

ANALISIS MUTASI GEN PROTEIN X VIRUS HBV PADA PENDERITA HEPATITIS B AKUT DI MANADO

Fatimawali¹ dan Billy Kepel¹

¹Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado
(E-mail: fatimawali12@gmail.com)

ABSTRAK

Faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan hepatitis B kronis menjadi kanker hati antara lain mutasi pada gen x. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi gen protein x virus HBV dan menganalisis apakah terjadi mutasi gen yang terkait dengan munculnya tumor ganas sirosis hati (HCC). Penelitian ini menggunakan primer untuk proses *nested* PCR yang telah dirancang sebelumnya. Proses *nested* PCR terhadap 10 sampel DNA HBV pasien dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen DNA gen x dilanjutkan dengan sekuensing untuk penentuan urutan nukleotida gen x. Urutan nukleotida gen x diterjemahkan menjadi urutan asam amino protein x. Terhadap hasil penentuan urutan asam amino protein x, dianalisis apakah terdapat keberadaan mutasi dikaitkan dengan hepatitis B akut. Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa dari 10 sampel DNA HBV pasien yang uji, 5 sampel yang berhasil ditentukan urutan nukleotida gen xnya. Hasil analisis mutasi gen, ditemukan adanya mutasi gen protein x, tapi tidak ada satupun ditemukan adanya mutasi yang terkait dengan HCC.

Kata kunci : Virus HBV, mutasi Gen x, Hepatitis B akut, Manado

PENDAHULUAN

Virus hepatitis B (HBV) adalah virus yang menyebabkan penyakit hepatitis B. Penyakit ini dapat menyebabkan hepatitis B akut dan kronis. Hepatitis B kronis dapat berlanjut menjadi sirosis hati dan karsinoma hati (*hepatocellular carcinoma*, HCC). Dengan prediksi lebih dari 500.000 kejadian dalam tahun 2000, HCC merupakan tumor ganas paling sering di dunia dan tingkat kejadiannya meningkat di banyak Negara termasuk Indonesia. Walaupun termasuk kanker paling sering ditemukan dengan peringkat ke lima untuk jumlahnya, HCC adalah penyebab kematian ketiga setelah kanker paru-paru dan lambung (Lupberger and Hildt, 2007).

Virus HBV adalah virus DNA berukuran kecil dan termasuk dalam kelompok hepadna virus. Virus HBV terdiri atas nukleokapsid dan envelop luar yang terutama mengandung tiga antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) yang berperan dalam diagnosis infeksi HBV. Nukleokapsid mengandung antigen *core* hepatitis B (HBcAg), *reverse transcriptase*, genom virus dan protein sel. Genom terdiri atas molekul DNA sirkular berukuran 3200 pasangan basa (pb). Gen S mengkode tiga antigen yaitu pre-S1/ pre-S2/dan S, yang merupakan variasi HBsAg. Protein yang

dikode oleh *pre-core* (pre-C)/*core* gene (C) mengalami modifikasi paska translasi untuk menghasilkan antigen Be (HBeAg), yang merupakan seromarker untuk replikasi virus tingkat tinggi. Gen *core* mengkode HBcAg, protein struktur mayor dari nukleokapsid. Gen *x* mengkode antigen x hepatitis (HBxAg). HBxAg telah diketahui sebagai transaktivator sel yang kuat dan gen virus. Berbagai interaksi dengan protein sel telah diusulkan sebagai target HBxAg (Baumert *et al.*, 2007).

Karena informasi mengenai mutasi-mutasi pada gen *x* dan kecepatan mutasi virus hepatitis B terutama yang menginfeksi pasien hepatitis B di Indonesia belum diketahui, maka penelitian ini bertujuan untuk mengungkap mutasi yang terkait dengan hepatitis B akut HBeAg positif dan HBeAg negatif yang diharapkan dapat digunakan sebagai prediktor untuk munculnya HCC. Dengan ditemukannya jenis mutasi tersebut, diharapkan dapat menjelaskan mekanisme terjadinya HCC dari hepatitis B akut. Selain itu, data ini juga diperlukan untuk melakukan strategi khemopreventif untuk mencegah munculnya HCC. Penggunaan interferon menunjukkan tidak mencegah terjadinya HCC, namun penggunaan lamivudin dapat menurunkan HCC (Yang *et al.*, 2008).

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

- a. Bagaimana urutan nukleotida gen protein x pasien dengan Hepatitis Akut di Kota Manado?
- b. Apakah terdapat mutasi gen protein x virus HBV tersebut yang terkait dengan HCC?

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk Mengidentifikasi mutasi gen *x* yang terkait dengan hepatitis B akut yang diharapkan dapat digunakan sebagai prediktor untuk munculnya HCC. Selain itu, data ini juga diperlukan untuk melakukan strategi khemopreventif untuk mencegah munculnya HCC, sedangkan tujuan khusus penelitian ini adalah :

- Isolasi DNA Virus HBV penderita Hepatitis B Akut di Kota Manado
- Amplifikasi Gen *x* virus HBV
- Menentukan urutan nukleotida gen *x* Virus HBV
- Menganalisis mutasi gen protein *x* virus HBV.

METODE PENELITIAN

Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada beberapa laboratorium

- Laboratorium Bioteknologi FMIPA Unsrat untuk persiapan dan pengumpulan sampel
- Laboratorium Pramita Jakarta untuk isolasi DNA virus HBV
- Laboratorium Bioteknologi Sekolah Farmasi ITB Bandung untuk amplifikasi gen x virus HBV.

Cara Pengumpulan Data dan Batasan Operasional

Pada tahun pertama ini, 10 penderita hepatitis B akut di Kota Manado yang menjadi fokus penelitian.

Alat yang digunakan

Applied biosystem 2720 *Thermal Cycler*, autoklaf (All American Model 25x Amerika), alat elektroforesis gel (BioRad), *microwave* (Goldstar), mikropipet (Eppendorf), gelas ukur (Pyrex), labu Erlenmeyer (Herma, Pyrex), tip (Biologix), mikrotube (Biologix) dan kamera digital (Canon).

Bahan yang digunakan

Aquadest steril, primer HBV_1233_for 5'-CATGCGTGGR (A/G) ACCTTTGTG-3', primer HBVF1_1685_rev 5'-GCCTCAAGGTCGGTCGTT-3', primer HBVF2_1545_for 5'-CTCCCC GTCTGTGCCTTC-3' (1st Base), primer HBVF2_1940_rev 5'-CAGAAGGCAAAAAGAGA GTA ACTC-3' (IDT), MgCl₂ (MD Bio), enzim *Taq* pol (MD Bio), dapar 10x (MD Bio), dNTP 10mM (Vivantis), DMSO, marka DNA 100 bp (MD Bio), marka DNA 1kb (Fermentas), agarosa (Promega), asam asetat glasial (Merck), Tris Base (J. T. Barker), EDTA (J. T. Barker), dan etidium bromida (Promega).

Pengambilan Sampel Darah

Sampel serum darah pasien terinfeksi Hepatitis B diambil sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan disimpan pada suhu 4⁰C sebelum dilakukan isolasi DNA VHB.

Isolasi DNA VHB

Isolasi DNA virus HBV dilakukan di Laboratorium Klinik Pramita Jakarta. DNA VHB diisolasi dari serum pasien menggunakan High Pure Viral nucleic acid kit (Roche). Lisis virus dilakukan dengan inkubasi dalam buffer pengikat / lisis dengan keberadaan proteinase K. Asam nukleat yang bebas diikat secara spesifik pada permukaan fiber gelas dengan adanya garam khaotropik. DNA kemudian dicuci untuk menghilangkan pengotor lainnya dan kemudian dielusi dengan buffer garam berkekuatan rendah atau air.

Amplifikasi gen *x* HBV dan Elektroforesis

Nested PCR dilakukan terhadap 10 isolat DNA total dari sampel serum yang telah diisolasi di Laboratorium Klinik Pramita Jakarta. Komposisi campuran PCR tahap pertama adalah : *aquadest* steril sebanyak 17,75 μL , buffer sebanyak 2,5 μL , MgCl_2 2,0 μl , dNTP 0,5 μl , Primer For 5'-CATGCGTGGR(A/G)ACCTTTGTG-3' (20mM) 0,5 μl , Primer Rev (20mM) 0,5 μl , *Taq* pol 0,25 μl , dan 1,0 μL Template DNA. Kondisi PCR pertama adalah sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit; denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, penempelan pada suhu 50 °C selama 1 menit, pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit diulang sebanyak 25 siklus; dan diakhiri dengan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil PCR pertama diencerkan 10x kemudian diambil 1 μL untuk dijadikan cetakan pada PCR kedua. Campuran dan kondisi PCR kedua sama dengan PCR pertama, hanya mengubah primer yang digunakan, yakni primer HBV_1233_For dan HBVF1_1685_rev untuk mendapat produk gen *x* fragmen pertama, serta HBVF2_1545_for dan HBVF2_1940_rev untuk mendapat produk gen *x* fragmen kedua. Terhadap produk PCR dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dan divisualisasi dibawah sinar UV untuk melihat fragmen gen *x* hasil amplifikasi.

*1. Penentuan Urutan Nukleotida gen *x* HBV*

Produk PCR dimurnikan dari gel agarosa, dengan memotong gel, kemudian dimurnikan menggunakan kolom Qiagen. Produk PCR ditentukan urutan nukleotidanya dua arah menggunakan kedua primer yang digunakan pada PCR kedua menggunakan metode dideoksi secara otomatis. Penentuan urutan nukleotida terhadap produk PCR dilakukan di MacroGen Inc. (Korea Selatan)

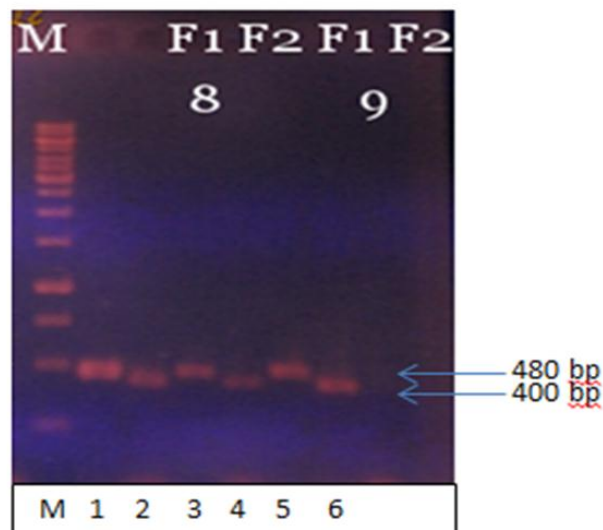
2. Deteksi Mutasi

Keberadaan mutasi dideteksi dengan mensejajarkan urutan nukleotida sampel dengan *wild type*-nya menggunakan ClustalW. Urutan subgenotipe VHB *wild type* didapatkan dari urutan yang telah terdaftar di GenBank NCBI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Amplifikasi gen *x* HBV dan Elektroforesis

Nested PCR dilakukan dengan dua tahapan PCR. PCR pertama dilakukan untuk mendapat produk berupa gen *x* utuh dan daerah DNA di sekitarnya, dengan ukuran produk PCR teoritis adalah 707 pb (Gunawan, 2012). PCR kedua dilakukan untuk mendapat produk berupa fragmen gen *x* pertama dengan ukuran produk PCR teoritis adalah 469 pb dan fragmen gen *x* kedua dengan ukuran produk PCR teoritis adalah 395 pb (Rini, 2013). Hasil elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa produk PCR pada kondisi optimum dengan suhu penempelan 50 °C dan pengenceran 100x untuk sampel F3, F4, dan F5, dan pengenceran 10x untuk sampel F8 dan F9. Hasil elektroforesis yang diperoleh berukuran 480 pb pada fragmen pertama (F1), dan 400 pb pada fragmen kedua (F2) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram hasil migrasi produk PCR kedua gen *x* dengan pengenceran 10x . M=Marka DNA, 1 = fragmen satu sampel F8, 2=fragmen 2 sampel F8, 3= fragmen 1 sampel F8, 4= fragmen 2 sampel F8, 5=fragmen 1 sampel F9, 6=fragmen 2 sampel 9.

Analisis BLAST

Penentuan urutan nukleotida dilakukan searah dengan menggunakan primer HBV_1233_For untuk sampel fragmen satu dan HBV F2_1545_for untuk sampel fragmen dua. Hasil kedua urutan nukleotida fragmen pertama dan kedua dianalisis

untuk masing-masing sampel, selanjutnya dilakukan penggabungan urutan nukleotida sehingga dapat diperoleh urutan nukleotida gen *x* utuh. Gen *x* utuh diterjemahkan menjadi urutan asam amino sehingga diperoleh urutan asam amino protein *x*. Analisis BLAST dilakukan untuk mengetahui tingkat homologinya dengan urutan protein *x* HBV yang terdapat di GenBank NCBI. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa urutan asam amino yang diperoleh untuk keenam sampel merupakan gen *x* virus hepatitis B. Hasil analisis BLAST untuk sampel F7 dapat dilihat pada Gambar 2.

Description	Max score	Total score	Query cover
X [Hepatitis B virus] >dbj BAF95065.1 X protein [Hepatitis B virus] >qbl ADA56792.1 X protein [Hepatitis B virus] >qbl ADA56832.1 X protein [Hepatitis B virus] >q	310	310	100%
X protein [Hepatitis B virus] >qbl ADA56991.1 X protein [Hepatitis B virus] >qbl ADA56999.1 X protein [Hepatitis B virus] >qbl ADK56480.1 X protein [Hepatitis B vi	309	309	100%
X protein [Hepatitis B virus]	309	309	100%
X protein [Hepatitis B virus]	309	309	100%
X protein [Hepatitis B virus]	309	309	100%
X peptide [Hepatitis B virus]	308	308	100%
X protein, partial [Hepatitis B virus]	308	308	100%
X protein [Hepatitis B virus]	308	308	100%

Gambar 2. Hasil Analisis BLAST urutan AA protein *x* sampel F7

Analisis Mutasi Gen *x*

Urutan asam amino gen *x* HBV kemudian disejajarkan dengan urutan nukleotida yang diperoleh untuk mengetahui mutasi yang terdapat pada gen *x*-nya. Hasil penjejajaran sampel F4 dengan urutan *wild type* VHB subgenotipe B2 dapat dilihat pada Gambar 3. Mutasi yang terdapat pada setiap sampel yang berhasil ditentukan urutan nukleotidanya, dapat dilihat pada Tabel 1.

```

AFY98987.1_HBVB2      EELGEEVRLKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF TSA 154
BAL45456.1_HBVB2      EELGEEVRLKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF TSA 154
ADA56928.1_B2         EELGEEVRLKVFVLGGCRHKLVCSPAPCNFF TSA 154
Isolate_F4            EELGEEVRLKVFVLGGCRHKLVCSPAPCTFF TSA 154
*****
    
```

Gambar 3. Hasil Alignment dengan ClustelW2 Isolate F10

Beberapa mutasi berhasil ditemukan pada sampel HBV, tetapi mutasi yang ditemukan sebagian besar belum pernah diketahui keterkaitannya terhadap peningkatan risiko terjadinya kanker hati. Mutasi yang terjadi pada tiap sampel, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Data Hasil Analisis Mutasi Protein x

No.	Kode Sampel	Mutasi Protein x
1.	F3	R87G, E119A, W120E
2.	F4	V45I, P46Q, R87G, N149T
3.	F5	V44A
4.	F8	L37I, T118N, A145T
5.	F9	V45L

Berdasarkan mutasi yang diperoleh, semua pasien terinfeksi HBV dengan mutasi pada protein x. Protein x HBV berhubungan dengan pathogenesis penyakit yang berhubungan dengan HBV, khususnya pada karsinoma hepatosellular dari pasien dengan hepatitis kronis. Hasil studi kohor menunjukkan bahwa mutasi asam amino pada posisi 127, 130 dan 131 berhubungan dengan penyakit liver (Barbini *et al.*, 2012). Selain itu, tipe mutasi V5M/L, P38S dan H94Y berefek pada keenam kodon yang ditemukan berhubungan secara signifikan dengan keparahan klinis. Pada penelitian ini tidak ditemukan mutasi ganda K130M dan V131I yang ditemukan lebih sering pada pasien dengan HBeAg negatif dari pada pasien dengan HBeAg positif. Walaupun pada penelitian ini tidak ditemukan mutasi ganda atau mutasi triple pada protein x pada pasien terinfeksi HBV akut, akan tetapi mengingat kebanyakan pasien yang terinfeksi HBV kronis tidak menunjukkan adanya gejala sampai akhirnya mengalami sirosis atau karsinoma hati (Hann *et al.*, 2007), maka deteksi lebih dini terhadap mutasi gen x / protein x perlu dilakukan.

Infeksi HBV genotipe C relatif lebih sering menyebabkan sirosis dan kanker hati dibandingkan dengan genotipe B (Wang *et al.*, 2012). Perbedaan genotipe juga memberikan perbedaan dalam respon terhadap pengobatan menggunakan IFN- α yang mana Genotipe B memiliki respon yang lebih baik terhadap pengobatan menggunakan IFN- α dibandingkan Genotipe C (Kao *et al.*, 2000; Wai *et al.*, 2007), begitupun pengobatan dengan antivirus Lamivudin, walaupun kedua jenis genotipe

ini beresiko terhadap terjadinya mutasi yang menyebabkan resistensi obat setelah pemberian pengobatan lebih dari 1 tahun (Kao *et al.*, 2000). Dengan demikian, perlu diketahui jenis genotipe HBV yang menginfeksi pasien sebagai informasi awal pada investigasi klinik.

KESIMPULAN

Telah berhasil ditentukan urutan nukleotida/AA gen x/protein x utuh virus HBV yang menjangkiti 5 pasien dari 10 pasien terinfeksi virus HBV akut yang dianalisis gen xnya. Berdasarkan analisis urutan AA protein x, terdapat mutasi protein x pada kelima sampel yang berhasil diamplifikasi gen xnya akan tetapi mutasi protein x pada 5 sampel, tidak berhubungan secara bermakna dengan keparahan klinis hati.

Diketahui bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi perkembangan hepatitis B kronis menjadi kanker hati antara lain genotipe dan subgenotipe HBV, kandungan DNA HBV, dan mutasi pada gen x, maka disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut pada penentuan jumlah kandungan DNA HBV dan penentuan genotipe serta subgenotipe virus HBV yang menginfeksi pasien baik akut maupun kronis.

DAFTAR PUSTAKA

- Barbini L, Tadey L, Fernandez S, Bouzas B, Campos R. 2012. Molecular characterization of hepatitis B virus X gene in Chronic hepatitis b patients, *Virology Journal*, open acces, 9:131
- Baumert TF, Thimme R, Weizsäcker FV, 2007, Pathogenesis of hepatitis B virus infection, *World J Gastroenterol* 2007 January 7; 13(1): 82-90
- Gunawan VA. Genotype and Subgenotype Determination of hepatitis B Virus from Patiens by Using Gene Sequence as a Basis for Counseling, THESES, 2012, Sekolah Farmasi ITB Bandung.
- Hann, H.W.L., 2007, Hepatitis B Virus Screening and Counseling Strategies for General Practitioners, *John Hopkins Advanced Studies in Medicine*, 7(15), 476-481.
- Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, 2000, Hepatitis B Genotypes and The response to Interferon Therapy, *Journal of hepatology*, Vol. 33, Issue 6, Pages 998-1002.
- Lupberger J, Hildt E, 2007, Hepatitis B virus-induced oncogenesis, *World J Gastroenterol*. 13(1): 74-81
- Rini Kartikasari R. Analisis Mutasi Gen x Virus Hepatitis B pada pasien dengan Metode Nested PCR sebagai dasar Konseling, SKRIPSI, 2013, Sekolah Farmasi ITB Bandung.

- Wai CT, Chu CJ, Hussain M, 2007. Lok ASF, HBV Genotype B Is Associated With Better Response to Interferon Therapy in HBeAg(+) Chronic Hepatitis Than Genotype C, *Hepatology*; 36; 1425-1430.
- Wang, X., Y. Chen, D. Yu, W. Zhang, C. Qiu, G. Xiang, W. Dai, S. Wu, 2012, HBV Subgenotype C2 Infection, A1762T/G1764A Mutations May Contribute To Hepatocellular Carcinoma with Cirrhosis in Southeast China, *Iranian J. Publ Health*, 41(11), 10-18.
- Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ, 2008, Associations Between Hepatitis B Virus Genotype and Mutants and the Risk of Hepatocellular, *J Natl Cancer Inst* , 2008;100: 1134 – 1143.