

Virus Hepatitis B Mutan

Yuswanto Setyawan

Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Ciputra Surabaya
Email: yuswanto_setyawan@yahoo.com

Abstract: It is estimated that there are two billions people ever infected by hepatitis B virus (HBV) and there are around 350 millions people suffering from chronic hepatitis B; 20-25% of them are going to develop chronic liver disorders and hepatocellular carcinoma (HCC). Development in vaccination programs and therapy of hepatitis B infection might trigger the genom mutation in part of viral adaptation to stress (mutant HBV). The characteristic of mutant HBV cases is negative results of anti-HBs and HBsAg, meanwhile other infection markers showed the occurrence of HBV infection. Antigenic determinant mostly used to detect this infection is determinant "a" of HbsAg located in the position of 124-127. Changes in that location will disturb detection of HbsAg caused by decreased reactivity against several commercial kits, therefore, the sensitivity will decrease and be undected. Mutant HBV causes difficulty in patient detection and evaluation of blood donor. Besides that, mutation will influence the result of vaccination or therapy due to uneffectiveness of several managements.

Keywords: hepatitis B infection, vaccination and therapy, mutant HBV

Abstrak: Diperkirakan sekitar 2 milyar penduduk pernah terinfeksi virus hepatitis B (HBV) dan saat ini sekitar 350 juta penduduk sedang menderita infeksi hepatitis B kronis dan 20-25% diantaranya akan berkembang menjadi penyakit hati kronis serta karsinoma hepatoseluler (HCC). Berkembangnya program vaksinasi serta berbagai terapi untuk infeksi hepatitis B memungkinkan timbulnya mutasi pada genomnya sebagai bagian dari adaptasi virus terhadap tekanan (HBV mutan). Karakteristik untuk kasus HBV mutan ini ialah negatifnya anti-HBs dan HBsAg, sedangkan petanda infeksi yang lain menunjukkan adanya infeksi HBV. Determinan antigenik yang banyak digunakan untuk mendeteksinya ialah determinan "a" dari HbsAg yang terletak di posisi 124-127. Perubahan pada daerah tersebut akan mengganggu deteksi adanya HbsAg, karena berkurangnya reaktivitas terhadap berbagai kit komersial sehingga sensitivitasnya menjadi semakin menurun yang berakibat tak terdeteksi. HBV mutan menyebabkan kesulitan pada deteksi penderita serta penapisan donor darah. Selain itu adanya mutasi akan berpengaruh pada hasil vaksinasi atau terapi karena menyebabkan tidak efektifnya berbagai penanganan yang dilakukan.

Kata kunci: infeksi virus hepatitis B, vaksinasi dan terapi, HBV mutan

Infeksi hepatitis B merupakan infeksi pada hati yang cukup banyak dijumpai di dunia. Terdapat lima tipe hepatitis virus pada manusia, hepatitis A-E, tergolong dalam famili yang berbeda dan memiliki struktur genomik dan pola replikasi yang berbeda pula. Kelima jenis virus tersebut memiliki gambaran klinis dan luaran yang berbeda. Pada infeksi hepatitis virus A (HAV) dan E (HEV), gambaran klinisnya seringkali

transien, penularannya terjadi melalui oral-fekal sedangkan pada hepatitis virus B (HBV), C (HCV) dan hepatitis delta virus (HDV) infeksi dapat transien atau kronik dan ditularkan secara parenteral. Meskipun demikian, kelima virus memiliki target infeksi primer dan replikasi yang sama yaitu pada hepatosit. Tergantung pada virusnya, selama fase akut hepatitis, terdapat periode selama 2-6 minggu dimana

hepatosit terinfeksi dan terjadi *shedding* dari virus, baik pada aliran darah atau pada kanalikuli biliaris. Selama periode ini, akan terjadi aktivasi sistem imun untuk eliminasi virus (membunuh virus dan perbaikan jaringan yang terinfeksi). Ketika respon imun gagal membunuh virus, penyakit akan berkembang menjadi kronik. Masing-masing hepatitis virus mempunyai kemampuan *escape* dari pertahanan tubuh host yang berbeda-beda. Karena itu, infeksi hepatitis virus merupakan proses yang dinamis dari interaksi virus-pejamu.¹⁻⁶

Diperkirakan sepertiga dari penduduk dunia pernah mengalami kontak dengan virus tersebut, sekitar 2 milyar penduduk pernah terinfeksi dan saat ini diperkirakan sekitar 350 juta penduduk sedang menderita infeksi hepatitis B kronis, dan 20-25% diantaranya akan berkembang menjadi penyakit hati kronis serta karsinoma hepatoseluler (HCC). *World Health Organization* memperkirakan sekitar 1-2 juta orang meninggal karena komplikasi hepatitis kronik aktif, sirosis serta HCC. Tiga perempat penduduk dunia juga berada di daerah endemik infeksi virus hepatitis B. Tingginya jumlah penderita mengakibatkan kemungkinan terjadinya virus hepatitis B mutan juga menjadi lebih besar. Adanya virus hepatitis B mutan dilaporkan pertama kali pada tahun 1980, dan dengan berkembangnya program vaksinasi serta berbagai terapi untuk infeksi hepatitis B menyebabkan timbulnya mutasi pada genomnya sebagai bagian dari adaptasi virus terhadap tekanan. Mutasi yang terjadi akan berpengaruh pada hasil vaksinasi atau terapinya karena menyebabkan tidak efektifnya berbagai penanganan yang dilakukan.^{1-3,7}

Tulisan ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai patogenesis infeksi HBV secara umum serta mekanisme terjadinya mutan pada infeksi HBV.

Patogenesis Infeksi HBV

HBV ditransmisikan melalui darah, produk darah dan perinatal. Virus penyebabnya telah diketahui sejak tahun 1940an, walaupun baru dapat teridentifikasi pada tahun 1970-an. HBV merupakan

penyebab tersering dari hepatitis kronis, selain HCV dan HDV, dengan sekitar 300-400 juta karier di seluruh dunia. Pada negara berkembang penularan virus ini dapat terjadi melalui transfusi, akibat skrining yang kurang efektif. Penyebab tersering infeksi HBV kronis adalah transmisi perinatal dari ibu ke janin dan transmisi horisontal ke anaknya atau diantara anak-anak sendiri. Sebagai dampaknya, 5-10% dari populasi di berbagai bagian dunia terinfeksi dengan virus ini, termasuk Asia Tenggara dan sub-Saharan Afrika. Vaksinasi untuk HBV telah tersedia selama 3 dekade dan telah dilakukan secara rutin di hampir seluruh negara. Awalnya vaksin menggunakan partikel virus yang inaktif yang dipurifikasi dari serum donor yang terinfeksi hepatitis B kronik. Sekarang, vaksin telah dibuat dari *sub-viral* partikel (*hepatitis B surface antigen* (HBsAg)), yang diambil dari sel mamalia dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan.¹⁻³

Hepatitis B virus tergolong dalam genus *Orthohepadnavirus*, famili *Hepadnaviridae*. HBV mempunyai genom DNA sirkular sepanjang 3,2 kb yang mempunyai 4 gen dengan *open reading frames* (ORFs) yang saling tumpang tindih. ORFs mengkode untuk protein polimerase (gen Pol), antigen core dan antigen e (gen C), protein surface antigen besar, medium dan kecil (gen S) serta protein X (gen X). Genom ini akan menghasilkan 7 protein. Virus ini mempunyai 8 genotipe (A-H) berdasarkan perbedaan intergenotipik lebih besar dari 8% dalam sekuen nukleotidanya. Genotipe HBV ini menampakkan adanya diversitas geografik, genotipe tertentu mungkin hanya terlokalisasi di area tertentu. Sebagai contoh genotipe E banyak dijumpai di Madagaskar sedangkan genotipe F di Amerika Selatan. Genotipe A-D dapat dijumpai di banyak tempat, genotipe B dan C banyak dijumpai di Asia Timur. Terjadinya perbedaan genotipe ini terjadi sama seperti terjadinya mutasi pada HBV.^{1,7-10}

Famili *Hepadnaviridae* dibagi menjadi genus *orthohepadnavirus* dan *avihepadna-*

virus, berdasarkan perbedaan *host species* dan struktur genomnya. Yang membedakan dengan *avihepadnaviruses* ialah *orthohepadnavirus* terdiri dari gen regulator, yaitu gen X. Sebuah studi terhadap *avihepadnavirus* dengan X ORF menunjukkan bahwa ORF intak tidak diperlukan dalam infeksi *in vivo*, sedangkan pada *orthohepadna* gen X sangat diperlukan untuk replikasi *in vivo*.¹

Orthohepadnavirus, seperti HBV, merupakan virus berbentuk sferikal dengan *envelope*, berdiameter 42 nm, morfologi *double-shelled* (lapis ganda). Lapisan terluar dari *envelope* virus terdiri dari HBsAg. Lapisan dalam merupakan nukleokapsid ikosahedral dengan diameter 37 nm, terdiri dari hepatitis B core antigen (HbcAg) yang dilampiri oleh genom virus. Nukleokapsid mengandung *partially double-stranded circular DNA* genom yang secara kovalen berhubungan dengan *viral polymerase*. Virion akan berlimpah dalam darah selama masa transien infeksi dan beberapa fase pada infeksi kronis, dengan titer mencapai 10^{10} /ml. Partikel virus yang terbanyak dalam darah bukan virion tetapi partikel virus non-infeksius HBsAg. Partikel ini dapat ditemukan hingga 100 kali lebih banyak dari virion dan merupakan partikel antigenik primer pada vaksin. HBsAg dijumpai sebagai partikel sferis berukuran 22 nm dan struktur filamen berukuran 20 x 20-200 nm pada manusia yang terinfeksi. Partikel ini tidak mengandung *deoxyribonucleic acid* (DNA), karena itu tidak infeksius.^{1,2,4,10}

Envelope protein dari HBsAg umumnya tersusun dari 3 jenis protein, *large* (L), *medium* (M) dan *small* (S), yang memiliki sekuens yang sama tetapi M dan L memiliki N-terminal (pre-S2 dan pre-S1). Rasio 3 protein ini pada virion sekitar 1:1:3 (L:M:S). Ketiga protein ini merupakan protein membran integral, dengan *internal hydrophobic loop*, 5 domain transmembran dan regio eksternal pada S (dikenal sebagai "A" determinan). "A" determinan ini sangat antigenik. Domain eksternal merupakan bagian yang dikenali antibodi dan seringkali merupakan tempat terjadinya

antibody-escape mutation, yang menyebabkan virus menjadi resisten terhadap netralisasi oleh antibodi yang didapatkan melalui vaksinasi. Regio pre-S1, yang hanya terdapat pada L-HBsAg, dianggap mengandung *host receptor-binding domain*. HbcAg, subunit dari *viral nucleocapsid* dengan struktur ikosahedral, merupakan fosfoprotein yang berinteraksi dengan RNA secara tidak spesifik. Struktur ini penting dalam sintesa DNA dan untuk replikasi virus.^{1,7,11}

Semua virus yang termasuk dalam famili *Hepadnaviridae* mengandung genom *double-stranded circular DNA* parsial sekitar 3,2 kb, tidak ada untaian yang tertutup secara kovalen. Untaian (-) lengkap dan pada terminalnya terdapat kelebihan 9 nukleotida. Untaian (+) seringkali tidak lengkap, memiliki 5' end yang konstan tetapi 3' end yang bervariasi. Terdapat ikatan pendek yang tumpang tindih antara 5' end dari 2 untaian DNA (~220 bp untuk HBV). Sebagai hasilnya, DNA virus mempertahankan struktur DNA sirkuler (sebagian *double stranded*, sebagian *single stranded*). Kedua untaian ini juga mempunyai 2 *direct-repeat sequences* pada nukleotida 10-11, dekat dengan 5' end. 17-basa *ribonucleic acid* (RNA) dengan 5'-cap struktur melekat secara kovalen pada 5' end dari untaian (+), sedangkan protein, RNA polimerase virus, melekat secara kovalen dengan 5' end dari untaian (-). Polimerase yang terdapat dalam virion mampu menutup sebagian gap pada untaian (+) pada reaksi *in vitro* dimana deoksinukleotida dicampurkan dengan virion. Fraksi kecil dari virion (sekitar 5%) mempunyai genom yang linear sebagai konsekuensi dari pembentukan untaian (+) yang tidak sesuai, virion ini juga bersifat infeksius, walaupun replikasinya tidak sempurna. Linear DNA tampaknya juga merupakan prekursor primer viral DNA yang berintegrasi pada pejamu DNA selama infeksi. Integrated DNA tidak memegang peranan dalam replikasi virus (hanya 0,1% hepatosit yang terinfeksi selama masa infeksi transient), tetapi pada kasus yang jarang dari infeksi kronis pada

manusia, integrated DNA ini dapat mengaktifasi onkogen selular yang menyebabkan karsinoma hepatoseluler primer. Genom HBV sangatlah padat, dengan 4 ORF yang tumpang tindih yang dikode oleh 7 protein. Semua ORF dilokalisasi pada untaian (-) (mRNA adalah untaian (+)). Produk protein tunggal dihasilkan oleh X dan DNA polimerase/*reverse transcriptase* ORF. Sebaliknya, 2 protein (nukleokapsid virus (*core protein*) dan e-antigen virus diproduksi oleh *core* atau *precore* ORF dan 3 protein oleh *gene envelope* ORF. ORF *envelope* 3 protein *envelope*, S, M (S + preS2) dan L (S + preS2 + preS1). S dan M diproduksi mRNA oleh promotor dengan letak awal yang berbeda antara AUG pada 5' end pada preS2. L dihasilkan dari AUG pada akhir dari L ORF. Proses yang sama terjadi pada produksi protein *core* dan *precore* dari promotor tunggal atau 2 promotor yang saling tumpang tindih.^{1,7,9,10,12}

Setelah terjadi infeksi, partikel *core* dari viral ditransport ke nukleus dan DNA viral dilepaskan dan *single stranded gap* dipenuhi, mungkin oleh DNA polimerase. DNA kemudian diubah menjadi *double-stranded covalently closed circular* (ccc) DNA. cccDNA berfungsi template untuk transkripsi semua virus mRNA, termasuk pregenome, yang ukurannya sedikit lebih panjang daripada genom virus DNA. Semua RNA mempunyai signal poliadenilasi, yang menunjukkan *viral core gene ORF*. Terdapat promotor dan nMRA untuk setiap protein virus, kecuali pada reverse transcriptase, yang ditranslasikan dari mRNA yang sama (pregenome) sebagai *viral core protein*. Transkripsi dari HBV mRNA dikontrol oleh 2 promotor dari *core* dan *gen X*, dan diregulasi oleh faktor transkripsi spesifik dari hepar. Fakta ini yang menerangkan mengapa replikasi HBV terutama terjadi pada hati. *Splicing* RNA tidak terlibat dalam replikasi virus tetapi salah satu studi menunjukkan bahwa protein L dari HBV ditranslasikan dari 2 mRNA yang berbeda. Proses ini diyakini memiliki peran dalam regulasi sintesis dari kopi cccDNA pada hepatosit yang

terinfeksi.^{1,9,10}

Infeksi awal ditandai dengan translasi pregenom mRNA ke dalam protein nukleokapsid virus (produk dari *core gene*) dan viral reverse transcriptase/RT (produk dari *Pol gene*). RT menyebabkan penonjolan pada sisi stem loop dengan gugus OH dari residu tirosin pada N-terminal region dari RT, diikuti penggandaan dari 4 nukleotida. DNA kemudian ditranslokasikan pada *complementary sequence* yang terletak dekat 3' end dari pregenome dan kemudian pada 5' end RNA. Sejumlah *cis-acting sequences* berperan dalam sintesis genom virus yang sirkuler.¹

Fase awal infeksi oleh HBV adalah akumulasi dari protein *envelope* virus. Hal ini penting tidak hanya untuk perakitan virion, yang terjadi oleh interaksi nukleokapsid dengan protein *envelope* dan budding ke dalam endoplasma retikulum, tetapi juga secara tidak langsung, untuk memastikan bahwa yang baru dibuat DNA *load* tidak semua bermigrasi ke inti untuk membentuk lebih cccDNA. Formasi cccDNA cepat terhenti pada *non dividing*-hepatosit, sehingga kopi cccDNA per inti umumnya tidak melebihi 50. Mekanisme ini diperlukan untuk kelangsungan hidup virus, karena jumlah kopi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kematian sel. Hasil sStudi menunjukkan bahwa mutan HBV yang tidak dapat menghentikan cccDNA sintesis dengan cepat digantikan dalam hati oleh *wild type* atau HBV mutan yang dapat menghentikannya.¹

Sampai saat ini, tidak jelas apakah ini mekanisme kopi cccDNA sama pada sel yang terinfeksi HBV. Sebagian besar protein *envelope* disekresikan bukan sebagai bagian dari virion 42 nm, tetapi sebagai subviral 22nm *rods and spheres*, secara kolektif disebut sebagai HBsAg. HBsAg umumnya hadir dalam serum individu yang terinfeksi dalam jumlah 100 kali lipat > virus. Protein S-HBsAg, yang terkecil dari tiga protein *envelope*, adalah komponen protein utama dari *envelope* virus dan HBsAg. Protein M dan L hanya menyusun HBsAg sekitar ~ 5 dan 1%.¹

Sintesis dari genom virus (*reverse*

transcriptase) berlangsung sepenuhnya dalam partikel inti. Dengan demikian, tidak seperti virus lainnya, perakitan nukleokapsid HBV benar-benar terjadi sebelum replikasi genom virus. Setelah sintesis DNA virus yang cukup telah terjadi, protein inti dapat mengalami perubahan konformasi, yang terkait dengan HBsAg. Interaksi ini berlangsung di retikulum endoplasma. L dan S-HBsAg diperlukan untuk sekresi partikel virus.^{1,11}

Fitur yang paling penting dari siklus replikasi virus ialah kemampuan untuk mempertahankan infeksi produktif kronis dari hepatosit individu tanpa membunuh sel pejamu. Karena itu, infeksi dari seluruh hepatosit akan menghasilkan infeksi kronis, dan resolusi infeksi akan menyebabkan terjadinya kerusakan hati oleh sistem imun mengeliminasi cccDNA. Namun, hal ini tampaknya tidak terjadi. Infeksi dapat bertahan selama beberapa minggu atau bulan dan kemudian mengalami resolusi dalam waktu singkat, mungkin kurang dari 2 minggu, bahkan setelah infeksi nyata dari seluruh hepatosit. Berdasarkan studi tentang infeksi transien dari simpanse HBV, satu kelompok peneliti menyimpulkan bahwa virus mungkin dihapus tanpa membunuh sel yang terinfeksi. Hal ini mengarah pada kesimpulan bahwa sitokin yang diproduksi selama respon imun antivirus dapat menginduksi penghancuran intrasel dari semua intermediet replikasi virus, termasuk cccDNA. Terdapat bukti langsung bahwa sitokin dapat memicu penghapusan RNA virus, protein, dan DNA replikasi dari hepatosit terinfeksi tetapi, belum ada bukti langsung bahwa sitokin dapat memicu hilangnya cccDNA dari hepatosit yang terinfeksi. Kematian hepatosit dan regenerasi mungkin memiliki peran yang penting. Hilangnya cccDNA terjadi tidak hanya oleh kematian sel, tetapi juga selama mitosis, atau penghancuran oleh sel T sitotoksik.^{1,13,14}

Setelah seluruh hepatosit terinfeksi, infeksi seringkali sembuh setelah 3-6 bulan, umumnya dengan respon antibodi penetralisir yang melindungi terhadap infeksi ulang. Sisa DNA virus dapat

dideteksi dalam darah dan jaringan beberapa tahun kemudian dengan *polymerase chain reaction* sensitif (PCR), tetapi sejauh ini tidak ada bukti bahwa residu ini adalah patogen. Di sisi lain, individu dengan riwayat infeksi transien harus dianggap sebagai sumber potensial infeksi dan beresiko kambuh saat terjadi penekanan dari sistem imun¹.

Perkembangan menjadi infeksi kronis terjadi bila respon imun pejamu tidak memadai selama minggu-minggu atau bulan pertama setelah terpapar virus. Sebanyak 90% dari mereka yang terinfeksi sebelum usia 1 tahun akan menjadi carrier kronis, jumlah itu menurun menjadi sekitar 5% pada orang dewasa. Infeksi kronis ditunjukkan dengan adanya HBsAg dalam serum selama lebih dari 1 tahun [nilai cut off bawah dari tes dengan *enzim-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) untuk deteksi HBsAg adalah antara 1 dan 10 ng/ml, carrier memiliki titer lebih dari 100 µg/ml]. Tes dengan PCR dapat juga dilakukan. Satu hipotesis adalah bahwa beberapa DNA virus diintegrasikan ke dalam DNA *host* selama infeksi, sebagai template untuk produksi HBsAg, tapi tidak untuk RNA pregenomic. Memang, integrasi DNA virus linier diproduksi secara "in situ priming sintesis untaian (+) akan memisahkan promotor *core/precore* dari urutan coding pregenome. Jadi, akhirnya terjadi penghentian produksi virus oleh sistem kekebalan tubuh, dengan sisa DNA virus hanya terdeteksi oleh PCR, dapat terjadi tanpa pengaruh pada produksi HBsAg, terutama jika HBsAg mampu membangun ketahanan terhadap infeksi ulang dari sel di mana ia dihasilkan. Tingkat dimana transisi ini terjadi mungkin tergantung pada sejarah alami infeksi. Sebagai contoh, perbandingan karier HBV pada Haimen City, Republik Rakyat Cina, dan di Senegal menunjukkan perbedaan besar dalam frekuensi carrier HBsAg jangka panjang yang juga viremic dengan teknik hibridisasi (titer virus > 5 × 10⁵/ml). Hampir tidak ada karier dengan viremic di atas usia 30 tahun yang terdeteksi di Senegal, sedangkan ~ 25% karier di Cina

tetap viremic sampai usia 50 tahun. Oleh karena itu infeksi kronis mungkin sebenarnya melibatkan setidaknya dua tahap yang berbeda, awalnya virus diproduksi pada titer tinggi oleh hati, dengan level mencapai 10^{10} /ml, selanjutnya hepatitis kehilangan cccDNA, dan tidak lagi terinfeksi, meskipun HBsAg produksi tetap ada, dan mungkin sintesis protein X terus terjadi dari DNA virus terintegrasi.^{1,15}

Masih kontroversi apakah ekspresi virus memberikan kontribusi langsung untuk penyakit hati, termasuk sirosis dan karsinoma hepatoseluler, atau jika manifestasi penyakit adalah hasil dari respon imun infeksi. Seperti disebutkan sebelumnya, beberapa peneliti berpendapat bahwa protein X mungkin onkogenik. Peneliti lain mengusulkan bahwa potongan C-terminal dari *envelope* protein M HBV, yang berfungsi sebagai aktifator transkripsi dalam kultur sel, mungkin juga onkogenik. Adapun X, hal ini tidak terbukti pada individu terinfeksi secara kronis. Di sisi lain, tampak jelas bahwa ekspresi gen virus memberikan kontribusi untuk perkembangan penyakit secara tidak langsung, dengan target respon imun host. Ada juga yang berpendapat bahwa HBV varian dapat timbul selama proses infeksi kronis, terutama pada e-antigen yang tidak terbentuk, bentuk ini dapat meningkatkan patogenitas dan progresi penyakit. Beberapa studi menunjukkan bahwa mutan muncul sebagai respon, dan bukan sebagai penyebab, dari penyakit hati.^{1,16}

Hepadnaviruses, yang berreplikasi dengan *reverse transcriptase*, akan mengalami evolusi cepat di dalam dan di antara karier. Namun, setidaknya terdapat dua faktor mitigasi terhadap evolusi virus cepat ini. Pertama, *reading frame* yang tumpang tindih dari berbagai genom virus akan membatasi jumlah mutasi yang viabel. Kedua, pada hati yang terinfeksi menyeluruh, tampak bahwa ruang replikasi baru hanya diciptakan oleh kematian sel dan regenerasi. Oleh karena itu, banyak mutan viabel mungkin hilang karena tidak ada sel dalam hati yang dapat diinfeksi, dan blok untuk intraselular amplifikasi cccDNA

membatasi konversi ke cccDNA. Meskipun tampak bahwa beberapa strain HBV tidak dikenali oleh antibodi pada vaksin yang ada saat ini, tetapi tidak ada bukti bahwa pemberian serangkaian vaksinasi lengkap pada individu yang rentan terhadap infeksi oleh *escape mutan* tersebut. Variasi virus/evolusi merupakan masalah akibat terapi dengan nukleosida antivirus. Umumnya membutuhkan waktu sekitar 1 tahun atau lebih untuk munculnya varian yang resistan terhadap obat ini.^{1,17,18}

HBV umumnya tetap diam selama beberapa minggu setelah infeksi dengan tingkat HBV-DNA rendah dalam sirkulasi (setara 10^2 - 10^4 genom per milliliter) sebelum memulai replikasi efisien dan cepat, yang dapat menyebabkan kadar dalam plasma sekitar 10^9 - 10^{10} kopi per milliliter virus dan infeksi pada hepatosit. Menariknya, dalam infeksi *self limited* dari HBV-DNA akan turun lebih dari 90% dalam waktu 2-3 minggu setelah puncak replikasi virus dan sebelum puncak antigen spesifik CD8 respon dan kerusakan hati, ditunjukkan dengan peningkatan alanin transaminase (ALT). Karena itu, DNA virus ini rupanya dapat dibersihkan tanpa perlu destruksi hati. Interferon tipe I umumnya terlibat dalam pertahanan awal pada kebanyakan infeksi virus, namun pada minggu-minggu pertama infeksi tidak terjadi perubahan pada respon imun innate. Stimulasi sel Kupfer dan endotel sinusoidal sel hati dengan *Toll-like receptor* (TLR) 3 dan 4 agonis menyebabkan penekanan kuat terhadap replikasi HBV, menunjukkan bahwa TLRs memainkan peran utama dalam pengendalian replikasi HBV. Sel natural killer (NK) dan/atau sel NK-T dapat menghambat replikasi virus melalui produksi interferon (IFN)- γ . Sel NK-T juga bisa langsung diaktifkan ketika disuntikkan ke tikus yang mengekspresikan antigen HBV di hati. Dengan demikian, NK dan sel NK-T bisa dipicu selama infeksi VHB alami, dengan ekspresi pada hepatosit yang terinfeksi atau sel dendritik (DC) atau mungkin melalui pengenalan langsung dari komponen virus.^{1,13,14}

Ketika limfosit T sitotoksik (CTLs)

telah mencapai hati, eliminasi gen HBV dari sel-sel hati yang terinfeksi terutama dimediasi oleh mekanisme *non-cytopathic* oleh sekresi IFN- γ . Rekrutmen CTL ke hati dimaksudkan untuk membunuh sel-sel hati yang terinfeksi dengan pelepasan *high mobility group box 1* (HMGB1) protein, yang bertanggung jawab untuk menarik sel polimorfonuklear (PMNC) ke dalam hati. Sel-sel yang tersebut menghasilkan matriks-metaloproteinase (MMPs) yang dapat mendukung perekrutan sel mononuklear (MNC), termasuk sel NK, sel T dan B, dan monosit ke dalam hati. Perekrutan sel mononuklear juga difasilitasi oleh kemokin CXCL9 dan CXCL10, yang diproduksi oleh sel parenkim dan non-parenkim hati sebagai respon terhadap IFN- γ . Hasil akhir dari peristiwa ini adalah amplifikasi kerusakan sel hati.^{1,13,14}

Respon CD4 dan CD8 umumnya terdeteksi dalam waktu singkat setelah terjadinya peningkatan replikasi HBV, yang mengikuti sebuah tahap awal dimana HBV-DNA negatif, yang berlangsung selama sekitar 4-7 minggu setelah infeksi. Respon ini biasanya multispesifik, terutama pada Th1 dan lebih kuat daripada yang terdeteksi pada infeksi kronis. Sel CD8 HBV-spesifik mengekspresikan perforins yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang terjadi pada infeksi HCV. Selain itu, proliferasi, produksi IFN- γ , dan aktivitas litik dari populasi CD8 terjadi dengan sangat efisien, terkait dengan kontrol infeksi yang berhasil.^{1,13,14}

Percobaan pada depleksi sel T dengan injeksi antibodi anti CD4 dan CD8 pada simpanse terinfeksi menunjukkan bahwa sel CD8 krusial bagi pembersihan virus dan patogenesis penyakit. Pada infeksi yang *self-limited*, depleksi CD4 tidak memengaruhi secara signifikan profile HBV DNA dan ALT, sebaliknya, depleksi sel CD8 akan mempengaruhi lama dan *outcome* dari infeksi HBV. Dengan demikian, NK dan NK-sel T dapat berkontribusi pada awal infeksi, tapi sel CD8 tampaknya penting untuk hasil akhir dari pengendalian infeksi. Peran utama dalam perekrutan CD8 sel ke hati dimainkan oleh trombosit, yang dapat

teraktifasi sebagai hasil dari perubahan dinding pembuluh dalam hati akibat respon inflamasi. Adhesi dan aktivasi platelet dapat memfasilitasi interaksi CD8 dengan CTLs. Ketika infeksi berhasil dikendalikan, pematangan memori sel T terjadi efisien, seperti ditunjukkan oleh meningkatnya ekspresi CD127 molekul dan penurunan PD-1 pada sel CD8 spesifik HBV mengikuti masa resolusi infeksi. Respon yang dimediasi CD4 dan CD8 dapat terdeteksi bertahun-tahun sesudah masa akut dan mungkin penting untuk mengontrol virus persisten, mungkin seumur hidup, bahkan setelah resolusi lengkap penyakit hati akut. Keberadaan virus persisten dalam jumlah kecil yang seringkali hanya dapat terdeteksi dalam jaringan hati tanpa adanya HBsAg, disebut sebagai *atenc (occult HBV infection)*.^{1,13,14}

Ketidakkampuan untuk mengendalikan infeksi dan terjadinya kronisitas menyebabkan penurunan yang progresif dari respon imun adaptif dengan penurunan sel T CD8 dan CD4 serta antibodi spesifik terhadap virus. Hal ini kontras dengan sel T memori CD4 dan CD8 yang tetap terdeteksi selama beberapa tahun setelah resolusi infeksi HBV.^{1,13,14}

Pasien yang mengalami infeksi kronis HBV akan mengalami penurunan fungsi sel T CD4 dan CD8 yang persisten. Pasien dengan tingkat replikasi HBV yang tinggi, sel T spesifik HBV hampir tidak terdeteksi dalam sirkulasi. Sel T spesifik HBV akan terkonsentrasi ke dalam hati, dimana mereka tercampur dengan sel T non-spesifik terhadap virus, dan berperan penting dalam kerusakan sel hati. Intensitas respon sel T tampaknya berkorelasi terbalik dengan tingkat viremia, dengan respon HBV-spesifik lebih intens pada pasien dengan viral load yang lebih rendah. Hepatitis flare telah terbukti didahului dengan pemulihan reaktivitas sel T CD4 terhadap antigen nukleokapsid HBV dan akan diikuti oleh kenaikan IL-12 yang signifikan dan produksi sitokin Th1 yang dapat mendahului atau terjadi bersamaan dengan serokonversi HBeAg. Kemungkinan bahwa *hyporesponsiveness* sel T

terhadap HBV antigen pada infeksi HBV kronis tidak ireversibel ditunjukkan dengan pemulihan respon CD4 dan CD8 spesifik HBV pada pasien dengan HBeAg + dengan terapi anti virus lamivudine. Epitop dominan yang dikenali oleh sel T akan dikembalikan sesuai dengan yang diidentifikasi dalam mengatasi infeksi secara spontan, menunjukkan bahwa *hyporesponsiveness* sel T pada pasien kronis lebih mungkin berhubungan dengan penghambatan fungsional daripada penghapusan cells secara ireversibel. Hepatitis flare juga dikaitkan dengan peningkatan frekuensi dan fungsi sel NK, menunjukkan peran komponen selular dari respon imun bawaan dalam patogenesis reactivations pada hepatitis B kronik dengan anti-Hbe +.^{1,13,14,19}

Sel CD8 yang terdapat dalam sirkulasi karier inaktif mampu berkembang biak dan menghasilkan sitokin antivirus secara efisien pada pertemuan kembali dengan antigen. Sel-sel tersebut secara fungsional kompeten dalam mengendalikan virus.^{1,13,14}

Respon humoral juga memainkan peran penting dalam pengendalian infeksi HBV. Produksi antibodi sangat penting untuk netralisasi partikel HBV bebas dan untuk masuknya virus ke dalam sel pejamu. Perlindungan dengan antibodi sangat penting sebelum invasi ke dalam sel pejamu, setelah itu, antibodi dapat berkontribusi dalam membatasi penyebaran partikel virus, tetapi penghapusan virus intrasel menjadi tugas pokok HLA kelas I melalui CTLs dan sel efektor lainnya yang direkrut ke lokasi infeksi. Sistem imun adaptif bekerja saling menunjang. Kurangnya sel T CD4 dapat mengganggu aktivitas sel T CD8 dan produksi antibodi, menyebabkan virus yang beredar yang tidak bisa dibersihkan oleh antibodi sendiri. Pembersihan HBV berkaitan dengan produksi antibodi *anti-envelope* dan sera dengan antibodi antivirus yang tinggi (khusus untuk virus *envelope*) yang dapat mengontrol HBV. Konsep-konsep ini juga didukung oleh bukti bahwa vaksin yang mengandung *envelope* polipeptida(s) efektif dalam pencegahan infeksi primer dan

pemberian anti-HBs immunoglobulin dosis tinggi dapat mencegah reinfeksi pada *liver graft*. Pentingnya *envelope* dalam memunculkan respons antibodi juga didukung oleh bukti-bukti yang menunjukkan bahwa *envelope* HBV *escape mutan* dapat menginfeksi host dalam tingkat proteksi dari *wild-type virus-specific* antibodi anti-HBs.^{1,13,14}

Patogenesis Terjadinya Persistensi dan HBV Mutan

Walaupun beberapa respon imun *innate* dan adaptif yang terkait dengan tahapan yang berbeda dari infeksi HBV telah dijelaskan, penyebab utama persistensi HBV setelah infeksi didapatkan saat dewasa masih tetap tidak jelas. Luaran dari Infeksi diyakini terkait dengan jenis respon imun yang diaktifasi oleh pejamu yang terinfeksi, tetapi faktor-faktor utama yang bertanggung jawab untuk menentukan efisiensi antivirus dari respon imun tetap spekulatif. Karena itu, masih belum jelas apakah kelemahan respon sel T pada hepatitis B kronis merupakan penyebab persistensi HBV. Tentunya, kondisi ini lebih lanjut dapat berkontribusi dalam mempertahankan persistensi virus, saat HBV berhasil menghindari respon imun tubuh. *Hyporesponsiveness* sel T perifer adalah defek imun yang nyata dan bukan disebabkan karena mobilisasi sel T ke hati.^{1,13,14}

Fungsi sel T yang abnormal mungkin dipertahankan terutama oleh pengaruh pemaparan berkepanjangan sel T dan B terhadap antigen virus dalam jumlah besar. HBV biasanya mampu menghasilkan jumlah besar partikel subviral non infeksi yang mengandung *envelope* antigen dan bentuk sekretori dari protein nukleokapsid, yang terdeteksi dalam sirkulasi sebagai antigen terlarut, yang disebut HBeAg. Kelelahan oleh penghapusan atau inaktivasi fungsional cenderung untuk mewakili nasib sel T spesifik HBV kronis yang terpapar antigen tersebut. Studi pada hewan model yang terinfeksi virus menunjukkan bahwa *hyperexpression* dari jalur *costimulatory* negatif, akan menghambat sinyal untuk sel

T dalam kondisi paparan kronis dengan konsentrasi antigen yang tinggi. Diketahui bahwa aktivasi sel T tidak hanya tergantung pada sinyal pada reseptor sel T, tetapi juga pada interaksi reseptor-ligan tambahan yang dapat memberikan sinyal *costimulatory* yang penting untuk aktivasi dan survival dari sel T. Keseimbangan antara aktivasi dan inhibisi pada tempat infeksi dapat mempengaruhi fungsi antivirus dari sel T yang berkontribusi pada disfungsi sel T pada hepatitis virus kronis.^{1,13,14}

Dalam kondisi paparan kronis terhadap konsentrasi antigen yang tinggi, sel T CD8 spesifik HBV tidak dapat mengikat tetramer HLA spesifik. *Phenotypical* ini mencerminkan kemampuan sel CD8 untuk menghindari penghapusan perifer oleh antigen dalam jumlah besar dan bertahan, mengabaikan virus yang menginfeksi.^{1,13,14}

Selain itu, HBeAg pada tikus transgenik ternyata mendukung produksi sitokin Th2 dan menyebabkan penghapusan Th1 sel dengan ketidakseimbangan sitokin yang menguntungkan persistensi virus. Akhirnya, HBsAg eksogen masuk jalur MHC kelas I melalui APC profesional, termasuk sel B, untuk pembentukan imunitas tubuh, dengan produksi antibodi anti-HBV yang defek dan hyporesponsiveness sel T.^{1,13,14}

Tidak kalah penting, patogenesis HBV persistent juga diperankan oleh sel T regulator (T reg). Sel T regulator mampu menekan respon imun virus-spesifik, hiperaktivitasnya mungkin merupakan salah satu penyebab potensial dari *hyporesponsiveness* sel T terhadap antigen HBV, sehingga menguntungkan untuk persistensi virus. Peningkatan T reg dalam darah perifer dan korelasi positif antara kadar HBV-DNA dan frekuensi T reg yang beredar mendukung peran T reg dalam patogenesis persistensi HBV kronis, namun kesimpulan ini bertentangan dengan hasil penelitian lainnya dimana tidak ada perbedaan dan aktivitas supresi T reg dalam hepatitis B kronis dibandingkan dengan *resolved HBV infection*.^{1,13,14}

Sel dendritik juga berperan dalam mekanisme persistensi HBV, dimana

mereka berperan sebagai penghubung antara imunitas innate dan adaptif. Di antara faktor yang dapat mempengaruhi tingkat efisiensi antivirus dari respon imun awal, jenis dan jumlah virus yang menginfeksi serta genetik pejamu yang terinfeksi dapat memberikan pengaruh yang penting dalam maturasi respon imun protektif. Rute infeksi, jumlah dan jenis virus, lingkungan sitokin, latar belakang genetik dari penderita ialah beberapa faktor yang berkontribusi pada awal penghambatan respon adaptif antivirus.^{1,20}

Di antara enam obat yang disetujui FDA untuk pengobatan hepatitis B kronis, dua adalah disuntikkan dan empat adalah per oral dalam bentuk nukleotida atau analog nukleosida. Semua nukleotida analog [lamivudine (Epivir), adefovir dipivoxil (HepSera), entecavir (Barraclude), dan telbivudine (Tyzeka)] ialah inhibitor Pol DNA viral yang secara langsung menghambat sintesis DNA virus dalam nukleokapsid sitoplasma. Mekanisme kerja IFN- α pada infeksi HBV masih belum sepenuhnya dipahami. Studi sebelumnya pada kultur sel menunjukkan bahwa IFN- α menginduksi respon anti-virus selular pejamu dan membatasi replikasi HBV baik melalui penghambatan transkripsi RNA virus atau mencegah pembentukan pgRNA yang mengandung nukleokapsid. Selain melalui aktivitas antivirusnya, IFN- α dapat juga menekan infeksi VHB in vivo oleh modulasi respon imun antivirus pejamu.^{1-3,17,18}

Proses replikasi HBV terjadi melalui tahapan *RNA reverse transcriptase* dan HBV varian akan terjadi pada proses tersebut. Proses dari *reverse transcriptase* dari *HBV polymerase* protein tidak mempunyai tahapan *control proofreading* sehingga memungkinkan terjadinya peletakan basa yang tidak seharusnya pada rantai DNA yang sedang bereplikasi. *Mismatch* atau kesalahan tersebut dapat menyebabkan terbentuknya sebuah generasi yang mempunyai bentuk transkrip varian yang berasal dari suatu *template* tunggal dan akan dapat membentuk suatu kelompok spesies khusus. Kelompok varian ini merupakan cikal bakal terbentuknya suatu HBV

mutan terutama bila terjadi suatu tekanan atau tindakan represi pada HBV *wild type*. Mutasi yang terjadi pada salah satu gen dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada satu asam amino pada suatu ORFs yang saling bertumpang tindih. Pada waktu terjadi replikasi akan terjadi rantai nukleotida dengan *mismatch sequence*. Seseorang dapat memproduksi hingga 10^{11} partikel virus per harinya. Bila kecepatan *polymerase reverse transcription error* adalah 1 kesalahan setiap 10^7 basa, maka pada suatu infeksi aktif HBV akan dapat terbentuk 10^7 kesalahan basa pada rantai yang terbentuk perhari dalam suatu genom 3200 bp.^{1,7}

Dalam keadaan biasa maka HBV mutan yang terbentuk umumnya tidak dapat berkompetisi terhadap HBV *wild type*, atau sifatnya tidak memungkinkannya berkembang hidup. Tetapi pada keadaan dimana HBV *wild type* mengalami tekanan akibat adanya antibodi yang terbentuk pada vaksinasi atau pemberian terapi antiviral maka tipe HBV *wild type* akan jauh berkurang atau hilang sedangkan tipe mutan akan mendapat kesempatan untuk berkembang menjadi banyak. Oleh karena itu HBV mutan dapat timbul di area tertentu saat populasi yang terinfeksi mendapat tekanan selektif tersebut.^{1,7}

Akhir-akhir ini perkembangan terapi terhadap infeksi HBV semakin menunjukkan kemajuan dengan pesat, tetapi hal ini juga mengakibatkan terjadinya lebih banyak HBV mutan. Berbagai terapi yang ditujukan terhadap infeksi HBV seperti imunoterapi dan nukleosid analog untuk menghambat aktivitas polimerase akan mengakibatkan tidak terdeteksinya HBV *wild type* tetapi akan membuka jalan bagi HBV mutan untuk menjadi bentuk dominan. Bila tekanan dihilangkan maka HBV *wild type* seringkali dapat timbul kembali sebagai bentuk dominan.^{1,7}

Tujuan utama terapi atau "pilar kembar" ialah penekanan virus yang ampuh dalam jangka panjang dan menghindari resistensi. Namun, munculnya varian HBV yang resisten terhadap HBV DNA Poli inhibitor tetap menjadi salah satu ancaman terbesar untuk dapat menggunakan obat

secara efektif. Berdasarkan asumsi bahwa *reverse transcriptase* dari HBV DNA Pol memiliki tingkat kesalahan $3 \times \text{dasar } 10^{-5}$ /basa per siklus replikasi, Perelson dan Ribeiro mengemukakan bahwa sekitar 0,1 perubahan basa akan dibuat setiap replikasi genome. Konsentrasi virus yang beredar biasanya di kisaran $10^8 - 10^{10}$ per mililiter, dengan asumsi waktu paruh 1 hari untuk virion HBV yang beredar, $\sim 10^{12}$ HBV virion diproduksi dan dibersihkan setiap hari. Dalam hal ini, $\sim 9 \times 10^{10}$ virion dengan perubahan basa tunggal dan $\sim 4,5 \times 10^9$ virion dengan 2 perubahan basa dibuat setiap hari. Hal ini memungkinkan mutan tunggal dan ganda dibuat setiap hari dan setiap individu terinfeksi VHB akan memiliki ribuan HBV mutan yang resisten terhadap masing-masing inhibitor Pol, bahkan sebelum terapi dimulai.^{1,7}

Kecepatan virus yang resisten terhadap obat muncul bisa berbeda antar individu. *Viral load* sebelum pengobatan mungkin penting dalam menentukan kapan mutan yang resisten terhadap obat muncul. Misalnya, orang dengan HBeAg-positif dan *viral load* tinggi dan orang dengan HBeAg-negatif dan *viral load* rendah dapat mengembangkan mutan virus resisten terhadap inhibitor Pol dengan kecepatan yang hampir sama. Studi klinis menunjukkan bahwa banyak faktor lainnya, seperti tingginya ALT serum dan indeks radang, mungkin mencerminkan fisiologi dan imunologi hati, yang berkaitan dengan kecepatan dimana virus mutan muncul.^{1,17,18}

Genotipe didefinisikan sebagai memiliki perbedaan sequence lebih besar dari 8% pada seluruh genom. Diketahui ada delapan genotipe VHB, A - H. Genotipe tersebut tidaklah terdistribusi merata di seluruh dunia. Hubungan antara genotipe dan patogenisitas tidak sepenuhnya dipahami, dan penelitian dipersulit oleh kenyataan bahwa genotipe C ditemukan lebih banyak di Asia, di mana infeksi perinatal adalah rute yang dominan, dan genotipe A lebih sering ditemukan di Amerika Utara, di mana HBV terutama ditularkan melalui hubungan seksual. Bukti

menunjukkan bahwa genotipe A terkait dengan peluang resolusi spontan yang lebih besar dan genotipe C cenderung kurang responsif terhadap interferon dan memiliki perjalanan klinis yang lebih agresif. Namun, harus disadari bahwa ini adalah asosiasi statistik, dan untuk setiap individu, genotip saja tidak dapat diandalkan untuk prediksi klinis.^{1,2,7}

HbsAg adalah suatu glikoprotein transmembran yang terdapat dalam serum penderita infeksi HBV baik akut maupun kronis. HbsAg dapat terdeteksi sebelum terjadinya gejala klinis. Deskripsi adanya HBV mutan pertama kali dilaporkan pada seorang anak dari ibu yang positif. Virus tetap bertahan meskipun pasien telah diimunisasi dan diberi imunoglobulin.^{1,7}

Mutasi tersering dijumpai pada posisi asam amino 145 (gly/Arg 145), mutasi ini akan mengubah suatu projecting loop (aa 139-147) dari determinan a sehingga antibodi yang terbentuk waktu vaksinasi tidak dapat mengenalinya. Perubahan asam amino tersebut mengubah suatu proyeksi di regio asam amino 139-147.^{1,7}

Gen Pol mempunyai ORF yang tumpang tindih dengan gen S, mutasi pada asam amino 145 (gly/Arg 145) di gen S juga berkaitan dengan mutasi pada asam amino 153 (Trp/Gln 153) pada gen Pol akan terjadi perubahan produk dan ekspresi gen Pol. Perubahan tersebut masih cukup untuk terjadinya replikasi meski tidak efisien. Oleh karena itu bila tekanan atau penyebab berkurangnya HBV *wild type* hilang akan terjadi dominasi dari bentuk *wild type* tersebut lagi. Munculnya bentuk mutan HBV 145 membutuhkan terdapatnya anti-Hbs dari host yang ditujukan pada region asam amino 139-147.^{1,7,15}

HBV *surface protein* mengandung epitop untuk sel T dan B. Mutasi pada epitop seharusnya secara teoritis akan berpengaruh pada profil terbentuknya anti-Hbs akibat interaksinya dengan sel T dan B. HBV mutan akan dapat lolos dari pengaruh anti-Hbs pada vaksinasi dan pemberian HbIg, dikenal sebagai escape mutants. Dilaporkan bahwa isolasi HbsAg escape mutants meningkat sejalan dengan

peningkatan anti-Hbs yang protektif pada proses vaksinasi dengan vaksin rekombinan. Diperkirakan bahwa pada seseorang yang mengalami infeksi HBV *wild type* akan membentuk spektrum antibodi yang lebih luas dibandingkan seseorang yang mendapat vaksin rekombinan. HBV escape mutans dijumpai lebih banyak pada populasi yang mendapat vaksinasi rekombinan dan pemberian HbIg. Terdapat berbagai laporan mengenai HBV mutan yang mengenai regio asam amino yang bervariasi, seperti pada I/T 126 A, Q 129 H, M 133 L, T 143 M, D 144 H/A dan G 145 R dan pada asam amino 144. Daerah determinan a pada gen S merupakan daerah dengan laporan mutasi terbanyak.^{1,7,15}

Infeksi oleh HBV menyebabkan suatu spektrum penyakit yang luas, mulai dari asimtomatik hingga hepatitis fulminan dan hepatitis kronis dengan berbagai variasi kondisinya. Pada infeksi kronik terdapat fase imunotoleran, *immune clearance*, non replikasi daripada beberapa penderita fase reaktivasi. Dalam fase tersebut dilaporkan terdapatnya berbagai mutasi seperti *double A1762T/G1764A basal core promoter (BCP) mutation*, mutasi G1896A pre-C stop-codon mutation yang sering disertai mutasi G 1899A. Kedua mutasi ini dihubungkan dengan reaktivasi penyakit dan timbulnya hepatitis fulminan. Mutasi di daerah BCP dilaporkan akan mengakibatkan peningkatan efisiensi virus dalam bereplikasi.^{1,7,12}

HBsAg merupakan selubung dari virion HBV, gen surface antigen akan menghasilkan 3 protein dengan tempat inisiasi awal berbeda tetapi berakhir di tempat yang sama. Yang dianggap paling berperan adalah protein sHBsAg bentuk terkecil yang terdiri dari 226 asam amino dan merupakan protein struktur utamanya pada selubung virus. Pada penderita HBV plasmanya mengandung HBsAg yang sebagian besar berupa partikel sferis 22 nm yang masing-masing terdiri dari 100 HbSAg monomer. Rangkaian asam amino HbsAg mempunyai domain yang sangat hidrofilik, konformasial, dari mulai posisi 100 hingga 160 dan dikenal sebagai

“determinan a”. Determinan a mewakili daerah imunodominan HbsAg, dan sebagian besar reagensia di dunia menggunakan epitop ini sebagai target. Epitop di daerah determinan a diperkuat oleh rangkaian sistin yang terikat dengan disulfida. Perubahan pada determinan a akan menyebabkan berkurangnya antigenitas dan penurunan ekspresi protein.^{1,7}

Daerah determinan a terdiri dari suatu lamina loop besar diperkuat ikatan residu sistin 108-138, dengan proyeksi *fingerlike* yang distabilisasi oleh sistin 121-124. Selain itu juga terdapat loop kedua yang menonjol dari membran virus dan distabilisasi oleh pasangan sistin 136-149 dan 139-147. Respon manusia terhadap HbsAg terutama ditujukan terhadap determinan a. Perubahan pada epitop ini menyebabkan gagalnya netralisasi oleh antibodi serta kegagalan diagnostik karena epitop tidak dapat dikenali oleh reagen yang digunakan.^{1,7,15}

Mutasi HBV selain disebabkan oleh karena tiadanya proses *reading proof* juga dapat terjadi akibat adanya mekanisme pertahanan terhadap *viral clearance*. Proses *viral clearance* antara lain ialah yang terjadi endogen seperti akibat pertahanan tubuh, adanya netralisasi oleh antibodi dan respon imun seluler dapat disebabkan oleh proses eksogen oleh adanya vaksinasi dengan HbsAg rekombinan, pemberian imunoterapi imunoglobulin, HbIg atau pemberian terapi antiviral yaitu nukleotida dan analog nukleosida seperti lamivudin. Mutasi dapat berupa penambahan asam amino, delesi, perubahan tunggal atau pada beberapa asam amino pada rangkaian genom.^{1,7,17,18}

Determinan antigenik "a", dibentuk oleh dua "loop" dari asam amino 120-163 dalam polipeptida SHBs. Determinan antigenik serologis dan target dikenali oleh *neutralizing* antibodi. Namun, itu bukan satu-satunya epitop yang dikenali oleh sistem kekebalan humoral. Setidaknya ada dua epitop subdominant lainnya, yaitu "d" atau "y" dan yang ketiga yaitu salah satu "w" atau "r." Karena itu serotipe HBV didefinisikan oleh tiga epitop dan

dinotasikan "adw," "adr," "ayw," " ayr, " dan sebagainya. Tidak ada perbedaan patologis pada serotipe HBsAg yang berbeda. Namun, point mutasi yang menyebabkan substitusi asam amino pada "a" determinan dikaitkan dengan *escape* dari *neutralizing* antibodi.^{1,7,15}

Telah dilaporkan bahwa frekuensi virus mutan pre-S dalam sirkulasi meningkat saat terjadi penurunan titer virus. Selain itu, virus mutan pre-S sering ditemukan pada karier HBV dengan HCC. Namun, karena orang dengan HCC seringkali memiliki berbagai HBV kuasi-spesies, sulit untuk membentuk hubungan sebab dan akibatnya. Peningkatan potensi patogen *envelope* protein dengan mutasi di wilayah pre-S2 pada studi dengan tikus transgenik, ditemukan pada usia 2 tahun, dimana mayoritas dari tikus jantan homozigot berkembang menjadi neoplasia hepatoselular, termasuk HCC.^{1,16}

Mengingat adanya tumpang tindih antara daerah pengkode HBsAg dan N-terminal- dua pertiga dari domain RT Pol DNA, maka tidak mengherankan bahwa perubahan *sequence* yang terkait dengan resistensi antivirus di Pol yang biasanya menyebabkan perubahan antigen permukaan.¹

Penting diketahui, beberapa mutasi tumpang tindih ini dapat mengubah fungsi HBsAg secara dramatis. HBsAg mutan dengan sW196L/S, tetapi bukan sI196M, sangat mengurangi perakitan dan sekresi partikel virus hepatitis delta (HDV), menunjukkan disfungsi *envelope* protein. Selain itu, HBsAg mutan mengandung sE164D, yang terkait dengan mutasi *lamivudine-resistant* rtV173L, telah diketahui memiliki penurunan kemampuan untuk mengikat anti-HBs. Ada juga laporan yang menunjukkan bahwa beberapa pasien yang diobati dengan lamivudine tampaknya memiliki HBsAg (-), namun tetap dengan kadar HBV DNA yang terdeteksi dalam sirkulasi. Kegagalan untuk mendeteksi HBsAg pada pasien ini adalah karena pemilihan mutasi sP120A yang mengurangi ikatan anti-HBs.^{1,15}

Hilangnya HBeAg umumnya dianggap

sebagai tanda serologis menguntungkan. Namun, HBeAg (-) dengan kadar DNA virus (*viral load*) yang tetap tinggi, sering dikaitkan dengan munculnya varian dengan mutasi di regio pre-C dan/atau *basal core promoter* (BCP). Salah satu precore mutasi paling umum adalah G1896A, yang mengubah kodon triptofan (UGG) menjadi kodon terminasi (UAG). Infeksi akut HBV dengan HBeAg negatif telah dikaitkan dengan beratnya penyakit hati kronis dan hepatitis fulminan. Mutasi yang memengaruhi urutan protein kapsid juga telah dilaporkan.^{1,19}

The BCP, dengan *enhancer*, berfungsi melakukan kontrol transkripsi pada pre-C dan pgRNA. Sepasang mutasi di wilayah ini, A1762T dan G1764A, dapat berhubungan dengan viremia HBeAg-negatif dan telah dilaporkan berhubungan dengan penyakit hati yang berat, terutama sirosis dan HCC. Karena adanya reading frame yang tumpang tindih, dua mutasi ini akan menghasilkan dua perubahan kodon (L130M dan V131I) pada protein X, selain membuat *binding site* untuk faktor transkripsi HNF1 di BCP. Studi di sel transfected menunjukkan bahwa mutasi mengurangi transkripsi pre-C mRNA, tetapi transkripsi pgRNA tidak terpengaruh. Secara keseluruhan, mungkin sebanyak 50% dari karier kronis HBV yang berkembang menjadi HCC mengalami viremic dengan *basal core* mutan. Namun, mutasi BCP mungkin hanya fenomena durasi infeksi, seperti pada perkembangan HCC. Semakin lama pasien terinfeksi, semakin besar kemungkinan untuk mengembangkan BCP, dan semakin besar pula kemungkinan menjadi HCC.^{1,12,16}

Masuknya partikel HBsAg subviral kepada orang-orang dan hewan memunculkan produksi antibodi spesifik untuk epitop "a" dan "b". Antibodi terhadap epitop "a", ketika hadir dalam jumlah yang cukup, mampu mencegah infeksi HBV kronis. Vaksin HBV asli dimurnikan dari partikel HBV subviral yang dilemahkan yang diperoleh dari sirkulasi manusia yang mengalami infeksi kronis virus. HBsAg rekombinan, diproduksi dan dipurifikasi

dari kultur ragi, telah terbukti menjadi imunogen efektif dan sekarang merupakan sumber utama vaksinasi HBV.¹⁻³

Dengan demikian, infeksi HBV kronis, yang merupakan penyebab dari proporsi terbesar HCCs di dunia, adalah 90% dicegah dengan penggunaan yang tepat vaksin hepatitis B. Vaksin, disetujui di Amerika Serikat pada tahun 1982, memiliki efek samping sangat sedikit. Studi di Taiwan, dimana imunisasi dilakukan menyeluruh pada bayi baru lahir yang diperkenalkan pada tahun 1984, telah menunjukkan pengurangan sekurangnya 50% dalam kejadian HCC di kalangan remaja. Dari studi yang dilakukan di negara-negara berisiko tinggi, dapat diprediksi bahwa program vaksinasi akan mengurangi prevalensi infeksi HBV kronis dari 8-20% menjadi kurang dari 2%, dan hal ini akan menurunkan kejadian HCC di dekade mendatang.^{1,16}

Rekombinan vaksin yang digunakan saat ini diharapkan membangkitkan antibodi terhadap hanya atau kebanyakan "a" epitop. *Vaccine escape mutant* yang telah mengalami mutasi pada rantai asam amino dalam epitop "a" bisa dan memang terjadi, dan kemungkinan bahwa ini akan menjadi masalah dari waktu ke waktu. Escape mutan sudah terdeteksi pada bayi yang lahir dari ibu dengan infeksi HBV kronis, di mana bayi baru lahir diberi vaksin dan imunoglobulin HBV-spesifik. Hebatnya, intervensi ini sangat efektif dalam mencegah infeksi kronis pada bayi baru lahir. Namun, dalam keadaan di mana imunoglobulin hepatitis B (HBIG) tidak diberikan bersama, atau pada keadaan dimana titer virus menjadi sangat tinggi dan tidak terkendali, tidak sulit untuk melihat bagaimana *vaccine escape* mutan dapat muncul dan menjadi masalah kesehatan publik yang lebih besar. Prevalensi mutan antigen HBV "a" ternyata cukup mengejutkan, mutan ini refrakter terhadap vaksin dependent "a" epitop yang banyak digunakan saat ini. Dalam satu laporan, kejadian HBsAg mutan pada bayi yang lahir dari ibu karier HBV dan diobati dengan vaksin dan HBIG adalah 4%. Oleh

karena itu pengembangan vaksin baru yang menginduksi terbentuknya antibodi terhadap epitop potensial lainnya, seperti epitop yang terletak di regio pre-S1 dan pre-S2 sangat diperlukan.^{1,7}

Aplikasi Klinis Deteksi HBV Mutan

Adanya bentuk HBV mutan menyebabkan berbagai kesulitan pada proses deteksinya. Sebuah karakteristik untuk kasus-kasus ini adalah negatifnya anti-HBs dan HBsAg, sementara petanda infeksi yang lain menunjukkan adanya infeksi HBV. Pemeriksaan HBsAg merupakan pemeriksaan yang sangat penting pada donor darah. Pemeriksaan terhadap HbsAg akan negatif palsu bila tidak dapat mendeteksi adanya perubahan pada determinan a HBV. Dua masalah timbul dari temuan ini yaitu kegagalan untuk mendeteksi HBsAg dapat menyebabkan penularan melalui darah yang disumbangkan atau organ, dan HBV mutan dapat menginfeksi individu yang anti-HBs positif setelah imunisasi. Terdapat beberapa upaya untuk menambah daya deteksi dari reagensia dengan menambah daerah deteksi yang bukan di regio determinan a tersebut.^{1,7,21}

Terdapat berbagai penelitian untuk membandingkan berbagai reagensia yang beredar komersial terhadap daya deteksinya untuk mengetahui adanya HBV mutan. Sebagai bahan yang digunakan adalah serum dan plasma dari penderita yang diikuti dari awal sakit hingga sembuh, serum rekombinan dari daerah yang banyak dilaporkan mengalami mutasi serta dari plasma donor darah yang hanya positif terhadap Hb core/HbeAg. Hasil yang diperoleh umumnya menunjukkan bahwa hampir seluruh jenis reagen utama yang digunakan cukup untuk mendeteksi mutasi tertentu dibandingkan reagensia lain.^{1,7}

Terdapat berbagai laporan dari rumah sakit maupun bank darah mengenai terdapatnya HBV mutan dengan hasil HbsAg negatif, oleh karena itu perlu dipertimbangkan pemilihan reagensia yang sesuai dengan kemungkinan mutasi yang ada di daerah tersebut.^{1,7}

Simpulan

Terbentuknya HBV mutan meningkat sejalan dengan peningkatan vaksinasi dan kemajuan terapi antiviral. Karakteristik untuk kasus hepatitis mutan adalah negatifnya anti-HBs dan HBsAg, sementara petanda infeksi yang lain menunjukkan adanya infeksi HBV. Determinan antigenik yang banyak digunakan untuk mendeteksinya ialah determinan a dari HbsAg yang terletak di posisi 124-127, dan juga merupakan determinan yang menginduksi terjadinya *neutralizing antibody*. Perubahan pada daerah tersebut akan mengganggu deteksi adanya HbsAg, karena terjadi reaktivitas yang berkurang terhadap berbagai kit komersial yang beredar sehingga sensitivitasnya menjadi semakin menurun hingga tak terdeteksi.

HBV mutan menyebabkan kesulitan pada deteksi penderita serta penapisan donor darah. Dua masalah yang timbul dari temuan ini ialah kegagalan mendeteksi HBsAg dapat menyebabkan penularan melalui darah yang disumbangkan atau organ, dan HBV mutan dapat menginfeksi individu yang anti-HBs positif setelah imunisasi.

Saran

Di bidang laboratorium terdapatnya mutasi pada genom virus hepatitis B akan sangat berpengaruh pada kemampuan deteksi berbagai reagensia yang tersedia di pasaran. Perlu dipertimbangkan jenis reagen yang digunakan bila melakukan penapisan terhadap HbsAg pada daerah yang banyak dijumpai kasus mutan. Penggunaan reagensia juga harus disesuaikan dengan keberadaan laporan HBV mutan di area tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Arias IM.** The Liver: Biology and Pathobiology. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 2009; p. 807-858, 859-876, 899-920.
2. **Feldman M.** Sleisenger and Fordtrans's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. Philadelphia: Saunders Elsevier,

- 2010;. Chapter 78.
3. **Fauci AS, Braunwald E.** Harrison's Principle of Internal Medicine (17th ed). USA: McGraw Hill, 2008; Chapter 336.
 4. **Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S.** Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I (5th ed). Jakarta: Interna Publishing, 2009; p. 429-40.
 5. **Goldman L, Ausiello DA, Arend W, Armitage JO, Clemmons D, Drazen J, editors.** Cecil Medicine (23rd ed). Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007; Chapter 245.
 6. **McPhee SJ, Papadakis M.** Current Medical Diagnosis & Treatment (48th ed). USA: McGraw-Hill, 2009; Chapter 26.
 7. **Timan.** Pendidikan Berkesinambungan Patologi Klinik. Jakarta : Balai Penerbit FKUI, 2010; p. 14-20.
 8. **Kumar V, Abbas AK, Fausto N,** editors. Robin and Cotran Pathologic Basic of Disease (7th ed). Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005; p. 891-4.
 9. **Schädler S, Hildt E.** HBV life cycle: entry and morphogenesis. *Viruses.* 2009;1:185-209. doi:10.3390/v1020185.
 10. **Dieter G.** Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13(1):65-73.
 11. **Lepere-Douard C, Trotard M, Le Seyec J, Gripon P.** The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol.* 2009;83(2):11819-29.
 12. **Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P.** Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *Journal of General Virology.* 2008;89:901-9.
 13. **Abbas.** Cellular and Molecular Immunology (6th ed). Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010.
 14. **Baratawijaya K.** *Imunologi Dasar* (8th ed). Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 2009.
 15. **Ji-Dong, Jia MH, Lai W, Zhang XX, Mao YL, Wang LL, et al.** Multicentre Evaluation of the Elecsys® Hepatitis B surface antigen II assay for detection of HBsAg in comparison with other commercially available assays. *Med Microbiol Immunol.* 2009. DoI 1 0. I 007/s0M3O-009 -O 121 -4.
 16. **Zhigang C, Xin B, Xia G, Yan J, Gengsun Q, Hong T.** High prevalence of hepatitis B virus pre-S mutation and its association with hepatocellular carcinoma in Qidong, China. *Arch Virol.* 2008;153:1807-12.
 17. **Sheldon J, Soriano V.** Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrobial Chemother.* 2008;61:766-8.
 18. **Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L.** Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *J Hepatol.* 2007;46(3):531-8.
 19. **Frelin L, Wahlstrom T, Tucker AE, Jones J.** Mechanism to explain the selection of the hepatitis e antigen-negative mutant during chronic hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2009;83(3):1379-92.
 20. **Jia-Horng K.** Role of viral factors in the natural course and therapy of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2007;1:415-30.
 21. WHO Hepatitis B. Hepatitis B mutant [Internet]. 2010 [cited 2010 Nov 29]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/index4.html#mutants>.