terinfeksi virus hepatitis B di Jayapura. Temuan-temuan awal lainnya pada penelitian ini membuka lahan penelitian lanjutan guna mengeksplorasi karakteristik isolat virus hepatitis B *C/adrq+* dan *C/adrq-* dari Jayapura.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Dua puluh tiga (85,2%) dari 27 isolat virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, termasuk genotipe C, 2 (7,4%) isolat termasuk genotipe B dan 2 (7,4%) isolat termasuk genotipe D.
2. Dua puluh tiga (85,2%) dari 27 isolat virus hepatitis B pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, termasuk subtipe *adr*, 2 (7,4%) isolat termasuk subtipe *adw2* dan 2 (7,4%) isolat termasuk subtipe *ayw2*.
3. Semua virus hepatitis B subtipe *adr* pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, termasuk dalam genotipe C, demikian pula semua subtipe *adw2* dalam genotipe B dan semua subtipe *ayw2* dalam genotipe D.
4. Determinan *q* teridentifikasi pada 10 (43,5%) dari 23 isolat virus hepatitis B C/*adr* pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia; terungkap fakta bahwa virus hepatitis B C/*adr* di Jayapura tidak hanya dikaitkan dengan virus hepatitis B C/*adr* dari Melanesia dan Polinesia yang tidak memiliki determinan *q*, seperti diasumsikan selama beberapa tahun terakhir.

5. Berdasarkan analisis filogenetik sebagian gen S, 20 (87,0%) dari 23 isolat virus hepatitis B genotipe C pada pendonor darah dengan *Hepatitis B surface Antigen* (HBsAg) positif di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, membentuk satu *cluster* yang terpisah, baik dari *cluster* Melanesia dan Polinesia maupun dari *cluster* Jepang, Korea dan Cina.

7.2 Saran

1. Kekerabatan virus hepatitis B *C/adr* dari Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, dengan isolat dari Vietnam, Myanmar dan Thailand serta dengan isolat dari populasi Aborigin di Australia, perlu dikaji.
2. Sekuensing pada keseluruhan gen S, regio penyandi lainnya atau bahkan keseluruhan genom virus hepatitis B genotipe C pada sampel penelitian ini perlu dilakukan untuk menelusuri kemungkinan adanya subgrup lain atau varian baru dalam genotipe ini.
3. Penelitian sejenis dapat dilakukan pada penduduk asli Papua di daerah pedalaman yang masih relatif terisolir, dengan menelusuri etnisitasnya sampai tiga generasi.
4. Pola genotipe dan subtipe virus hepatitis B pada kelompok populasi lainnya seperti penderita hepatitis B akut; penderita penyakit hati kronik seperti hepatitis B kronik, sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler; pasien hemodialisis dan kelompok populasi lainnya di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia, juga patut diteliti.

5. Sebuah survei skala besar dengan prinsip-prinsip randomisasi menggunakan metode penentuan genotipe dan subtipe virus hepatitis B yang lebih terjangkau dapat dilakukan secara periodik di Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.
6. Penelitian yang mengkaitkan aspek biologi molekuler virus hepatitis B dan aspek klinik infeksi virus hepatitis B dapat dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah Jayapura, Provinsi Papua, Indonesia.
7. Pengembangan lingkup penelitian meliputi virus hepatitis lainnya, kemungkinan ko-infeksi satu virus dengan virus lainnya serta keterkaitannya dengan *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) yang prevalens di Provinsi Papua, Indonesia, patut dimulai.

DAFTAR PUSTAKA

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, and Magnius LO, 2002. Genotype H : a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 83:2059-2073.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visoná KA, and Magnius LO, 1997. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 176:851-858.

Asmunandar Y, 2002. Laporan Tahunan 2002. Unit Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Jayapura. (Tidak dipublikasikan).

Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, Van Geyt C, Norder H, Magnius LO, Echevarria JM, and Stuyver L, 1998. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 36(3):648-651.

Brooks GF, Butel JS, and Morse SA, 2004. Hepatitis viruses. In (Jawetz, Melnick, Adelberg eds). *Medical microbiology*, 23rd ed. Singapore : McGraw-Hill Companies Inc., pp 466-486.

Centers for Disease Control and Prevention, 2003a. Hepatitis B virus (online). http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_3.htm (accessed 1 February 2005).

Centers for Disease Control and Prevention, 2003b. Hepatitis B virus (online). http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_4.htm (accessed 1 February 2005).

Centers for Disease Control and Prevention, 2003c. Hepatitis B virus (online). http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_7.htm (accessed 1 February 2005).

Centers for Disease Control and Prevention, 2003d. Hepatitis B virus (online). http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_9.htm (accessed 1 February 2005).

Centers for Disease Control and Prevention, 2003e. Hepatitis B virus (online). http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_b/slide_10.htm (accessed 1 February 2005).

Chan HLY, Wong ML, Hui AY, Hung LCT, Chan FKL, and Sung JJY, 2003. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in Hepatitis B e Antigen-positive patients. *J Clin Microbiol* 41(3):1277-1279.

- Cornish-Bowden, 1985. The nucleotide base codes. *A Nucl Acid Res* 13:3021-3030.
- Friedman GD, 1993. Prinsip-prinsip epidemiologi, ed 2. Penerjemah Siswanto. Yogyakarta : Yayasan Essentia Medica, hlm 67-120.
- Horvat RT, and Tegtmeyer GE, 2003. Hepatitis B and D viruses. In (Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington DC : ASM Press, pp 1464-1479.
- Hou J, Liu Z, and Gu F, 2005. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci* 2:50-57.
- Hutabarat RH, 2003. Laporan Tahunan 2003. Unit Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Jayapura. (Tidak dipublikasikan).
- Hutabarat RH, 2004. Laporan Tahunan 2004. Unit Transfusi Darah Palang Merah Indonesia Cabang Jayapura. (Tidak dipublikasikan).
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, and Abe K, 2004. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 85:283-292.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1984. Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Eur J Biochem* 138:9-37.
- Kamiya N, 2003. The mechanisms of action of antivirals against hepatitis B virus infection. *JAC* 51:1085-1089.
- Kao JH, 2002. Hepatitis B viral genotypes : clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 17:643-650.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, and Chen DS, 2002. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C. *J Clin Microbiol* 40(1):22-25.
- Karayannis P, 2003. Hepatitis B virus : old, new and future approaches to antiviral treatment. *JAC* 51:761-785.
- Khan M, Dong JJ, Acharya SK, Dhagwahdorj Y, Abbas Z, Jafri W, Mulyono DH, Tozun N, and Sarin SK, 2004. Hepatology issues in Asia : perspective from regional leaders. *J Gastroenterol Hepatol* 19:419-430.
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa, and Kidd AH, 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 83:1267-1280.

- Kidd-Ljunggren K, Myhre E, and Bläckberg J, 2004. Clinical and serological variation between patients infected with different hepatitis B virus genotypes. *J Clin Microbiol* 42(12):5837-5841.
- Kordi R, and Wallace WA, 2004. Blood borne infections in sports : risks of transmission, methods of prevention, and recommendations for hepatitis B vaccination. *Br J Sports Med* 38:678-684.
- Kramvis A, Kew M, and François G, 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine* 23:2409-2423.
- Lee WM, 1997. Hepatitis B virus infection. *NEJM* 337(24):1733-1745.
- Levinson W, and Jawetz E, 2003. Hepatitis viruses. In *medical microbiology and immunology*, 7th ed. Singapore : McGraw-Hill Companies Inc., pp 257-266.
- Lindh M, Anderson AS, and Gusdal A, 1997. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus – large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 175:1285-1293.
- Liu CJ, Kao JH, Chen PJ, Lai MY, and Chen DS, 2002. Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in Taiwan. *J Biomed Sci* 9:166-170.
- Lusida MI, Surayah, Sakugawa H, Nagano-Fujii M, Soetjipto, Mulyanto, Handajani R, Boediwarsono, Setiawan PB, Nidom CA, Ohgimoto S, and Hotta H, 2003. Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis C virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. *Microbiol Immunol* 47(12):969-975.
- Magnius LO, and Norder H, 1995. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38:24-34.
- Moriya T, Kuramoto IK, Yoshizawa H, and Holland PV, 2002. Distribution of hepatitis B virus genotypes among American blood donors determined with a preS2 epitope enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 40(3):877-880.
- Mulyanto, Sandjaja B, Hartono, Soewignjo S, Sumarsidi D, Gunawan S, and Soesbandoro SDA, 1990. HBsAg subtypes in some areas of the eastern part of Indonesia. Seventh Biennial Scientific Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Jakarta, Indonesia.

- Mulyanto, Tsuda F, Karossi AT, Soewignjo S, Roestamsjah, Sumarsidi D, Trisnamurti RH, Sumardi, Surayah, Udin LZ, Melani-Wikanta, Kanai K, and Mishiro S, 1997. Distribution of the Hepatitis B surface Antigen subtypes in Indonesia : implications for ethnic heterogeneity and infection control measures. *Arch Virol* 142:2121-2129.
- Norder H, Couroucé AM, and Magnius LO, 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198:489-503.
- Nuraeny N, 2005. Keanekaragaman molekuler virus hepatitis B dan kaitannya dengan latar belakang populasi manusia di Indonesia. Disertasi, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, and Mayumi M, 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence : comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69:2575-2583.
- Program for Appropriate Technology in Health, 2003. IC strips test for hepatitis B (online). http://vps.path.org/files/htupIC_striptest_Hepatitis_B.pdf (accessed 8 February 2005).
- Regan FAM, Hewitt P, Barbara JAJ, and Contreras M, 2000. Prospective investigation of transfusion transmitted infection in recipients of over 20.000 units of blood. *BMJ* 320:403-406.
- Sandjaja B, 1979. Frekuensi *Hepatitis B surface Antigen* pada donor darah di Jayapura. Laporan Laboratorium Kesehatan Masyarakat Jayapura. (Tidak dipublikasikan).
- Sandjaja B, Mulyanto, Sumarsidi D, Gunawan S, Depamede SAN, and Soewignjo S, 1990. Hepatitis A and hepatitis B virus infection in school children in Jayapura, Irian Jaya. Fifth Scientific Meeting, Indonesian Association for the Study of the Liver, Jakarta, Indonesia.
- Sastrosoewignjo RI, Sandjaja B, and Okamoto H, 1991. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Indonesia. *J Gastroenterol Hepatol* 6:491-498.
- Seeger C, and Mason WS, 2000. Hepatitis B virus biology. *MMBR* 64(1):51-68.
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, and Rossau R, 2000. A new genotype of hepatitis B virus : complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 81:67-74.

Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, Kimura Y, Ueda R, Butterworth LA, and Cooksley WGE, 2001. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines : complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 82:883-892.

Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, and Mizokami M, 2002. Hepatitis B virus genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol* 76(12):5985-5992.

Swenson PD, Van Geyt C, Alexander ER, Hagan H, Freitag-Koontz JM, Wilson S, Norder H, Magnius LO, and Stuyver L, 2001. Hepatitis B virus genotypes and HBsAg subtypes in refugees and injection drug users in the United States determined by LiPA and monoclonal EIA. *J Med Virol* 64:305-311.

Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, and Mayumi M, 1999. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods* 80:97-112.

World Health Organization, 2000. Hepatitis B (online). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (accessed 1 February 2005).

Yuen MF, Yuan HJ, Sablon E, Wong DKH, Chan AOO, Wong BCY, and Lai CL, 2004. Long-term follow-up study of Chinese patients with YMDD mutations : significance of hepatitis B virus genotypes and characteristics of biochemical flares. *J Clin Microbiol* 42(9):3932-3936.

Zuckerman AJ, 1999. More than third of world's population has been infected with hepatitis B virus. *BMJ* 318:1213.

Lampiran 1 Lembar persetujuan mengikuti penelitian (*informed consent*).

Yang bertanda tangan di bawah ini :

NAMA :

UMUR : tahun JENIS KELAMIN : Laki-Laki / Perempuan

ALAMAT :

UNTUK : Diri Sendiri Istri Anak

Orang Tua Lainnya

NAMA PENDERITA :

UMUR : tahun JENIS KELAMIN : Laki-Laki / Perempuan

ALAMAT :

NOMOR REGISTER :

Dengan ini saya menyatakan dengan sesungguhnya, bahwa secara sadar, sukarela dan tanpa paksaan :

1. Saya bersedia ikut berpartisipasi dalam penelitian dan akan mengikuti semua prosedur penelitian.
2. Saya akan mengikuti tindakan dalam penelitian tersebut berupa pengambilan darah sebanyak 5 ml melalui pembuluh darah *vena cubiti* sesuai dengan prosedur rutin donor darah di Unit Transfusi Darah (UTD) Palang Merah Indonesia (PMI) Cabang Jayapura.
3. Setelah mempelajari tata cara penelitian dan mendengar penjelasan dari peneliti atau pihak lain yang diberi kewenangan, saya memahami akan maksud dan tujuan penelitian tersebut serta metode yang digunakan. Saya mengerti bahwa penelitian semacam ini pernah dilakukan dan tidak ada laporan mengenai pengaruh buruk pada peserta penelitian.
4. Saya mengerti bahwa saya dapat membatalkan pernyataan ini dan dapat menarik diri dari penelitian ini setiap waktu.

Saksi,

Jayapura,

Yang membuat pernyataan,

(.....) (.....)

Mengetahui :

Kepala UTD PMI Cabang Jayapura

Dokter,

Reginald H. Hutabarat, dr, MKes
NIP 140 201 912

Yusak Alfrets Porotuo, dr
NIP 132 304 647

Lampiran 2 Lembar persetujuan tindakan medik.

Yang bertanda tangan di bawah ini :

NAMA :
 UMUR : tahun JENIS KELAMIN : Laki-Laki / Perempuan
 ALAMAT :

Dengan ini menyatakan telah memberikan persetujuan untuk dilakukan tindakan medik berupa pengambilan darah sebanyak 5 ml.

UNTUK : Diri Sendiri Istri Anak
 Orang Tua Lainnya

NAMA PENDERITA :
 UMUR : tahun JENIS KELAMIN : Laki-Laki / Perempuan
 ALAMAT :
 NOMOR REGISTER :

Yang tujuan, sifat dan perlunya tindakan medis tersebut di atas serta risiko yang dapat ditimbulkan telah cukup dijelaskan oleh peneliti atau pihak lain yang diberi kewenangan dan saya mengerti sepenuhnya.

Saksi,

Jayapura,
 Yang membuat pernyataan,

(.....) (.....)

Mengetahui :
 Kepala UTD PMI Cabang Jayapura

Dokter,

Reginald H. Hutabarat, dr, MKes
 NIP 140 201 912

Yusak Alfrets Porotuo, dr
 NIP 132 304 647

Lampiran 3 Referensi sekuens nukleotida dan asam amino virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank).

- ✦ S50225 :
 Genotipe A / Subtipe *adw2*.
 AUTHORS Wands JR, Liang TJ, Blum HE, and Shafritz DA.
 TITLE Molecular pathogenesis of liver disease during persistent hepatitis B virus infection.
 JOURNAL Semin Liver Dis 12(3):252-264 (1992).

- ✦ X51970 (HBV 991) :
 Genotipe A / Subtipe *adw2*.
 AUTHOR Koechel H.
 JOURNAL Submitted (23 February 1990) to the DDBJ, EMBL, GenBank databases. Department of Medical Microbiology of the University, Kreuzberging 57, D 3400 Goettingen.

- ✦ D00330 (pODW282) :
 Genotipe B / Subtipe *adw2*.
 AUTHORS Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, and Mayumi M.
 TITLE Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes.
 JOURNAL J Gen Virol 69:2575-2583 (1988).

- ✦ D00329 (pJDW233) :
 Genotipe B / Subtipe *adw2*.
 AUTHORS Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, and Mayumi M.
 TITLE Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes.
 JOURNAL J Gen Virol 69:2575-2583 (1988).

- ✦ D23678 (A2-HBVYS2) :
 Genotipe B / Subtipe *adw2*.
 AUTHORS Horikita M, Itoh S, Yamamoto K, Shibayama T, Tsuda F, and Okamoto H.
 TITLE Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to Hepatitis B e Antigen with and without active disease.
 JOURNAL J Med Virol 44:96-103 (1994).

- ✦ X75656 (Cha) :
 Genotipe C / Subtipe *adrq-*.
 AUTHORS Norder H, Courouce AM, and Magnius LO.

- TITLE Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.
 JOURNAL Virology 198(2):489-503 (1994).
- ♣ X75665 (HMA) :
 Genotype C / Subtype *adrq-*.
 AUTHORS Norder H, Courouce AM, and Magnius LO.
 TITLE Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.
 JOURNAL Virology 198(2):489-503 (1994).
- ♣ L08805 :
 Genotype C / Subtype *adrq+*.
 AUTHORS Ogata N, Miller RH, Ishak KG, and Purcell RH.
 TITLE The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees.
 JOURNAL Virology 194(1):263-276 (1993).
- ♣ AY123041 / M12906 (pHBV1-1) :
 Genotype C / Subtype *adrq+*.
 AUTHORS Kobayashi M, and Koike K.
 TITLE Complete nucleotide sequence of hepatitis B virus DNA of subtype *adr* and its conserved gene organization.
 JOURNAL Gene 30(1-3):227-232 (1984).
- ♣ X01587 (pBRHBadr4) :
 Genotype C / Subtype *adrq+*.
 AUTHORS Fujiyama A, Miyanochara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, and Matsubara K.
 TITLE Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype *adr*.
 JOURNAL Nucleic Acids Res 11(13):4601-4610 (1983).
- ♣ V00867 (pHBr330) :
 Genotype C / Subtype *adrq+*.
 AUTHORS Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, and Nishioka K.
 TITLE The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA subtype *adr* and *adw*.
 JOURNAL Nucleic Acids Res 11(6):1747-1757 (1983).
- ♣ X14193 (pADRRho) :
 Genotype C / Subtype *adrq+*.
 AUTHORS Rho HM, Kim K, Hyun SW, and Kim YS.

- TITLE The nucleotide sequence and reading frames of a mutant hepatitis B virus *adr*.
 JOURNAL Nucleic Acids Res 17(5):2124-2124 (1989).
- ♣ M54892 (pADRRen) :
 Genotipe C / Subtipe *adrq+*.
 AUTHORS Gan RB, Shen LP, Chu MJ, and Li ZP.
 TITLE The nucleotide sequence of surface antigen gene of hepatitis B virus subtype *adr*.
 JOURNAL Sci Sin, Ser B, Chem Biol Agric Med Earth Sci 27 (9): 926-935 (1984).
- ♣ M32138 (HBValpha1) :
 Genotipe D / Subtipe *ayw2*.
 AUTHORS Tong SP, Li JS, Vitvitski L, and Trepo C.
 TITLE Active hepatitis B virus replication in the presence of anti-HBe is associated with viral variants containing an inactive pre-C region.
 JOURNAL Virology 176(2):596-603 (1990).
- ♣ J02203 (EcoHBVDNA) :
 Genotipe D / Subtipe *ayw3*.
 AUTHORS Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, and Charnay P.
 TITLE Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype *ayw*) cloned in *E. coli*.
 JOURNAL Nature 281(5733):646-650 (1979).
- ♣ X75664 (Kou) :
 Genotipe E / Subtipe *ayw4*.
 AUTHORS Norder H, Courouce AM, and Magnius LO.
 TITLE Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.
 JOURNAL Virology 198(2):489-503 (1994).
- ♣ X75657 (Bas) :
 Genotipe E / Subtipe *ayw4*.
 AUTHORS Norder H, Courouce AM, and Magnius LO.
 TITLE Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.
 JOURNAL Virology 198(2):489-503 (1994).
- ♣ X69798 :
 Genotipe F / Subtipe *adw4q-*.
 AUTHORS Naumann H, Schaefer S, Yoshida CF, Gaspar AM, Repp R, and Gerlich WH.

TITLE Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype *adw4*.
JOURNAL J Gen Virol 74:1627-1632 (1993).

* X75658 (Fou) :

Genotype F / Subtipe *adw4q-*.

AUTHORS Norder H, Courouce AM, and Magnius LO.

TITLE Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes.

JOURNAL Virology 198(2):489-503 (1994).

* AF160501 (IG29227) :

Genotype G / Subtipe *adw2*.

AUTHORS Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, and Rossau R.

TITLE A new genotype of hepatitis B virus : complete genome and phylogenetic relatedness.

JOURNAL J Gen Virol 81:67-74 (2000).

* AY090454 (1853Nic) :

Genotype H / Subtipe *adw4*.

AUTHORS Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, and Magnius LO.

TITLE Genotype H : a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America.

JOURNAL J Gen Virol 83:2059-2073 (2002).

* AY090460 (LAS2523) :

Genotype H / Subtipe *adw4*.

AUTHORS Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, and Magnius LO.

TITLE Genotype H : a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America.

JOURNAL J Gen Virol 83:2059-2073 (2002).

Lampiran 4 Data pendonor darah di Jayapura yang dipakai sebagai sampel penelitian.

Nomor Sampel	Inisial	Jenis Kelamin	Umur		Kelompok Etnis	Jenis Pendonor Darah
			Tahun	Bulan		
01UC	AR	Laki-laki	19	01	Papua	Pengganti keluarga
02UC	GD	Laki-laki	41	00	Papua	Sukarela
03UC	AbD	Laki-laki	29	06	Papua	Pengganti keluarga
04UC	NP	Laki-laki	40	10	Papua	Sukarela
05UC	YA	Laki-laki	27	03	Papua	Pengganti keluarga
06UC	Yp	Laki-laki	30	03	Papua	Pengganti keluarga
07UC	ST	Laki-laki	44	02	Non Papua	Sukarela
08UC	AHA	Laki-laki	35	03	Papua	Pengganti keluarga
09UC	Ki	Laki-laki	42	11	Non Papua	Sukarela
10UC	P	Laki-laki	22	06	Non Papua	Sukarela
11UC	Su	Laki-laki	21	09	Non Papua	Sukarela
12UC	Sa	Laki-laki	47	08	Non Papua	Sukarela
13UC	MS	Laki-laki	24	07	Papua	Pengganti keluarga
14UC	KA	Perempuan	21	00	Papua	Pengganti keluarga
15UC	T	Laki-laki	21	00	Papua	Pengganti keluarga
16UC	JWF	Laki-laki	29	11	Papua	Pengganti keluarga
17UC	RMB	Laki-laki	21	06	Non Papua	Pengganti keluarga
18UC	AP	Laki-laki	19	10	Papua	Pengganti keluarga
19UC	ET	Laki-laki	21	11	Papua	Pengganti keluarga
20UC	REM	Laki-laki	24	10	Papua	Pengganti komersial
21UC	SPW	Laki-laki	46	05	Papua	Pengganti keluarga
22UC	YNW	Laki-laki	34	11	Papua	Pengganti keluarga
23UC	AT	Laki-laki	22	10	Papua	Pengganti keluarga
24UC	BS	Laki-laki	24	00	Papua	Pengganti komersial
25UC	YI	Laki-laki	31	00	Papua	Pengganti komersial
26UC	RN	Laki-laki	29	11	Papua	Pengganti komersial
27UC	FM	Laki-laki	29	00	Papua	Pengganti komersial
28UC	HCM	Laki-laki	32	04	Papua	Pengganti keluarga
29UC	AgD	Laki-laki	18	00	Papua	Pengganti keluarga
30UC	PB	Laki-laki	39	01	Papua	Pengganti keluarga
31UC	Ko	Laki-laki	40	05	Papua	Pengganti keluarga
32UC	YR	Laki-laki	40	11	Papua	Pengganti keluarga
33UC	IWK	Laki-laki	18	11	Non Papua	Pengganti keluarga
34UC	JW	Laki-laki	20	06	Papua	Pengganti keluarga
35UC	RS	Laki-laki	37	04	Papua	Pengganti keluarga
36UC	YB	Laki-laki	23	01	Papua	Pengganti keluarga
37UC	Mn	Laki-laki	26	01	Papua	Pengganti keluarga
38UC	L	Laki-laki	34	00	Papua	Pengganti keluarga
39UC	AR	Laki-laki	19	04	Papua	Pengganti keluarga
40UC	Yh	Laki-laki	36	05	Papua	Pengganti keluarga
41UC	Mr	Laki-laki	38	06	Papua	Pengganti keluarga
42UC	SR	Laki-laki	20	09	Papua	Pengganti keluarga
43UC	O	Laki-laki	27	08	Papua	Pengganti komersial

Lampiran 6 Deteksi DNA virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura dan kualitas *electropherogram*.

Nomor Sampel	Deteksi DNA Virus Hepatitis B			Kualitas <i>Electropherogram</i>		Keterangan
	Tidak Terdeteksi	Terdeteksi pada PCR		Baik	Noise	
		1st-round	2nd-round			
01UC						
02UC						Tidak disekuensing
03UC						
04UC						Tidak dianalisis
05UC						
06UC						
07UC						
08UC						
09UC						Tidak dianalisis
10UC						Tidak dianalisis
11UC						
12UC						Tidak dianalisis
13UC						
14UC						
15UC						Tidak disekuensing
16UC						
17UC						
18UC						
19UC						
20UC						
21UC						

Nomor Sampel	Deteksi DNA Virus Hepatitis B		Kualitas <i>Electropherogram</i>		Keterangan	
	Tidak Terdeteksi	Terdeteksi pada PCR		Baik		Noise
		<i>1st-round</i>	<i>2nd-round</i>			
22UC						
23UC						
24UC					Tidak dianalisis	
25UC						
26UC					Tidak dianalisis	
27UC					Tidak dianalisis	
28UC					Tidak dianalisis	
29UC						
30UC					Tidak dianalisis	
31UC						
32UC						
33UC						
34UC					Tidak disequensing	
35UC						
36UC					Tidak dianalisis	
37UC						
38UC						
39UC						
40UC					Tidak dianalisis	
41UC					Tidak dianalisis	
42UC					Tidak dianalisis	
43UC						
Total	3	17	23	27	13	

Lampiran 7 Persentase homologi sekuens nukleotida virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura terhadap sekuens nukleotida virus hepatitis B dari bank data DNA internasional (DDBJ/EMBL/GenBank).

Nomor Sampel	Kelompok Etnis	Persentase Homologi dengan Genotipe							
		A	B	C	D	E	F	G	H
01UC	Papua	92,2	94,1	97,5	93,1	92,6	91,7	92,6	90,7
03UC*	Papua	92,5	95,1	98,8	93,7	94,8	92,4	93,3	92,4
05UC*	Papua	92,2	94,9	98,6	93,4	94,5	92,1	93,1	92,1
06UC	Papua	90,7	93,6	98,0	92,6	92,2	91,2	92,2	90,2
07UC*	Non Papua	93,2	93,9	94,8	96,3	95,5	93,6	94,5	94,0
08UC*	Papua	92,2	95,1	97,4	93,9	94,5	92,6	93,1	92,6
11UC*	Non Papua	93,7	95,4	99,0	94,9	95,2	92,9	94,3	92,6
13UC	Papua	90,7	93,6	98,0	92,6	92,2	91,2	92,2	90,2
14UC	Papua	90,7	93,6	97,5	92,2	91,7	92,2	92,2	90,2
16UC*	Papua	92,5	95,1	98,3	93,4	94,3	92,4	93,8	92,6
17UC*	Non Papua	92,9	94,2	94,5	98,5	95,7	93,8	94,8	94,3
18UC*	Papua	92,0	94,6	98,3	93,2	94,3	91,9	92,9	91,9
19UC	Papua	90,2	93,1	97,5	92,2	91,7	90,7	91,7	89,7
20UC	Papua	91,2	94,1	98,5	93,1	92,6	91,7	92,6	90,7
21UC*	Papua	92,0	94,6	97,9	93,7	93,8	92,4	92,9	91,9
22UC	Papua	91,2	93,6	97,1	92,6	92,2	91,2	92,6	90,2
23UC	Papua	91,2	94,1	98,5	93,1	92,6	91,7	92,6	90,7
25UC*	Papua	93,9	98,5	95,2	94,6	94,8	91,7	94,8	93,3
29UC*	Papua	92,2	94,9	98,1	93,4	94,0	92,1	92,6	91,7
31UC*	Papua	91,7	93,9	96,7	92,9	93,6	91,7	93,1	91,7
32UC*	Papua	92,2	94,9	97,6	93,9	94,5	92,6	93,6	92,6
33UC*	Non Papua	93,4	98,1	94,3	93,9	94,0	91,0	94,3	92,6
35UC	Papua	92,6	94,6	99,0	94,6	93,6	91,7	93,6	91,2
37UC*	Papua	92,2	94,9	98,1	93,4	94,3	91,7	92,6	91,7
38UC*	Papua	91,7	93,6	98,0	93,6	92,6	90,7	92,6	90,2
39UC	Papua	93,1	96,1	97,5	93,1	92,2	92,2	93,1	91,2
43UC*	Papua	92,2	94,9	98,1	93,4	94,3	91,7	92,6	91,7

Keterangan :

- * Persentase homologi diperhitungkan dari 411 bp pada genotipe A, B, D dan 420 bp pada genotipe C, E, F, G, H untuk produk PCR *first-round* (*) serta 204 bp pada genotipe A-H untuk produk PCR *second-round* (tanpa *).
- * Persentase homologi tertinggi untuk masing-masing sampel ditandai dengan

Lampiran 8 Sekuens nukleotida pada asam amino posisi tertentu terkait dengan penentuan sub tipe virus hepatitis B pada pendonor darah di Jayapura.

Nomor Sampel	Kelompok Etnis	Sekuens Nukleotida pada Asam Amino ke						Sub-tipe
		122	127	134	159	160	177	
01UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
03UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
05UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
06UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
07UC*	Non Papua	CGA (R)	CCT (P)	TAT (Y)		AAA (K)		<i>ayw2</i>
08UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
11UC*	Non Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
13UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
14UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
16UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
17UC*	Non Papua	CGA (R)	CCT (P)	TAT (Y)		AAA (K)		<i>ayw2</i>
18UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
19UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
20UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
21UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
22UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
23UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
25UC*	Papua	AAA (K)	CCT (P)	TTT (F)		AAA(K)		<i>adw2</i>
29UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
31UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
32UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
33UC*	Non Papua	AAA (K)	CCT (P)	TTT (F)		AAA (K)		<i>adw2</i>
35UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
37UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GCG (A)	<i>adrq-</i>
38UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
39UC	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>
43UC*	Papua	AAG (K)			GCA (A)	AGA (R)	GTG (V)	<i>adrq+</i>

Keterangan :

- * Produk PCR *first-round* (*).
- * Produk PCR *second-round* (tanpa *).
- * A : alanin.
- * F : fenilalanin.
- * K : lisin.
- * P : prolin.
- * R : arginin.
- * V : valin.
- * Y : tirosin.
- * Virus hepatitis B selain sub tipe *adrq+* dan *adrq-* ditandai dengan

Lampiran 9 Pendonor darah dan positività HBsAg di UTD PMI Cabang Jayapura tahun 2002-2004 (Asmunandar, 2002; Hutabarat, 2003; dan Hutabarat, 2004).

Tahun	Jumlah Pendonor Darah			Positivitas HBsAg pada Pendonor Darah		
	Sukarela	Pengganti	Total	Sukarela	Pengganti	Total
2002	2.180	3.148	5.328	89	92	181 (3,40%)
2003	3.251	3.201	6.452	42	85	127 (1,97%)
2004	2.284	3.820	6.104	92	206	298 (4,88%)

Lampiran 10 Kode basa nukleotida (Cornish-Bowden, 1985).

Simbol	Arti	Penjelasan
A	A	<i>Adenine</i>
C	C	<i>Cytosine</i>
G	G	<i>Guanine</i>
T atau U	T atau U	<i>Thymine</i> pada DNA; <i>Uracil</i> pada RNA
M	A atau C	Amino
R	A atau G	<i>Purine</i>
W	A atau T	
S	C atau G	
Y	C atau T	<i>Pyrimidine</i>
K	G atau T	Keto
V	A atau C atau G	Bukan T
H	A atau C atau T	Bukan G
D	A atau G atau T	Bukan C
B	C atau G atau T	Bukan A
N	A atau C atau G atau T	

Lampiran 11 Tabel kodon.

HURUF I	HURUF II				HURUF III
	T	C	A	G	
T	PHE	SER	TYR	CYS	T
	PHE	SER	TYR	CYS	C
	LEU	SER	(Term.)	(Term.)	A
	LEU	SER	(Term.)	TRP	G
C	LEU	PRO	HIS	ARG	T
	LEU	PRO	HIS	ARG	C
	LEU	PRO	GLN	ARG	A
	LEU	PRO	GLN	ARG	G
A	ILE	THR	ASN	SER	T
	ILE	THR	ASN	SER	C
	ILE	THR	LYS	ARG	A
	MET (In.)	THR	LYS	ARG	G
G	VAL	ALA	ASP	GLY	T
	VAL	ALA	ASP	GLY	C
	VAL	ALA	GLU	GLY	A
	VAL (In.)	ALA	GLU	GLY	G

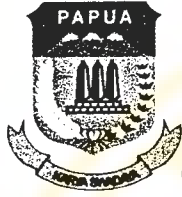
Keterangan :

- * (In.) = *Initiation.*
- * (Term.) = *Termination.*

Lampiran 12 Kode asam amino (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, 1984).

Nama Asam Amino	Singkatan	Singkatan 1 Huruf
<i>Alanine</i>	ALA	A
<i>Cysteine</i>	CYS	C
<i>Aspartic Acid</i>	ASP	D
<i>Glutamic Acid</i>	GLU	E
<i>Phenylalanine</i>	PHE	F
<i>Glycine</i>	GLY	G
<i>Histidine</i>	HIS	H
<i>Isoleucine</i>	ILE	I
<i>Lysine</i>	LYS	K
<i>Leucine</i>	LEU	L
<i>Methionine</i>	MET	M
<i>Asparagine</i>	ASN	N
<i>Proline</i>	PRO	P
<i>Glutamine</i>	GLN	Q
<i>Arginine</i>	ARG	R
<i>Serine</i>	SER	S
<i>Threonine</i>	THR	T
<i>Valine</i>	VAL	V
<i>Tryptophan</i>	TRP	W
<i>Tyrosine</i>	TYR	Y

Lampiran 13 Keterangan kelaikan etik.



PEMERINTAH PROVINSI PAPUA
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH
JAYAPURA

Jl. Kesehatan No. 01 ☎ (0967) - 533616,533516 Fax (0967) -
533781

J A Y A P U R A

KETERANGAN KELAIKAN ETIK

Nomor : 890 / 3633

KOMITE MEDIK RUMAH SAKIT UMUM DAERAH JAYAPURA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI KAMI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

“ GENOTIPE DAN SUBTIPE VIRUS HEPATITIS B PADA PENDONOR DARAH DENGAN HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN (HBsAg) POSITIF DI JAYAPURA, PROVINSI PAPUA, INDONESIA “

PENELITI UTAMA : VICTOR EKA NUGRAHAPUTRA, dr.
TEMPAT PENELITIAN : RSUD JAYAPURA / UNIT TRANSFUSI DARAH
PMI CABANG JAYAPURA

DINYATAKAN LAIK ETIK.

JAYAPURA, 17 JANUARI 2005

RUMAH SAKIT UMUM DAERAH
JAYAPURA
KEPADA KOMITE MEDIK

PEMERINTAH PROVINSI
RSUD KELAS B
JAYAPURA
Dr. H. SOEHARTONO, SpOG
NIP : 140 322 780

Lampiran 14 *Electropherogram* virus hepatitis B dari pendonor darah di Jayapura.

Genotipe/ Subtipe	Kelompok Etnis	Produk PCR	Nomor Sampel	Halaman
<i>C/adrq+</i>	Papua	<i>First-round</i>	08UC	113
<i>C/adrq-</i>	Papua	<i>First-round</i>	05UC	114

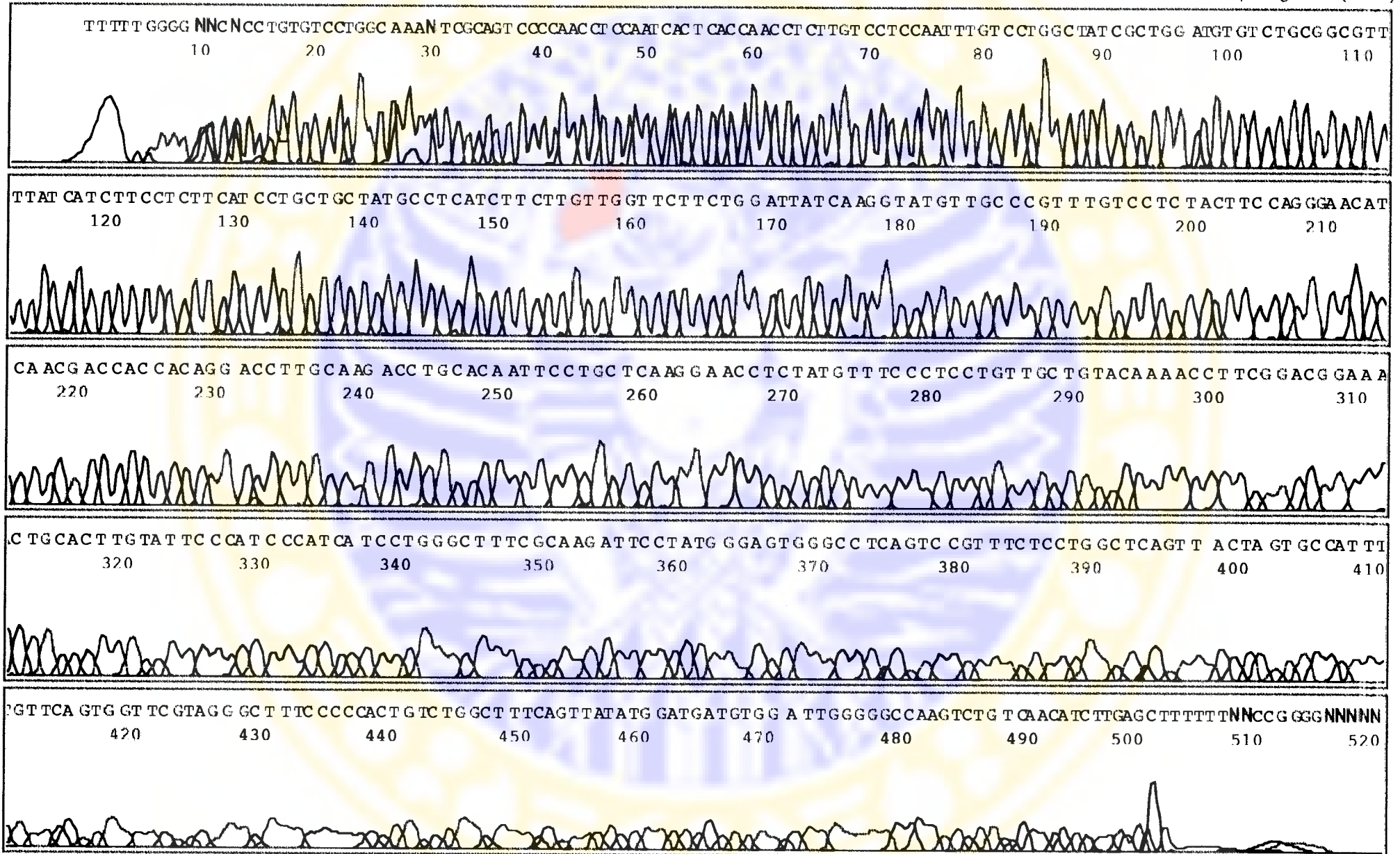


Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

dr.Victor/08UC.P7Sample5
dr.Victor/08UC.P7
Lane 5

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga
Signal: 757 A:499 T:870 C:729
DT POP6{BD Set-AnyPrimer}
Matrix V 1.1
Points 787 to 9840 Base 1: 787

Page 1 of 2
15. Mon Aug. 2005 4:12 PM
15. Mon Aug. 2005 2:58 PM
Spacing: 10.44(10.44)





Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

dr.Victor/05UC.P7Sample3
dr.Victor/05UC.P7
Lane 3

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga
Signal G:476 A:284 T:649 C:503
DT POP6(BD Set-AnyPrimer)
Matrix V 1.1
Points 818 to 9840 Base 1: 818

Page 1 of 2
15, Mon Aug, 2005 1:44 PM
15, Mon Aug, 2005 12:29 PM
Spacing: 10.34(10.34)

