



UNIVERSITAS INDONESIA

**Produksi *in vitro* sitokin IL-10, IFN-gamma, IL-2 serta anti-HBs
pada pasien hepatitis B kronis dan resolusi infeksi**

TESIS

**ERICK SIDARTA
1206178584**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
JAKARTA
2016**



UNIVERSITAS INDONESIA

**Produksi *in vitro* sitokin IL-10, IFN-gamma, IL-2 serta anti-HBs
pada pasien hepatitis B kronis dan resolusi infeksi**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER BIOMEDIK (M. Biomed)**

**ERICK SIDARTA
1206178584**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
KEKHUSUSAN IMUNOLOGI
JAKARTA
2016**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Erick Sidarta

NPM : 1206178584

Tanda Tangan :



Tanggal : 8 April 2016

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Erick Sidarta
NPM : 1206178584
Program Studi : Magister Biomedik
Kekhususan : Imunologi
Judul Tesis : Produksi *in vitro* sitokin IL-10, IFN-gamma, IL-2 serta anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dan resolusi infeksi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Alida R. Harahap, SpPK(K), PhD. (Alida Harahap)
Pembimbing II : Prof. dr. David Handojo Muljono, SpPD., FINASIM., PhD. (David Handojo Muljono)
Penguji I : Dr. Drs. Heri Wibowo, M. Biomed. (Heri Wibowo)
Penguji II : Dr. dr. Yuyun S.M. Soedarmono, M. Sc. (Yuyun S.M. Soedarmono)
Penguji III : Dr. Andi Yasmon, S. Pi., M. Biomed. (Andi Yasmon)
Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 8 April 2016

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI (Ketua Program Studi)
: Dr. rer. Physiol. Dr. Septelia Inawati W. (Septelia Inawati W.)



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya sehingga tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulisan tesis ini dilakukan dalam memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI). Dalam menyelesaikan studi ini, saya sepenuhnya menyadari dan mensyukuri bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sejak masa perkuliahan hingga penyusunan tesis. Tanpa keterlibatan mereka, akan sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada mereka yang telah mencurahkan bantuannya:

1. Ucapan terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada para pembimbing: dr. Alida R. Harahap, SpPK(K)., PhD. dan Prof. dr. David Handojo Muljono, SpPD., FINASIM., PhD., atas bimbingan, waktu, tenaga yang dicurahkan dan dukungan semangat. Saya sangat menghargai keterlibatan para pembimbing yang intensif dan penuh perhatian dalam mengantar saya melalui perjalanan studi ini.
2. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Dr. dr. Ratna Sitompul SpM(K)., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; Dr. rer. Physiol. Dr. Septelia Inawati Wanandi, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik; Dr. Drs. Heri Wibowo, M. Biomed., selaku Ketua Kekhususan Imunologi; dan jajaran pengajar FKUI atas segenap bantuan, bimbingan dan ilmu yang telah dibagi; terima kasih kepada staff sekretariat Program Studi Magister Ilmu Biomedik, serta segenap staff lain atas bantuannya.
3. Ucapan terima kasih dan penghormatan saya sampaikan kepada Prof. dr. Amin Soebandrio, PhD., SpMK. dan Prof. dr. Herawati Sudoyo, MS., PhD. selaku pimpinan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman atas kesempatan untuk mengenyam pendidikan lebih tinggi dan melakukan penelitian di lingkungan Lembaga Eijkman.

4. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada para penguji, Dr. Drs. Heri Wibowo, M. Biomed., Dr. dr. Yuyun S.M. Soedarmono, M.Sc., Dr. Andi Yasmon, S. Pi, M. Biomed dan kepada sekretaris sidang tesis Dr. Dra. Puspita Eka Wujyung, MS. atas diskusi, masukan dan arahan membangun yang berharga.
5. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada dr. Meta Dewi Thedja, PhD atas bimbingannya yang berharga dan kepada rekan-rekan laboratorium Hepatitis, Lembaga Eijkman: Turyadi M.Biomed, Susan Irawati, M. Biomed. Sc, Maghfira S.Si, dr. Martono, SpPK. Rahmi Safitri. Untuk dukungan semangat dan bantuan dalam penyelesaian studi ini.
6. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada staff Lembaga Eijkman atas bantuan, diskusi, dan masukan yang berharga. Terima kasih kepada Khin Saw Mynt MBBS, DTMH, PhD. atas diskusi dan bantuan di laboratorium kultur sel; terima kasih kepada Benedictus Yohan M.Biomed. atas masukannya dalam pengembangan teknik isolasi sel dan penggunaan mesin Luminex; Dra. Chairin Nisa Ma'Roef dan Hannie Kartapradja, S. Si. atas ajarannya yang berharga dalam kultur sel; Dra. Saraswati dan dr. Fajrina M. Biomed yang telah membantu saya selama pengerjaan *assay* Luminex; Iqbal Elyazar D.Phil yang telah memberikan masukan dalam perhitungan statistik.
7. Ucapan terima kasih juga saya berikan kepada Neni Nurainy, PhD dan PT. Biofarma atas sumbangan HBsAg rekombinan; Dr. dr. Christina Safira Whinie Lestari, M. Kes dari badan Litbangkes atas izin menggunakan mesin Luminex; dan dr. Ulfah Suryani, M. Biomed dan rekan-rekan di UTDP PMI yang telah mengizinkan saya untuk melakukan analisa anti-HBsAg kuantitatif.
8. Terima kasih kepada rekan satu angkatan di Program Magister Ilmu Biomedik dan rekan di kekhususan imunologi terutama Ika P. Dewi dan Lenggo Geni untuk kekompakan, bantuan dan dukungan semangat selama menjalani perkuliahan. Terima kasih atas waktu-waktu penuh kenangan selama kuliah.
9. Ucapan terima kasih dan rasa cinta saya sampaikan kepada kedua orang tua dan keluarga. Secara khusus saya ingin mengucapkan terima kasih kepada tunangan tercinta Ellen Luigiparana atas rasa cinta yang tulus, kesabaran,

perhatian, waktu dan dukungan sepenuh hati dalam mendampingi saya menyelesaikan pendidikan ini. Tesis ini saya dedikasikan untuk kalian.

Akhir kata, semoga tesis ini dapat membawa manfaat bagi perkembangan dunia pendidikan pada umumnya dan ilmu pengetahuan dan kedokteran pada khususnya. Besar harapan saya semoga tulisan dan hasil dari tesis saya ini dapat membantu dalam upaya pemahaman mengenai penyakit hepatitis B dan upaya penanggulangan penyakit yang menjadi masalah publik di dunia ini.

Jakarta, 8 April 2016

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK**

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Erick Sidarta
NPM : 1206178584
Program Studi : Magister Biomedik
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Produksi *in vitro* sitokin IL-10, IFN-gamma, IL-2 serta anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dan resolusi infeksi”

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan), dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk basis data, merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya terlebih dahulu selama tetap mencantumkan nama saya dan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 8 April 2016
Yang menyatakan,



Erick Sidarta

ABSTRAK

Nama : Erick Sidarta
NPM : 1206178584
Program Studi : Magister Biomedik
Kekhususan : Imunologi
Judul Tesis : Produksi *in vitro* sitokin IL-10, IFN-gamma, IL-2 serta anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dan resolusi infeksi

Infeksi oleh virus hepatitis B (VHB) dapat menjadi infeksi akut yang berakhir dengan resolusi infeksi ataupun berlanjut menjadi infeksi kronis. Resolusi infeksi dalam infeksi VHB ditandai dengan hilangnya *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) dan keberadaan antibodi terhadap HBsAg (anti-HBs). Kemampuan sel B dalam mensintesis anti-HBs dipengaruhi oleh sel *T helper 1* (Th1) ataupun *T helper 2* (Th2). Sekresi sitokin yang terkoordinasi dari Th1 ataupun Th2 sangat dibutuhkan mengingat sitokin yang dihasilkan oleh kedua sel *T helper* (Th) tersebut memiliki peranan yang berbeda dan dapat bekerja secara antagonis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam mensintesis anti-HBs dan membandingkan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dari pasien hepatitis B kronis dengan pasien yang mengalami resolusi infeksi. Pada penelitian ini sel mononuklear darah tepi manusia (SMDT) diambil dari 10 subjek pasien hepatitis B kronis, 10 subjek pasien yang mengalami resolusi infeksi dari hepatitis B dan 10 subjek individu sehat yang berhasil divaksinasi. SMDT dikultur dengan stimulan HBsAg rekombinan (rHBsAg) atau fitohemaglutinin (PHA) untuk sintesis sitokin dan *pokeweed mitogen* (PWM) untuk sintesis anti-HBs secara *in vitro*. Hasil dari penelitian ini ditemukan produksi anti-HBs secara *in vitro* dari 70% individu sehat yang berhasil divaksinasi dan 40% pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi, sementara pada pasien hepatitis B kronis tidak ditemukan hal tersebut. Pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 antara pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan pasien hepatitis B kronis tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Akan tetapi, respons IFN-gamma terhadap rHBsAg pada pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi cenderung lebih kuat. Korelasi antara sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan produksi anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada kedua kelompok tersebut, sementara korelasi IL-2 dengan sintesis anti-HBs *in vitro* ditemukan pada individu yang divaksinasi. Penelitian ini menunjukkan SMDT dari pasien hepatitis B kronis tidak dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dan pada pasien tersebut tidak memiliki perbedaan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 jika dibandingkan dengan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi.

Kata kunci: hepatitis B, kronis, resolusi infeksi, anti-HBs, IL-10, IFN-gamma, IL-2

ABSTRACT

Name : Erick Sidarta
Study Programme : Biomedical Science
Judul Tesis : In vitro production of IL-10, IFN-gamma, IL-2 cytokines, and anti-HBs on patients with chronic and resolved hepatitis B infection

Hepatitis B virus (HBV) infection can lead to acute self-limited infection or lead to chronic hepatitis B infection. Resolution of infection is marked by seroconversion of hepatitis B surface antigen (HBsAg) to antibody to HBsAg (anti-HBs) which also give protection to HBV reinfection. Anti-HBs is produced by B cells as response to HBsAg. B cells response to HBsAg is affected by cytokines from T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cells. Coordinated cytokines secreted by Th1 or Th2 cells is necessary due to the fact that they could work antagonistically. Th1 cytokines, such as IFN-gamma, are known to induce cellular immune responses, while Th2 cytokines, such as IL-4, -5 and -10, are known to induce humoral immune responses. This study aimed to investigate the capability of chronic hepatitis B patients (CHB) to synthesize anti-HBs *in vitro* and to compare IL-10, IFN-gamma and IL-2 levels between CHB patients with resolved hepatitis B (RHB) patients. In this study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were taken from 10 CHB patients, 10 RHB patients and 10 healthy hepatitis B vaccinated individuals. PBMCs were cultured in presence of recombinant HBsAg (rHBsAg) and PHA to cytokines synthesis and pokeweed mitogen (PWM) to anti-HBs synthesis *in vitro*. As results, synthesis of anti-HBs *in vitro* were found in PBMCs from 70% of healthy hepatitis B vaccinated individuals and 40% of RHB patients, while PBMCs from CHB patients could not. No significant differences were found in IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels between CHB patients and RHB patients, although IFN-gamma responses to rHBsAg had a tendency to be stronger in RHB patients. Correlation between IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels and anti-HBs synthesis *in vitro* was not found in CHB patients and RHB patients. Meanwhile, IL-2 and anti-HBs synthesis *in vitro* were correlated in healthy hepatitis B vaccinated individuals. In conclusion, this study showed that PBMCs from CHB patients were not capable in synthesizing anti-HBs *in vitro* and had no differences in IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels with RHB patients.

Keywords: hepatitis B virus, chronic, resolved infection, anti-HBs, IL-10, IFN-gamma, IL-2

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN TESIS.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan umum.....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Kerangka Teori.....	7
1.6 Kerangka Konsep.....	8
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1 Epidemiologi.....	9
2.2 Virologi Virus Hepatitis B.....	10
2.3 Genom Virus Hepatitis B.....	11
2.4 Siklus Hidup VHB.....	13
2.5 Protein – Protein Virus Hepatitis B.....	15
2.6 Protein <i>Hepatitis B Surface Antigen</i> (HBsAg).....	15
2.7 Respons Imun Terhadap VHB.....	18
2.7.1 Respons imun bawaan.....	19
2.7.2 Respons imun adaptif.....	20
2.8 Perjalanan Infeksi VHB.....	22
2.8.1 Infeksi VHB akut.....	22
2.8.2 Infeksi VHB kronis.....	23
2.9 Anti-HBs pada Pasien Hepatitis B Kronis.....	25
2.10 Aplikasi Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia (SMDT) dalam Mempelajari Respons Imun Terhadap VHB.....	26
2.10.1 Kultur SMDT untuk sintesis anti-HBs.....	26
2.10.2 Kultur SMDT untuk sintesis sitokin.....	27
3. BAHAN DAN CARA KERJA.....	28
3.1 Desain Penelitian.....	28
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.3 Bahan Penelitian.....	29
3.4 Alur Penelitian.....	30

3.5 Isolasi Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia.....	30
3.6 Persiapan Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia.....	31
3.7 Stimulasi SMDT Secara <i>In Vitro</i> untuk Sintesis Sitokin.....	32
3.8 Stimulasi Sel SMDT Secara <i>In Vitro</i> untuk Sintesis Anti-HBs.....	32
3.9 Deteksi Anti-HBs Serum Subjek dan Media Kultur.....	33
3.10 Pengukuran Kadar Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 Menggunakan Luminex.....	34
3.11 Analisis Statistik.....	36
4. HASIL.....	37
4.1 Subjek Penelitian dan Data Demografi.....	37
4.2 Pengamatan Kultur SMDT.....	38
4.3 Kadar Anti-HBs <i>In Vitro</i> dari Kultur SMDT Setiap Kelompok Subjek.....	39
4.4 Analisis Korelasi antara Anti-HBs <i>In Vivo</i> dan Anti-HBs <i>In Vitro</i>	39
4.5 Kadar Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada Kultur SMDT.....	41
4.5.1 Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok vaksinasi.....	41
4.5.2 Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok kronis dan resolusi infeksi.....	42
4.6 Hubungan antara Anti-HBs <i>In Vitro</i> dengan Respons Sitokin oleh Stimulan rHBsAg.....	44
5. PEMBAHASAN.....	48
5.1 Sintesis Anti-HBs <i>In Vitro</i> tidak Ditemukan pada Pasien Hepatitis B Kronis.....	49
5.2 Pasien Hepatitis B Kronis tidak Memiliki Perbedaan Pola Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 Dibandingkan dengan yang Mengalami Resolusi Infeksi.....	52
5.3 Sintesis Anti-HBs secara <i>In Vitro</i> Memiliki Hubungan dengan Sintesis IL-2.....	54
5.4 Keberadaan Anti-HBs Merupakan Perbedaan Utama antara Pasien Hepatitis B Kronis dan Pasien Hepatitis B yang Mengalami Resolusi Infeksi.....	56
6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Prevalensi infeksi hepatitis B di seluruh dunia.....	9
Gambar 2.2	Organisasi genom VHB.....	12
Gambar 2.3	Siklus hidup hepatitis B.....	14
Gambar 2.4	Model virion VHB dan partikel subviral dari VHB.....	16
Gambar 2.5	Hasil transkripsi dan translasi dari gen S.....	16
Gambar 2.6	Skema protein SHBs dari VHB.....	17
Gambar 2.7	Struktur dan konformasi determinan “a” SHBs.....	18
Gambar 2.8	Respons imun adaptif terhadap infeksi VHB.....	19
Gambar 2.9	Perubahan penanda serologi setelah infeksi hepatitis B akut.....	23
Gambar 2.10	Perjalanan infeksi hepatitis B kronis.....	24
Gambar 3.1	Alur Penelitian.....	30
Gambar 4.1	Pengamatan kultur sel SMDT dengan menggunakan mikroskop <i>inverted (Nikon Eclipse Ti)</i> dengan perbesaran 100 x.....	38
Gambar 4.2	Korelasi antara kadar anti-HBs <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i> pada kelompok vaksinasi, resolusi infeksi dan kronis.....	40
Gambar 4.3	Korelasi rasio sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap kadar anti-HBs <i>in vitro</i> pada kelompok vaksinasi.....	46
Gambar 4.4	Korelasi rasio sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap kadar anti-HBs <i>in vitro</i> pada kelompok vaksinasi.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penentuan sub tipe VHB berdasarkan posisi asam amino pada determinan HBsAg.....	11
Tabel 4.1	Subjek penelitian dan data demografi.....	37
Tabel 4.2	Kadar anti-HBs secara <i>in vitro</i> dari kultur SMDT setiap kelompok subjek	39
Tabel 4.3	Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok vaksinasi.....	42
Tabel 4.4	Kadar sitokin IL10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi.....	43
Tabel 4.5	Perbandingan rasio sitokin terhadap status anti-HBs <i>in vitro</i>	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat keterangan lolos kaji etik.....	65
Lampiran 2	Surat keterangan amandemen protokol etik.....	66
Lampiran 3	<i>Informed consent</i>	67
Lampiran 4	Data kadar anti-HBs pada setiap kultur.....	68
Lampiran 5	Data kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada setiap kultur.....	69

DAFTAR SINGKATAN

Anti-HBs	antibodi terhadap <i>hepatitis B surface antigen</i>
APC	<i>antigen presenting cells</i>
Badan Litbangkes	Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CHB	<i>chronic hepatitis B patients</i>
CTL	<i>cytotoxic T cells</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunoassay</i>
ELISPOT	<i>enzyme linked immunospot</i>
ENH	<i>HBeAg negative hepatitis B chronic</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GRE	<i>glukocorticoid responsive element</i>
GSHV	<i>ground squirrel hepatitis virus</i>
HBcAg	<i>hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>hepatitis B e antigen</i>
HBIG	<i>hepatitis B immunoglobulin</i>
HBsAg	<i>hepatitis B surface antigen</i>
HBV	<i>hepatitis B virus</i>
HBx	<i>hepatitis B X protein</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC	<i>Immunoclearance</i>
IFN-gamma	<i>interferon gamma</i>
IgG	<i>imunoglobulin G</i>
IgM	<i>imunoglobulin M</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IT	<i>Immunotolerant</i>
LHBs	<i>large hepatitis B surface protein</i>
LLME	<i>L-leucyl L-leucine methyester</i>
LR	<i>low replicative</i>
MHBs	<i>middle hepatitis B surface protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MHR	<i>major hydrophilic region</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NKT	<i>sel natural killer T</i>
NRE	<i>negative regulatory element</i>
NTCP	<i>sodium-dependent taurocholic cotransporting polypeptide</i>
ORF C	<i>open reading frame core</i>

ORF P	<i>open reading frame polymerase</i>
ORF S	<i>open reading frame surface</i>
ORF X	<i>open reading frame x</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PHA	Fitohemagglutinin
PKR	<i>protein kinase R</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PWM	<i>pokeweed mitogen</i>
RHB	<i>patients with resolved HBV infection</i>
rHBsAg	HBsAg rekombinan
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RNAse H	<i>ribonuclease H</i>
SHBs	<i>small hepatitis B surface protein</i>
SMDT	sel mononuklear darah tepi manusia
TGF-beta	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	<i>T helper</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	<i>T regulator</i>
UTDP PMI	Unit Transfusi Darah Pusat Palang Merah Indonesia
VHB	virus hepatitis B
WHV	<i>woodchuck hepatitis virus</i>
WMHV	<i>woolly monkey hepatitis virus</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infeksi virus hepatitis B (VHB) merupakan salah satu masalah besar bagi dunia kesehatan. Di seluruh dunia diperkirakan sekitar 2 milyar penduduknya telah terinfeksi oleh VHB meskipun vaksin terhadap VHB yang bermanfaat untuk memberikan perlindungan terhadap infeksi hepatitis B telah tersedia. Lebih dari 240 juta mengidap penyakit infeksi hati kronis dan dari semua itu sekitar 780.000 penderitanya meninggal setiap tahun akibat konsekuensi dari penyakit tersebut.^{1,2}

Infeksi oleh VHB dapat menjadi infeksi akut ataupun kronis. Infeksi VHB akut ditandai secara klinis dengan radang hati akut yang disertai dengan kenaikan enzim hati yang ditemukan pada darah penderita. Secara serologi pada infeksi VHB akut dapat ditemukan keberadaan *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) disertai keberadaan imunoglobulin M yang mengenali keberadaan *hepatitis B core antigen* (HBcAg) yang disebut sebagai IgM anti-HBc.¹ Namun pada sebagian kasus infeksi VHB tidak didapatkan gejala klinis sehingga saat terjadi infeksi akut tersebut tidak diketahui. Apabila penanda HBsAg tersebut menetap dalam waktu lebih dari 6 bulan maka penderita tersebut dikatakan berlanjut menjadi infeksi kronis.^{1,3}

Umumnya infeksi yang terjadi pada orang dewasa memiliki kemungkinan yang rendah untuk menjadi kronis ($\pm 5\%$), sementara infeksi yang terjadi pada balita memiliki tingkat persistensi virus yang tinggi.^{4,5} Infeksi VHB kronis umumnya bersifat asimtomatik, akan tetapi penderitanya memiliki risiko yang tinggi untuk mengidap sirosis hati dan kanker hati. Selain hal tersebut, penderitanya juga berpotensi untuk menularkan VHB ke individu lain.⁵

Manifestasi dari infeksi hepatitis B ditentukan oleh respons imun inang dalam mengendalikan infeksi VHB. Mekanisme pembersihan VHB dari dalam tubuh penderita dan patogenesis dari infeksi VHB merupakan hasil dari respons

imunologis yang sama.⁶ Infeksi VHB bersifat non-sitopatik sehingga respons imun inang merupakan faktor yang berperan dalam kerusakan hati. Patogenesis dari penyakit ini disebabkan oleh usaha respons imun dalam mengeliminasi VHB di dalam sel hepatosit yang terinfeksi. Pada individu yang mengalami persistensi VHB, respons imun terhadap VHB kurang kuat, akibatnya eliminasi VHB tidak berhasil dengan sempurna. Hal tersebut mengakibatkan penghancuran dan induksi inflamasi secara terus menerus pada sel hati penderita.⁷

Individu yang terinfeksi VHB dinyatakan terjadi resolusi infeksi apabila terjadi eliminasi HBsAg dan terdeteksi anti-HBs pada darahnya.³ Anti-HBs adalah antibodi yang akan mengenali protein permukaan virus (HBsAg) dan terbentuk sebagai salah satu mekanisme perlawanan inang terhadap VHB. Antibodi tersebut berperan dalam netralisasi virus dan perlindungan dari infeksi VHB dengan cara membentuk kompleks dengan partikel virus yang bersirkulasi di dalam darah dan mencegah infeksi VHB ke sel hepatosit yang belum terinfeksi.⁸ Anti-HBs hanya dapat terdeteksi setelah HBsAg hilang dari dalam serum sehingga antibodi ini umumnya tidak dapat terdeteksi pada fase kronis.^{6,9} Hal ini menunjukkan pentingnya peranan sel B spesifik penghasil anti-HBs dalam resolusi infeksi.

Anti-HBs tidak terlibat langsung dalam eliminasi infeksi VHB seperti yang dilakukan oleh sel T sitotoksik dalam mengeliminasi hepatosit yang terinfeksi, akan tetapi antibodi tersebut memiliki peran yang penting bagi individu yang mengalami resolusi infeksi dari VHB.¹⁰ Hal ini dikarenakan pada individu yang mengalami resolusi infeksi masih terdapat *covalently closed circular DNA* (cccDNA) VHB pada hepatositnya.^{10,11} Pada kondisi tersebut kemampuan replikasi VHB dikendalikan oleh sel T sitotoksik sementara penyebarannya dibatasi oleh anti-HBs.¹⁰ Fungsi dari anti-HBs ini juga didukung oleh suatu percobaan yang melaporkan terjadinya reaktivasi VHB setelah dilakukan eliminasi sel B spesifik HBsAg dengan pemberian anti-CD20.¹²

Aktivasi sel B dalam memproduksi antibodi tertentu dipengaruhi oleh keberadaan subset sel B yang mempunyai reseptor terhadap antigen tersebut, kemampuan sel B tersebut untuk memproduksi antibodi, dan keberadaan sel *T helper* (Th) yang membantu respons sel B tersebut.¹³ HBsAg, protein permukaan VHB yang akan dikenali oleh anti-HBs, merupakan antigen glikoprotein sehingga

aktivasi sel B dalam memproduksi anti-HBs akan dipengaruhi oleh aktivitas sel T (*T-cell dependent*).¹⁴

Keberadaan subset sel B spesifik pada pasien hepatitis B kronis telah dilaporkan oleh Bocher *et al.* yang menunjukkan keberadaan sel B spesifik yang memproduksi anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dengan menggunakan metode *Enzyme Linked Immunospot* (ELISPOT).¹⁵ Pada beberapa kasus infeksi hepatitis B kronis juga dapat ditemukan pasien yang memiliki keberadaan ko-eksistensi HBsAg dan anti-HBs. Hal tersebut menunjukkan kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam memproduksi anti-HBs.^{16,17} Selain itu, kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam memproduksi imunoglobulin total juga telah dilaporkan oleh Barnaba *et al.* dan Dusheiko *et al.* yang menunjukkan bahwa pasien hepatitis B kronis tidak memiliki masalah disfungsi sel B secara umum.^{18,19} Hal ini menunjukkan bahwa tidak terbentuknya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis lebih diakibatkan oleh kemampuan sel B tersebut dalam merespons HBsAg.

Kemampuan sel B dalam merespons HBsAg dipengaruhi oleh sel *T helper 1* (Th1) ataupun *T helper 2* (Th2) yang merupakan diferensiasi dari sel Th naif. Th1 dan Th2 memiliki fungsi dan menghasilkan sitokin yang berbeda. Sitokin yang dihasilkan oleh Th1 seperti IFN-gamma akan menginduksi respons imun seluler sementara Th2 menghasilkan IL-4, -5, dan -10 yang akan menginduksi respons imun humoral.¹³ Sitokin yang dihasilkan oleh kedua Th tersebut juga dapat bekerja secara antagonis, seperti *interleukin 10* (IL-10) yang dapat menghambat aktivitas Th1, dan IFN-gamma yang dapat menghambat aktivitas Th2. IL-2 selain berfungsi untuk menjaga kelangsungan hidup dan proliferasi sel T juga berperan dalam proliferasi sel B.¹³ Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag seperti IL-12 juga berperan dalam polarisasi sel Th menjadi Th1 dan *transforming growth factor beta* (TGF-beta) yang dihasilkan oleh sel *T regulator* (Treg) dapat menekan aktivitas kedua subset sel Th.²⁰ Hal ini menunjukkan bahwa produksi anti-HBs oleh sel B membutuhkan sekresi sitokin yang terkoordinasi.

Sitokin juga telah dilaporkan memiliki pengaruh terhadap infeksi VHB. Produksi sitokin dari Th1, terutama IFN-gamma, umumnya dapat ditemukan di dalam darah dari individu yang mengalami resolusi infeksi.²¹ IFN-gamma telah

dilaporkan memiliki fungsi sebagai antiviral dan dapat menjadi mediator untuk pemanggilan sel-sel yang berperan dalam inflamasi pada hepatosit.²² IL-2 juga telah dilaporkan berperan dalam pengendalian VHB bagi individu mengalami resolusi infeksi.²³ Sementara itu, pada pasien hepatitis B kronis dapat ditemukan kadar IL-10 yang tinggi.^{24,25} Sitokin ini lebih berperan dalam membatasi efek dari penyakit autoimun dan sering diasosiasikan dengan persistensi infeksi virus.²⁶

Dalam mempelajari respons imun pada hepatitis B, Loggi *et al.* dan Gerlich menekankan perlunya penelitian mengenai sel B pada individu yang terinfeksi VHB dalam menentukan jumlah anti-HBs yang sebenarnya. Hal ini dikarenakan pada penderita VHB kronis terdapat jumlah HBsAg sangat tinggi pada darah individu tersebut. Pada kondisi seperti ini kemungkinan terdapat produksi anti-HBs dalam jumlah kecil pada individu tersebut tidak dapat diabaikan sekalipun keberadaannya terhalangi oleh HBsAg.^{6,10} Keberadaan HBsAg dan bahkan antigen lain pada pasien hepatitis B kronis tersebut menjadi kendala dalam mempelajari respons imun terhadap VHB. Gerlich juga mengungkapkan bahwa pengetahuan mengenai lemahnya respons imun dalam memproduksi antibodi dapat menjadi landasan dalam usaha pengobatan yang memiliki konsep meningkatkan respons antibodi sampai ke tingkat kuratif.¹⁰

1.2 Rumusan Masalah

Tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dapat disebabkan oleh ketidakmampuan individu tersebut dalam memproduksi anti-HBs ataupun lemahnya kemampuan produksi anti-HBs. Anti-HBs berperan dalam resolusi infeksi sehingga kemampuan sebenarnya pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs perlu dikaji lebih lanjut. Akan tetapi, dalam mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs terdapat kendala yaitu kadar HBsAg yang tinggi dalam darah pasien tersebut. HBsAg dapat membentuk kompleks imun dengan anti-HBs sehingga keberadaan anti-HBs yang dihasilkan dalam jumlah yang sedikit akan tersamarkan. Metode kultur SMDT diharapkan dapat digunakan untuk mengatasi hal tersebut mengingat kultur yang digunakan bebas dari HBsAg yang berada di dalam darah.

Respons sel CD4, terutama dalam respons sel Th1, pada pasien hepatitis B kronis telah dilaporkan lebih lemah jika dibandingkan dengan pasien yang mengalami resolusi infeksi.^{27,28} Mengingat proses produksi anti-HBs bersifat *T-dependent*.¹⁴ Lemahnya produksi anti-HBs dapat dipengaruhi oleh lemahnya respons sel T. Hal ini menunjukkan perlunya kajian lebih lanjut mengenai respons pola sitokin dari pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi terhadap HBsAg, dan hubungan antara anti-HBs tersebut dengan pola sitokin yang dihasilkan.

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum:

Mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs dan pengaruh pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dalam kronisitas dan sintesis anti-HBs.

1.3.2. Tujuan khusus:

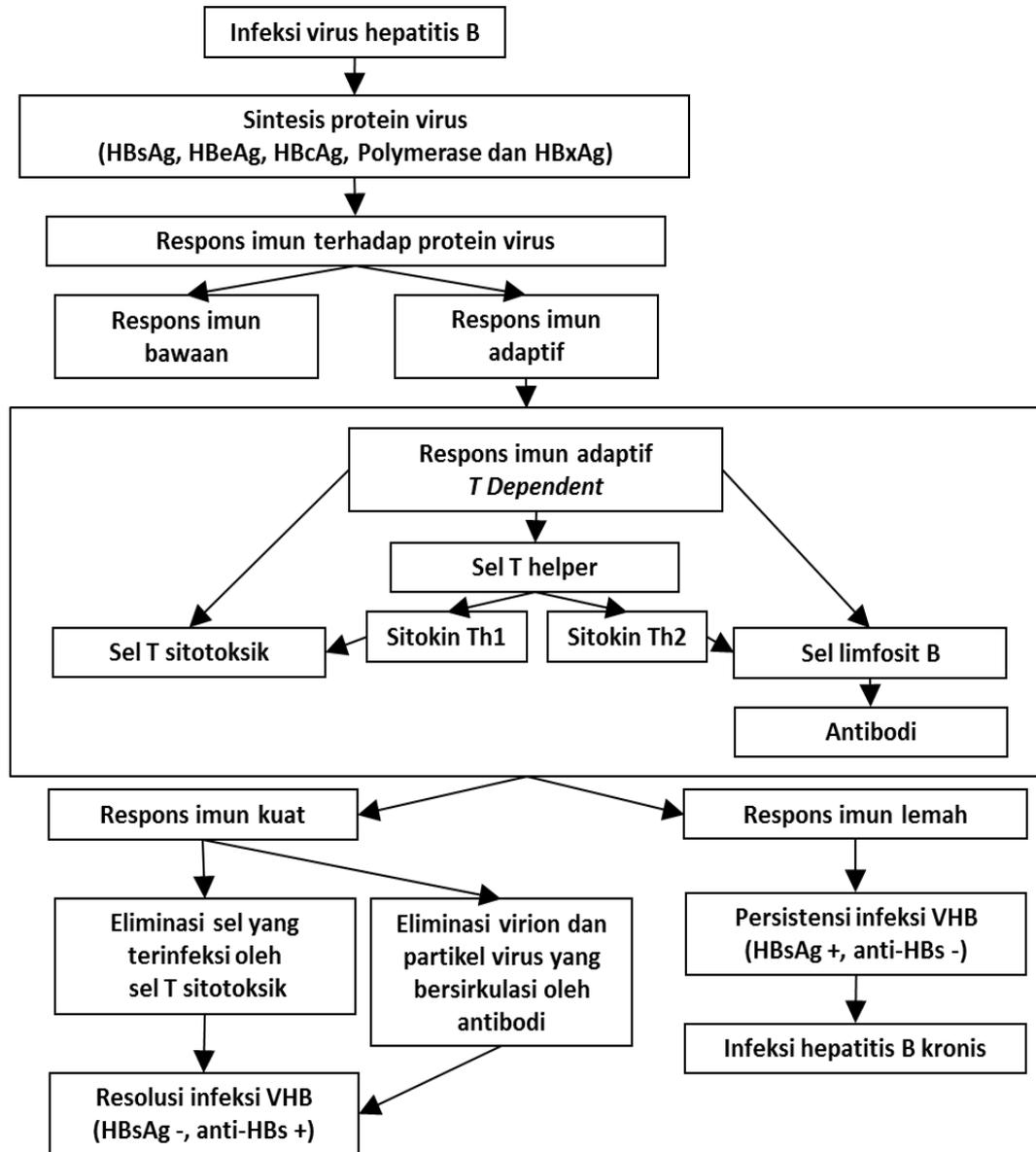
1. Mengetahui kemampuan sel mononuklear darah tepi manusia (SMDT) dari pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs secara *in vitro*.
2. Mengetahui kemampuan SMDT dari pasien hepatitis B kronis dalam mensintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 secara *in vitro* akibat stimulasi dengan HBsAg rekombinan (rHBsAg).
3. Mengetahui korelasi antara sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan produksi anti-HBs secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

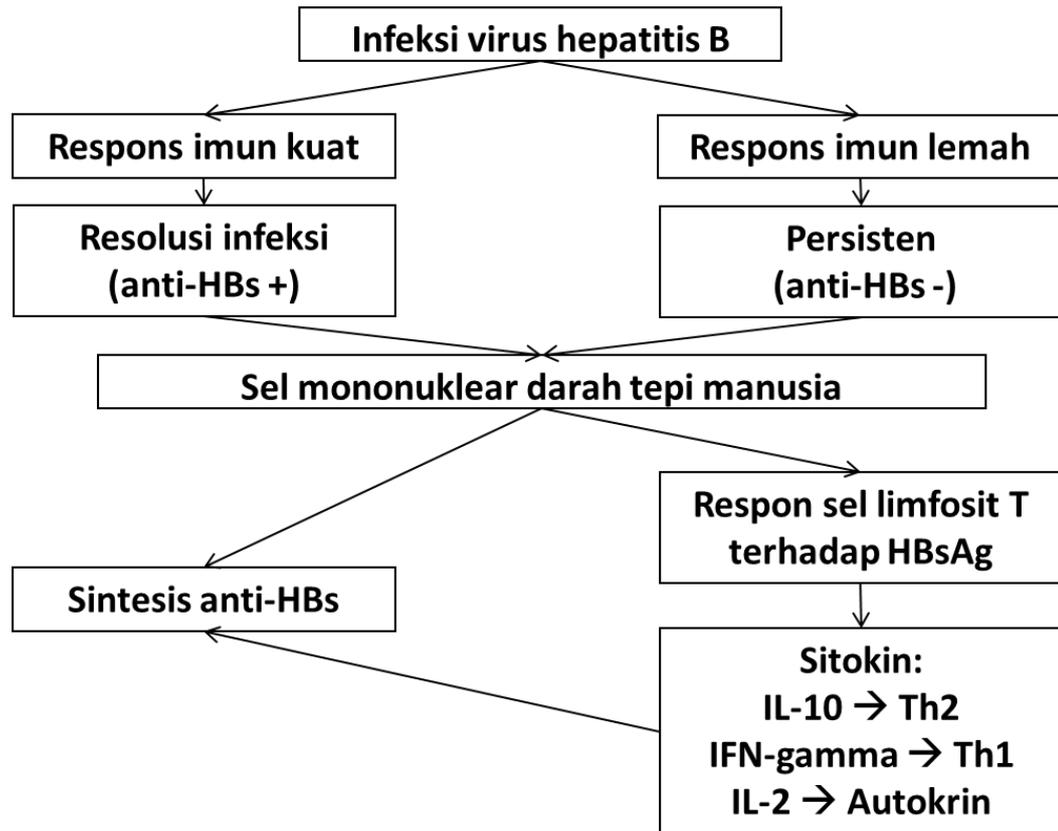
1. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terhadap pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 yang berperan dalam produksi anti-HBs. Informasi tersebut diharapkan akan berguna dalam mengembangkan suatu terapi untuk meningkatkan atau memicu produksi anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis ke tahap kuratif.

2. Informasi tersebut juga dapat digunakan dalam pemberian suplemen ataupun adjuvan tertentu pada vaksinasi dalam merangsang pola sitokin yang terbaik untuk mendapatkan kadar antibodi tertinggi.

1.5. Kerangka Teori



1.6. Kerangka Konsep

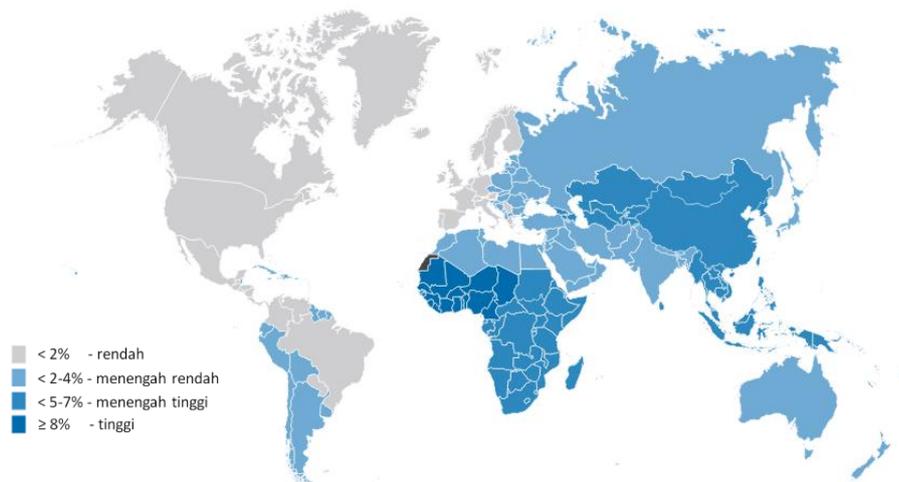


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Epidemiologi

Hepatitis B adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus hepatitis B (VHB) yang menyerang hati dan dapat mengakibatkan penyakit hati akut atau kronis. Penyakit ini merupakan salah satu masalah besar bagi dunia kesehatan karena penderitanya memiliki risiko kematian yang tinggi akibat sirosis hati dan kanker hati. Di seluruh dunia diperkirakan sekitar 2 milyar penduduknya telah terinfeksi oleh VHB dan lebih dari 240 juta mengidap penyakit infeksi hati kronis. Sekitar 780.000 penderitanya meninggal setiap tahun akibat konsekuensi dari penyakit tersebut.^{1,3}



Gambar 2.1. Prevalensi infeksi hepatitis B diseluruh dunia.³

Dalam pengukuran prevalensi infeksi VHB di seluruh dunia digunakan HBsAg sebagai penanda. Berdasarkan tingkat prevalensi HBsAg suatu wilayah dapat dikategorikan menjadi empat golongan yaitu: prevalensi tinggi (> 8%), prevalensi menengah tinggi (5-7%), menengah rendah (2-4%) dan prevalensi rendah (< 2%). Berdasarkan WHO, Indonesia termasuk daerah dengan prevalensi hepatitis B sedang sampai tinggi (Gambar 2.1).³

2.2. Virologi Virus Hepatitis B

Virus hepatitis B (VHB) adalah virus DNA yang bersifat hepatotropik dengan ukuran 42 nm yang terdiri dari selubung luar dan inti nukleokapsid. Pada inti nukleokapsid tersebut terdapat enzim DNA polimerase dan DNA virus untai ganda dengan untai positif yang tidak lengkap. Berdasarkan kriteria tersebut VHB merupakan bagian dari famili *Hepadnaviridae*. Famili *Hepadnaviridae* mempunyai 2 genus yaitu *Orthohepadnavirus* yang menginfeksi mamalia dan *Avihepadnavirus* yang menginfeksi unggas. VHB termasuk dalam genus *Orthohepadnavirus* bersama dengan *woodchuck hepatitis virus* (WHV), *ground squirrel hepatitis virus* (GSHV) dan *woolly monkey hepatitis virus* (WMHV).²⁹

Berdasarkan tingkat perbedaan genom virusnya, VHB dikelompokkan menjadi 10 genotipe (A-J).³⁰⁻³³ Beberapa genotipe dari VHB juga dapat dikelompokkan lebih lanjut menjadi sub-genotipe. Pengelompokan tersebut ditentukan berdasarkan tingkat perbedaan urutan basa nukleotida > 8% untuk genotipe dan 4-8% untuk sub-genotipe.^{29,33,34}

VHB juga dibagi menjadi empat subtipe utama (*adr*, *adw*, *ayr* dan *ayw*) berdasarkan variasi antigen pada protein permukaan VHB (HBsAg). Antigen pada HBsAg tersebut dibagi menjadi tiga daerah determinan yaitu: determinan “a” yang umum ditemukan pada VHB, determinan “d” atau “y” dan determinan “r” atau “w” yang spesifik untuk subtipe HBsAg tertentu. Penentuan subtipe dari HBsAg dilakukan dengan melihat variasi asam amino pada posisi 122 dan posisi 160 dari protein S. Asam amino lisin pada posisi 122 akan menentukan determinan “d” sementara asam amino arginin pada posisi yang sama akan menunjukkan determinan “y” dari HBsAg. Selanjutnya pada posisi 160 dari protein S, asam amino lisin akan menentukan determinan “w” dan keberadaan asam amino arginin pada posisi tersebut menunjukkan determinan “r”.^{34,35}

Selain keempat subtipe tersebut, variasi pada HBsAg dari VHB diperluas lagi menjadi sepuluh subtipe yaitu *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw3*, *adw4q-*, *adr* dan *adrq-* (Tabel 2.1).³⁶ Asam amino ke 127 akan menentukan variasi w1 – w4. Asam amino prolin akan menentukan w1 atau w2, asam amino threonin akan menentukan w3 dan asam amino leusin akan menentukan w4. Keberadaan dari w1 juga ditentukan oleh keberadaan arginine pada posisi 122,

fenilalanin pada posisi 134 dan/atau alanin pada posisi 159. Determinan lain yang dinamakan “q” diekspresikan oleh hampir semua varian VHB terkecuali varian yang mengekspresikan *adw4* dan beberapa varian yang mengkodekan *adr*.³⁴

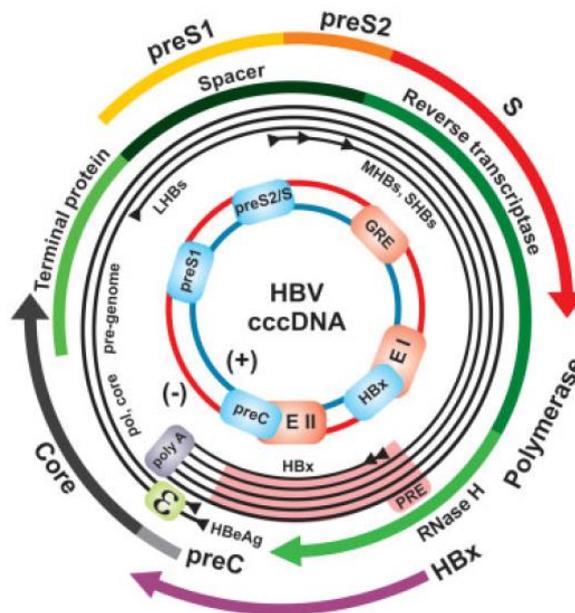
Tabel 2.1. Penentuan sub tipe VHB berdasarkan posisi asam amino pada determinan HBsAg.³⁶

Posisi Asam Amino pada HBsAg							Prediksi sub tipe HBsAg
122	127	134	159	160	177	178	
Lisin	Prolin	Fenilalanin	Alanin	Lisin	Valin	Prolin	adw2
Lisin	Threonin	Fenilalanin	Alanin	Lisin	Valin	Prolin	adw3
Lisin	Leusin	Fenilalanin	Glisin	Lisin	Valin	Glutamin	adw4q-
Lisin	Prolin	Fenilalanin	Alanin	Arginin	Valin	Prolin	adr
Lisin	Prolin	Fenilalanin	Valin	Arginin	Alanin	Prolin	adrq-
Arginin	Prolin	Fenilalanin	Alanin	Lisin	Valin	Prolin	ayw1
Arginin	Prolin	Tirosin	Glisin	Lisin	Valin	Prolin	ayw2
Arginin	Prolin	Fenilalanin	Glisin	Lisin	Valin	Prolin	ayw3
Arginin	Leusin/Isoleusin	Fenilalanin	Glisin	Lisin	Valin	Prolin	ayw4
Arginin	Prolin	Fenilalanin	Alanin	Arginin	Valin	Prolin	ayr

2.3. Genom Virus Hepatitis B

Genom VHB terdiri dari DNA untai ganda berbentuk sirkuler dengan panjang kira-kira 3200 pasang basa nukleotida dimana kedua untai DNA tersebut memiliki panjang untai yang tidak sama (*partially double stranded DNA*). Untai DNA dari genom VHB yang lebih panjang dan terletak pada bagian luar tersebut disebut sebagai untai DNA negatif, sementara untai DNA yang lebih pendek dan terletak pada bagian dalam disebut untai DNA positif. Bentuk sirkuler DNA dipertahankan dengan adanya ikatan non-kovalen antara pasangan basa dari untai

negatif dan untai positif. Pada ujung 5' dari untai negatif genom VHB terdapat DNA *polymerase* yang terikat secara kovalen pada bagian amino terminal dan juga terdapat residu 19 basa nukleotida RNA yang berperan sebagai penutup (*cap*) untai RNA pregenomic VHB dan primer untuk sintesis DNA untai positif VHB (Gambar 2.2).³⁷



Gambar 2.2. Organisasi genom VHB.³⁷

Genom VHB terorganisasi menjadi empat *open reading frame* (ORF) yang tumpang tindih. Keempat ORF tersebut adalah S (*Surface*), C (*Core*), P (*Polymerase*) dan X. Seluruh bagian dari ORF S merupakan bagian dari ORF P, sementara hanya sebagian dari ORF C dan ORF X adalah bagian dari ORF P. Dalam satu ORF dapat dihasilkan beberapa protein yang berbeda. Protein-protein tersebut memiliki jumlah asam amino yang berbeda dengan bagian karboksi terminal (*C-terminal*) yang sama sehingga keempat ORF tersebut dapat mengkodekan tujuh protein yang berbeda. Tujuh protein tersebut adalah LHBs (*large hepatitis B surface protein*), MHBs (*middle hepatitis B surface protein*), SHBs (*small hepatitis B surface protein*), HBeAg (*hepatitis B e antigen*), HBcAg (*hepatitis B core antigen*), *polymerase*, dan *hepatitis B X protein* (HBx).³⁸

ORF P yang merupakan ORF terpanjang dari genom VHB, mengkode enzim polimerase dari virus yang merupakan gabungan dari tiga subdomain katalitik

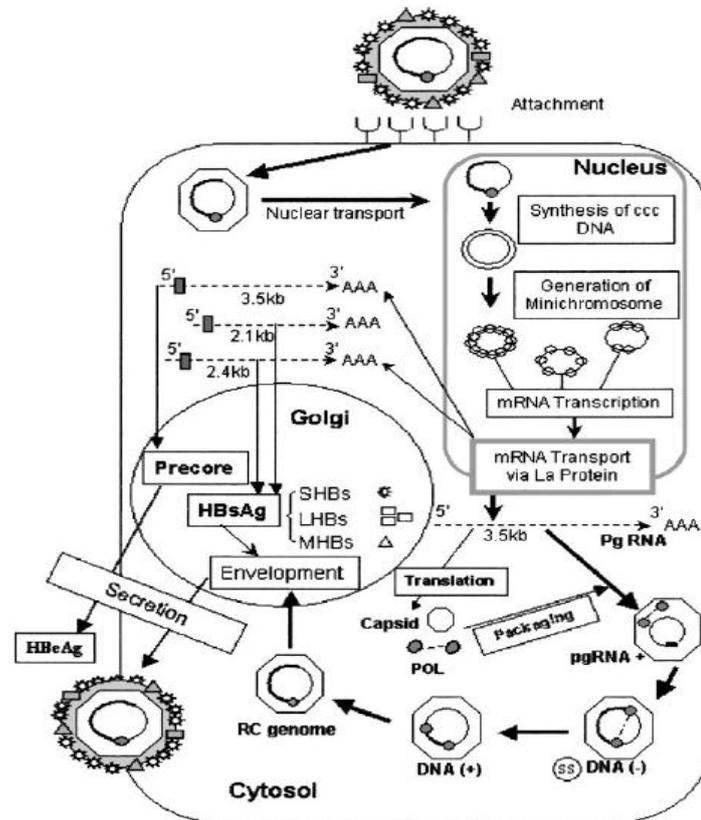
yang berbeda, yaitu subdomain protein terminal, subdomain transkripsi balik yang juga mempunyai aktivitas DNA *polymerase*, dan subdomain *ribonuclease H* (RNase H). ORF S mengkode tiga macam protein permukaan yang memiliki ujung karboksi terminal yang sama dengan panjang yang berbeda-beda yaitu LHBs, MHBs dan SHBs. ORF C mengkode protein inti yang merupakan protein struktural beserta protein non struktural yang disebut sebagai HBeAg, yang merupakan variasi *splicing* dari ORF tersebut. ORF X mengkode HBx yang telah dilaporkan dapat berinteraksi dengan berbagai protein selular dari sel inang dan memiliki peran dalam karsinogenesis.³⁷

Pada genom VHB terdapat empat promotor yang berfungsi sebagai elemen pengatur transkripsi. Berdasarkan ekspresi gen yang dikendalikan oleh promotor tersebut, promotor tersebut dinamakan promotor preC/C, pre-S1, preS2/S dan X. Promotor tersebut akan menginisiasi transkripsi *messenger ribonucleic acid* (mRNA) dengan panjang yang berbeda-beda, yaitu 3,5- , 2,4- , 2,1- dan 0,9-kb. Semua hasil transkripsi mRNA dari virus tersebut akan memiliki poliadenosin dan struktur penutup pada ujung 5'. Selain keempat promotor tersebut, pada genom VHB dapat ditemukan elemen pengatur lainnya yaitu *enhancers*, *glukocorticoid responsive element* (GRE) serta *negative regulatory element* (NRE) dan elemen CCAT yang dapat meningkatkan ataupun menurunkan transkripsi RNA VHB. *Enhancers* dapat menaikkan transkripsi dari semua promotor VHB, GRE berfungsi sebagai sinyal untuk memperkuat aktivitas dari *enhancers* sehingga dapat meningkatkan transkripsi RNA virus, sementara NRE menekan transkripsi mRNA HBcAg ataupun HBeAg dan elemen CCAT menekan transkripsi mRNA preS1.³⁹

2.4. Siklus Hidup VHB

VHB bersifat hepatotropik sehingga dalam siklus hidupnya virus tersebut akan menginfeksi sel hati. Virus tersebut akan membentuk ikatan antara preS1 dari VHB dengan *sodium-dependent taurocholic cotransporting polypeptide* (NTCP) yang merupakan molekul yang berada pada permukaan sel hepatosit dan mengakibatkan masuknya virus ke dalam sitoplasma sel hati.⁴⁰ Pada sitoplasma terjadi pelepasan nukleokapsid virus yang di dalamnya terdapat genom virus

dalam bentuk *relaxed circular*. Selanjutnya genom virus tersebut ditransfer ke dalam nukleoplasma di mana pada tempat tersebut DNA VHB akan dibentuk menjadi *covalently closed circular DNA (cccDNA)* oleh sel inang. cccDNA inilah yang akan menghasilkan 4 RNA dengan panjang yang berbeda-beda yaitu: 3,5- , 2,4- , 2,1- , dan 0,7-kb (Gambar 2.3).



Gambar 2.3. Siklus hidup hepatitis B.⁴²

RNA yang dihasilkan akan ditranslasi untuk membentuk protein-protein virus yaitu: *Hepatitis B core antigen* (HBcAg) yang akan menjadi inti nukleokapsid, *hepatitis B e antigen* (HBeAg) dan protein polimerase dari 3,5-kb RNA; protein selubung yang disebut juga dengan HBsAg dari 2,4- dan 2,1-kb RNA; dan *hepatitis B X protein* (HBx) dari 0,7-kb RNA. Selain berfungsi sebagai mRNA untuk translasi protein nukleokapsid dan polimerase, RNA pregenomik dengan panjang 3,5-kb juga berfungsi sebagai cetakan RNA yang akan di transkripsi balik menjadi genom virus dengan bantuan enzim polimerase virus. Genom virus tersebut akan dibungkus oleh nukleokapsid dan protein permukaan virus untuk menjadi virion VHB baru, sebelum akhirnya dikeluarkan dari sel hati

yang terinfeksi bersama dengan protein-protein virus seperti HBsAg dan HBeAg.^{37,41-43}

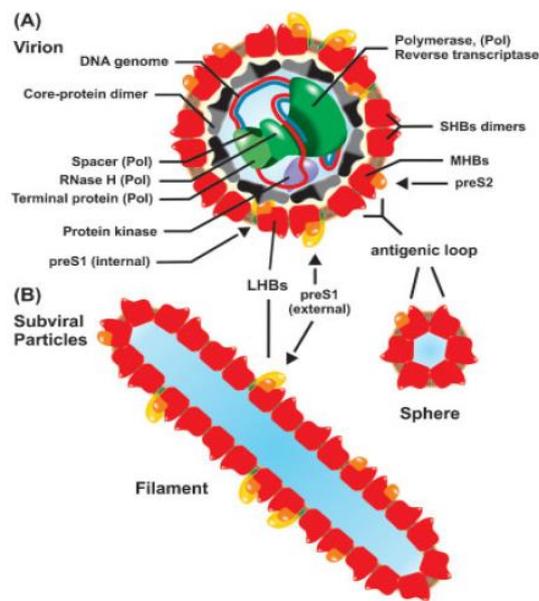
2.5. Protein – Protein Virus Hepatitis B

Protein virus diproduksi di dalam sel hati dalam jumlah yang banyak untuk keperluan membuat virus-virus baru. Selain digunakan untuk membuat virus baru, beberapa protein virus tersebut juga disekresikan keluar dari sel hati. Protein-protein yang dibentuk oleh VHB dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu protein struktural dan protein non-struktural. Protein non-struktural meliputi *hepatitis B e antigen* (HBeAg), dan *hepatitis B x antigen* (HBxAg). Protein struktural meliputi *hepatitis B surface antigen* (HBsAg), *hepatitis B core antigen* (HBcAg) dan polimerase.³⁹ Selama proses infeksi VHB, tubuh juga membuat antibodi (anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc) terhadap beberapa protein tersebut yang dapat dideteksi keberadaannya di dalam darah penderita.¹ HBsAg akan dibahas lebih lanjut pada tesis ini mengingat protein ini akan menginduksi terbentuknya anti-HBs yang merupakan satu-satunya antibodi yang memiliki peranan dalam mencegah infeksi VHB.

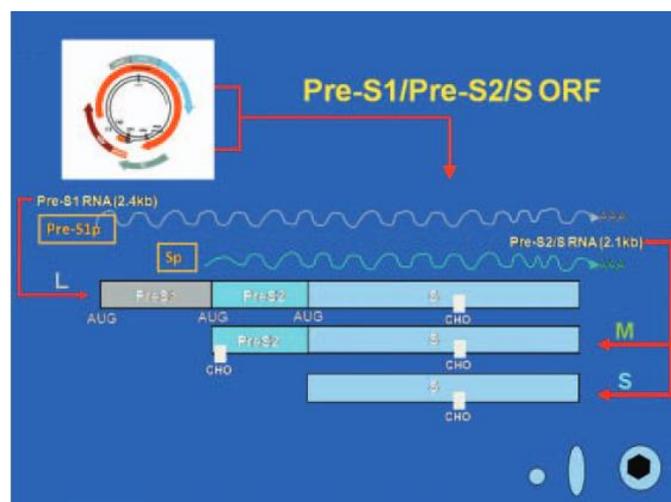
2.6. Protein *Hepatitis B Surface Antigen* (HBsAg)

Berdasarkan hal yang sudah dikemukakan sebelumnya, anti-HBs memiliki peranan yang penting sebagai penanda resolusi infeksi dari individu yang terinfeksi karena anti-HBs mampu menetralkan dan memberikan perlindungan dengan mengikat partikel virus dan mencegah reinfeksi ke sel hati.^{6,8} Proses pembentukan anti-HBs tersebut terjadi akibat adanya induksi sistem imun inang oleh HBsAg. Selubung terluar VHB merupakan protein permukaan yang terbentuk oleh tiga macam glikoprotein. Ketiga bentuk protein permukaan VHB (LHBs, MHBs dan SHBs) dikode oleh satu ORF yang di dalamnya memiliki tiga kodon “*start*” untuk inisiasi translasi yang berbeda. Ketiga protein tersebut memiliki asam amino dengan panjang yang berbeda tetapi memiliki ujung karboksil yang sama. Ketiga protein tersebut, dengan panjang asam amino secara berurutan yaitu 398/400, 281, dan 226 asam amino, akan digunakan untuk membentuk selubung permukaan dari virion VHB dan juga digunakan untuk

membentuk partikel subviral dengan bentuk sferis ataupun filamen yang akan dikeluarkan oleh sel hati yang terinfeksi selama siklus hidup VHB (Gambar 2.4). Partikel subviral yang dibentuk oleh ketiga protein permukaan VHB tersebut akan memiliki ukuran yang berbeda-beda, umumnya pada bentuk sferis akan memiliki diameter 20-22 nm, sedangkan bentuk filamen memiliki panjang yang bervariasi dengan lebar mencapai 20 nm.⁴¹



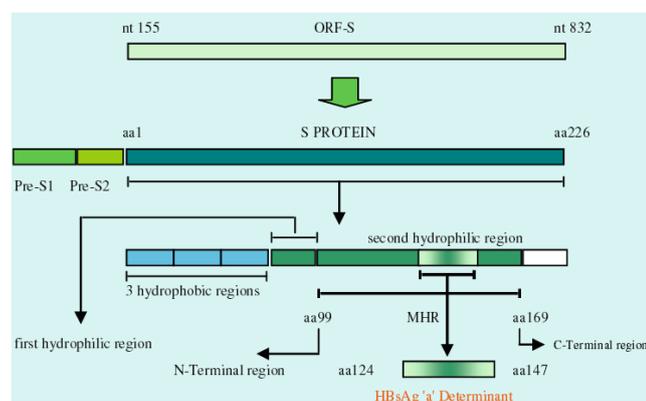
Gambar 2.4. Model virion VHB (a) dan partikel subviral dari VHB (b).³⁷



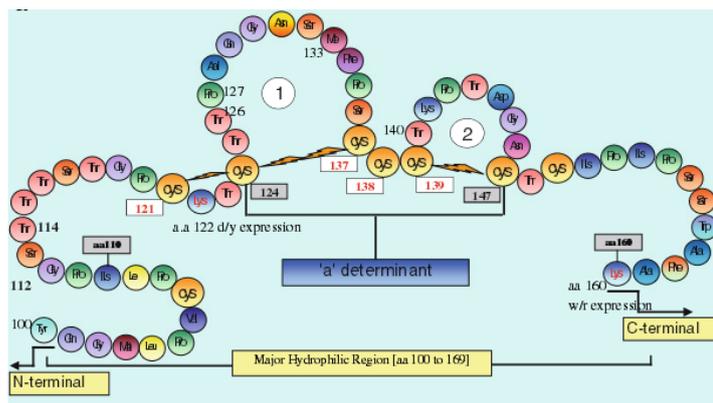
Gambar 2.5. Hasil transkripsi dan translasi dari gen S.⁴⁴

Translasi untuk ketiga protein permukaan tersebut berasal dari ORF yang sama yang akan menghasilkan dua mRNA yang memiliki panjang berbeda. mRNA yang memiliki panjang 2,4-kb akan ditranslasikan menjadi LHBs, sementara translasi dari mRNA yang memiliki panjang 2,1-kb akan membentuk MHBs dan SHBs (Gambar 2.5). Transkripsi kedua mRNA tersebut diatur oleh promoter yang berbeda dengan karakter yang khas. Promoter pre-S1 untuk mRNA yang mentranslasikan LHBs memiliki situs pengikatan untuk faktor transkripsi yang spesifik hati (seperti HNF1)⁴⁵ dan memiliki aktivitas yang relatif lebih lemah dibandingkan dengan promoter pre-S2/S. Selain itu, promoter pre-S2 juga bersifat tidak spesifik sehingga dapat berfungsi pada sel lain selain sel hati.⁴⁶ Hal ini dapat menjelaskan mengapa pada partikel virus yang berukuran 22-nm komposisi LHBs hanya sekitar 2%. LHBs beserta MHBs memiliki proporsi yang lebih banyak sebagai komponen virion dan partikel subviral yang berbentuk filamen, akan tetapi kedua protein tersebut hanya mewakili sekitar 20% dari total protein permukaan virus sementara sisanya didominasi oleh SHBs.⁴⁷

SHBs dibagi menjadi tiga bagian (Gambar 2.6): daerah *N-terminal* (asam amino 1–99), *major hydrophilic region* [MHR] (asam amino 100–169) dan *C-terminal* (asam amino 170–226). Daerah determinan “a”, yang berada pada posisi asam amino 124–147, merupakan daerah yang memiliki lima asam amino sistein yang dihubungkan dengan jembatan disulfida, yaitu: asam amino sistein posisi 121–124, 124–137, dan 139–147, yang berfungsi menjaga stabilitas dan struktur SHBs. Daerah tersebut memiliki peran penting dalam menentukan imunogenisitas dan struktur dari protein SHBs (Gambar 2.7).



Gambar 2.6. Skema protein SHBs dari VHB.¹⁷



Gambar 2.7. Struktur dan konformasi determinan “a” SHBs.¹⁷

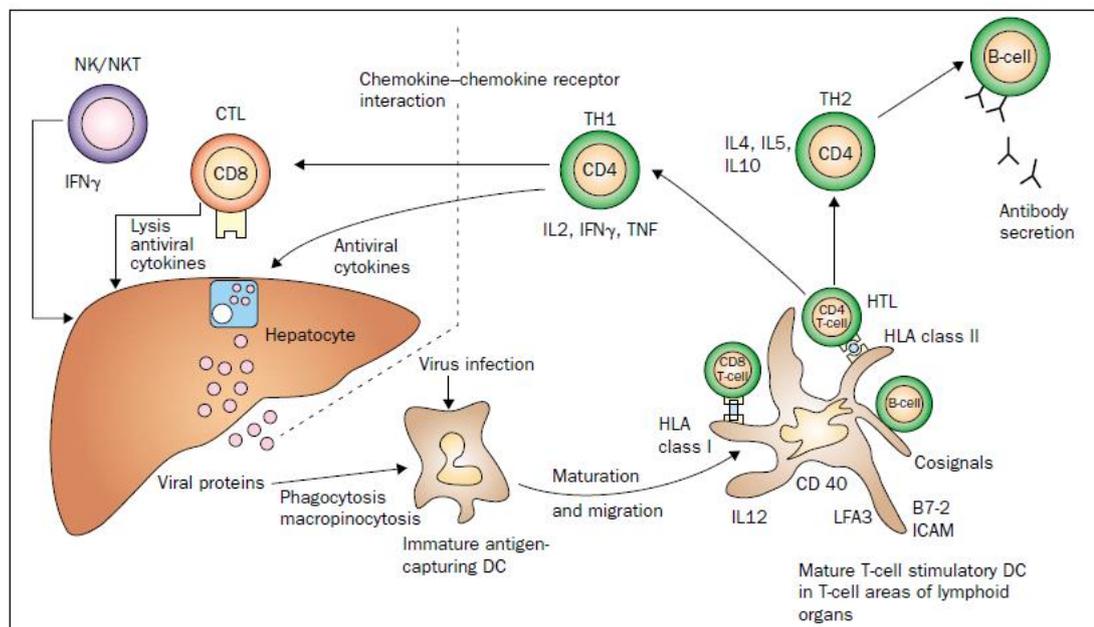
Anti-HBs yang terbentuk setelah infeksi VHB ataupun vaksinasi terdiri dari antibodi yang mengenali bagian MHR dari protein HBsAg dan terutama pada daerah epitop dari determinan “a”.⁴⁸ Struktur ini telah diketahui bahwa pada determinan “a” terdapat dua *loop* yang terbentuk dari ikatan disulfida pada residu asam amino pada posisi 124 dengan 137 dan pada posisi 139 dengan 147 (Gambar 2.7).^{17,48}

2.7. Respons Imun Terhadap VHB.

Respons imun terhadap VHB selain berperan dalam pembersihan virus pada infeksi akut juga berperan dalam imunopatogenesis infeksi VHB. Pada individu yang terinfeksi, pembersihan dari VHB diikuti dengan respons imun yang hebat yang diasosiasikan dengan inflamasi akut. Respons imun yang terjadi dalam pembersihan VHB merupakan reaksi yang kompleks antara sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif (Gambar 2.8). Sel imun bawaan seperti sel dendritik berfungsi dalam proses pengenalan awal dari antigen VHB dan berfungsi untuk mengarahkan respons dari sel T spesifik VHB yang merupakan sel imun adaptif dan merupakan sel imun efektor utama dalam melawan infeksi VHB. *Major histocompatibility complex* (MHC) kelas II, sel *T helper* (CD4⁺) akan membantu sel B dalam memproduksi antibodi yang berperan dalam menangkap dan mengeliminasi antigen ataupun virion VHB yang bersirkulasi dalam darah. MHC kelas I dan sel T sitotoksik (CD8⁺) akan mengeliminasi sel yang terinfeksi.⁴⁹⁻⁵¹

2.7.1 Respons imun bawaan

Secara umum, respons imun bawaan berperan dalam mengendalikan infeksi segera setelah terjadi kontak dengan patogen untuk membatasi penyebaran infeksi dan menginisiasi respons imun adaptif yang efisien. Respons imun bawaan diaktivasi oleh patogen yang dikenali oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) yang mengenali struktur tertentu dari patogen yang disebut *pathogen associated molecular pattern* (PAMP). PRRs yang berperan dalam infeksi virus adalah *Toll-like receptors* (TLRs), *RNA helixase*, seperti *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I), dan *double stranded RNA-dependent protein kinase* (PKR).¹³



Gambar 2.8. Respons imun adaptif terhadap infeksi VHB.⁴⁹

Fase awal dari infeksi virus umumnya ditandai oleh produksi sitokin, interferon tipe 1 (α/β), dan aktivasi dari sel *natural killer* (NK), *natural killer T* (NKT) dan Kupffer. Hepatosit yang merupakan target infeksi dari VHB akan mengeluarkan IFN- α dan IFN- β . IFN- α/β ini diasosiasikan dengan penurunan kadar virus dan aktivasi dari *double stranded RNA-dependent* PKR yang menghambat sintesis protein VHB. Selain itu, IFN- α/β memanggil dan memediasi aktivitas dari *antigen presenting cells* (APC) terutama sel Kupffer dan sel dendritik. APC ini akan menghasilkan interleukin-18 dan kemokin CCL3 yang menginduksi sel NK dan NKT¹² (Gambar 2.8). Sel NK, NKT dan Kupffer telah

dibuktikan memiliki peranan dalam respons pertama melawan VHB. Produksi IFN tipe 1 dapat dipicu secara langsung oleh replikasi virus melalui mekanisme sistem imun yang mengenali keberadaan RNA ataupun DNA virus. Sumber utama dari IFN- α/β adalah sel yang terinfeksi dan sel dendritik *plasmacytoid*, sementara IFN- γ lebih banyak diproduksi oleh sel NK dan NKT.^{51,52}

Pada model hewan coba, sel NKT dapat menghambat replikasi VHB secara langsung dengan menggunakan IFN- γ . Aktivitas NK dan NKT sangat penting untuk respons anti-VHB sebelum dimulainya sistem imun adaptif yang membutuhkan waktu, sehingga sistem imun bawaan dapat dikatakan mampu mengendalikan replikasi VHB pada tahap awal sebelum terjadinya kerusakan sel hati yang disebabkan oleh sistem imun adaptif. Sel Kupffer selain memiliki peranan utama dalam memediasi sistem imun bawaan dan adaptif, juga dapat menghasilkan sitokin dan kemokin seperti IFN- γ , IL-12, IL-18, CXCL9, CXCL10 yang berperan dalam memanggil dan pematangan sel T yang spesifik VHB. IL-12 dan IL-18 telah dilaporkan dapat menekan replikasi VHB pada tikus transgenik.⁵²

2.7.2. Respons imun adaptif

Setelah respons imun bawaan yang bersifat tidak spesifik teraktivasi, respons imun akan dilanjutkan oleh respons imun adaptif yang bersifat spesifik. Respons imun adaptif ini akan mengenali protein virus dan memicu eliminasi. Respons imun adaptif ini dibagi menjadi 2 yaitu: respons imun humoral yang meliputi sel limfosit B yang akan menghasilkan antibodi dan respons imun seluler yang terdiri dari fagosit dan sel limfosit T.¹³

Aktivasi sel limfosit B bermula dari pengenalan antigen virus secara utuh oleh sel B. Pengenalan antigen itu dilakukan oleh reseptor sel B yang spesifik yang selanjutnya akan memicu proliferasi dan diferensiasi dari sel B tersebut. Sel B yang mengalami diferensiasi akan berubah menjadi sel plasma yang secara aktif mensekresikan antibodi. Dalam proses aktivasi sel B, tergantung dari antigen yang diproses, dapat dibagi menjadi dua yaitu *T independent* dan *T dependent*. Partikel virus yang bersirkulasi dalam darah, HBsAg dan HBeAg, merupakan protein sehingga aktivasi sel B terhadap antigen tersebut merupakan proses *T dependent*. Dalam proses ini aktivasi sel B dipengaruhi oleh aktivitas sel *T helper* (CD4⁺). Sel

B selain sebagai penghasil antibodi dapat juga mempresentasikan antigen ke sel *T helper* melalui molekul MHC kelas II. Sel *T helper* tersebut akan teraktivasi dan memproduksi sitokin-sitokin yang dapat memicu pembentukan sel B memori, *affinity maturation* dan *isotype switching*.¹³

Respons imun seluler berawal dari pengenalan antigen yang sudah diproses oleh sel dan dipresentasikan dalam bentuk kompleks molekul MHC kelas I ataupun kelas II. Antigen yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I akan dikenali oleh sel *cytotoxic T cells* (CTL). Sel $T\ CD8^+$ yang telah matang adalah sel efektor utama yang terlibat dalam pembersihan VHB. Sel $T\ CD8^+$ yang mengenali sel yang terinfeksi tersebut akan mengeluarkan perforin dan granzyme yang akan menginduksi apoptosis.¹³ Selain menggunakan mekanisme sitopatik, sel $T\ CD8^+$ juga dapat menggunakan mekanisme nonsitopatik. Mekanisme non-sitopatik ini diperantarai oleh sitokin seperti $IFN-\gamma$ dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) yang umumnya disekresikan oleh sel $T\ CD8$.⁵³ Kedua sitokin tersebut dilaporkan dapat menghambat replikasi VHB secara langsung tanpa menginduksi penghancuran sel hepatosit.⁵⁴

Sel *T helper* akan mengenali antigen yang dipresentasikan bersama MHC kelas II pada APC. Selanjutnya sel *T helper* tersebut akan berdiferensiasi menjadi Th1 ataupun Th2 tergantung dari pengaruh sitokin yang dihasilkan. Th1 umumnya berperan dalam imunitas seluler dan diferensiasinya dipengaruhi oleh sitokin IL-12 dan IL-2. Sel Th1 berperan dalam aktivasi makrofag, sel $CD8^+$, sel B melalui sekresi sitokin $IFN-\gamma$. Sementara sel Th2 berperan dalam imunitas humoral dan diferensiasinya dipicu oleh IL-4 dan IL-10. Sitokin efektor dari sel Th2 adalah IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 dan IL-13 dan sitokin tersebut mempengaruhi sel eosinofil, basofil, sel mast, dan sel B. IL-4 dapat menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi IgE. Sementara $IFN-\gamma$ menstimulasi sel B untuk memproduksi antibodi IgG.¹³ Sitokin yang dihasilkan oleh Th1 dan Th2 dapat saling menekan satu sama lain, seperti $IFN-\gamma$ yang mampu menekan aktivitas sel Th2 dan IL-10 yang mampu menekan aktivitas sel Th1.²⁰ Aktivasi dari sel *T helper* selain membentuk sel efektor juga dapat membentuk sel memori dan sel *T regulator*.¹³

Aktivasi sel Th1 $CD4^+$ yang multispesifik dan memiliki respons kuat umumnya ditemukan pada infeksi VHB akut yang mengalami resolusi infeksi.

Sementara itu pada individu yang mengalami persistensi VHB kronis dipercayai disebabkan oleh keberadaan cccDNA dan immunosupresi oleh VHB. Infeksi hepatitis B kronis umumnya diasosiasikan dengan kurangnya kemampuan sel dendritik untuk mengaktivasi sel T dan memproduksi sitokin, kecenderungan diferensiasi untuk menjadi sel Th2 daripada sel Th1, meningkatnya aktivitas sel T regulator ($CD25^+ CD4^+$) dalam memproduksi IL-10, kurangnya kemampuan proliferasi dan produksi sitokin antiviral dari sel Th1, cacat fungsi dan kurangnya jumlah sel CTL akibat lemahnya kemampuan sel dendritik dalam mempresentasikan antigen dan kurangnya aktivitas Th1 dan anergi akibat ekspresi PD-1 yang menginduksi apoptosis pada sel CTL.⁵²

2.8. Perjalanan Infeksi VHB

Infeksi VHB dapat berlangsung akut dan diakhiri dengan resolusi infeksi. Pada orang-orang tertentu infeksi VHB tersebut berlanjut menjadi kronis yang merupakan risiko tinggi untuk terjadinya sirosis ataupun kanker hati. Perjalanan infeksi hepatitis B dapat ditentukan melalui keberadaan penanda serologi dari protein virus yang dihasilkan selama siklus hidupnya seperti HBsAg, HBeAg dan dengan antibodi terhadap protein tersebut anti-HBs, anti-HBe dan imunoglobulin G dan M terhadap HBcAg (IgM dan IgG anti-HBc) yang merupakan produk respons imun inang.²⁸

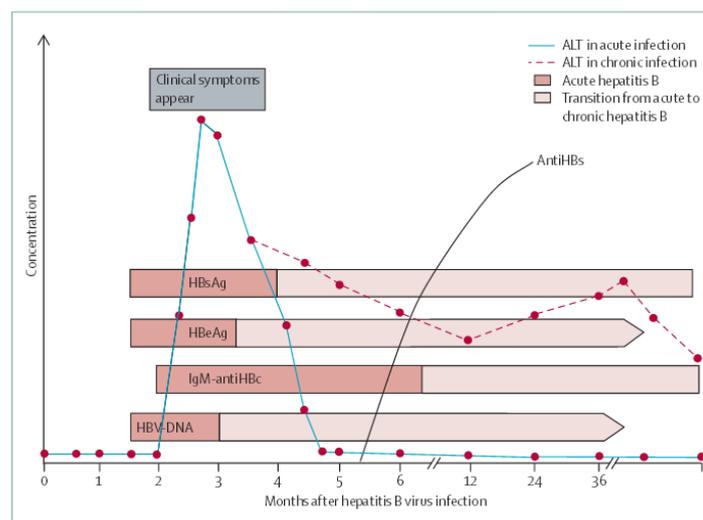
Masa inkubasi VHB dapat terjadi selama satu sampai empat bulan. Infeksi VHB umumnya bersifat asimtomatik, akan tetapi pada beberapa individu dapat muncul gejala-gejala seperti: demam, ruam pada kulit, radang sendi, mual-mual, penyakit kuning dan gejala-gejala lain yang tidak spesifik. Gejala yang timbul tersebut bervariasi dan tergantung dari faktor virus dan inangnya.⁵⁵

2.8.1. Infeksi VHB akut

Infeksi VHB dikatakan akut apabila seseorang terinfeksi VHB yang ditandai dengan keberadaan HBsAg dan juga positif untuk IgM anti-HBc. Infeksi VHB akut dapat berlanjut menjadi infeksi VHB kronis ataupun berakhir dengan resolusi infeksi. Resolusi infeksi dari VHB yang disertai dengan serokonversi dari HBsAg menjadi anti-HBs dapat ditemukan pada 95% individu dewasa. Akan tetapi, dalam

jumlah yang kecil DNA VHB masih dapat ditemukan dalam serum dan sel mononuklear darah tepi (SMDT) dari individu yang mengalami resolusi infeksi dari infeksi.¹¹ Hal ini menandakan adanya infeksi VHB terselubung dan reaktivasi dari VHB dapat terjadi apabila individu tersebut mendapat pengobatan immunosupresan.²⁸

Penanda serologi yang pertama kali terdeteksi pada tahap infeksi akut adalah HBsAg. IgM anti-HBc akan muncul 1-2 minggu setelah HBsAg muncul dan bertahan selama 6 bulan. Pada individu yang mengidap infeksi VHB kronis, IgM anti-HBc tidak akan terdeteksi sehingga IgM anti-HBc merupakan diagnosis utama untuk menentukan infeksi hepatitis B akut. Anti-HBc total akan bertahan seumur hidup dan dapat ditemukan pada penderita kronis ataupun yang telah mengalami resolusi infeksi. Pada orang yang mengalami resolusi infeksi dari VHB, HBsAg akan tereliminasi dari dalam darah, dan anti-HBs akan terbentuk selama pemulihan. Keberadaan anti-HBs menandakan adanya perlindungan terhadap VHB. Bagi orang yang pulih dari infeksi VHB hanya anti-HBc dan anti-HBs yang akan terdeteksi. Perjalanan serologi dan DNA VHB pada tahap ini dapat dilihat pada gambar 2.9.²⁸

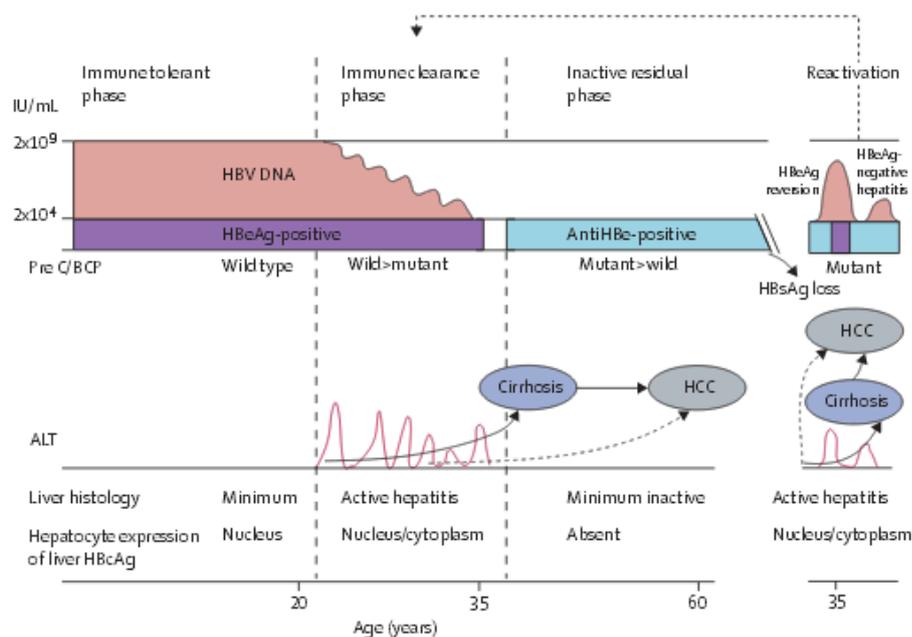


Gambar 2.9. Perubahan penanda serologi setelah infeksi hepatitis B akut.²⁸

2.8.2 Infeksi VHB kronis

Infeksi VHB kronis selain didefinisikan sebagai keberadaan HBsAg pada serum lebih dari 6 bulan semenjak infeksi, dapat juga didefinisikan sebagai

keberadaan HBsAg pada pasien yang negatif untuk tes IgM anti-HBc tetapi positif untuk tes IgG anti-HBc. Hal ini menunjukkan ketidakmampuan inang untuk melawan infeksi VHB. Pada tahap ini, umumnya tidak terdeteksi anti-HBs, dan HBsAg akan tetap ada untuk waktu yang lama. HBeAg, penanda untuk aktivitas replikasi VHB yang tinggi, akan ada selama tahap awal infeksi dan setelah memasuki tahap kronis akan menjadi tidak terdeteksi.²⁸ Infeksi VHB kronis menunjukkan persistensi VHB dalam melawan sistem imun.



Gambar 2.10. Perjalanan infeksi hepatitis B Kronis.²⁸

Perjalanan infeksi VHB kronis dapat dibagi menjadi empat fase yang meliputi; (1) fase *immunotolerant* = IT, pada fase ini infeksi yang terjadi tidak menimbulkan respons imun dari inang dan ditandai dengan kadar DNA VHB yang tinggi, kadar ALT normal dan HBeAg positif, (2) fase *immuclearance* = IC, pada fase ini infeksi VHB mendapat perlawanan dari inang dan terjadi lisis sel hepatosit akibat respons imun inang yang ditandai dengan tingginya kadar ALT, (3) fase *low-replicative* = LR, pada fase ini terjadi penurunan kadar DNA VHB menjadi rendah atau bahkan tidak terdeteksi akibat eliminasi oleh sistem imun sehingga fase ini ditandai dengan rendahnya DNA VHB, kadar ALT yang rendah dan serokonversi HBeAg menjadi anti-HBe, (4) fase HBeAg *negative Hepatitis B chronic* = ENH yang terjadi akibat adanya reaktivasi VHB mutan yang tidak

menghasilkan HBeAg. Fase ini ditandai dengan kadar DNA VHB yang tinggi, HBeAg negatif dan kadar ALT yang tinggi (Gambar 2.10).²⁸

2.9. Anti-HBs pada Pasien Hepatitis B Kronis

Anti-HBs umumnya tidak terdeteksi pada pasien hepatitis B kronis. Akan tetapi hal tersebut tidak berarti bahwa pasien kronis tidak memproduksi anti-HBs.⁶ Keberadaan anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dapat ditemukan pada individu yang terinfeksi oleh VHB yang memiliki mutasi pada daerah pengenalan antibodinya. Pada pasien tersebut terjadi koeksistensi anti-HBs dan HBsAg.¹⁷ Tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien kronis dapat disebabkan oleh ketidakmampuan individu tersebut dalam memproduksi anti-HBs ataupun karena antibodi yang terbentuk membentuk kompleks imun dengan antigennya sehingga keberadaannya tersembunyikan oleh antigennya.⁶ Kedua hal tersebut menunjukkan respons imun yang tidak adekuat terhadap HBsAg.

Respons imun yang tidak adekuat terhadap HBsAg dapat diasosiasikan dengan berbagai mekanisme meliputi defisiensi pembentukan sel T ataupun B yang spesifik terhadap HBsAg,^{56,57} ekspresi *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dengan haplotipe tertentu,⁵⁸ eliminasi sel B spesifik HBsAg oleh CTL (*Cytotoxic T Cells*),⁵⁹ toleransi imunologis dan ketidakseimbangan pada fungsi sel *T helper* (Th).⁶⁰

Penelitian ini akan membahas mengenai kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam mensintesis anti-HBs serta pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 yang terbentuk akibat stimulasi oleh rHBsAg. Selain itu dalam penelitian ini juga akan melihat apakah ada perbedaan respons imun antara pasien hepatitis B kronis dengan pasien hepatitis B yang telah mengalami resolusi infeksi. Hal ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dan apakah hal tersebut dipengaruhi oleh sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2.

2.10. Aplikasi Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia (SMDT) dalam Mempelajari Respons Imun Terhadap VHB.

Dengan melihat penjelasan sebelumnya maka manifestasi infeksi VHB ditentukan oleh respons imun. Untuk mengetahui pola respons tersebut dapat dilakukan dengan mempelajari sel-sel imun yang dapat dipelajari secara *in vivo* ataupun *in vitro*. Kultur *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), atau yang disebut juga sebagai sel mononuklear darah tepi (SMDT), yang terdiri dari sel limfosit dan monosit, telah banyak digunakan untuk mempelajari respons imunologis dari inang terhadap VHB. Model kultur ini telah banyak digunakan untuk mempelajari limfosit T seperti: induksi proliferasi sel T pada pasien hepatitis B kronis untuk terapi vaksin,^{61,62} asosiasi kegagalan vaksinasi dengan aktivasi sel T,⁶³ pengaruh antigen HLA terhadap respons Th1 dan Th2,⁵⁸ dan respons sitokin pada subjek yang mendapat vaksinasi.^{64,65} Model kultur ini juga dapat digunakan untuk mempelajari sel B seperti: produksi antibodi secara *in vitro*,⁶⁶ dan mempelajari keberadaan sel B memori penghasil anti-HBs setelah vaksinasi.⁶⁷

2.10.1 Kultur SMDT untuk sintesis anti-HBs

Kultur SMDT untuk produksi anti-HBs secara *in vitro* dilakukan dengan memberikan stimulan *Pokeweed Mitogen* (PWM). PWM, yang merupakan lektin yang dipurifikasi dari *Phytolacca americana*, merupakan stimulan yang umum digunakan untuk menstimulasi proliferasi dan sekresi imunoglobulin dari sel B.^{68,69} Mitogen tersebut juga dapat mengaktivasi sel T helper untuk memproduksi sitokin dan mengaktivasi sel *T supressor* yang menghambat sintesis antibodi.^{19,70} PWM bekerja secara poliklonal sehingga akan menginduksi sekresi imunoglobulin dari setiap sel B yang terdapat pada kultur SMDT tersebut. Model kultur ini diperkenalkan oleh Volkman pada tahun 1981 sebagai model untuk aktivasi dan imunoregulasi pada sel B. Dalam perkembangannya, selain menggunakan PWM, untuk induksi terhadap sel limfosit B tersebut juga dapat digunakan antigen spesifik^{66,67,69,71,72} dan virus Epstein-Barr.⁵⁷ Antibodi yang disekresikan di dalam media kultur tersebut dapat diukur dengan berbagai metode

seperti *radioimmunoassay*,⁷³ dan *enzyme linked immunoassay* (ELISA)^{66,67,71} Sel penghasil antibodi juga dapat diukur dengan menggunakan metode *enzyme linked immunospot* (ELISPOT).^{15,71}

Produksi antibodi secara *in vitro* merupakan alat yang efektif dalam mengeksplorasi respons imun humoral. Metode ini telah digunakan pada beberapa penyakit infeksi seperti brucellosis, AIDS, infeksi cytomegalovirus dan hepatitis C. Pada penyakit tersebut produksi antibodi *in vitro* secara spontan oleh SMDT mencerminkan infeksi aktif yang terjadi pada penderitanya dan berpotensi sebagai alat diagnostik.⁶⁶ Pada hepatitis B, metode ini digunakan untuk mempelajari respons imun humoral terhadap HBsAg rekombinan,^{66,69} menghitung jumlah sel B spesifik yang memproduksi anti-HBs pada individu yang merespons dan yang tidak merespons terhadap vaksinasi⁵⁷ dan respons sel memori pada individu yang telah divaksinasi terhadap hepatitis B lebih dari 13 tahun.⁶⁷

2.10.2 Kultur SMDT untuk sintesis sitokin

Kultur SMDT untuk produksi sitokin secara *in vitro* membutuhkan keberadaan sel T dan APC. Sel T yang merupakan mayoritas dari komposisi SMDT merupakan penghasil sitokin utama dalam kultur SMDT secara *in vitro*,⁷⁴ sementara APC, seperti monosit yang terdapat pada SMDT, berfungsi untuk mempresentasikan antigen ke sel T.⁷⁵ Kultur ini menggunakan SMDT yang didapatkan dari individu yang sudah pernah terpajan oleh antigen sebelumnya. SMDT tersebut dapat teraktivasi dan berproliferasi secara *in vitro* apabila distimulasi oleh antigen yang sama. Pada SMDT tersebut dapat terdeteksi keberadaan sitokin yang merupakan produk dari SMDT yang teraktivasi.⁷⁶

Selain menggunakan antigen, kultur SMDT untuk memproduksi sitokin dapat menggunakan fitohemagglutinin (PHA). PHA, merupakan lektin yang didapatkan dari kacang merah (*Phaseous vulgaris*), dapat mengaktivasi proliferasi dari sel T secara poliklonal. Hal ini membuat PHA sering digunakan sebagai kontrol dalam menguji kemampuan proliferasi ataupun produksi sitokin dari sel T secara *in vitro*.^{58,64,65,77}

BAB 3

BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian merupakan penelitian deskriptif eksperimental. Pada penelitian ini dilakukan kultur sel mononuklear darah tepi manusia (SMDT) dari pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang telah mengalami resolusi infeksi. Kultur SMDT tersebut diberi perlakuan yang berbeda untuk memproduksi anti-HBs dan sitokin. Untuk memproduksi anti-HBs, SMDT tersebut diberikan stimulan PWM. PWM yang diberikan akan menginduksi sintesis imunoglobulin dari semua sel B yang terdapat dalam kultur tersebut termasuk sel B pemroduksi anti-HBs.⁶⁸ Selanjutnya anti-HBs dideteksi dari kumpulan imunoglobulin pada kultur tersebut dengan *kit* yang secara spesifik hanya mendeteksi anti-HBs secara kuantitatif (Wantai, China). Untuk memproduksi sitokin, SMDT tersebut diberikan stimulan HBsAg rekombinan (rHBsAg-Biofarma, Indonesia) dan PHA. rHBsAg tersebut akan dipotong-potong menjadi peptida dan dipresentasikan oleh APC ke sel T yang spesifik mengenali antigen tersebut dan mengakibatkan sintesis sitokin dari sel T sebagai respons terhadap antigennya. Sementara itu PHA akan menginduksi semua sel T yang terdapat pada kultur SMDT untuk mensekresikan sitokin. Dari kumpulan sitokin yang disekresikan akibat stimulan HBsAg ataupun PHA, sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada supernatan kultur tersebut dideteksi secara spesifik dengan *kit* Luminex (R&D System, England) yang mendeteksi keberadaan dan jumlah sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2.

Selain kedua kelompok di atas, kelompok vaksinasi juga digunakan dalam penelitian ini. Subjek vaksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah individu sehat yang tidak pernah memiliki riwayat infeksi VHB, tetapi memiliki riwayat vaksinasi hepatitis B dan merespons kuat terhadap vaksinasi tersebut. Respons yang kuat pada subjek vaksinasi ditandai oleh kadar anti-HBs pada serumnya yang lebih dari 100 mIU/mL.⁷⁷ Subjek vaksinasi ini digunakan dalam penelitian ini sebagai kontrol untuk membuktikan bahwa metode yang

digunakan berjalan dengan baik. Penggunaan subjek vaksinasi untuk sintesis sitokin dan anti-HBs secara *in vitro* telah banyak dilaporkan sehingga dapat digunakan sebagai kontrol dalam metode penelitian ini.^{58,64-66,69,77}

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Hepatitis Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, mulai Agustus 2014 sampai dengan Mei 2015.

3.3. Bahan Penelitian

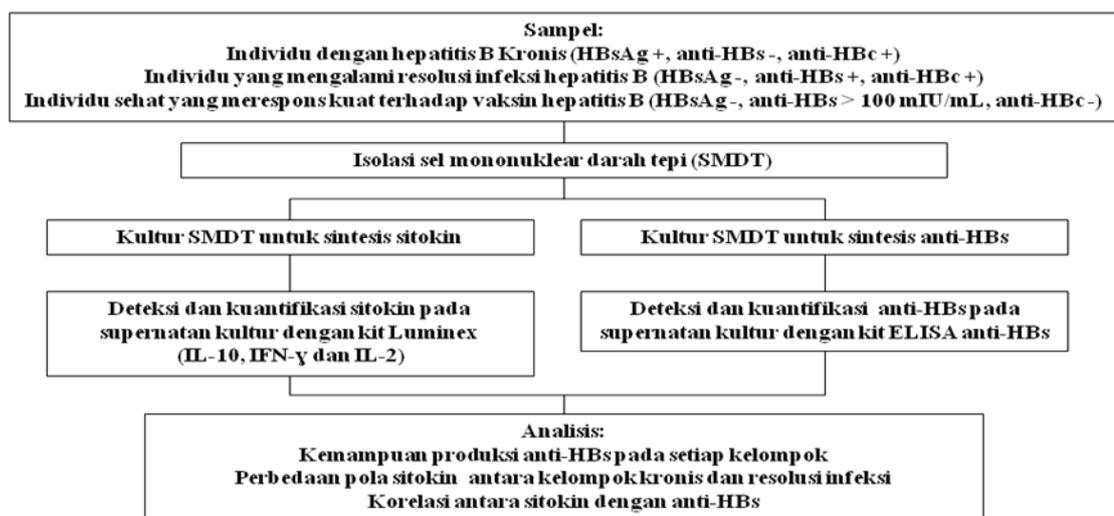
Penelitian ini menggunakan SMDT yang didapatkan dari tiga kategori subjek yaitu: individu dengan infeksi VHB kronis (ditandai dengan HBsAg +, anti-HBs - dan anti-HBc +), individu yang mengalami resolusi infeksi dari infeksi VHB (ditandai dengan HBsAg -, anti-HBs + dan anti-HBc +) dan individu sehat yang merespons terhadap vaksin hepatitis B (ditandai dengan HBsAg -, anti-HBs > 100 mIU/mL dan anti-HBc -).

Dalam menentukan jumlah sampel minimum yang akan digunakan, penelitian ini menggunakan referensi dari Velu *et al.*⁷⁷ Berbeda dengan penelitian ini, penelitian yang dilakukan Velu *et al.* menggunakan kategori individu sehat yang merespons terhadap vaksinasi hepatitis B dan membandingkannya dengan individu yang tidak merespons terhadap vaksinasi hepatitis B dalam melihat pola sitokin yang muncul akibat stimulasi oleh rHBsAg. Referensi tersebut digunakan karena sedikitnya publikasi mengenai pola sitokin dari kultur PBMC pada kelompok pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi terhadap stimulant HBsAg. Pada penelitian ini, kelompok pasien hepatitis B kronis yang diketahui memiliki respons imun yang lemah terhadap infeksi VHB disamakan dengan kelompok individu sehat yang tidak merespons terhadap vaksinasi hepatitis B. Sementara itu, pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi disamakan dengan individu sehat yang merespons terhadap vaksinasi hepatitis B. Berdasarkan hal tersebut dengan menggunakan metode ANOVA dari software GPOWER 3.1, perhitungan jumlah sampel minimum untuk penelitian ini didapatkan 10 subjek untuk setiap kelompok dengan total 30 subjek. Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian

Kesehatan FKUI RSCM yang tertuang dalam surat keputusan tanggal 21 Juli 2014 dan disertai surat keputusan amandemen perubahan protokol tertanggal 9 Februari 2015. (Lampiran 1 dan 2)

3.4. Alur Penelitian

Alur penelitian ini ditampilkan pada gambar 3.1. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah SMDT dari pasien hepatitis B kronis, individu yang mengalami resolusi infeksi dari infeksi hepatitis B, dan individu sehat yang merespons terhadap vaksin hepatitis B. Pada penelitian ini akan dilihat adanya hubungan antara sitokin dengan kronisitas hepatitis B dan produksi anti-HBs, serta melihat kemampuan individu yang terinfeksi hepatitis B kronis dalam memproduksi anti-HBs.



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.5 Isolasi Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia

Sebanyak ± 12 cc darah diambil dari vena kubiti pasien atau relawan dengan *syringe* 10 cc oleh dokter ataupun perawat yang berada di tempat. Sebagian kecil darah tersebut dimasukkan dalam tabung EDTA 0,5 mL untuk dilakukan analisis hematologi rutin, sementara sisanya dimasukkan ke dalam tabung heparin berkapasitas 3 mL. Darah dari tabung heparin tersebut dibagi dengan rata ke dalam dua tabung sentrifus berukuran 15 mL. Selanjutnya ditambahkan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,4 steril sehingga didapatkan dua kali volume awal.

Kedua tabung ditutup dan dibolak-balikkan secara perlahan sampai PBS dan darah tercampur rata. Dua buah tabung sentrifus 15 mL steril baru disiapkan lalu campuran PBS dan darah tersebut dibagi ke dalam tabung baru tersebut sehingga terdapat empat tabung yang memiliki volume campuran PBS dan darah yang sama. Dengan menggunakan teknik *underlayer*, 4,5 mL Ficoll dimasukkan secara perlahan dengan *syringe* yang telah dipasangkan jarum IV Catheter 16G langsung ke bagian dasar dari masing-masing tabung yang berisi campuran PBS dengan darah. Keempat tabung tersebut ditutup lalu disentrifus dengan kecepatan 400 g pada suhu 18 - 20°C selama 35 menit dalam kondisi tanpa rem. Setelah sentrifus akan terbentuk empat bagian pada keempat tabung tersebut. bagian tersebut adalah (dari paling atas tabung): plasma (berwarna agak kuning), sel mononuklear darah tepi manusia (putih berkabut), ficoll (transparan), dan sel darah merah (merah kecokelatan). Dengan menggunakan pipet transfer, sel mononuklear darah tepi manusia (bagian kedua) dari masing-masing tabung pindahkan ke dalam tabung sentrifus 15 mL baru yang steril. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menambahkan PBS sampai 12 mL lalu disentrifus dengan kecepatan 400 g pada suhu 18 – 20°C selama 15 menit dengan kondisi tanpa rem. Supernatan hasil sentrifus dibuang lalu pencucian diulang dua kali. Setelah pencucian terakhir, supernatan hasil sentrifus dibuang lalu ditambahkan 2 mL media kultur yang komposisinya terdiri dari: RPMI-1640 (Gibco, Life technologies, USA) steril yang sudah ditambahkan dengan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (SIGMA-ALDRICH, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco, Life technologies, USA), dan 1% larutan antibiotik dan antimikotik dengan komposisi 10.000 unit/mL penisilin, 10.000 mg/mL streptomisin dan 0,25 µg/mL amfoterisin B (SIGMA-ALDRICH, USA).

3.6 Persiapan Kultur Sel Mononuklear Darah Tepi Manusia

SMDT yang telah diisolasi sebelumnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama satu jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan cara disentrifus pada kecepatan 400 g pada suhu ruangan selama 10 menit dan membuang supernatan hasil sentrifus, kemudian menambahkan kembali 2 mL media kultur. Pencucian dilakukan empat kali sebelum ditambahkan kembali 2

mL media kultur. Hal ini dilakukan untuk mengelusi antibodi yang menempel pada sel. Selanjutnya homogenisasi dilakukan dengan menggunakan pipet transfer sebelum dilakukan penghitungan jumlah dan viabilitas sel menggunakan 0,4 % *tryptan blue* sebagai pewarna dan hemositometer (*Improved Neubauer*). Setelah diketahui jumlah selnya dilakukan pengenceran dengan menggunakan media kultur sehingga didapatkan stok SMDT dengan konsentrasi $\pm 1,875 \times 10^6$ sel/mL.

3.7 Stimulasi SMDT Secara *In Vitro* untuk Sintesis Sitokin

Kultur dilakukan pada 24 *well plate*, dan satu spesimen dikultur pada tiga sumur yang diberikan perlakuan yang berbeda. Sebanyak 800 μ L suspensi sel dengan konsentrasi $\pm 1,875 \times 10^6$ sel/mL dimasukkan ke dalam tiap sumur dengan total lima sumur. Kelima sumur tersebut diberikan tiga perlakuan yang berbeda. Dua sumur diberikan penambahan 200 μ L RPMI-1640 yang didalamnya terdapat 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% antibiotik dan antimikotik dan 50 μ g/mL HBsAg. Dua sumur diberikan penambahan 200 μ L RPMI-1640 yang didalamnya terdapat 10 % FBS, 2 mM L-glutamine, 1% antibiotik dan antimikotik dan 50 μ g/mL PHA. Sebagai kontrol, sumur terakhir diberikan penambahan 200 μ L RPMI-1640 yang di dalamnya terdapat 10 % FBS, 2 mM L-glutamine, 1 % antibiotik dan antimikotik dan tanpa HBsAg ataupun PHA. Konsentrasi sel terakhir untuk setiap sumur adalah adalah $\pm 1,5 \times 10^6$ sel/mL. *Well plate* tersebut selanjutnya diinkubasi dalam kondisi 37°C dan 5% CO₂. Supernatan diambil setelah 72 jam untuk pemeriksaan kadar sitokin dengan sentrifugasi pada kecepatan 1.000 g selama 15 menit. Supernatan dibuat *aliquote* sebanyak 3 tabung untuk masing-masing perlakuan lalu disimpan pada suhu – 80°C.

3.8 Stimulasi Sel SMDT Secara *In Vitro* untuk Sintesis Anti-HBs

Kultur dilakukan pada 24 *well plate* dan satu spesimen dikultur dalam enam sumur yang diberikan perlakuan yang berbeda. Sebanyak 800 μ L suspensi sel dengan konsentrasi $\pm 1,875 \times 10^6$ sel/mL dimasukkan ke dalam tiap sumur dengan total enam sumur. Keenam sumur tersebut dibagi untuk mendapatkan dua perlakuan yang berbeda. Lima sumur akan diberikan penambahan 200 μ L RPMI-1640 yang di dalamnya terdapat 10 % FBS, 2 mM L-glutamine, 1 % antibiotik

dan antimikotik dan 50 µg/mL PWM. Sementara sebagai kontrol, satu sumur akan diberikan penambahan 200 µL RPMI-1640 yang didalamnya terdapat 10 % FBS, 1 % antibiotik dan antimikotik dan tanpa PWM. Konsentrasi sel terakhir untuk setiap sumur adalah adalah $\pm 1,5 \times 10^6$ sel/mL.

Sumur yang tidak diberikan stimulan memiliki fungsi sebagai kontrol untuk menunjukkan bahwa anti-HBs yang terdeteksi pada kultur tersebut bukan kontaminan dari serum subjek, melainkan adalah antibodi yang diproduksi oleh sel B yang terdapat dalam kultur secara *de novo*. Sementara itu lima pengulangan untuk kultur yang distimulasi dengan PWM dilakukan untuk memperbesar kemungkinan didapatkannya sel B spesifik penghasil anti-HBs. Shokrgozar dan Shokri melaporkan, jumlah sel B total pada individu penerima vaksinasi hepatitis B memiliki rerata 15% dari total sel SMDT. Dari jumlah tersebut frekuensi terendah untuk ditemukannya sel B spesifik penghasil anti-HBs adalah 1 : 49.115 sel B total. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini diharapkan dari total 7,5 juta sel SMDT bisa didapatkan minimal 4 sel B spesifik penghasil anti-HBs.⁵⁷

Well plate tersebut selanjutnya diinkubasi dalam kondisi 37°C dan 5% CO₂. Supernatan diambil setelah 12 x 24 jam untuk pemeriksaan kadar anti-HBs setelah sentrifugasi pada kecepatan 1.000 g selama 15 menit. Supernatan dibuat *aliquote* sebanyak 2 tabung untuk masing-masing sumur lalu disimpan pada suhu – 80°C.

3.9 Deteksi Anti-HBs Serum Subjek dan Media Kultur

Deteksi anti-HBs serum pasien dan media kultur dilakukan di Unit Transfusi Darah Pusat Palang Merah Indonesia (UTDP PMI) dengan menggunakan *kit* Wantai Hep.BV (Wantai, kode katalog WB-2896) yang mendeteksi anti-HBs total dengan menggunakan prinsip *sandwich Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) sesuai instruksi pembuat kit. Sebanyak 50 µL serum atau larutan standar dimasukkan ke dalam sumur dari *microwell plate* yang sudah dilapisi dengan rHBsAg dan selanjutnya ditambahkan dengan 50 µL HBsAg yang telah dikonjugasikan dengan enzim *horseradish peroxidase (HRP-Conjugate)*. *Microwell plate* tersebut selanjutnya diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C dengan kondisi tertutup oleh penutup yang telah disediakan pada *kit*. Setelah inkubasi selesai, penutup dari *microwell plate* tersebut dibuang dan begitu juga

larutan yang sebelumnya ditambahkan. Pembuangan larutan tersebut dilakukan dengan cara membalikkan *plate* tersebut. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan menggunakan dapar pencuci yang sudah diencerkan 20X dengan aquades. Pencucian tersebut dilakukan dengan menambahkan 200 μL dapar pencuci yang telah diencerkan ke tiap sumur. Setelah dapar pencuci dimasukkan, *plate* tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit sebelum dapar pencuci dibuang. Proses pencucian ini dilakukan sebanyak empat kali. Pada tahap pencucian terakhir dilakukan *blotting* ke kertas tisu tebal untuk menghilangkan sisa-sisa dapar pencuci. Selanjutnya pada masing-masing sumur tersebut ditambahkan 50 μL larutan kromogen A yang mengandung *urea peroxidase* dan 50 μL larutan kromogen B yang mengandung TMB (*Tetramethyl benzidine*). *Microwell plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 μL larutan penghenti reaksi yang didalamnya terdapat 2 M H_2SO_4 . Pembacaan dilakukan dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm. Sesuai instruksi pembuat, kadar anti-HBs akan dinyatakan sebagai positif apabila hasil perhitungan terhadap sampel memiliki kadar lebih dari 5 mIU/mL. Dalam menentukan anti-HBs dari supernatan kultur *in vitro*, hasil kultur dinyatakan positif apabila ditemukan salah satu dari lima pengulangan kultur SMDT yang distimulasi dengan PWM memiliki kadar lebih dari 5 mIU/mL. Kadar anti-HBs pada supernatan kultur diukur dengan merata-ratakan hasil pengukuran anti-HBs dari kelima pengulangan kultur yang distimulasi dengan PWM.

3.10 Pengukuran Kadar Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 Menggunakan Luminex

Pengukuran kadar sitokin dilakukan di Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Badan Litbangkes). Kadar sitokin dalam supernatan diukur menggunakan *Luminex Polystyrene Screening Assays* (R&D Systems, kode katalog LXS AH) sesuai petunjuk dari pembuat kit. Analit yang terdapat dalam kit adalah mikropartikel polistirene yang diwarnai fluoresensi dan dikonjugasi dengan antibodi monoklonal spesifik untuk protein target. Analit pada kit ini dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi beberapa sitokin secara bersamaan dari

supernatan kultur. Kit ini dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi kadar IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dari sampel tunggal.

Untuk mengkuantifikasi kadar sitokin dalam sampel, *premixed cytokine standard* yang tersedia pada kit direkonstitusi dengan menggunakan dapar yang tersedia dalam kit sehingga menghasilkan konsentrasi standar yang siap untuk diencerkan. Standar tersebut kemudian diencerkan secara berseri dengan faktor pengenceran 3 kali menggunakan dapar yang tersedia sebanyak 6 kali pengenceran. Standar tersebut digunakan dalam setiap pengukuran.

Prosedur *immunoassay* dari luminex melibatkan reaksi pengenceran campuran mikropartikel, campuran antibodi berlabel biotin dan streptavidin-PE dari kit tersebut. Setiap langkah dalam prosedur *immunoassay* Luminex dilakukan dalam kondisi redup cahaya untuk menghindari *photobleaching*. Sebanyak 500 μL mikropartikel diencerkan dengan menggunakan 5 mL diluen RD2-1. Hasil pengenceran tersebut disebar sebanyak 50 μL untuk setiap sumur yang akan digunakan. Selanjutnya 50 μL dari standar yang telah diencerkan sebelumnya ataupun supernatan kultur ditambahkan ke masing-masing sumur dari plat yang telah disediakan. Plat tersebut ditutup dengan penutup berbahan aluminium yang tersedia pada kit dan diinkubasi pada suhu ruang dengan menggunakan *shaker* yang diatur dengan kecepatan 800 rpm. Cairan dibuang terlebih dahulu menggunakan pompa vakum yang akan menyedot cairan melalui pori-pori yang terdapat pada dasar plate. Pencucian dilakukan dengan menambahkan 100 μL dapar pencuci yang telah diencerkan 20X dengan menggunakan air yang telah dideionisasi lalu membuang cairan tersebut dengan menggunakan pompa vakum. Prosedur mencuci ini dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya setiap sumur ditambahkan dengan 50 μL campuran antibodi berlabel biotin yang telah diencerkan dengan diluennya. Sebanyak 500 μL antibodi berlabel biotin diencerkan dengan menggunakan 5 mL diluen RD2-1. Plate tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 800 rpm setelah ditutup dengan sealer terlebih dahulu dan melepas *Luminex Magnetic Plate Separator*. Setelah inkubasi dilakukan pencucian sebanyak tiga kali seperti sebelumnya. Sebanyak 220 μL streptavidin-PE didilusi menggunakan 5,35 mL dapar pencuci. Larutan tersebut dimasukkan sebanyak 50 μL ke masing-

masing *well*. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama setengah jam pada suhu ruang dengan menggunakan shaker pada kecepatan 800 rpm. Setelah tahap ini juga dilakukan pencucian sebanyak tiga kali dengan menggunakan dapar pencuci. Mikropartikel yang terdapat pada sumur diresuspensi dengan menggunakan 100 μ L dapar pencuci dan dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 2 menit dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 800 rpm. Plat kemudian dianalisis menggunakan mesin Luminex.

Di dalam mesin Luminex tersebut, supernatan yang terdapat pada setiap *well* akan diambil satu per satu oleh jarum *probe*. Supernatan yang di dalamnya terdapat mikropartikel yang mengikat sitokin yang diinginkan akan dibawa oleh larutan dapar melalui pipa halus melewati dua sumber sinar laser. Sinar laser pertama akan mengeksitasikan pewarna yang terdapat pada mikropartikel, sementara sinar laser kedua akan mengeksitasikan fluoresens yang terikat pada sitokin yang menempel di mikropartikel. Selanjutnya sebuah detektor optik akan membaca eksitasi dari pewarna mikropartikel dan mengklasifikasikan mikropartikel tersebut, sementara detektor optik lainnya akan membaca fluoresens yang terikat pada sitokin untuk menentukan keberadaan dari sitokin yang diinginkan.

3.11 Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 16. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan uji Mann Whitney U untuk menentukan perbedaan sintesis sitokin terhadap kelompok subjek dan status anti-HBs. Uji Wilcoxon digunakan untuk melihat adanya pengaruh pemberian stimulan HBsAg dan PHA dalam sintesis sitokin. Uji korelasi Spearman digunakan untuk melihat adanya korelasi antara kadar anti-HBs dari serum subjek dengan kadar anti-HBs dari supernatan kultur dan korelasi antara sitokin dengan kadar anti-HBs dari supernatan kultur. Uji Chi square digunakan untuk melihat adanya hubungan antara status kronis dengan umur, status kronis dengan jenis kelamin dan status kronis dengan sintesis anti-HBs *in vitro*.

BAB 4 HASIL

4.1. Subjek Penelitian dan Data Demografi

Subjek dalam penelitian ini terdiri dari 10 pasien hepatitis B kronis (kronis), 10 pasien yang mengalami resolusi infeksi dari hepatitis B (resolusi infeksi) dan 10 individu sehat yang berhasil divaksinasi (vaksinasi); komposisi perbandingan jenis kelamin pria dengan wanita berturut-turut adalah 5/5, 6/4 dan 2/8, dengan rerata umur berturut-turut $35,5 \pm 11$, 43 ± 10 dan $25,3 \pm 2,5$ tahun (Tabel 4.1). Mengingat kelompok vaksinasi merupakan kelompok kontrol untuk metode penelitian yang digunakan, uji statistik hanya dilakukan terhadap kelompok pasien hepatitis B kronis dan pasien yang mengalami resolusi infeksi hepatitis B. Semua pasien hepatitis B kronis telah diketahui terdeteksi HBsAg dan anti-HBs negatif, demikian pula pada pasien resolusi infeksi adalah HBsAg negatif dan anti-HBs positif.

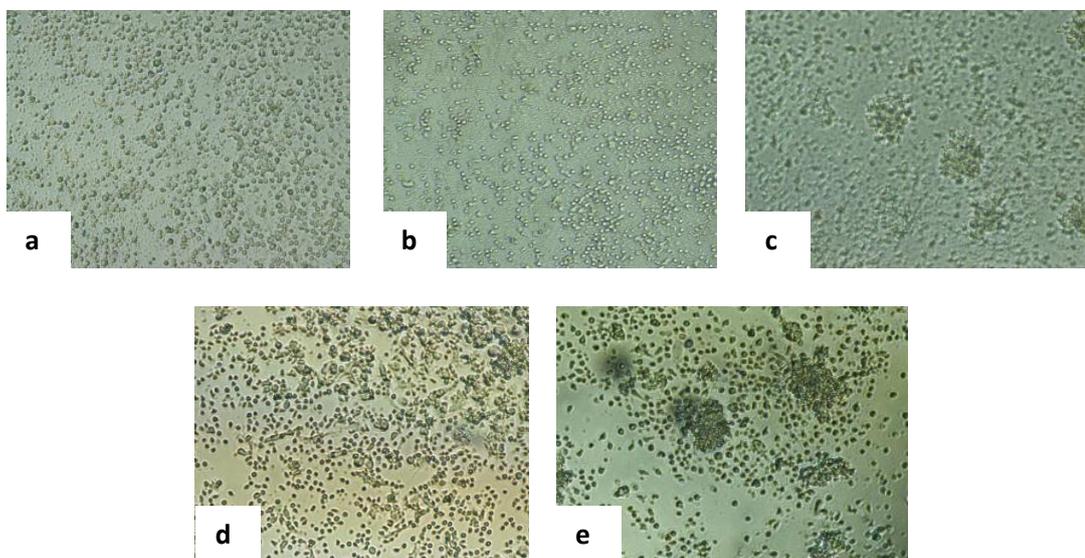
Tabel 4.1. Subjek penelitian dan data demografi.

	Kronis (n = 10)	Resolusi Infeksi (n = 10)	Vaksinasi (n = 10)	<i>p-value</i> (Kronis vs Resolusi Infeksi)
Jenis kelamin (n, pria/wanita)	5/5	6/4	2/8	1,000 ^a
Umur (tahun, mean \pm SD)	$35,5 \pm 11$	43 ± 10	$25,3 \pm 2,5$	0,160 ^b
Kadar anti-HBs <i>in vivo</i> (mIU/mL, mean \pm SD)	< 5	$163,35 \pm$ 74,29	$219,18 \pm$ 30,93	0,001^b

^a = uji Chi Square; ^b = uji Mann Whitney

Pada kelompok kronis dan resolusi infeksi tidak ditemukan perbedaan dan hubungan yang bermakna antara umur dan jenis kelamin. Hal ini menunjukkan bahwa faktor umur dan jenis kelamin dari kedua kelompok tersebut tidak mengakibatkan bias terhadap analisis yang dilakukan. Antara kelompok kronis dan resolusi infeksi dapat ditemukan perbedaan yang bermakna pada kadar anti-HBs *in vivo* yang ditunjukkan dengan *p-value* dari uji Mann Whitney yang kurang dari 0,05

4.2. Pengamatan Kultur SMDT



Gambar 4.1. Pengamatan kultur sel SMDT dengan menggunakan mikroskop *inverted* (*Nikon Eclipse Ti*) dengan perbesaran 100 x, (a) sel ditumbuhkan tanpa stimulan selama 3 x 24 jam, (b) sel ditumbuhkan dengan stimulan 10 $\mu\text{g/mL}$ HBsAg selama 3 x 24 jam, (c) sel ditumbuhkan dengan stimulan 10 $\mu\text{g/mL}$ PHA selama 3 x 24 jam, (d) sel ditumbuhkan tanpa stimulan selama 12 x 24 jam, (e) sel ditumbuhkan dengan stimulan 10 $\mu\text{g/mL}$ PWM selama 12 x 24 jam.

Hasil pengamatan terhadap kultur SMDT 3 x 24 jam dan 12 x 24 jam dengan menggunakan mikroskop *inverted* (*Nikon Eclipse Ti*) dengan perbesaran 100 X menunjukkan terbentuknya suatu agregat sel pada SMDT yang diberikan stimulan PHA dan PWM. SMDT yang ditumbuhkan tanpa stimulan menunjukkan sel dalam keadaan monodispersi dan tidak memiliki perbedaan terhadap sel yang diberikan stimulan HBsAg (Gambar 4.1). Pengamatan ini ditemukan pada

kelompok individu sehat yang berhasil divaksinasi, kelompok pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan kelompok pasien hepatitis B kronis.

4.3. Kadar Anti-HBs *In Vitro* dari Kultur SMDT Setiap Kelompok Subjek

Pada kelompok vaksinasi dapat ditemukan 70% subjek yang mampu mensintesis anti-HBs secara *in vitro* menggunakan stimulan PWM, sementara pada kultur yang tidak diberikan stimulan tidak ditemukan sintesis anti-HBs (Tabel 4.2). Sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada SMDT yang berasal dari pasien kronis, sementara 40% subjek dari kelompok resolusi infeksi mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dengan rerata $5,83 \pm 10,39$ mIU/mL. Hasil analisis statistik dengan menggunakan metode chi-square dan Mann Whitney pada kelompok kronis dan resolusi infeksi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara keduanya dalam sintesis anti-HBs secara *in vitro*.

Tabel 4.2. Kadar anti-HBs secara *in vitro* dari kultur SMDT setiap kelompok subjek.

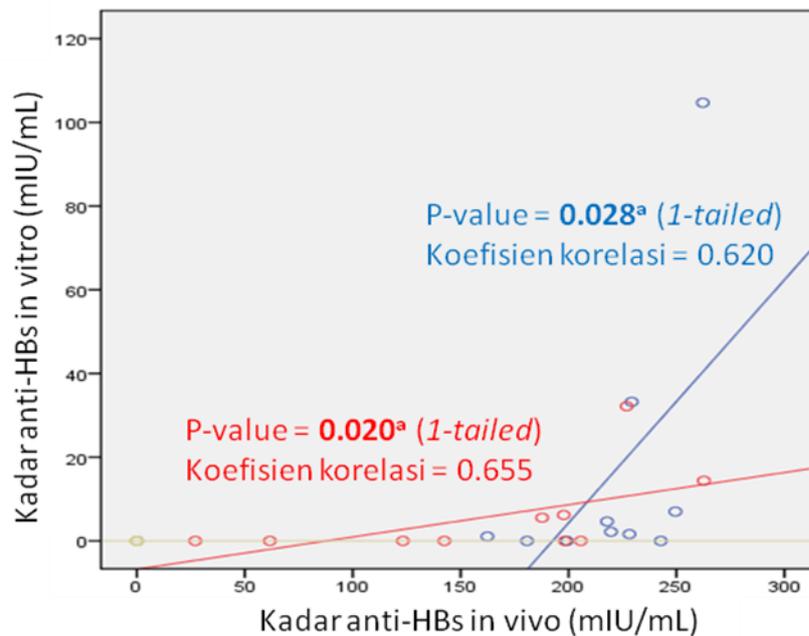
	Kronis (n = 10)	Resolusi Infeksi (n = 10)	Vaksinasi (n = 10)	<i>p-value</i> (Kronis vs Resolusi Infeksi)
Anti-HBs positif <i>in vitro</i> (n)	0/10	4/10	7/10	0,043^a
Kadar anti-HBs <i>in vitro</i> kontrol (mIU/mL, mean \pm SD)	< 5	< 5	< 5	-
Kadar anti-HBs <i>in vitro</i> PWM (mIU/mL, mean \pm SD)	< 5	5,83 \pm 10,39	15,44 \pm 32,93	0,031^b

^a = uji Chi Square; ^b = uji Mann Whitney; - = tidak dilakukan uji statistik.

4.4. Analisis Korelasi antara Anti-HBs *In Vivo* dan Anti-HBs *In Vitro*.

Korelasi antara anti-HBs *in vivo* dan *in vitro* dilakukan dengan membandingkan data kadar anti-HBs yang dideteksi dari serum masing-masing subjek dengan data rerata kadar anti-HBs yang dideteksi dari supernatan kelima perulangan kultur SMDT yang diberikan PWM. Analisis korelasi dilakukan dengan menggunakan metode Spearman dan menunjukkan korelasi yang signifikan untuk kadar anti-HBs *in vivo* dengan *in vitro* pada kelompok vaksinasi

(Gambar 4.2). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar anti-HBs pada darah subjek vaksinasi, semakin tinggi kemungkinan untuk mendapatkan anti-HBs dengan kadar tinggi pada kultur SMDT yang diberikan stimulan PWM.



Gambar 4.2. Korelasi antara kadar anti-HBs *in vitro* dan *in vivo* pada kelompok vaksinasi ($n = 10$), resolusi infeksi ($n = 10$) dan kronis ($n = 10$). (^a = uji korelasi Spearman). \circ = vaksinasi, \circ = resolusi infeksi, \circ = kronis, --- = kelompok vaksinasi, --- = kelompok resolusi infeksi, --- = kelompok kronis.

Analisis korelasi yang serupa juga dilakukan pada data yang berasal dari kelompok kronis dan resolusi infeksi. Sama seperti analisis kelompok vaksinasi, kelompok resolusi infeksi juga memiliki korelasi yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar anti-HBs yang terdapat pada serum subjek dari kelompok resolusi infeksi maka semakin tinggi kemungkinan untuk didapatkan kadar anti-HBs yang tinggi pada kultur SMDT yang distimulasi dengan PWM. Sementara itu pada kelompok kronis tidak dapat dilakukan analisis korelasi anti-HBs *in vivo* dengan *in vitro* karena pada kelompok tersebut tidak ditemukan kultur SMDT yang mensintesis anti-HBs. Pada Gambar 4.2 terlihat seluruh subjek dari kelompok kronis berkelompok pada daerah yang menghasilkan anti-HBs *in vivo* dan *in vitro* yang rendah.

4.5. Kadar Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada Kultur SMDT

Polystyrene Luminex Screening Assay (R&D Biosystem) digunakan untuk menentukan kadar sitokin (IL-2, IL-10 dan IFN-gamma) dari kultur SMDT setiap subjek yang tidak diberikan stimulan, diberikan stimulan rHBsAg ataupun PHA. Analisis yang dilakukan menghasilkan data *Median Fluorescent Intensity* (MFI) untuk ketiga analit yang diuji. Peningkatan angka MFI pada sampel akan menunjukkan peningkatan kadar analit. Selanjutnya data MFI tersebut dikonversikan dengan menggunakan analisis *weighted 5-parameter logistic* untuk menghasilkan kadar sitokin dalam sampel sebagai konsentrasi dalam pg/mL. Pengukuran hasil sitokin dari ketiga kelompok subjek tersebut menunjukkan bahwa SMDT mampu menghasilkan ketiga sitokin tersebut dengan kadar yang berbeda-beda untuk setiap perlakuan.

Untuk melihat pengaruh dari PHA dan rHBsAg dalam sintesis sitokin dilakukan uji dua sampel berhubungan dengan menggunakan metode Wilcoxon dan untuk melihat perbedaan kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 antara kelompok kronis dan resolusi infeksi dilakukan uji Mann Whitney. Analisis untuk kelompok vaksinasi dilakukan terpisah dari kelompok lainnya.

4.5.1. Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok vaksinasi.

Pemberian rHBsAg dan PHA pada SMDT yang didapatkan dari kelompok vaksinasi dapat meningkatkan sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 secara signifikan. Kadar tertinggi sitokin didapatkan pada perlakuan PHA sementara kadar terendah didapatkan pada perlakuan tanpa stimulan (kontrol). Sementara sintesis sitokin tertinggi adalah IL-2 dan sintesis sitokin terendah adalah IFN-gamma (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok vaksinasi (n = 10).

	pg/mL (median, min-max)			Wilcoxon <i>p-value</i>	
	kontrol	rHBsAg	PHA	kontrol vs rHBsAg	kontrol vs PHA
IL-10	13,1 (10,9 – 22,3)	18,1 (13,6 – 57,5)	1490,2 (418,2 – 4269,7)	0,005**	0,008**
IFN- gamma	6,3 (5,9 – 9,6)	7,5 (6,1 – 58,4)	737 (520,5 – 856,2)	0,022*	0,008**
IL-2	32 (14,8 – 106)	190,3 (35 – 1767)	4750,7 (26,9 – 14770,1)	0,005**	0,012*

* berbeda bermakna

** sangat berbeda bermakna

4.5.2. Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok kronis dan resolusi infeksi

Pemberian HBsAg pada kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi menunjukkan kenaikan kadar IL-10 yang bermakna (Uji Wilcoxon). Sementara itu, tidak ditemukan adanya kenaikan yang signifikan pada sitokin IFN-gamma dan IL-2 akibat pemberian HBsAg pada kedua kelompok tersebut. Akan tetapi pada Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa sintesis sitokin IFN-gamma pada kelompok resolusi infeksi memiliki kecenderungan untuk meningkat bila dibandingkan dengan kelompok kronis. Hal ini nampak dari nilai *p-value* uji Wilcoxon pada kelompok resolusi infeksi yang mencapai 0,092, sementara pada kelompok kronis hanya mencapai 0,192.

Pemberian PHA dapat meningkatkan sekresi ketiga sitokin tersebut pada kelompok kronis maupun kelompok resolusi infeksi. Hal ini dapat dilihat pada nilai *p-value* dari uji Wilcoxon yang kurang dari 0,05 pada kedua kelompok tersebut untuk ketiga sitokin yang diuji. Uji Mann Whitney yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 di antara kedua kelompok tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang

bermakna pada kadar sitokin dari kultur yang tidak diberikan stimulan, kultur yang diberikan stimulan HBsAg dan kultur yang diberikan stimulan PHA (Tabel 4.4).

Tabel 4.4. Kadar sitokin IL10, IFN-gamma dan IL-2 pada berbagai perlakuan terhadap kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi.

		pg/mL (median, min-max)			Wilcoxon <i>p-value</i>	
		kontrol	rHBsAg	PHA	kontrol vs rHBsAg	kontrol vs PHA
Kronis (n = 10)	IL-10	12 (10,8 – 17,3)	13,1 (11,6 – 28,3)	343,5 (16,2 – 4055,7)	0,047*	0,005**
	IFN-gamma	6,5 (5,9 – 8,4)	6,6 (6,1 – 141,6)	591,3 (7,2 – 755,9)	0,192	0,007**
	IL-2	41,4 (17,5 – 134,8)	34 (26,9 – 398,8)	1654 (47,4 – 8050)	0,441	0,005**
Resolusi Infeksi (n = 10)	IL-10	13,1 (10,4 – 21,9)	15,4 (11,3 – 31,5)	249,6 (10,8 – 3188)	0,022*	0,005**
	IFN-gamma	6,2 (5,9 – 6,8)	6,5 (5,9 – 14,6)	659 (7 – 950,9)	0,092	0,005**
	IL-2	40,5 (17,5 – 68,9)	39,6 (17,5 – 163,1)	2442,7 (22,4 – 8050)	0,646	0,017*
		Mann Whitney <i>p-value</i> (kronis vs resolusi infeksi)				
	IL-10	0,750	0,326	0,880		
	IFN-gamma	0,170	0,398	0,545		
	IL-2	0,677	0,791	0,879		

* berbeda bermakna; ** sangat berbeda bermakna

4.6. Hubungan antara Anti-HBs *In Vitro* dengan Respons Sitokin oleh Stimulan rHBsAg.

Tabel 4.5. Perbandingan rasio sitokin (rHBsAg/kontrol) terhadap status anti-HBs *in vitro*. (n = 30)

	Rasio rHBsAg/kontrol (median, min - max)		<i>p-value</i> (Mann Whitney U)
	anti-HBs + (n = 11)	anti HBs – (n = 19)	
IL-10	1,17 (1,01 – 4,51)	1,19 (0,74 – 2,47)	0,683
IFN-gamma	1,16 (0,96 – 9,19)	1,03 (0,83 – 21,92)	0,081
IL-2	2,37 (0,83 – 71, 56)	1,33 (0,3 – 4,16)	0,033*

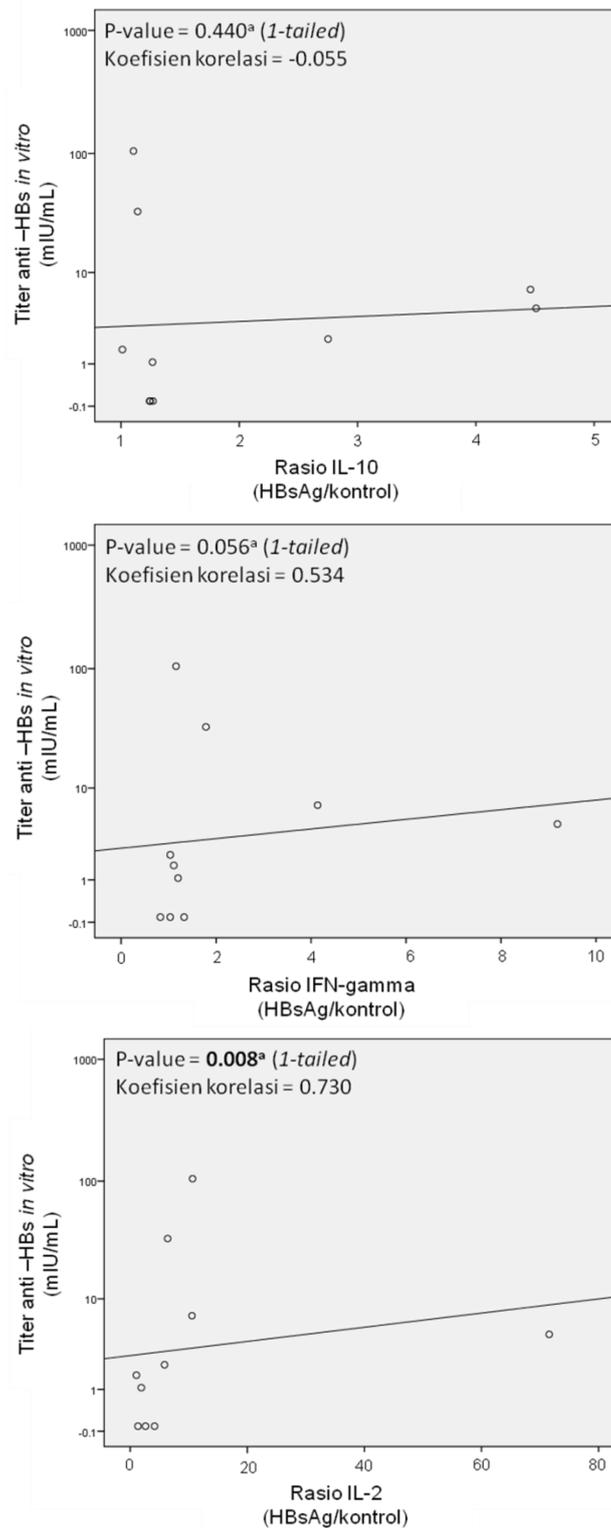
* berbeda bermakna

Analisis rasio sitokin akibat stimulasi oleh HBsAg dengan kemampuan kultur SMDT dalam mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 4.5. Rasio sitokin didapatkan dengan membandingkan kadar sitokin pada kultur yang distimulasi oleh rHBsAg dengan kultur yang tidak diberikan stimulant (rasio rHBsAg/kontrol). Rasio sitokin digunakan dalam analisis ini sebagai penanda kuat respons sitokin dari kultur yang digunakan terhadap rHBsAg. Seluruh subjek (n = 30) digunakan dalam analisis tanpa memperdulikan kelompok vaksinasi, resolusi infeksi ataupun kronis untuk memberikan gambaran secara keseluruhan mengenai pengaruh respons sitokin terhadap rHBsAg dengan kemampuan sintesis anti-HBs. Pada Tabel 4.5 dapat dilihat adanya perbedaan yang bermakna dalam kemampuan respons sitokin IL-2 terhadap HBsAg antara kultur yang dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dengan yang tidak. Sementara kemampuan respons IFN-gamma juga memiliki kecenderungan untuk berbeda bermakna di antara kedua kelompok tersebut. Hal ini dapat dilihat dari nilai *p-value* dari uji Mann Whitney yang mencapai 0,081.

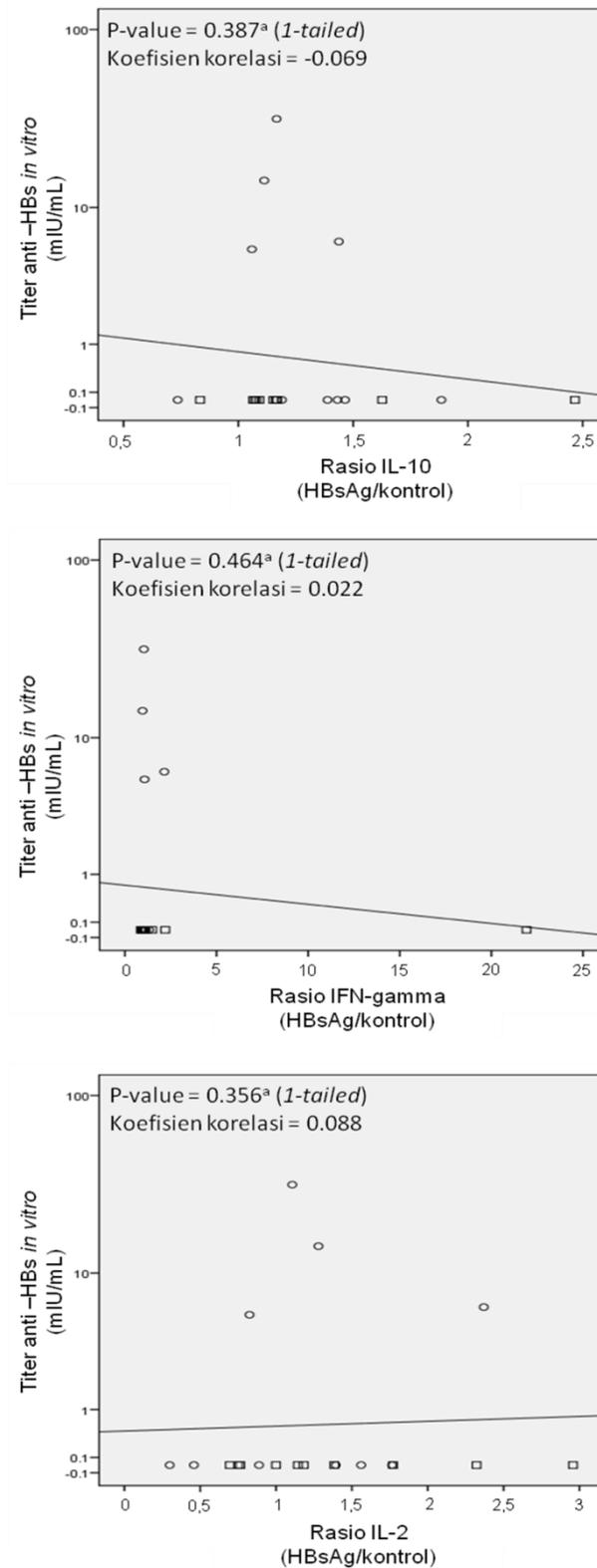
Untuk melihat apakah ada pengaruh dari status kelompok (vaksinasi, resolusi infeksi dan kronis) dalam hubungan antara sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan anti-HBs *in vitro*, dilakukan analisis korelasi secara terpisah (Gambar 4.3 dan 4.4). Analisis kelompok kronis dan resolusi infeksi (n = 20) dilakukan

terpisah dengan kelompok vaksinasi ($n = 10$) yang merupakan kelompok kontrol. Korelasi dilakukan dengan menggunakan uji Spearman (*1-tailed*) dan dilakukan terhadap kadar anti-HBs *in vitro* dengan rasio kadar sitokin antara kultur yang diberikan stimulan rHBsAg dengan kadar sitokin pada kultur yang tidak diberikan stimulan.

Pada kelompok vaksinasi dapat ditemukan korelasi antara rasio IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa respons SMDT terhadap rHBsAg mempengaruhi sintesis anti-HBs *in vitro*. Semakin kuat respons IL-2 maka akan semakin tinggi kadar anti-HBs yang dihasilkan. Korelasi antara sitokin IL-10 dan IFN-gamma dengan kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi tidak signifikan pada penelitian ini. Akan tetapi antara rasio IFN-gamma dengan kadar anti-HBs secara *in vitro* memiliki kecenderungan untuk berkorelasi. Hal ini ditunjukkan dengan *p-value* yang mencapai 0,056 (Gambar 4.3). Sementara itu, pada kelompok kronis dan resolusi infeksi tidak ditemukan adanya korelasi yang bermakna antara rasio sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* (Gambar 4.4).



Gambar 4.3. Korelasi rasio sitokin (a) IL-10, (b) IFN-gamma dan (c) IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi ($n = 10$, ^a = uji korelasi Spearman)



Gambar 4.4. Korelasi rasio sitokin (a) IL-10, (b) IFN-gamma dan (c) IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok kronis dan resolusi infeksi ($n = 20$, ^a = uji korelasi Spearman). ○ = resolusi infeksi, □ = kronis.

BAB 5

PEMBAHASAN

Indonesia tergolong dalam negara yang memiliki endemisitas hepatitis B menengah sampai tinggi dengan tingkat prevalensi HBsAg yang mencapai 2,5–10%.⁷⁸ Pada infeksi VHB yang terjadi pada orang dewasa umumnya dapat terjadi resolusi infeksi dan terdeteksi keberadaan anti-HBs dalam darahnya, akan tetapi 5–10% individu dewasa yang terinfeksi tersebut dapat mengalami persistensi infeksi VHB sehingga menjadi infeksi hepatitis B kronis.¹ Pada individu yang mengalami infeksi hepatitis B kronis tidak ditemukan adanya anti-HBs dalam darahnya. Tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dapat disebabkan oleh adanya disfungsi sistem imun sehingga tidak terjadi sintesis anti-HBs atau antibodi disintesis tetapi membentuk kompleks imun dengan HBsAg ataupun virion VHB yang berada dalam jumlah yang sangat banyak sehingga keberadaannya tersembunyikan.^{6,9,10} Untuk mengetahui kedua kemungkinan tersebut dilakukan studi imunologi untuk mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs yang memiliki peranan dalam eliminasi dan netralisasi virion VHB yang bersirkulasi dalam darah. Selain itu, penelitian ini juga melihat pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada penderita yang mengalami kronisitas hepatitis B dibandingkan dengan pasien yang mengalami resolusi infeksi beserta pengaruh pola sitokin tersebut terhadap sintesis anti-HBs secara *in vitro*. Penelitian ini dapat memberikan informasi terhadap kemampuan sintesis anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dalam mengembangkan suatu terapi untuk meningkatkan atau memicu produksi anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis ke tahap kuratif.

Dalam usaha untuk mencapai maksud di atas telah dilakukan kultur SMDT secara *in vitro* yang berasal dari pasien hepatitis B kronis, pasien hepatitis B yang telah mengalami resolusi infeksi dan individu sehat yang telah berhasil divaksinasi. Metode yang dilakukan dapat memberikan informasi dalam menjawab tujuan penelitian ini.

Kultur SMDT dengan berbagai stimulan merupakan metode yang sering digunakan dalam mempelajari respons imun. Umumnya kultur SMDT dilakukan untuk mempelajari respons sel T dimana dalam kultur SMDT juga didapatkan sel-sel lain seperti monosit dan sel B yang dapat berperan sebagai APC. Pada SMDT juga dapat ditemukan keberadaan sel B sehingga kultur SMDT juga dapat digunakan untuk mempelajari sel B terutama dalam sintesis antibodi.⁷³ Hal ini juga didukung oleh adanya laporan mengenai komposisi dari suspensi SMDT yang terdiri dari $74,4 \pm 2,0\%$ sel limfosit T ($48,1 \pm 4,1\%$ CD4+ dan $19 \pm 2,9\%$ CD8+), $7,5 \pm 1,2\%$ sel limfosit B, $16,1 \pm 1,9\%$ sel NK, dan $2,3 \pm 0,4\%$ sel monosit.⁷⁴ Metode kultur SMDT ini juga telah digunakan untuk mempelajari sintesis sitokin^{58,64,65,77} dan anti-HBs.^{66,67,73}

5.1. Sintesis Anti-HBs *In Vitro* tidak Ditemukan pada Pasien Hepatitis B Kronis

Pada penelitian ini tidak ditemukan sintesis anti-HBs secara *in vitro* pada pasien hepatitis B kronis. Sebagai pembanding untuk membuktikan hal tersebut, dalam penelitian ini digunakan kultur SMDT yang berasal dari pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi yang ternyata dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro*.

Kultur SMDT dari pasien hepatitis B kronis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kultur SMDT yang masih hidup dan dapat merespons terhadap stimulan. Hal itu dapat dilihat dari terbentuknya agregat sel pada semua kultur yang didapatkan dari masing-masing kelompok yang diberikan stimulan PHA dan PWM. Agregat tersebut merupakan sel limfosit yang teraktivasi. PHA merupakan mitogen yang khusus menstimulasi sel limfosit T untuk bermitosis. Sementara PWM, selain dapat menstimulasi sel limfosit T, juga dapat memicu aktivasi dan proliferasi dari sel limfosit B.⁷⁹ Sel SMDT tersebut berproliferasi sehingga membentuk klaster sel yaitu sel-sel yang berasal dari progenitor yang sama.^{72,80} Terbentuknya klaster sel pada kultur SMDT tersebut menunjukkan bahwa sel yang digunakan masih hidup dan dapat merespons terhadap mitogen yang digunakan.

Selain kelompok pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi yang digunakan sebagai pembanding terhadap pasien hepatitis B kronis, dalam penelitian ini juga digunakan kultur SMDT yang berasal dari individu sehat yang berhasil divaksinasi untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan berjalan dengan baik. Dalam memilih subjek dari kelompok vaksinasi, tidak semua individu sehat yang mendapatkan vaksinasi hepatitis B dapat digunakan. Hal ini dikarenakan pada individu sehat yang mendapatkan vaksinasi tersebut terdapat 4-10% individu yang tidak merespons terhadap vaksinasi yang ditandai dengan kadar anti-HBs kurang dari 10 mIU/mL pada darah individu tersebut meskipun telah menerima tiga kali vaksinasi hepatitis B.⁶³ Subjek yang digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini adalah individu yang merespons kuat terhadap vaksinasi hepatitis B. Hal tersebut ditandai dengan keberadaan kadar anti-HBs pada serum yang lebih dari 100 mIU/mL.⁷⁷

Sintesis anti-HBs secara *in vitro* membutuhkan keberadaan sel B spesifik penghasil anti-HBs dan stimulan yang dapat mengaktivasi sel tersebut. Stimulan yang dapat digunakan adalah stimulan non-spesifik, seperti PWM ataupun virus Epstein Barr, ataupun antigen yang bersifat spesifik.^{57,66,67,69,71-73}

PWM merupakan mitogen untuk sel B yang bersifat poliklonal dan mitogen yang paling umum digunakan untuk mempelajari sekresi imunoglobulin.⁶⁸ Penggunaannya dalam penelitian ini akan mengaktivasi seluruh sel B yang terdapat pada kultur SMDT. Aktivasi dari setiap sel B tersebut akan memicu proliferasi dan sintesis antibodi dari setiap sel B secara keseluruhan sehingga terjadi kenaikan kadar imunoglobulin total pada kultur SMDT tersebut.^{18,69} Selanjutnya keberadaan anti-HBs dapat dideteksi pada supernatan dari kultur dengan menggunakan metode ELISA yang spesifik mengenali anti-HBs.

Penggunaan HBsAg juga telah dilaporkan dalam menstimulasi sel B spesifik penghasil anti-HBs secara *in vitro*.^{66,69} Akan tetapi dalam penelitian pendahuluan yang dilakukan, penggunaan HBsAg dalam sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak memicu sintesis anti-HBs (data tidak ditampilkan). Hal ini dapat disebabkan oleh keberadaan sel immunosupresif, seperti sel NK dan monosit yang dapat menekan aktivasi sel B oleh antigen spesifik. Penggunaan LLME dapat mensensitivasi

SMDT yang digunakan untuk sintesis anti-HBs *in vitro* dengan cara mengeliminasi sel immunosupresif tersebut.⁸⁰

Kemampuan kelompok kronis dalam memproduksi antibodi telah dilaporkan oleh Dusheiko *et al.* dan Barnaba *et al.* Pada kedua penelitian tersebut kemampuan hepatitis B kronis dalam memproduksi imunoglobulin juga telah ditunjukkan dengan meningkatnya kadar imunoglobulin total pada kultur SMDT dari pasien hepatitis B kronis yang distimulasi oleh PWM dan tidak adanya perbedaan kadar imunoglobulin total antara subjek sehat dan kronis.^{18,19} Selain itu, kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam memproduksi antibodi juga dapat dilihat dari keberadaan anti-HBc dan anti-HBe pada kasus hepatitis B kronis, adanya kompleks imun antara anti-HBs dengan HBsAg pada pasien hepatitis B kronis⁹ dan anti-HBs pada kasus infeksi hepatitis B mutan yang dapat lolos dari anti-HBs.¹⁷ Hal ini menunjukkan bahwa pada pasien hepatitis B kronis tidak memiliki masalah disfungsi sel B secara umum melainkan lebih disebabkan oleh hal yang spesifik.

Tidak terambilnya sel B spesifik penghasil anti-HBs sewaktu tahap pengambilan darah pada awal isolasi SMDT dapat mengakibatkan gagalnya sintesis anti-HBs *in vitro*. Shokrgozar dan Shokri melaporkan bahwa frekuensi sel B penghasil anti-HBs pada kultur SMDT dari individu yang sehat yang merespons kuat terhadap vaksin memiliki kisaran dari 1 sel B spesifik/387 sel B total sampai 1 sel B spesifik/44.460 sel B total.⁵⁷ Hal tersebut menunjukkan tingginya variasi dari keberadaan sel B spesifik penghasil anti-HBs meskipun individu tersebut merespons kuat terhadap vaksinasi. Tingginya variasi tersebut juga menjadi alasan mengapa dalam penelitian ini SMDT yang didapatkan dari masing-masing kelompok dinyatakan dapat menghasilkan anti-HBs *in vitro* apabila salah satu dari kelima pengulangan kultur untuk mensintesis anti-HBs *in vitro* tersebut dapat menghasilkan anti-HBs.

Sementara itu, frekuensi sel B spesifik penghasil anti-HBs yang rendah pada kelompok pasien hepatitis B kronis juga dilaporkan oleh Bocher *et al.* yang hanya mencapai rerata $3,7 \pm 1,2$ sel penghasil anti-HBs untuk setiap 10^6 sel SMDT (data dari 7 subjek pasien kronis) dibandingkan dengan pasien hepatitis B akut yang memiliki rerata 168 ± 46 sel penghasil anti-HBs untuk setiap 10^6 sel SMDT (data

dari 6 pasien akut).¹⁵ Tingginya variasi keberadaan sel B dan rendahnya frekuensi sel B spesifik penghasil anti-HBs ini dapat mengakibatkan tidak terambilnya sel B tersebut dari darah subjek kronis pada tahap awal sebelum isolasi SMDT dilakukan.

5.2. Pasien Hepatitis B Kronis tidak Memiliki Perbedaan Pola Sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 Dibandingkan dengan yang Mengalami Resolusi Infeksi

Respons sel T *helper* dan sel T sitotoksik yang kuat pada pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan lemah pada pasien yang mengalami persistensi infeksi VHB telah banyak dilaporkan.^{21,81-84} Akan tetapi, respons yang kuat tersebut lebih diasosiasikan terhadap HBcAg dan HBeAg dari VHB.⁸¹⁻⁸⁵ Respons terhadap HBsAg pada kelompok pasien hepatitis B kronis dan kelompok resolusi infeksi juga telah dilaporkan. Akan tetapi pengukuran yang dilaporkan lebih mengarah pada analisis proliferasi sel SMDT terhadap stimulan yang digunakan. Bocher telah melaporkan bahwa pada kelompok kronis hanya mencapai *stimulation index* (SI) $0,9 \pm 0,1$ sementara pada kelompok resolusi infeksi dapat mencapai SI $2,0 \pm 1,4$ dalam merespons terhadap stimulan rHBsAg.⁷¹ Sedikit sekali informasi mengenai respons sitokin terhadap rHBsAg pada pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi.

Pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 di antara pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi. Sama seperti sebelumnya, individu sehat yang berhasil divaksinasi dan merespons kuat digunakan dalam penelitian ini untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan berjalan dengan baik untuk sintesis IL-10, IFN-gamma dan IL-2. Hal ini dikarenakan SMDT dari individu yang gagal divaksinasi telah dilaporkan cenderung mensintesis sitokin lebih rendah daripada individu yang merespons kuat terhadap vaksinasi.^{65,77}

Seperti yang telah diutarakan sebelumnya bahwa respons terhadap rHBsAg dapat terlihat pada kenaikan IL-10 pada kelompok resolusi infeksi dan kronis. IL-10 merupakan sitokin yang berperan dalam regulasi respons inflamasi. Sitokin

tersebut, selain disekresikan oleh sel Th2 juga diketahui diproduksi oleh makrofag, sel T regulator dan sel limfosit B. IL-10 telah ditunjukkan dapat menghambat respons imun seperti presentasi antigen, produksi sitokin dan aktivasi makrofag.²⁶ Dalam menghambat produksi sitokin, sitokin ini bekerja dengan menghambat diferensiasi Th1 dengan menurunkan produksi sitokin yang berhubungan dengan Th1 seperti IL-12 dan IFN-gamma dan cenderung mengarahkan respons imun menjadi Th2 dengan meningkatkan kadar sitokin IL-4, IL-5 dan IL-13.¹³ IL-10 selain berperan dalam mengarahkan diferensiasi sel T helper menjadi sel Th2 juga memiliki peran dalam aktivasi dan proliferasi dari sel B.^{13,72,86,87}

Pada penelitian ini, pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi cenderung untuk mensintesis sitokin IFN-gamma oleh stimulan rHBsAg lebih kuat jika dibandingkan dengan kelompok kronis. IFN-gamma, sitokin yang dapat dihasilkan oleh sel Th1, CD8+ dan sel NK, merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam mengaktivasi makrofag untuk memfagositosis mikroba, memicu diferensiasi sel CD4+ naif menjadi Th1 dan menghambat diferensiasi sel Th2, memicu sel B untuk mengubah sintesis Ig menjadi IgG2 dan menstimulasi ekspresi molekul MHC kelas I dan II pada APC.¹³ Sitokin ini juga telah dilaporkan memiliki kemampuan dalam menghambat replikasi VHB tanpa memicu terjadinya lisis sel hepatosit dan menurunkan ekspresi dari protein-protein VHB.^{54,88} Tingginya respons dalam mensintesis IFN-gamma pada kelompok yang telah mengalami resolusi infeksi sudah banyak dilaporkan. Kurangnya jumlah subjek penelitian dapat menyebabkan analisis statistik dalam penelitian ini menjadi tidak signifikan.

Pada individu dengan resolusi infeksi VHB umumnya dapat ditemukan respons CD4 dan CD8 yang multispesifik dan kuat disertai keberadaan sitokin-sitokin Th1 yang dominan pada darahnya.²¹ Salah satu sitokin dari Th1 tersebut adalah IFN-gamma. Peranan IFN-gamma dalam infeksi virus hepatitis nampak pada penelitian yang dilakukan oleh Menne *et al.* dengan menggunakan hewan coba. Pada penelitian tersebut, resolusi infeksi dari infeksi *Woodchuck Hepatitis Virus* (WHV) umumnya didahului dengan ekspresi IFN-gamma dan TNF- α yang tinggi. Sementara pada hewan coba yang tidak mampu mengekspresikan IFN-

gamma dan TNF- α yang tinggi akan mengakibatkan persistensi infeksi. Hal yang sama juga telah dilaporkan dalam pada proses kesembuhan dari infeksi hepatitis C pada manusia.²¹ IFN-gamma telah dilaporkan memiliki fungsi sebagai antiviral dan dapat menjadi mediator untuk pemanggilan sel-sel yang berperan dalam inflamasi pada hepatosit.²² Sitokin tersebut juga telah dilaporkan bahwa sitokin tersebut dapat meningkatkan produksi anti-HBs.¹⁵

Perlu diingat bahwa respons sitokin terhadap rHBsAg sangat bervariasi.^{64,65,77} Respons sitokin terhadap rHBsAg yang telah dilaporkan meliputi kecenderungan untuk sintesis sitokin dari Th1,⁵⁶ kecenderungan untuk sintesis sitokin dari Th2,⁷⁷ ataupun sintesis dari kedua sitokin.¹⁵ Meskipun demikian Larsen *et al.* menyebutkan bahwa respons terhadap HBsAg tersebut lebih dipengaruhi oleh subjeknya.⁶⁴ Hipotesis tersebut juga didukung oleh penemuan dari Jafarzadeh dan Shokri yang melaporkan bahwa respons imun terhadap HBsAg dipengaruhi oleh HLA. Pada penelitian tersebut dilaporkan bahwa sekresi sitokin dari Th1 (IFN- γ) dan Th2 (IL-4, IL-10) mengalami penurunan pada subjek yang mengekspresikan HLA-DR7 dibandingkan dengan yang tidak mengekspresikan DR7. Subjek dengan HLA DR3+ lebih lemah dalam mensekresikan sitokin Th2 dan subjek dengan HLA B8+ dan A9+ lebih cenderung mensekresikan sitokin Th1 daripada Th2.⁵⁸ Mengingat subjek yang digunakan berasal dari famili dan etnis yang berbeda, HLA dari setiap subjek tersebut juga akan berbeda.

5.3. Sintesis Anti-HBs secara *In Vitro* Memiliki Hubungan dengan Sintesis IL-2.

Pada kelompok kultur yang dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* memiliki perbedaan kemampuan sintesis IL-2 dengan kultur SMDT yang tidak mensintesis anti-HBs. Mengingat bahwa dalam penelitian ini kadar anti-HBs *in vitro* dapat merepresentasikan jumlah sel B spesifik penghasil anti-HBs, tingginya kadar IL-2 dapat diasosiasikan dengan jumlah sel B spesifik tersebut. IL-2 merupakan sitokin yang berperan dalam kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi dari sel T yang teraktivasi oleh antigen,¹³ proliferasi dan diferensiasi dari sel NK,⁸⁹ dan juga berperan terhadap sel B sebagai faktor pertumbuhan dan

stimulan untuk sintesis antibodi.¹³ Sitokin ini telah dilaporkan berasosiasi dengan kegagalan vaksinasi hepatitis B dan sintesis antibodi secara *in vitro*.¹³ Hubungan antara anti-HBs dengan sitokin IL-2 juga telah dilaporkan oleh Velu et al. yang menunjukkan adanya korelasi positif antara kadar anti-HBs dan IL-2.⁷⁷

Pola korelasi sitokin dengan kadar anti-HBs *in vitro* dipengaruhi oleh status dari subjek. Hal ini nampak pada perbedaan pola korelasi sitokin dengan kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi dengan kelompok kronis dan resolusi infeksi. Hubungan antara sitokin IL-2 dengan sintesis anti-HBs *in vitro* hanya dapat ditemukan pada kelompok individu yang berhasil divaksinasi sementara pada kelompok pasien hepatitis B kronis dan kelompok pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi tidak ditemukan adanya hubungan yang bermakna.

Perbedaan respons antara kelompok resolusi infeksi dan kronis dengan kelompok vaksinasi dapat disebabkan oleh perbedaan pengenalan epitop dari antigen yang diberikan oleh reseptor sel T yang terdapat pada kelompok resolusi infeksi dan kelompok kronis. Kelompok resolusi infeksi dan kronis terdiri dari individu yang terpajan oleh VHB sementara kelompok vaksinasi terdiri dari individu yang terpajan oleh rHBsAg. rHBsAg yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rHBsAg yang digunakan sebagai vaksin untuk individu sehat sehingga sel T memori yang terbentuk sewaktu pajanan awal akan memiliki epitop yang sama dengan epitop rHBsAg yang digunakan sebagai stimulan dalam penelitian ini. Pada kelompok resolusi infeksi dan kronis, perbedaan pajanan tersebut dapat mengakibatkan perbedaan pengenalan epitop terhadap rHBsAg yang digunakan sebagai stimulan. Perbedaan respons terhadap antigen virus dengan rHBsAg pada kelompok yang mengalami resolusi infeksi dari infeksi dari VHB telah dilaporkan dengan adanya perbedaan proliferasi SMDT dari kelompok tersebut terhadap HBsAg rekombinan ($SI\ 2.0 \pm 1.4$) dibandingkan dengan HBsAg yang dipurifikasi dari plasma pasien hepatitis B kronis ($SI\ 6.6 \pm 10.7$).⁷¹ Hal ini menunjukkan bahwa perlunya penelitian lebih lanjut untuk menganalisis variasi dari gen S yang dimiliki dari VHB pada pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi, dan membandingkannya dengan rHBsAg yang digunakan dalam penelitian ini.

Pemberian virion utuh sebagai stimulan untuk melihat pola sitokin yang muncul pada pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi juga perlu dipertimbangkan. Virion utuh memiliki berbagai macam protein virus seperti HBsAg, HBeAg, HBcAg, HBx dan polimerase virus.⁴¹ Hal ini mengakibatkan adanya respons imun yang lebih kompleks dalam merespons protein-protein virus tersebut secara bersamaan jika dibandingkan dengan hanya satu protein virus. Perbedaan respons imun ini juga akan nampak pada sitokin yang dihasilkan mengingat bahwa masing-masing protein virus tersebut dapat memberikan respons sitokin yang berbeda.⁹⁰ Dalam hal ini, respons imun yang terkoordinasi akan sangat dibutuhkan mengingat respons sitokin dari sel Th1 ataupun Th2 dapat bersifat antagonis satu sama lain.²⁰ Penelitian lebih lanjut dalam hal ini dapat memberikan gambaran yang lebih lengkap mengenai pola sitokin yang mempengaruhi kronisitas infeksi VHB.

5.4. Keberadaan Anti-HBs Merupakan Perbedaan Utama antara Pasien Hepatitis B Kronis dan Pasien Hepatitis B yang Mengalami Resolusi Infeksi

Pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan signifikan respons sitokin terhadap rHBsAg antara pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan pasien hepatitis B kronis. Perbedaan paling utama yang ditemukan pada penelitian ini adalah keberadaan anti-HBs secara *in vivo* ataupun *in vitro* pada pasien yang mengalami resolusi infeksi, sementara pada kelompok kronis tidak ditemukan anti-HBs. Anti-HBs, yang merupakan penanda resolusi dari infeksi VHB, memiliki peranan dalam netralisasi VHB dan perlindungan dari infeksi ataupun reinfeksi VHB.⁸

Dalam siklus hidup VHB, virion VHB dan HBsAg disekresikan dalam jumlah yang tinggi.⁵ Tingginya virion dan HBsAg dapat memicu terjadinya *T cell exhaustion* yang mengakibatkan kehilangan fungsi dari limfosit T.⁹¹ Pada kondisi tersebut, anti-HBs berfungsi dalam menurunkan jumlah virion dan HBsAg yang bersirkulasi dalam darah dengan membentuk kompleks imun dan inisiasi eliminasi virion.⁸ Pentingnya peranan anti-HBs tersebut nampak pada penelitian yang dilakukan Bocher *et al.* yang menunjukkan respons sel B spesifik penghasil anti-HBs yang kuat pada individu yang berada pada fase akut umumnya

diasosiasikan dengan resolusi infeksi, sementara pada individu yang tidak menunjukkan hal tersebut memiliki kemungkinan yang tinggi untuk terjadi persistensi VHB.¹⁵ Peranan anti-HBs tersebut juga didukung oleh terjadinya reaktivasi VHB setelah dilakukan eliminasi sel B spesifik HBsAg dengan pemberian anti-CD20 pada pasien yang telah mengalami resolusi infeksi.¹²

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada SMDT yang berasal dari pasien hepatitis B kronis.
2. Tidak ditemukan perbedaan pola sitokin di antara pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi, akan tetapi pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi cenderung lebih kuat dalam produksi IFN-gamma sebagai respons terhadap HBsAg rekombinan.
3. Hubungan antara sintesis anti-HBs *in vitro* dengan respons sitokin IL-2 dapat ditemukan pada penelitian ini. Akan tetapi korelasi antara keduanya hanya dapat ditemukan pada individu sehat yang berhasil divaksinasi.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan uji lebih lanjut terhadap panel sitokin yang lebih luas untuk melihat pola sitokin yang dihasilkan akibat HBsAg.
2. Perlunya penambahan jumlah sampel sehingga hasil yang didapatkan lebih akurat.
3. Perlu dilakukan analisis variasi gen S dari VHB yang terdapat pada pasien infeksi VHB kronis.
4. Perlu dilakukan uji lebih lanjut dengan menggunakan stimulan virion VHB utuh untuk melihat adanya perbedaan respons sitokin diantara kelompok resolusi infeksi dan kronis.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Hepatitis B [Internet]. World Health Organization. [cited 2015 Feb 4]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Hope VD, Eramova I, Capurro D, Donoghoe MC. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol Infect.* 2014 ;142(2):270–86.
3. WHO. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. 2015.
4. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004;11(2):97–107.
5. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med.* 2004; 350(11):1118–29.
6. Loggi E, Gamal N, Bihl F, Bernardi M, Andreone P. Adaptive response in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2014;21(5):305–13.
7. Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol.* 2006; 3(2):97–106.
8. Alberti A, Diana S, Scularid GH, Eddleston AL, Williams R. Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection. *Br Med J.* 1978; 2(6144):1056–8.
9. Madalinski K, Burczynska B, Heermann KH, Uy A, Gerlich WH. Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol.* 1991; 84(3):493–500.
10. Gerlich WH. The Enigma of Concurrent Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and Antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(9):1170–2.
11. Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1994; 94(2):907.
12. Matsue K, Kimura S, Takanashi Y, Iwama K, Fujiwara H, Yamakura M, et al. Reactivation of hepatitis B virus after rituximab-containing treatment in patients with CD20-positive B-cell lymphoma. *Cancer.* 2010; 116(20):4769–76.
13. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access.* Elsevier Health Sciences; 2014.
14. Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science.* 1986; 234(4782):1398–401.
15. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer zum Büschenfelde K-H, Löhner HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or After HBs vaccination: Stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology.* 1999;29(1):238–44.
16. Shiels MT, Taswell HF, Czaja AJ, Nelson C, Swenke P. Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 1987; 93(4):675–80.

17. Pondé R a. A. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2011; 30(11):1325–40.
18. Barnaba V, Valesini G, Levrero M, Zaccari C, Van Dyke A, Falco M, et al. Immunoregulation of the in vitro anti-HBs antibody synthesis in chronic HBsAg carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol.* 1985; 60(2):259–66.
19. Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Cooksley WG, James SP, Jones EA. Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest.* 1983; 71(5):1104–13.
20. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today.* 1997; 18(6):263–6.
21. Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology Baltim Md.* 2003; 38(1):4–13.
22. Liu Z-X, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK Cells Cause Liver Injury and Facilitate the Induction of T Cell-Mediated Immunity to a Viral Liver Infection. *J Immunol.* 2000; 164(12):6480–6.
23. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut.* 2009; 58(7):974–82.
24. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppia D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2012; 189(8):3925–35.
25. Dunn C, Peppia D, Khanna P, Nebbia G, Jones M, Brendish N, et al. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2009; 137(4):1289–300.
26. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol.* 2008; 180(9):5771–7.
27. Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol.* 2006; 87(6):1439–49.
28. Liaw Y-F, Chu C-M. Hepatitis B virus infection. *The Lancet.* 2009; 373(9663):582–92.
29. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol WJG.* 2007; 13(1):14–21.
30. Arankalle VA, Gandhe SS, Borkakoty BJ, Walimbe AM, Biswas D, Mahanta J. A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India. *J Viral Hepat.* 2010;17(7):501–10.
31. Ismail AM, Goel A, Kannangai R, Abraham P. Further evidence of hepatitis B virus genotype I circulation in Northeast India. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2013; 18:60–5.
32. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A Genetic Variant of Hepatitis B Virus Divergent from Known Human and Ape Genotypes Isolated from a Japanese Patient and Provisionally Assigned to New Genotype J. *J Virol.* 2009; 83(20):10538–47.
33. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(18):5427–34.
34. Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarria JM, Lee S-D, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide:

- genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004; 47(6):289–309.
35. Norder H, Couroucé A-M, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol*. 1992; 73(12):3141–5.
 36. Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol*. 2006;78 Suppl 1:S36-42.
 37. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*. 2013; 33(2):103–12.
 38. Kann M, H Gerlich W. Structure and molecular virology. In: *Viral Hepatitis*. 3rd ed. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2005. p. 149–80.
 39. Lai C-L, Locarnini S. *Hepatitis B Virus*. London: International Medical Press; 2002.
 40. Seeger C, Mason WS. Sodium-dependent taurocholic cotransporting polypeptide: a candidate receptor for human hepatitis B virus. *Gut*. 2013; 62(8):1093–5.
 41. Locarnini S. Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis*. 2004; 24:3–10.
 42. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64(1):51–68.
 43. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2010; 52(2):282–4.
 44. Locarnini S, Bowden S. Hepatitis B surface antigen quantification: Not what it seems on the surface. *Hepatology*. 2012; 56(2):411–4.
 45. Raney AK, Easton AJ, Milich DR, McLachlan A. Promoter-specific transactivation of hepatitis B virus transcription by a glutamine- and proline-rich domain of hepatocyte nuclear factor 1. *J Virol*. 1991; 65(11):5774–81.
 46. Cattaneo R, Will H, Hernandez N, Schaller H. Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature*. 1983; 305(5932):336–8.
 47. Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 1984; 52(2):396–402.
 48. Dindoost P, Jazayeri SM, Karimzadeh H, Saberfar E, Miri SM, Alavian SM. HBsAg Variants: Common Escape Issues. *Jundishapur J Microbiol*. 2012; 5(4):521–7.
 49. Jung M-C, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(1):43–50.
 50. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010; 58(4):258–66.
 51. Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virol J*. 2014;11:22.
 52. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol*. 2006; 85(1):16–23.
 53. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. *J Virol*. 2003; 77(1):68–76.

54. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8+ T Cell Control of Hepatitis B Virus Replication: Direct Comparison between Cytolytic and Noncytolytic Functions. *J Immunol*. 2010; 184(1):287–95.
55. Mohr R, Boesecke C, Wasmuth J-C. Hepatitis B. In: *Hepatology 2015: A Clinical Textbook*. 6th ed. Flying Publisher; p. 36–46.
56. Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, et al. Defect in Th1-Like Cells of Nonresponders to Hepatitis B Vaccine. *Hum Immunol*. 1997; 58(1):42–51.
57. Shokrgozar MA, Shokri F. Enumeration of hepatitis B surface antigen-specific B lymphocytes in responder and non-responder normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B surface antigen. *Immunology*. 2001; 104(1):75–9.
58. Jafarzadeh A, Shokri F. TH1 and TH2 responses are influenced by HLA antigens in healthy neonates vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2012; 11(4):308–15.
59. Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature*. 1990; 345(6272):258–60.
60. Livingston BD, Alexander J, Crimi C, Oseroff C, Celis E, Daly K, et al. Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999; 162(5):3088–95.
61. Couillin I, Pol S, Mancini M, Driss F, Bréchet C, Tiollais P, et al. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis*. 1999; 180(1):15–26.
62. Fernan A, Cayzer CJ, Cooksley WG. HBsAg-induced antigen-specific T and B lymphocyte responses in chronic hepatitis B virus carriers and immune individuals. *Clin Exp Immunol*. 1989 ; 76(2):222–6.
63. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, et al. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology*. 2004; 326(1):20–8.
64. Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, et al. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine*. 2000; 18(26):3021–30.
65. Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates. *Clin Exp Immunol*. 2003; 131(3):451–6.
66. Ducos J, Bianchi-Mondain A-M, Pageaux G, Conge AM, Poncet R, Vendrell J-P, et al. Hepatitis B virus (HBV)-specific in vitro antibody production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after vaccination by recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg). *Clin Exp Immunol*. 1996; 103(1):15–8.
67. do Livramento A, Schultz J, Batista KZS, Treitinger A, de Cordova CMM, Spada C. Immune memory response induced in vitro by recombinant hepatitis B surface antigen challenge 13-18 years after primary vaccination. *J Med Virol*. 2014; 86(10):1700–4.

68. Bekeredjian-Ding I, Foermer S, Kirschning CJ, Parcina M, Heeg K. Poke Weed Mitogen Requires Toll-Like Receptor Ligands for Proliferative Activity in Human and Murine B Lymphocytes. *PLoS ONE*. 2012; 7(1):e29806.
69. Cupps TR, Gerin JL, Purcell RH, Goldsmith PK, Fauci AS. In vitro antigen-induced antibody responses to hepatitis B surface antigen in man. Kinetic and cellular requirements. *J Clin Invest*. 1984; 74(4):1204–13.
70. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. Cytokine Production in Cell Culture by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Immunocompetent Hosts. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998; 5(1):78–81.
71. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Herr W, Heermann K, Gerken G, Meyer Zum Büschenfelde K-H, et al. Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 1996; 105(1):52–8.
72. Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, Fang S, Tamura T, Matsumoto S-E, et al. IL-10 augments antibody production in in vitro immunized lymphocytes by inducing a Th2-type response and B cell maturation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004; 68(11):2279–84.
73. Volkman DJ, Lane HC, Fauci AS. Antigen-induced in vitro antibody production in humans: a model for B cell activation and immunoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(4):2528–31.
74. Quémeñeur L, Gerland L-M, Flacher M, Ffrench M, Revillard J-P, Genestier L. Differential Control of Cell Cycle, Proliferation, and Survival of Primary T Lymphocytes by Purine and Pyrimidine Nucleotides. *J Immunol*. 2003; 170(10):4986–95.
75. Sung SJ. Monocyte-derived dendritic cells as antigen-presenting cells in T-cell proliferation and cytokine production. *Methods Mol Med*. 2008; 138:97–106.
76. Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods Mol Med*. 2008; 138:17–30.
77. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Shankar E-M, Vengatesan A, Jadhav S-S, et al. Relationship between T-lymphocyte cytokine levels and sero-response to hepatitis B vaccines. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(22):3534–40.
78. Yano Y, Utsumi T, Lusida MI, Hayashi Y. Hepatitis B virus infection in Indonesia. *World J Gastroenterol WJG*. 2015; 21(38):10714–20.
79. Movafagh A, Ghanati K, Amani D, Mahdavi SM, Hashemi M, Abdolahi DZ, et al. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. *J Paramed Sci*. 2013; 4(Supplement):126–41.
80. Tomimatsu K, Shirahata S. Antigen-specific in vitro immunization: a source for human monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1060:297–307.
81. Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachoval R, Eisenburg J, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1991; 13(3):310–7.

82. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest.* 1996; 98(5):1185–94.
83. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1990; 145(10):3442–9.
84. Rehermann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med.* 1995; 181(3):1047–58.
85. Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett.* 1994; 39(2):163–8.
86. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995; 154(9):4341–50.
87. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(5):1890–3.
88. Lau JYN, Bain VG, Naoumov NV, Smith HM, Alexander GJM, Williams R. Effect of interferon- γ on hepatitis B viral antigen expression in primary hepatocyte culture. *Hepatology.* 199; 14(6):975–9.
89. Liao W, Lin J-X, Leonard WJ. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity.* 2013; 38(1):13–25.
90. Koumbi L, Bertoletti A, Anastasiadou V, Machaira M, Goh W, Papadopoulos NG, et al. Hepatitis B-specific T helper cell responses in uninfected infants born to HBsAg+/HBeAg- mothers. *Cell Mol Immunol.* 2010; 7(6):454–8.
91. Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis.* 2015; 6(3):e1694.

Lampiran 1. Surat keterangan lolos kaji etik



**Komite Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo**

*Health Research Ethics Committee
Faculty of Medicine Universitas Indonesia
Cipto Mangunkusumo Hospital*

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430. Telp. 021-3157008. E-mail: ec_fkui@yahoo.com



Nomor : *Agz* /H2.F1/ETIK/2014

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

“Produksi Sitokin dan Anti-HBs pada Pasien Hepatitis B Kronis dan Akut”.

Peneliti Utama : Erick Sidarta, S.Si
Principal Investigator

Nama Institusi : Lembaga Biologi Molekuler EJKMAN
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



21 JUL 2014
Ketua
Chairman
Rianto
Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

* *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
** Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Lampiran 2. Surat keterangan amandemen protokol etik



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

Nomor : 123 /UN2. FK/ETIK/II/2015 9 Februari 2015
 Lampiran : -
 Hal : Amandemen protokol penelitian.

Yth.
 Erick Sidarta, S.Si
 Peneliti Utama/Peserta Pendidikan Program Studi Biomedik
 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
 Jakarta.

Sehubungan protokol penelitian berjudul :
 "Produksi Sitokin dan Anti-HBs pada Pasien Hepatitis B Kronis dan Akut".
 Surat Keterangan Lolos Kaji Etik No. 492/H2.F1/ETIK/2014, tanggal 21 Juli 2014.

Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI RSCM telah menerima dan meninjau surat Sejawat :

Tanggal	Nomor Surat	Perihal	Dokumen
29 Januari 2015	-	Amandemen proposal penelitian, pada :	<ul style="list-style-type: none"> Proposal penelitian yang telah direvisi, 1 kopi. Formulir <i>informed consent</i> yang telah direvisi, 2 halaman. Fotokopi Surat Keterangan Lolos Kaji Etik, 1 lembar.
<ul style="list-style-type: none"> Jumlah volume pengambilan darah setiap subjek dari 7 mL menjadi 12 mL. 			

Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI RSCM menyetujui perubahan tersebut.

Atas laporan dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.



Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK
Ketua

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 3. *Informed consent*

FORMULIR PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : SUNARDI WILIM

Alamat : KARYA INDAH VILLAGE I / A 6 , RT004 / RW03
PONDOK KARYA, PONDOK AREN - TANGSEL

Menyatakan bahwa :

1. Saya telah diberi penjelasan mengenai penelitian yang sedang berlangsung dan Saya sudah mengerti semua keterangan yang diberikan oleh peneliti tentang manfaat dan pentingnya pemeriksaan darah ini
2. Berdasarkan penjelasan yang diberikan, saya menyadari bahwa masih sangat diperlukan penelitian baik penelitian dasar maupun klinis untuk mengatasi dan melakukan terobosan baik dari segi pencegahan maupun pengobatan penyakit hepatitis B.
3. Berdasarkan hal tersebut diatas (no. 2), saya bersedia untuk turut serta dalam penelitian dan bersedia menyumbangkan darah saya sebanyak kurang lebih 12 ml untuk penelitian yang berkaitan dengan penyakit hepatitis B dan ilmu kedokteran.
4. Saya menyetujui bahwa semua data yang berkaitan dengan identitas saya akan dipperlakukan secara rahasia oleh peneliti dan apabila saya masih memerlukan penjelasan. Saya akan mendapat jawaban dari Sdr. Erick Sidarta.
5. Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut dalam penelitian ini.

JAKARTA , 25/03/13

Mengetahui : Yang Menyetujui:

Saksi Pasien/relawan

(.....)

 (.....) SUNARDI WILIM

Lampiran 4. Data kadar anti-HBs pada setiap kultur

Sampel	anti-HBs in vivo (mIU/mL)	anti-HBs in vitro (mIU/mL)					
		kontrol	stimulan PWM				
			1	2	3	4	5
VV-1	217,86	< 5	5,94	7,69	< 5	9,54	< 5
VV-2	162,39	< 5	< 5	5,33	< 5	< 5	< 5
VV-3	262,20	< 5	50,19	193,94	< 5	55,53	223,77
VV-4	249,50	< 5	< 5	35	< 5	< 5	< 5
VV-5	228,22	< 5	< 5	< 5	8,05	< 5	< 5
VV-6	180,74	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
VV-7	199,22	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
VV-8	219,66	< 5	< 5	< 5	< 5	10,89	< 5
VV-9	242,73	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
VV-10	229,29	< 5	< 5	103,02	53,50	< 5	9,59
AR-1	27,04	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
AR-2	197,76	< 5	< 5	24,89	< 5	6,06	< 5
AR-3	142,45	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
AR-4	198,29	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
AR-5	262,71	< 5	26,36	45,58	< 5	< 5	< 5
AR-6	61,63	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
AR-7	123,27	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
AR-8	187,76	< 5	< 5	< 5	14,10	6,88	6,70
AR-9	226,92	< 5	41,79	11,63	35,64	< 5	71,79
AR-10	205,68	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-1	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-2	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-3	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-4	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-6	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-7	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-8	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-9	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
CC-10	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5

Keterangan:

VV = kelompok vaksinasi, AR = kelompok resolusi infeksi, CC = kelompok kronis

Lampiran 5. Data kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada setiap kultur

sampel	perlakuan	pg/mL		
		IL-10	IFN-gamma	IL-2
Standard1	-	3340,00	1840,00	8050,00
Standard2	-	1113,33	613,33	2683,33
Standard3	-	371,11	204,44	894,44
Standard4	-	123,70	68,15	298,15
Standard5	-	41,24	22,72	99,38
Standard6	-	13,75	7,57	33,13
VV-1	kontrol	11,12	6,35	24,69
	HBsAg	50,14	58,38	1766,98
	PHA	1651,31	824,03	8050,00
VV-2	kontrol	22,35	9,56	105,98
	HBsAg	28,30	11,46	201,97
	PHA	1624,93	849,14	8050,00
VV-3	kontrol	13,42	6,14	42,28
	HBsAg	14,83	7,11	450,52
	PHA	-	-	-
VV-4	kontrol	12,89	6,35	38,70
	HBsAg	57,48	26,30	408,63
	PHA	1627,60	856,20	1696,70
VV-5	kontrol	15,18	5,92	33,02
	HBsAg	15,36	6,57	34,96
	PHA	1208,20	794,97	14770,10
VV-6	kontrol	14,39	6,35	50,72
	HBsAg	18,28	6,57	67,43
	PHA	4269,72	706,52	8050,00
VV-7	kontrol	10,95	5,92	14,83
	HBsAg	13,59	7,86	38,70
	PHA	418,22	701,98	3174,53
VV-8	kontrol	12,00	6,14	31,03
	HBsAg	33,02	6,35	182,09
	PHA	781,74	606,74	4750,68
VV-9	kontrol	12,18	7,43	26,88
	HBsAg	15,18	6,14	111,78
	PHA	469,58	520,50	26,88
VV-10	kontrol	15,71	6,35	31,03
	HBsAg	17,92	11,35	198,43
	PHA	1490,23	737,05	119,68

AR-1	kontrol	15,36	6,57	58,58
	HBsAg	11,30	5,92	26,88
	PHA	398,17	657,46	57,04
AR-2	kontrol	21,91	6,78	68,86
	HBsAg	31,50	14,59	163,15
	PHA	3188,31	950,92	8050,00
AR-3	kontrol	14,47	6,46	42,28
	HBsAg	21,20	6,35	65,99
	PHA	16,60	7,00	2510,67
AR-4	kontrol	14,92	5,92	38,70
	HBsAg	17,75	6,57	53,92
	PHA	955,54	818,82	2374,79
AR-5	kontrol	10,95	6,14	17,52
	HBsAg	12,18	5,92	22,42
	PHA	50,06	317,65	394,90
AR-6	kontrol	11,30	6,35	34,96
	HBsAg	21,29	6,57	31,03
	PHA	19,87	9,56	67,43
AR-7	kontrol	10,68	5,92	26,88
	HBsAg	14,83	6,78	47,42
	PHA	101,11	717,25	5834,89
AR-8	kontrol	15,01	5,92	49,08
	HBsAg	15,89	6,35	40,51
	PHA	2823,99	660,53	3968,79
AR-9	kontrol	11,65	6,14	34,96
	HBsAg	13,59	6,35	38,70
	PHA	616,86	838,74	8050,00
AR-10	kontrol	10,42	6,59	58,58
	HBsAg	14,92	8,71	17,52
	PHA	10,77	520,41	22,42
CC-1	kontrol	17,30	8,39	134,85
	HBsAg	18,54	18,42	398,84
	PHA	4055,70	693,72	8050,00
CC-2	kontrol	12,71	5,92	38,70
	HBsAg	14,65	6,57	45,74
	PHA	240,02	45,15	1595,12
CC-3	kontrol	10,95	6,14	17,52
	HBsAg	12,80	6,14	31,03
	PHA	374,38	622,36	1022,36
CC-4	kontrol	10,77	6,25	22,42
	HBsAg	12,53	6,46	31,03
	PHA	133,92	707,32	1396,76
CC-5	kontrol	12,71	6,78	34,96

	HBsAg	20,67	10,09	81,16
	PHA	455,82	755,96	8050,00
CC-6	kontrol	11,56	6,14	47,42
	HBsAg	12,62	6,57	33,02
	PHA	16,24	10,19	1812,71
CC-7	kontrol	12,36	7,32	44,03
	HBsAg	13,33	6,35	33,02
	PHA	311,15	7,21	1712,82
CC-8	kontrol	14,83	7,21	45,74
	HBsAg	12,36	6,57	52,33
	PHA	364,95	755,34	3226,65
CC-9	kontrol	10,95	6,57	26,88
	HBsAg	11,65	6,35	26,88
	PHA	390,02	438,44	47,42
CC-10	kontrol	11,47	6,46	45,74
	HBsAg	28,30	141,63	34,96
	PHA	322,15	560,29	242,66

Keterangan:

VV = kelompok vaksinasi, AR = kelompok resolusi infeksi, CC = kelompok kronis

POLA SITOKIN IL-10, IFN-GAMMA DAN IL-2 SERTA SINTESIS ANTI-HBS PADA PASIEN HEPATITIS B KRONIS DAN PASIEN HEPATITIS B YANG TELAH MENGALAMI RESOLUSI INFEKSI

Sidarta E^{1,2}, Harahap AR^{1,3}, Muljono DH²

¹Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jl. Diponegoro 69 Jakarta 10430

²Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya 6 Jakarta 10430

³Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya 6 Jakarta 10430

Abstrak

Infeksi oleh virus hepatitis B (VHB) dapat menjadi infeksi akut yang berakhir dengan resolusi infeksi ataupun berlanjut menjadi infeksi kronis. Resolusi infeksi dalam infeksi VHB ditandai dengan hilangnya *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) dan keberadaan antibodi terhadap HBsAg (anti-HBs). Kemampuan sel B dalam mensintesis anti-HBs dipengaruhi oleh sel *T helper 1* (Th1) ataupun *T helper 2* (Th2). Sekresi sitokin yang terkoordinasi dari Th1 ataupun Th2 sangat dibutuhkan mengingat sitokin yang dihasilkan oleh kedua sel *T helper* (Th) tersebut memiliki peranan yang berbeda dan dapat bekerja secara antagonis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam mensintesis anti-HBs dan membandingkan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dari pasien hepatitis B kronis dengan pasien yang mengalami resolusi infeksi. Pada penelitian ini sel mononuklear darah tepi manusia (SMDT) diambil dari 10 subjek pasien hepatitis B kronis, 10 subjek pasien yang mengalami resolusi infeksi dari hepatitis B dan 10 subjek individu sehat yang berhasil divaksinasi. SMDT dikultur dengan stimulan HBsAg rekombinan (rHBsAg) atau fitohemaglutinin (PHA) untuk sintesis sitokin dan *pokeweed mitogen* (PWM) untuk sintesis anti-HBs secara *in vitro*. Hasil dari penelitian ini ditemukan produksi anti-HBs secara *in vitro* dari 70% individu sehat yang berhasil divaksinasi dan 40% pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi, sementara pada pasien hepatitis B kronis tidak ditemukan hal tersebut. Pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 antara pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan pasien hepatitis B kronis tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Akan tetapi, respons IFN-gamma terhadap rHBsAg pada pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi cenderung lebih kuat. Korelasi antara sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan produksi anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada kedua kelompok tersebut, sementara korelasi IL-2 dengan sintesis anti-HBs *in vitro* ditemukan pada individu yang divaksinasi. Penelitian ini menunjukkan SMDT dari pasien hepatitis B kronis tidak dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dan pada pasien tersebut tidak memiliki perbedaan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 jika dibandingkan dengan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi.

Kata kunci: hepatitis B, kronis, resolusi infeksi, anti-HBs, IL-10, IFN-gamma, IL-2

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection can lead to acute self-limited infection or lead to chronic hepatitis B infection. Resolution of infection is marked by seroconversion of hepatitis B surface antigen (HBsAg) to antibody to HBsAg (anti-HBs) which also give protection to HBV reinfection. Anti-HBs is produced by B cells as response to HBsAg. B cells response to HBsAg is affected by cytokines from T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cells. Coordinated cytokines secreted by Th1 or Th2 cells is necessary due to the fact that they could work antagonistically. Th1 cytokines, such as IFN-gamma, are known to induce cellular immune responses, while Th2 cytokines, such as IL-4, -5 and -10, are known to induce humoral immune responses. This study aimed to investigate the capability of chronic hepatitis B patients (CHB) to synthesize anti-HBs *in vitro* and to compare IL-10, IFN-gamma and IL-2 levels between CHB patients with resolved hepatitis B (RHB) patients. In this study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were taken from 10 CHB patients, 10 RHB patients and 10 healthy hepatitis B vaccinated individuals. PBMCs were cultured in presence of recombinant HBsAg (rHBsAg) and PHA to cytokines synthesis and pokeweed mitogen (PWM) to anti-HBs synthesis *in vitro*. As results, synthesis of anti-HBs *in vitro* were found in PBMCs from 70% of healthy hepatitis B vaccinated individuals and 40% of RHB patients, while PBMCs from CHB patients could not. No significant differences were found in IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels between CHB patients and RHB patients, although IFN-gamma responses to rHBsAg had a tendency to be stronger in RHB patients. Correlation between IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels and anti-HBs synthesis *in vitro* was not found in CHB patients and RHB patients. Meanwhile, IL-2 and anti-HBs synthesis *in vitro* were correlated in healthy hepatitis B vaccinated individuals. In conclusion, this study showed that PBMCs from CHB patients were not capable in synthesizing anti-HBs *in vitro* and had no differences in IL-10, IFN-gamma and IL-2 cytokine levels with RHB patients.

Keywords: hepatitis B virus, chronic, resolved infection, anti-HBs, IL-10, IFN-gamma, IL-2

Latar Belakang

Infeksi virus hepatitis B (VHB) merupakan salah satu masalah besar bagi dunia kesehatan. Di seluruh dunia diperkirakan sekitar 2 milyar penduduknya telah terinfeksi oleh VHB meskipun vaksin terhadap VHB yang bermanfaat untuk memberikan perlindungan terhadap infeksi hepatitis B telah tersedia. Lebih dari 240 juta mengidap penyakit infeksi hati kronis dan dari semua itu, sekitar 780 000 penderitanya meninggal setiap tahun akibat konsekuensi dari penyakit tersebut.^{1,2}

Perjalanan infeksi VHB dimulai dengan infeksi akut dan selanjutnya dapat terjadi resolusi infeksi dengan sendirinya ataupun berlanjut menjadi infeksi kronis yang berisiko tinggi untuk sirosis dan kanker hati.³ Mekanisme terjadinya resolusi infeksi ataupun kronisitas dari infeksi VHB belum diketahui secara pasti, akan tetapi mekanisme tersebut melibatkan respons imun terhadap VHB.⁴

Pada individu yang mengalami resolusi infeksi dapat terdeteksi anti-HBs dalam serumnya. Antibodi ini memiliki manfaat dalam netralisasi VHB. Pentingnya anti-HBs dapat juga ditemukan pada penggunaan *Hepatitis B Immunoglobulin* (HBIG) untuk mencegah transmisi vertikal dari ibu ke anaknya.⁵ Akan tetapi, anti-HBs tidak dapat terdeteksi pada individu yang mengalami persistensi infeksi VHB. Mengingat anti-HBs berperan dalam pencegahan reinfeksi virion ke sel hati dan resolusi infeksi dari infeksi VHB, tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis perlu dikaji lebih lanjut.⁶

Tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dapat disebabkan oleh ketidakmampuan individu tersebut dalam memproduksi anti-HBs ataupun karena antibodi yang terbentuk membentuk kompleks imun dengan antigennya sehingga keberadaannya tersembunyi oleh antigennya.⁶⁻⁸ Kedua hal tersebut menunjukkan lemahnya respons sel B penghasil anti-HBs. Lemahnya respons sel B pada pasien hepatitis B kronis telah dilaporkan disebabkan oleh hal yang bersifat spesifik daripada oleh defektif sel B secara umum.^{9,10}

Anti-HBs merupakan antibodi terhadap protein permukaan VHB yang dalam proses pembentukannya bersifat *T-dependent*.¹¹ Proses ini membutuhkan bantuan sitokin dari sel T

helper dalam proliferasi dan diferensiasinya. Sitokin seperti IL-10, IFN-gamma dan IL-2 telah dilaporkan memiliki pengaruh dalam sintesis anti-HBs.¹²⁻¹⁴ Selain itu, sitokin tersebut juga telah dilaporkan memiliki pengaruh terhadap kronisitas infeksi VHB.¹⁵⁻¹⁸ Mengingat besarnya peranan sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap sintesis anti-HBs dan kronisitas, hubungan antara ketiga sitokin tersebut dengan sintesis anti-HBs dan kronisitas infeksi VHB perlu dikaji lebih lanjut. Dalam studi ini, kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs dan pengaruh pola sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dalam kronisitas dan sintesis anti-HBs akan dikaji lebih lanjut.

Metodologi

Subjek penelitian

Penelitian ini akan menggunakan sel mononuklear darah tepi manusia (SMDT) yang berasal dari tiga kategori yaitu: pasien hepatitis B kronis (ditandai dengan HBsAg +, anti-HBs - dan anti-HBc +), pasien yang telah mengalami resolusi infeksi hepatitis B (ditandai dengan HBsAg -, anti-HBs + dan anti-HBc +) dan individu sehat yang telah berhasil divaksinasi (ditandai dengan HBsAg -, anti-HBs >100 mIU/mL dan anti-HBc -).

Kultur SMDT

SMDT dipisahkan dari darah vena yang berada dalam tabung berisi heparin dengan sentrifugasi bertingkat menggunakan Histopaque (Sigma-Aldrich, USA). Setelah dilakukan pencucian menggunakan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), SMDT selanjutnya diresuspensi dalam RPMI-1640 (Gibco, Life technologies, USA) steril yang sudah ditambahkan dengan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) (SIGMA-ALDRICH, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco, Life technologies, USA), dan 1% larutan antibiotik dan antimikotik dengan komposisi 10000 unit/mL penisilin, 10000 mg/mL streptomisin dan 0,25 µg/mL amfoterisin B (SIGMA-ALDRICH, USA) dan

Stimulasi SMDT untuk sintesis sitokin

Sebanyak $1,5 \times 10^6$ sel/mL PBMC dari setiap subjek ditempatkan pada masing-masing *well* dari 24 *sterile well plate* dan diinkubasi dalam kondisi 37°C dan 5% CO₂ tanpa ditambahkan stimulan atau dengan keberadaan stimulan 10 µg/mL rHBsAg atau PHA. Supernatan diambil setelah 72 jam untuk pemeriksaan kadar sitokin dan disimpan pada suhu - 80°C.

Stimulasi SMDT untuk sintesis anti-HBs

Sebanyak $1,5 \times 10^6$ sel/mL PBMC dari setiap subjek ditempatkan pada masing-masing *well* dari 24 *sterile well plate* dan diinkubasi dalam kondisi 37°C dan 5% CO₂ tanpa ditambahkan stimulan atau dengan keberadaan stimulan 10 µg/mL PWM. Supernatan diambil setelah 72 jam untuk pemeriksaan kadar anti-HBs dan disimpan pada suhu - 80°C.

Pengukuran kadar anti-HBs pada serum subjek dan supernatan kultur

Pengukuran anti-HBs dilakukan dengan menggunakan kit Wantai Hep.BV (Wantai, China) sesuai instruksi protokol. Supernatan dari kultur PBMC didistribusikan pada 96 *well plate* yang telah dilapisi oleh HBsAg dengan berbagai sub tipe. Selanjutnya ditambahkan konjugat setelah dilakukan pencucian terlebih dahulu. Perubahan warna terjadi setelah ditambahkan TMB dan *stopping solution*. Pembacaan dilakukan dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Pengukuran kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2

Supernatan dari kultur PBMC dilakukan pengukuran kadar sitokin dengan menggunakan kit Lumindex dari R&D System sesuai dengan instruksi protokol. Sitokin yang diukur adalah IL-10, IFN-gamma, dan IL-2. Supernatan dari kultur PBMC didistribusikan pada 96 *well plate* yang steril yang selanjutnya akan ditambahkan analyte yang berisi beads yang telah dikonjugasikan dengan antibodi yang spesifik untuk tiap sitokin. Pembacaan hasil dilakukan dengan mesin *LUMINEX 200*.

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 16. P-value dihitung dengan menggunakan uji Mann Whitney, uji Wilcoxon, uji korelasi Spearman, dan uji Chi square.

Hasil

Subjek dalam penelitian ini terdiri dari 10 subjek pasien hepatitis B kronis (kronis), 10 subjek pasien yang mengalami resolusi infeksi dari hepatitis B (resolusi infeksi) dan 10 subjek individu sehat yang berhasil divaksinasi (vaksinasi); dengan komposisi perbandingan jenis kelamin pria dengan wanita berturut-turut adalah 5/5, 6/4 dan 2/8; dan dengan rerata umur secara berturut-turut adalah $35,5 \pm 11$, 43 ± 10 dan $25,3 \pm 2,5$ tahun (Tabel 1).

Pada kelompok kronis dan resolusi infeksi tidak ditemukan perbedaan dan hubungan yang bermakna antara umur dan jenis kelamin. Hal ini menunjukkan bahwa faktor umur dan jenis kelamin dari kedua kelompok tersebut tidak mengakibatkan bias terhadap analisis yang dilakukan. Antara kelompok kronis dan resolusi infeksi dapat ditemukan perbedaan yang bermakna pada kadar anti-HBs *in vivo*.

Pada kelompok vaksinasi dapat ditemukan 70% subjek yang mampu mensintesis anti-HBs secara *in vitro* menggunakan stimulan PWM, sementara pada kultur yang tidak diberikan stimulan tidak ditemukan sintesis anti-HBs. Pada kelompok ini juga dapat ditemukan sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada kultur SMDT yang diberikan stimulan HBsAg. Kadar tertinggi ditemukan pada sitokin IL-2 dan kadar terendah ditemukan pada sitokin IFN-gamma (Tabel 2).

Tabel 1. Subjek penelitian dan data demografi

	Kronis (n = 10)	Resolusi Infeksi (n = 10)	Vaksinasi (n = 10)	<i>p-value</i> (Kronis vs Resolusi infeksi)
Jenis kelamin (n, pria/wanita)	5/5	6/4	2/8	1,000 ^a
Umur (tahun, mean \pm SD)	$35,5 \pm 11$	43 ± 10	$25,3 \pm 2,5$	0,160 ^b
Kadar anti-HBs <i>in vivo</i> (mIU/mL, mean \pm SD)	< 5	$163,35 \pm 74,29$	$219,18 \pm 30,93$	0,001^b

^a = uji Chi Square; ^b = uji Mann Whitney.

Sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada SMDT yang berasal dari pasien kronis, sementara 40% subjek dari kelompok resolusi infeksi mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dengan rerata $5,83 \pm 10,39$ mIU/mL. Hasil analisis statistik dengan menggunakan metode chi-square dan Mann Whitney pada kelompok kronis dan resolusi infeksi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara keduanya dalam sintesis anti-HBs secara *in vitro*. Pada kedua kelompok tersebut juga ditemukan sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan kadar tertinggi ditemukan pada IL-2 dan kadar terendah ditemukan pada IFN-gamma pada kultur SMDT yang diberikan stimulan rHBsAg. Akan tetapi, tidak ditemukan adanya perbedaan yang bermakna untuk sintesis IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada kedua kelompok tersebut.

Korelasi antara anti-HBs *in vivo* dan *in vitro* dilakukan dengan membandingkan data kadar anti-HBs yang dideteksi dari serum masing-masing subjek dengan data rerata kadar anti-HBs yang dideteksi dari supernatan kelima perulangan kultur SMDT yang diberikan PWM. Analisis korelasi dilakukan dengan menggunakan metode Spearman dan menunjukkan korelasi yang signifikan untuk kadar anti-HBs *in vivo* dengan *in vitro* pada kelompok vaksinasi (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar anti-HBs pada darah subjek vaksinasi, semakin tinggi kemungkinan untuk mendapatkan anti-HBs dengan kadar tinggi pada kultur SMDT yang diberikan stimulan PWM.

Analisis korelasi yang serupa juga dilakukan pada data yang berasal dari kelompok kronis dan resolusi infeksi. Sama seperti analisis kelompok vaksinasi, kelompok resolusi infeksi juga memiliki korelasi yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar anti-HBs yang terdapat pada serum subjek dari kelompok resolusi infeksi maka semakin tinggi kemungkinan untuk didapatkan kadar anti-HBs yang tinggi pada kultur SMDT yang distimulasi dengan PWM. Sementara itu pada kelompok kronis tidak didapatkan analisis korelasi anti-HBs *in vivo* dengan *in vitro* yang dikarenakan pada kelompok tersebut tidak ditemukan kultur SMDT yang

mensintesis anti-HBs. Pada gambar 4.2 seluruh subjek dari kelompok kronis berkelompok pada daerah yang menghasilkan anti-HBs *in vivo* dan *in vitro* yang rendah.

Pemberian rHBsAg dan PHA pada SMDT yang didapatkan dari kelompok vaksinasi dapat meningkatkan sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 secara signifikan. Kadar tertinggi sitokin didapatkan pada perlakuan PHA sementara kadar terendah didapatkan pada perlakuan tanpa stimulan (kontrol). Sementara sintesis sitokin tertinggi adalah IL-2 dan sintesis sitokin terendah adalah IFN-gamma (Tabel 3).

Tabel 2. Kadar anti-HBs secara *in vitro* dari kultur SMDT setiap kelompok subjek.

	Kronis (n = 10)	Resolusi Infeksi (n = 10)	Vaksinasi (n = 10)	<i>p-value</i> (Kronis vs Resolusi infeksi)
Anti-HBs positif <i>in vitro</i> (n)	0/10	4/10	7/10	0,043^a
Kadar anti-HBs <i>in vitro</i> kontrol (mIU/mL, mean ± SD)	< 5	< 5	< 5	-
Kadar anti-HBs <i>in vitro</i> PWM (mIU/mL, mean ± SD)	< 5	5,83 ± 10,39	15,44 ± 32,93	0,031^b

^a = uji Chi Square; ^b = uji Mann Whitney; - = tidak dilakukan uji statistik.

Pemberian HBsAg pada kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi menunjukkan kenaikan kadar IL-10 yang bermakna (Uji Wilcoxon). Sementara itu, tidak ditemukan adanya kenaikan yang signifikan pada sitokin IFN-gamma dan IL-2 akibat pemberian HBsAg pada kedua kelompok tersebut. Akan tetapi pada tabel 3 dapat dilihat bahwa sintesis sitokin IFN-gamma pada kelompok resolusi infeksi memiliki kecenderungan untuk meningkat bila dibandingkan dengan kelompok kronis. Hal ini nampak dari nilai *p-value* dari uji Wilcoxon pada kelompok resolusi infeksi yang mencapai 0,092, sementara pada kelompok kronis yang hanya mencapai 0,192.

Tabel 3. Kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap berbagai perlakuan pada kelompok vaksinasi (n = 10).

	pg/mL			Wilcoxon <i>p-value</i>	
	kontrol (mean ± SD)	rHBsAg (mean ± SD)	PHA (mean ± SD)	kontrol vs rHBsAg	kontrol vs PHA
IL-10	14,02 ± 3,35	26,41 ± 15,85	1504,61 ± 1148,86	0,005**	0,008**
IFN-gamma	6,65 ± 1,10	14,81 ± 16,48	733,01 ± 113,78	0,022*	0,008**
IL-2	39,92 ± 25,22	346,15 ± 519,30	5409,84 ± 4805,03	0,005**	0,012*

* berbeda bermakna

** sangat berbeda bermakna

Pemberian PHA dapat meningkatkan sekresi sitokin ketiga sitokin tersebut pada kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi. Hal ini dapat dilihat pada nilai *p-value* dari uji Wilcoxon yang kurang dari 0,05 pada kedua kelompok tersebut untuk ketiga sitokin yang diuji. Uji

Mann Whitney yang digunakan untuk melihat adanya perbedaan kadar sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 diantara kedua kelompok tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada kedua kelompok tersebut pada sitokin dari kultur yang tidak diberikan stimulan, kultur yang diberikan stimulan HBsAg dan kultur yang diberikan stimulan PHA (Tabel 4).

Tabel 4. Kadar sitokin IL10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap berbagai perlakuan pada kelompok kronis dan kelompok resolusi infeksi.

		pg/mL			Wilcoxon <i>p-value</i>	
		kontrol (mean ± SD)	rHBsAg (mean ± SD)	PHA (mean ± SD)	kontrol vs rHBsAg	kontrol vs PHA
Kronis (n = 10)	IL-10	12,56 ± 2,06	15,74 ± 5,31	666,44 ± 1198,01	0,047*	0,005**
	IFN-gamma	6,72 ± 0,75	21,52 ± 42,37	459,60 ± 317,44	0,192	0,007**
	IL-2	45,82 ± 33,01	76,80 ± 114,29	2715,65 ± 2945,62	0,441	0,005**
Resolusi Infeksi (n = 10)	IL-10	13,67 ± 3,52	17,44 ± 5,99	818,13 ± 1197,80	0,022*	0,005**
	IFN-gamma	6,28 ± 0,32	7,41 ± 2,64	549,83 ± 334,98	0,092	0,005**
	IL-2	43,04 ± 15,81	50,75 ± 42,17	3133,09 ± 3220,54	0,646	0,017*
		Mann Whitney <i>p-value</i> (kronis vs resolusi infeksi)				
	IL-10	0,750	0,326	0,880		
	IFN-gamma	0,170	0,398	0,545		
	IL-2	0,677	0,791	0,879		

* berbeda bermakna; ** sangat berbeda bermakna

Analisis rasio sitokin akibat stimulasi oleh HBsAg dengan kemampuan kultur SMDT dalam mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dapat dilihat pada tabel 5. Rasio sitokin didapatkan dengan membandingkan kadar sitokin pada kultur yang distimulasi oleh rHBsAg dengan kultur yang tidak diberikan stimulan (rasio rHBsAg/kontrol). Rasio sitokin digunakan dalam analisis ini sebagai penanda kuat respons sitokin dari kultur yang digunakan terhadap rHBsAg. Seluruh subjek (n = 30) digunakan dalam analisis tanpa memperdulikan kelompok vaksinasi, resolusi infeksi ataupun kronis untuk memberikan gambaran secara keseluruhan mengenai pengaruh respons sitokin terhadap rHBsAg dengan kemampuan sintesis anti-HBs. Pada tabel 5 dapat dilihat adanya perbedaan yang bermakna dalam kemampuan respons sitokin IL-2 terhadap HBsAg antara kultur yang dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* dengan yang tidak. Sementara kemampuan respons IFN-gamma juga memiliki kecenderungan untuk berbeda bermakna diantara kedua

kelompok tersebut. Hal ini dapat dilihat dari nilai *p-value* dari uji Mann Whitney yang mencapai 0,081.

Untuk melihat apakah ada pengaruh dari status kelompok (vaksinasi, resolusi infeksi dan kronis) dalam hubungan antara sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 dengan anti-HBs *in vitro* dilakukan analisis korelasi secara terpisah (Gambar 2 dan 3). Analisis kelompok kronis dan resolusi infeksi (n = 20) dilakukan terpisah dengan kelompok vaksinasi (n = 10) yang merupakan kelompok kontrol. Korelasi dilakukan dengan menggunakan uji Spearman (*1-tailed*) dan dilakukan terhadap kadar anti-HBs *in vitro* dengan rasio kadar sitokin antara kultur yang diberikan stimulan rHBsAg dengan kadar sitokin pada kultur yang tidak diberikan stimulan.

Pada kelompok vaksinasi dapat ditemukan korelasi antara rasio IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa sintesis anti-HBs secara *in vitro* mempengaruhi respons SMDT terhadap rHBsAg untuk sintesis sitokin IL-2. Semakin tinggi kadar anti-HBs yang dihasilkan maka akan semakin kuat respons IL-2 yang dihasilkan. Korelasi antara sitokin IL-10 dan IFN-gamma dengan kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi tidak ditemukan secara signifikan pada penelitian ini. Akan tetapi antara rasio IFN-gamma dengan kadar anti-HBs secara *in vitro* memiliki kecenderungan untuk berkorelasi. Hal ini ditunjukkan dengan *p-value* yang mencapai 0.056 (Gambar 2). Sementara itu, pada kelompok kronis dan resolusi infeksi tidak ditemukan adanya korelasi yang bermakna antara rasio sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* (Gambar 3).

Tabel 5. Perbandingan rasio sitokin (rHBsAg/kontrol) terhadap status anti-HBs *in vitro*. (n = 30)

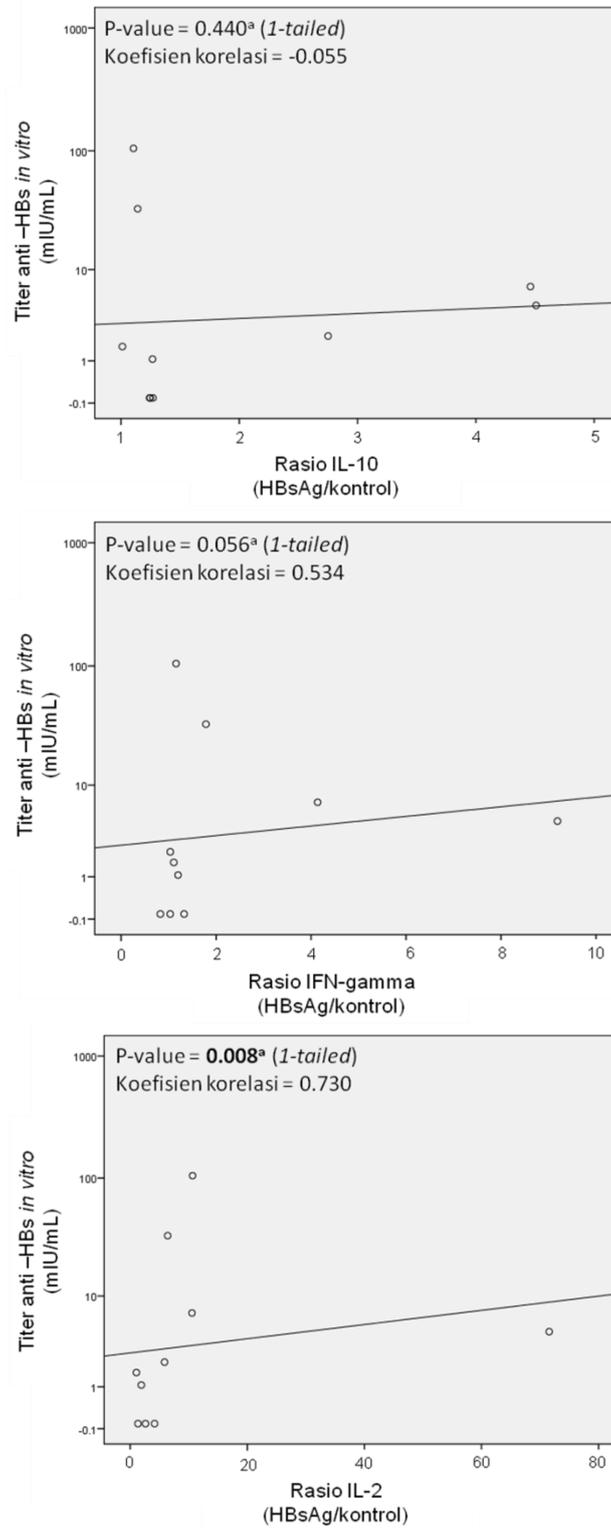
	Rasio rHBsAg/kontrol (mean ± SD)		<i>p-value</i> (Mann Whitney U)
	anti-HBs + (n = 11)	anti HBs – (n = 19)	
IL-10	1,911 ± 1,363	1,293 ± 0,385	0,683
IFN-gamma	2,258 ± 2,480	2,223 ± 4,780	0,081
IL-2	10,326 ± 20,646	1,497 ± 0,955	0,033*

* berbeda bermakna

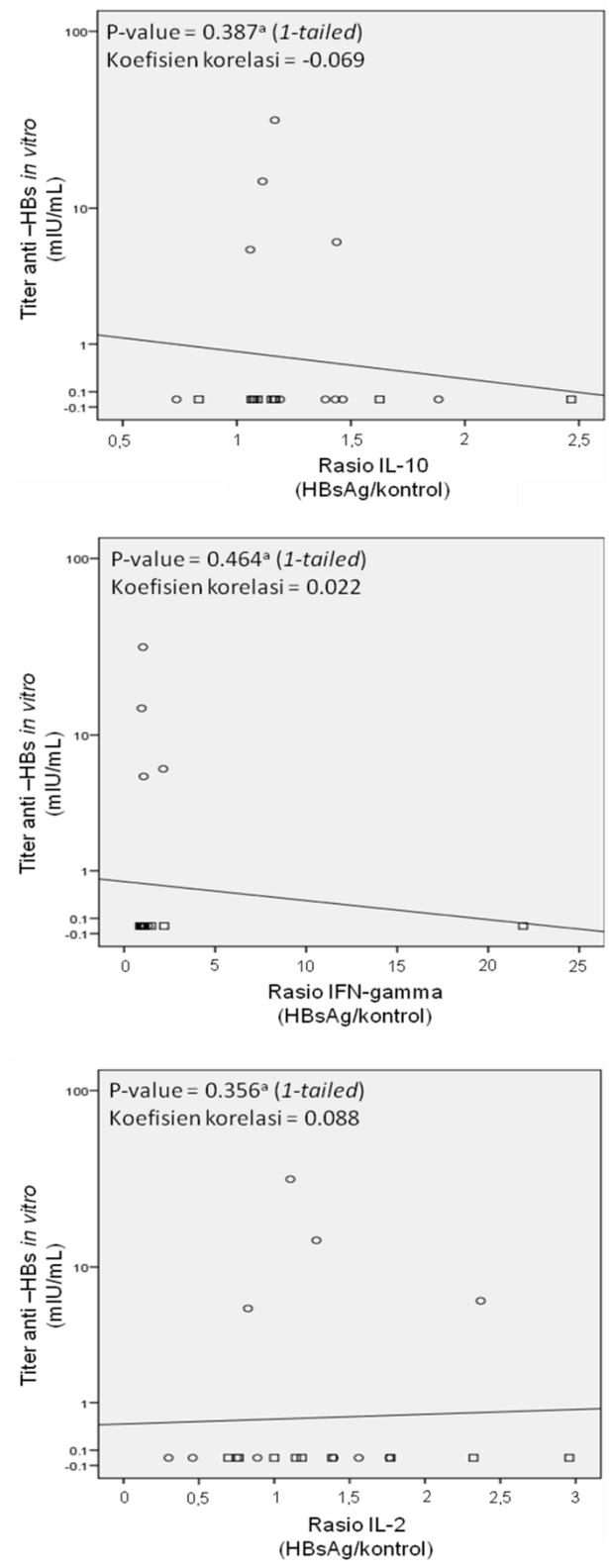
Diskusi

Indonesia tergolong dalam negara yang memiliki endemisitas hepatitis B menengah sampai tinggi dengan tingkat prevalensi HBsAg yang mencapai 2,5–10%.¹⁹ Pada infeksi VHB yang terjadi pada orang dewasa umumnya dapat terjadi resolusi infeksi dan terdeteksi keberadaan anti-HBs dalam darahnya, akan tetapi 5–10% individu dewasa yang terinfeksi tersebut dapat mengalami persistensi infeksi VHB sehingga menjadi infeksi hepatitis B kronis.¹ Pada individu yang mengalami infeksi hepatitis B kronis tidak ditemukan adanya anti-HBs dalam darahnya. Tidak terdeteksinya anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dapat disebabkan oleh adanya disfungsi sistem imun sehingga tidak terjadi sintesis anti-HBs atau antibodi yang terbentuk membentuk kompleks imun dengan HBsAg ataupun virion VHB yang berada dalam jumlah yang sangat banyak sehingga keberadaannya tersembunyikan.⁶⁻⁸ Untuk mengetahui kedua kemungkinan tersebut dilakukan studi imunologi untuk mengetahui kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam menghasilkan anti-HBs yang memiliki peranan dalam eliminasi dan netralisasi virion VHB yang bersirkulasi dalam darah. Selain itu penelitian ini juga melihat pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 pada penderita yang mengalami kronisitas hepatitis B dibandingkan dengan pasien yang mengalami resolusi infeksi beserta pengaruh pola sitokin tersebut terhadap sintesis anti-HBs secara *in vitro*. Penelitian ini dapat memberikan informasi terhadap kemampuan

sintesis anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis dalam dalam mengembangkan suatu terapi untuk meningkatkan atau memicu produksi anti-HBs pada pasien hepatitis B kronis ke tahap kuratif.



Gambar 1. Korelasi rasio sitokin (a) IL-10, (b) IFN-gamma dan (c) IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi (n = 10, ^a = uji korelasi Spearman)



Gambar 4.4. Korelasi rasio sitokin (a) IL-10, (b) IFN-gamma dan (c) IL-2 terhadap kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok kronis dan resolusi infeksi (n = 20, ^a= uji korelasi Spearman). ○ = resolusi infeksi, □ = kronis.

Kultur SMDT dengan berbagai stimulan merupakan metode yang sering digunakan dalam mempelajari respons imun. Umumnya kultur SMDT dilakukan untuk mempelajari respons dari sel T mengingat mayoritas sel dalam kultur SMDT yang didapatkan adalah sel limfosit T. Pada SMDT juga dapat ditemukan keberadaan sel B sehingga kultur SMDT juga dapat digunakan untuk mempelajari sel B terutama dalam sintesis antibodi.²⁰ Hal ini juga didukung oleh adanya laporan mengenai komposisi dari suspensi SMDT yang terdiri dari $74,4 \pm 2,0\%$ sel limfosit T ($48,1 \pm 4,1\%$ CD4+ dan $19 \pm 2,9\%$ CD8+), $7,5 \pm 1,2\%$ sel limfosit B, $16,1 \pm 1,9\%$ sel NK, dan $2,3 \pm 0,4\%$ sel monosit.²¹ Metode kultur SMDT ini juga telah digunakan untuk mempelajari sintesis sitokin^{12-14,22} dan anti-HBs.^{20,23,24}

Pada penelitian ini tidak ditemukan sintesis anti-HBs secara *in vitro* pada pasien hepatitis B kronis. Sebagai pembanding untuk membuktikan hal tersebut, dalam penelitian ini digunakan kultur SMDT yang berasal dari pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi yang ternyata dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro*.

Kultur SMDT dari pasien hepatitis B kronis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kultur SMDT yang masih hidup dan dapat merespon terhadap stimulan. Hal itu dapat dilihat dari terbentuknya agregat sel pada semua kultur yang didapatkan dari masing-masing kelompok yang diberikan stimulan PHA dan PWM (data tidak ditampilkan). Agregat tersebut merupakan sel limfosit yang teraktivasi. PHA merupakan mitogen yang khusus menstimulasi sel limfosit T untuk bermitosis. Sementara PWM, selain dapat menstimulasi sel limfosit T, juga dapat memicu aktivasi dan proliferasi dari sel limfosit B.²⁵ Sel SMDT tersebut berproliferasi sehingga membentuk klaster sel yaitu sel-sel yang berasal dari progenitor yang sama.^{26,27} Terbentuknya klaster sel pada kultur SMDT tersebut menunjukkan bahwa sel yang digunakan masih hidup dan dapat merespons terhadap mitogen yang digunakan.

Selain kelompok pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi yang digunakan sebagai pembanding terhadap pasien hepatitis B kronis, dalam penelitian ini juga digunakan kultur SMDT yang berasal dari individu sehat yang berhasil divaksinasi untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan berjalan dengan baik. Dalam memilih subjek dari kelompok vaksinasi, tidak semua individu sehat yang mendapatkan vaksinasi hepatitis B dapat digunakan. Hal ini dikarenakan pada individu sehat yang mendapatkan vaksinasi tersebut terdapat 4-10% individu yang tidak merespons terhadap vaksinasi yang ditandai dengan kadar anti-HBs kurang dari 10 mIU/mL pada darah individu tersebut meskipun telah menerima tiga kali vaksinasi hepatitis B.²⁸ Subjek yang digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini adalah individu yang merespons kuat terhadap vaksinasi hepatitis B. Hal tersebut ditandai dengan keberadaan kadar anti-HBs pada serum yang lebih dari 100 mIU/mL.¹³

Sintesis anti-HBs secara *in vitro* membutuhkan keberadaan sel B spesifik penghasil anti-HBs dan stimulan yang dapat mengaktivasi sel tersebut. Stimulan yang dapat digunakan adalah stimulan non-spesifik, seperti PWM ataupun virus Epstein Barr, ataupun antigen yang bersifat spesifik.^{20,23,24,26,29-31} PWM merupakan mitogen untuk sel B yang bersifat poliklonal dan mitogen yang paling umum digunakan untuk mempelajari sekresi imunoglobulin.³² Penggunaannya dalam penelitian ini akan mengaktivasi seluruh sel B yang terdapat pada kultur SMDT. Aktivasi dari setiap sel B tersebut akan memicu proliferasi dan sintesis antibodi dari setiap sel B secara keseluruhan sehingga terjadi kenaikan kadar imunoglobulin total pada kultur SMDT tersebut.^{9,31} Selanjutnya keberadaan anti-HBs dapat dideteksi pada supernatan dari kultur dengan menggunakan metode ELISA yang spesifik mengenali anti-HBs.

Penggunaan HBsAg juga telah dilaporkan dalam menstimulasi sel B spesifik penghasil anti-HBs secara *in vitro*.^{23,31} Akan tetapi dalam penelitian pendahuluan yang dilakukan, penggunaan HBsAg dalam sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak memicu sintesis anti-HBs (data tidak ditampilkan). Hal ini dapat disebabkan oleh keberadaan sel immunosupresif, seperti sel NK dan monosit yang dapat menekan aktivasi sel B oleh antigen spesifik. Penggunaan LLME dapat mensensitivasi SMDT yang digunakan untuk sintesis anti-HBs *in vitro* dengan cara mengeliminasi sel immunosupresif tersebut.²⁷

Kemampuan kelompok kronis dalam memproduksi antibodi telah dilaporkan oleh Dusheiko *et al* dan Barnaba *et al*. Pada kedua penelitian tersebut kemampuan hepatitis B kronis dalam memproduksi imunoglobulin juga telah ditunjukkan dengan meningkatnya kadar imunoglobulin total pada kultur SMDT dari pasien hepatitis B kronis yang distimulasi oleh PWM dan tidak adanya perbedaan kadar imunoglobulin total antara subjek sehat dan kronis.^{9,10} Selain itu, kemampuan pasien hepatitis B kronis dalam memproduksi antibodi juga dapat dilihat dari keberadaan anti-HBc dan anti-HBe pada kasus hepatitis B kronis, adanya kompleks imun antara

anti-HBs dengan HBsAg pada pasien hepatitis B kronis⁷ dan anti-HBs pada kasus infeksi hepatitis B mutan yang dapat lolos dari anti-HBs.³³ Hal ini menunjukkan bahwa pada pasien hepatitis B kronis tidak memiliki masalah disfungsi sel B secara umum melainkan lebih disebabkan oleh hal yang spesifik.

Tidak terambilnya sel B spesifik penghasil anti-HBs sewaktu tahap pengambilan darah pada awal isolasi SMDT dapat mengakibatkan gagalnya sintesis anti-HBs *in vitro*. Shokrgozar dan Shokri melaporkan bahwa frekuensi sel B penghasil anti-HBs pada kultur SMDT dari individu yang sehat yang merespons kuat terhadap vaksin memiliki kisaran dari 1 sel B spesifik/387 sel B total sampai 1 sel B spesifik/44.460 sel B total.²⁹ Hal tersebut menunjukkan tingginya variasi dari keberadaan sel B spesifik penghasil anti-HBs meskipun individu tersebut merespons kuat terhadap vaksinasi. Tingginya variasi tersebut juga menjadi alasan mengapa dalam penelitian ini SMDT yang didapatkan dari masing-masing kelompok dinyatakan dapat menghasilkan anti-HBs *in vitro* apabila salah satu dari kelima pengulangan kultur untuk mensintesis anti-HBs *in vitro* tersebut dapat menghasilkan anti-HBs.

Sementara itu, frekuensi sel B spesifik penghasil anti-HBs yang rendah pada kelompok pasien hepatitis B kronis juga dilaporkan oleh Bocher *et al.* yang hanya mencapai rerata $3,7 \pm 1,2$ sel penghasil anti-HBs untuk setiap 10^6 sel SMDT (data dari 7 subjek pasien kronis) dibandingkan dengan pasien hepatitis B akut yang memiliki rerata 168 ± 46 sel penghasil anti-HBs untuk setiap 10^6 sel SMDT (data dari 6 pasien akut).¹⁷ Tingginya variasi keberadaan sel B dan rendahnya frekuensi sel B spesifik penghasil anti-HBs ini dapat mengakibatkan tidak terambilnya sel B tersebut dari darah subjek kronis pada tahap awal sebelum isolasi SMDT dilakukan.

Respons dari sel T helper dan sel T sitotoksik yang kuat pada pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan lemah pada pasien yang mengalami persistensi infeksi VHB telah banyak dilaporkan.^{18,34-37} Akan tetapi, respons yang kuat tersebut lebih diasosiasikan terhadap HBcAg dan HBeAg dari VHB.³⁴⁻³⁸ Respons terhadap HBsAg pada kelompok pasien hepatitis B kronis dan kelompok resolusi infeksi juga telah dilaporkan. Akan tetapi pengukuran yang dilaporkan lebih mengarah pada analisis proliferasi sel SMDT terhadap stimulan yang digunakan. Bocher telah melaporkan bahwa pada kelompok kronis hanya mencapai *stimulation index* (SI) $0,9 \pm 0,1$ sementara pada kelompok resolusi infeksi dapat mencapai SI $2,0 \pm 1,4$ dalam merespons terhadap stimulan rHBsAg.³⁰ Sedikit sekali informasi mengenai respons sitokin terhadap rHBsAg pada pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi.

Pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan pola sintesis sitokin IL-10, IFN-gamma dan IL-2 di antara pasien hepatitis B kronis dan pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi. Sama seperti sebelumnya, individu sehat yang berhasil divaksinasi dan merespons kuat digunakan dalam penelitian ini untuk menunjukkan bahwa metode yang digunakan berjalan dengan baik untuk sintesis IL-10, IFN-gamma dan IL-2. Hal ini dikarenakan SMDT dari individu yang gagal divaksinasi telah dilaporkan cenderung mensintesis sitokin lebih rendah daripada individu yang merespons kuat terhadap vaksinasi.^{12,13}

Seperti yang telah diutarakan sebelumnya bahwa respons terhadap rHBsAg dapat terlihat pada kenaikan IL-10 pada kelompok resolusi infeksi dan kronis. IL-10 merupakan sitokin yang berperan dalam regulasi respons inflamasi. Sitokin tersebut, selain disekresikan oleh sel Th2 juga diketahui diproduksi oleh makrofag, sel T regulator dan sel limfosit B. IL-10 telah ditunjukkan dapat menghambat respons imun seperti presentasi antigen, produksi sitokin dan aktivasi makrofag.³⁹ Dalam menghambat produksi sitokin, sitokin ini bekerja dengan menghambat diferensiasi Th1 dengan menurunkan produksi sitokin yang berhubungan dengan Th1 seperti IL-12 dan IFN-gamma dan cenderung mengarahkan respons imun menjadi Th2 dengan meningkatkan kadar sitokin IL-4, IL-5 dan IL-13.⁴⁰ IL-10 selain berperan dalam mengarahkan diferensiasi sel T helper menjadi sel Th2 juga memiliki peran dalam aktivasi dan proliferasi dari sel B.^{26,40-42}

Pada penelitian ini, pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi cenderung untuk mensintesis sitokin IFN-gamma oleh stimulan rHBsAg lebih kuat jika dibandingkan dengan kelompok kronis. IFN-gamma, sitokin yang dapat dihasilkan oleh sel Th1, CD8+ dan sel NK, merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam mengaktivasi makrofag untuk memfagositosis mikroba, memicu diferensiasi sel CD4+ naif menjadi Th1 dan menghambat diferensiasi sel Th2, memicu sel B untuk mengubah sintesis Ig menjadi IgG2 dan menstimulasi ekspresi molekul MHC kelas I dan II pada APC.⁴⁰ Sitokin ini juga telah dilaporkan memiliki kemampuan dalam menghambat replikasi VHB tanpa memicu terjadinya lisis sel hepatosit dan menurunkan ekspresi dari protein-protein VHB.^{43,44} Tingginya respons dalam mensintesis IFN-gamma pada kelompok yang telah mengalami resolusi infeksi sudah banyak dilaporkan.

Kurangnya jumlah subjek penelitian dapat menyebabkan analisis statistik dalam penelitian ini menjadi tidak signifikan.

Pada individu dengan resolusi infeksi VHB umumnya dapat ditemukan respons CD4 dan CD8 yang multispesifik dan kuat disertai keberadaan sitokin-sitokin Th1 yang dominan pada darahnya.¹⁸ Salah satu sitokin dari Th1 tersebut adalah IFN-gamma. Peranan IFN-gamma dalam infeksi virus hepatitis nampak pada penelitian yang dilakukan oleh Menne *et al.* dengan menggunakan hewan coba. Pada penelitian tersebut, resolusi infeksi dari infeksi *Woodchuck Hepatitis Virus* (WHV) umumnya didahului dengan ekspresi IFN-gamma dan TNF- α yang tinggi. Sementara pada hewan coba yang tidak mampu mengekspresikan IFN-gamma dan TNF- α yang tinggi akan mengakibatkan persistensi infeksi. Hal yang sama juga telah dilaporkan dalam proses kesembuhan dari infeksi hepatitis C pada manusia.¹⁸ IFN-gamma telah dilaporkan memiliki fungsi sebagai antiviral dan dapat menjadi mediator untuk pemanggilan sel-sel yang berperan dalam inflamasi pada hepatosit.⁴⁵ Sitokin tersebut juga telah dilaporkan bahwa sitokin tersebut dapat meningkatkan produksi anti-HBs.¹⁷

Perlu diingat bahwa respon sitokin terhadap rHBsAg sangat bervariasi.¹²⁻¹⁴ Respons sitokin terhadap rHBsAg yang telah dilaporkan meliputi kecenderungan untuk sintesis sitokin dari Th1,⁴⁶ kecenderungan untuk sintesis sitokin dari Th2,¹³ ataupun sintesis dari kedua sitokin.¹⁷ Meskipun demikian Larsen *et al.* menyebutkan bahwa respons terhadap HBsAg tersebut lebih dipengaruhi oleh subjeknya.¹⁴ Hipotesis tersebut juga didukung oleh penemuan dari Jafarzadeh dan Shokri yang melaporkan bahwa respons imun terhadap HBsAg dipengaruhi oleh HLA. Pada penelitian tersebut dilaporkan bahwa sekresi sitokin dari Th1 (IFN- γ) dan Th2 (IL-4, IL-10) mengalami penurunan pada subjek yang mengekspresikan HLA-DR7 dibandingkan dengan yang tidak mengekspresikan DR7. Subjek dengan HLA DR3+ lebih lemah dalam mensekresikan sitokin Th2 dan subjek dengan HLA B8+ dan A9+ lebih cenderung mensekresikan sitokin Th1 daripada Th2.²² Mengingat subjek yang digunakan berasal dari famili dan etnis yang berbeda, HLA dari setiap subjek tersebut juga akan berbeda.

Pada kelompok kultur yang dapat mensintesis anti-HBs secara *in vitro* memiliki perbedaan kemampuan sintesis IL-2 dengan kultur SMDT yang tidak mensintesis anti-HBs. Mengingat bahwa dalam penelitian ini kadar anti-HBs *in vitro* dapat merepresentasikan jumlah sel B spesifik penghasil anti-HBs, tingginya kadar IL-2 dapat diasosiasikan dengan jumlah sel B spesifik tersebut. IL-2 merupakan sitokin yang berperan dalam kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi dari sel T yang teraktivasi oleh antigen,⁴⁰ proliferasi dan diferensiasi dari sel NK,⁴⁷ dan juga berperan dalam sel B sebagai faktor pertumbuhan dan stimulan untuk sintesis antibodi.⁴⁰ Sitokin ini telah dilaporkan berasosiasi dengan kegagalan vaksinasi hepatitis B dan sintesis antibodi secara *in vitro*.⁴⁰ Hubungan antara anti-HBs dengan sitokin IL-2 juga telah dilaporkan oleh Velu *et al.* yang menunjukkan adanya korelasi positif antara kadar anti-HBs dan IL-2.¹³

Pola korelasi sitokin dengan kadar anti-HBs *in vitro* dipengaruhi oleh status dari subjek. Hal ini nampak pada perbedaan pola korelasi sitokin dengan kadar anti-HBs *in vitro* pada kelompok vaksinasi dengan kelompok kronis dan resolusi infeksi. Hubungan antara sitokin IL-2 dengan sintesis anti-HBs *in vitro* hanya dapat ditemukan pada kelompok individu yang berhasil divaksinasi sementara pada kelompok pasien hepatitis B kronis dan kelompok pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi tidak ditemukan adanya hubungan yang bermakna.

Perbedaan respons antara kelompok resolusi infeksi dan kronis dengan kelompok vaksinasi dapat disebabkan oleh perbedaan pengenalan epitop dari antigen yang diberikan oleh reseptor sel T yang terdapat pada kelompok resolusi infeksi dan kelompok kronis. Kelompok resolusi infeksi dan kronis terdiri dari individu yang terpajan oleh VHB sementara kelompok vaksinasi terdiri dari individu yang terpajan oleh rHBsAg. rHBsAg yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rHBsAg yang digunakan sebagai vaksin untuk individu sehat sehingga sel T memori yang terbentuk sewaktu pajanan awal akan memiliki epitop yang sama dengan epitop rHBsAg yang digunakan sebagai stimulan dalam penelitian ini. Pada kelompok resolusi infeksi dan kronis, perbedaan pajanan tersebut dapat mengakibatkan perbedaan pengenalan epitop terhadap rHBsAg yang digunakan sebagai stimulan. Perbedaan respons terhadap antigen virus dengan rHBsAg pada kelompok yang mengalami resolusi infeksi dari infeksi dari VHB telah dilaporkan dengan adanya perbedaan proliferasi SMDT dari kelompok tersebut terhadap HBsAg rekombinan (SI 2.0 ± 1.4) dibandingkan dengan HBsAg yang dipurifikasi dari plasma pasien hepatitis B kronis (SI 6.6 ± 10.7).³⁰

Pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan respons sitokin terhadap rHBsAg antara pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi dan pasien hepatitis B kronis yang signifikan.

Perbedaan paling utama yang ditemukan pada penelitian ini adalah keberadaan anti-HBs secara *in vivo* ataupun *in vitro* pada pasien yang mengalami resolusi infeksi, sementara pada kelompok kronis tidak ditemukan anti-HBs. Anti-HBs, yang merupakan penanda resolusi dari infeksi VHB, memiliki peranan dalam netralisasi VHB dan perlindungan dari infeksi ataupun reinfeksi VHB.⁴⁸

Dalam siklus hidup VHB, virion VHB dan HBsAg disekresikan dalam jumlah yang tinggi.³ Tingginya virion dan HBsAg dapat memicu terjadinya *T cell exhaustion* yang mengakibatkan kehilangan fungsi dari limfosit T.⁴⁹ Pada kondisi tersebut, anti-HBs berfungsi dalam menurunkan jumlah virion dan HBsAg yang bersirkulasi dalam darah dengan membentuk kompleks imun dan inisiasi eliminasi virion.⁴⁸ Pentingnya peranan anti-HBs tersebut nampak pada penelitian yang dilakukan Bocher *et al.* yang menunjukkan respons sel B spesifik penghasil anti-HBs yang kuat pada individu yang berada pada fase akut umumnya diasosiasikan dengan resolusi infeksi, sementara pada individu yang tidak menunjukkan hal tersebut memiliki kemungkinan yang tinggi untuk terjadi persistensi VHB.¹⁷ Peranan anti-HBs tersebut juga didukung oleh terjadinya reaktivasi VHB setelah dilakukan eliminasi sel B spesifik HBsAg dengan pemberian anti-CD20 pada pasien yang telah mengalami resolusi infeksi.⁵⁰

Kesimpulan

Sintesis anti-HBs secara *in vitro* tidak ditemukan pada SMDT yang berasal dari pasien hepatitis B kronis. Pasien hepatitis B yang mengalami resolusi infeksi tidak memiliki perbedaan pola sitokin dengan pasien hepatitis B kronis. Hubungan antara sintesis anti-HBs *in vitro* dengan respons sitokin IL-2 dapat ditemukan pada penelitian ini. Akan tetapi korelasi antara keduanya hanya dapat ditemukan pada individu sehat yang berhasil divaksinasi.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization . Hepatitis B [Internet]. World Health Organization. [cited 2015 Feb 4]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Hope VD, Eramova I, Capurro D, Donoghoe MC. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol Infect.* 2014 Feb;142(2):270–86.
3. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):1118–29.
4. Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol.* 2006 Jun 1;87(6):1439–49.
5. Zhang L, Gui X, Teter C, Zhong H, Pang Z, Ding L, et al. Effects of hepatitis B immunization on prevention of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus and on the immune response of infants towards hepatitis B vaccine. *Vaccine.* 2014 Oct 21;32(46):6091–7.
6. Gerlich WH. The Enigma of Concurrent Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and Antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis.* 2007 May 1;44(9):1170–2.
7. Madalinski K, Burczynska B, Heermann KH, Uy A, Gerlich WH. Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol.* 1991 Jun;84(3):493–500.
8. Loggi E, Gamal N, Bihl F, Bernardi M, Andreone P. Adaptive response in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2014 May;21(5):305–13.
9. Barnaba V, Valesini G, Levrero M, Zaccari C, Van Dyke A, Falco M, et al. Immunoregulation of the *in vitro* anti-HBs antibody synthesis in chronic HBsAg carriers and in recently boosted anti-hepatitis B vaccine recipients. *Clin Exp Immunol.* 1985 May;60(2):259–66.
10. Dusheiko GM, Hoofnagle JH, Cooksley WG, James SP, Jones EA. Synthesis of antibodies to hepatitis B virus by cultured lymphocytes from chronic hepatitis B surface antigen carriers. *J Clin Invest.* 1983 May 1;71(5):1104–13.
11. Milich DR, McLachlan A. The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen. *Science.* 1986 Dec 12;234(4782):1398–401.
12. Jafarzadeh A, Shokri F. The antibody response to HBs antigen is regulated by coordinated Th1 and Th2 cytokine production in healthy neonates. *Clin Exp Immunol.* 2003 Mar;131(3):451–6.

13. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Shankar E-M, Vengatesan A, Jadhav S-S, et al. Relationship between T-lymphocyte cytokine levels and sero-response to hepatitis B vaccines. *World J Gastroenterol WJG*. 2008 Jun 14;14(22):3534–40.
14. Larsen CE, Xu J, Lee S, Dubey DP, Uko G, Yunis EJ, et al. Complex cytokine responses to hepatitis B surface antigen and tetanus toxoid in responders, nonresponders and subjects naive to hepatitis B surface antigen. *Vaccine*. 2000 Jul 1;18(26):3021–30.
15. Das A, Ellis G, Pallant C, Lopes AR, Khanna P, Peppia D, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Oct 15;189(8):3925–35.
16. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*. 2009 Jul;58(7):974–82.
17. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Schlaak J, Meyer zum Büschenfelde K-H, Löhner HF. Kinetics of hepatitis B surface antigen-specific immune responses in acute and chronic hepatitis B or After HBs vaccination: Stimulation of the in vitro antibody response by interferon gamma. *Hepatology*. 1999;29(1):238–44.
18. Bertolotti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatol Baltim Md*. 2003 Jul;38(1):4–13.
19. Yano Y, Utsumi T, Lusida MI, Hayashi Y. Hepatitis B virus infection in Indonesia. *World J Gastroenterol WJG*. 2015 Oct 14;21(38):10714–20.
20. Volkman DJ, Lane HC, Fauci AS. Antigen-induced in vitro antibody production in humans: a model for B cell activation and immunoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Apr;78(4):2528–31.
21. Quémeñeur L, Gerland L-M, Flacher M, Ffrench M, Revillard J-P, Genestier L. Differential Control of Cell Cycle, Proliferation, and Survival of Primary T Lymphocytes by Purine and Pyrimidine Nucleotides. *J Immunol*. 2003 May 15;170(10):4986–95.
22. Jafarzadeh A, Shokri F. TH1 and TH2 responses are influenced by HLA antigens in healthy neonates vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2012 Dec;11(4):308–15.
23. Ducos J, Bianchi-Mondain A-M, Pageaux G, Conge Am, Poncet R, Vendrell JP, et al. Hepatitis B virus (HBV)-specific in vitro antibody production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after vaccination by recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg). *Clin Exp Immunol*. 1996 Jan;103(1):15–8.
24. do Livramento A, Schultz J, Batista KZS, Treitinger A, de Cordova CMM, Spada C. Immune memory response induced in vitro by recombinant hepatitis B surface antigen challenge 13-18 years after primary vaccination. *J Med Virol*. 2014 Oct;86(10):1700–4.
25. Movafagh A, Ghanati K, Amani D, Mahdavi SM, Hashemi M, Abdolahi DZ, et al. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. *J Paramed Sci*. 2013 Feb 1;4(Supplement):126–41.
26. Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, Fang S, Tamura T, Matsumoto SE, et al. IL-10 augments antibody production in in vitro immunized lymphocytes by inducing a Th2-type response and B cell maturation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 Nov;68(11):2279–84.
27. Tomimatsu K, Shirahata S. Antigen-specific in vitro immunization: a source for human monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1060:297–307.
28. Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, et al. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology*. 2004 Aug 15;326(1):20–8.
29. Shokrgozar MA, Shokri F. Enumeration of hepatitis B surface antigen-specific B lymphocytes in responder and non-responder normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B surface antigen. *Immunology*. 2001 Sep;104(1):75–9.
30. Böcher WO, Herzog-Hauff S, Herr W, Heermann K, Gerken G, Meyer Zum Büschenfelde KH, et al. Regulation of the neutralizing anti-hepatitis B surface (HBs) antibody response in vitro in HBs vaccine recipients and patients with acute or chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol*. 1996 Jul;105(1):52–8.
31. Cupps TR, Gerin JL, Purcell RH, Goldsmith PK, Fauci AS. In vitro antigen-induced antibody responses to hepatitis B surface antigen in man. Kinetic and cellular requirements. *J Clin Invest*. 1984 Oct;74(4):1204–13.

32. Bekeredjian-Ding I, Foermer S, Kirschning CJ, Parcina M, Heeg K. Poke Weed Mitogen Requires Toll-Like Receptor Ligands for Proliferative Activity in Human and Murine B Lymphocytes. *PLoS ONE*. 2012 Jan 4;7(1):e29806.
33. Pondé R a. A. The underlying mechanisms for the “simultaneous HBsAg and anti-HBs serological profile.” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2011 Nov;30(11):1325–40.
34. Jung MC, Spengler U, Schraut W, Hoffmann R, Zachoval R, Eisenburg J, et al. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1991 Nov;13(3):310–7.
35. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1185–94.
36. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A, Valli A, Antoni AD, Giuberti T, et al. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Nov 15;145(10):3442–9.
37. Reherrmann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Brown M, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med*. 1995 Mar 1;181(3):1047–58.
38. Vingerhoets J, Vanham G, Kestens L, Penne G, Leroux-Roels G, Gigase P. Deficient T-cell responses in non-responders to hepatitis B vaccination: absence of TH1 cytokine production. *Immunol Lett*. 1994 Feb;39(2):163–8.
39. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5771–7.
40. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access*. Elsevier Health Sciences; 2014. 548 p.
41. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1995 May 1;154(9):4341–50.
42. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1;89(5):1890–3.
43. Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8+ T Cell Control of Hepatitis B Virus Replication: Direct Comparison between Cytolytic and Noncytolytic Functions. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):287–95.
44. Lau JYN, Bain VG, Naoumov NV, Smith HM, Alexander GJM, Williams R. Effect of interferon- γ on hepatitis B viral antigen expression in primary hepatocyte culture. *Hepatology*. 1991 Dec 1;14(6):975–9.
45. Liu Z-X, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. NK Cells Cause Liver Injury and Facilitate the Induction of T Cell-Mediated Immunity to a Viral Liver Infection. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6480–6.
46. Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, et al. Defect in Th1-Like Cells of Nonresponders to Hepatitis B Vaccine. *Hum Immunol*. 1997 Nov;58(1):42–51.
47. Liao W, Lin J-X, Leonard WJ. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*. 2013 Jan 24;38(1):13–25.
48. Alberti A, Diana S, Sculard GH, Eddleston AL, Williams R. Detection of a new antibody system reacting with Dane particles in hepatitis B virus infection. *Br Med J*. 1978 Oct 14;2(6144):1056–8.
49. Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. *Cell Death Dis*. 2015 Mar 19;6(3):e1694.
50. Matsue K, Kimura S, Takanashi Y, Iwama K, Fujiwara H, Yamakura M, et al. Reactivation of hepatitis B virus after rituximab-containing treatment in patients with CD20-positive B-cell lymphoma. *Cancer*. 2010 Oct 15;116(20):4769–76.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : Erick Sidarta

Jenis Kelamin : Pria

Tempat/Tanggal lahir : Jakarta, 1 April 1985

Status : Belum menikah

Alamat : Taman Harapan Indah Blok H No. 38

no. Hp : 0815 97 28099

no. telepon rumah : 021 - 5675794

E-mail : X_Sidarta@yahoo.com; erick@eijkman.go.id



Pendidikan

1991 - 1997 : SD Kristen Yusuf

1997 - 2000 : SMP Kristen Yusuf

2000 - 2003 : SMA Kristen Yusuf

2003 - 2007 : Sarjana Sains di Universitas Katolik Atma Jaya (IPK = 3.58)

2012 - sekarang : Program Magister Biomedik di Universitas Indonesia

Pengalaman Kerja

2008 - sekarang : Asisten Riset di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman