

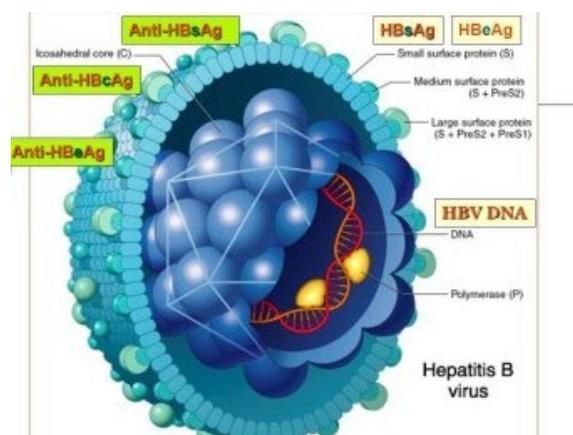
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hepatitis B

VHB (Virus Hepatitis B) termasuk dalam anggota famili *Hepadnavirus* yang memiliki 3 jenis antigen spesifik yaitu HBsAg, HBeAg dan HBcAg. Protein pada selubung virus membentuk HBsAg, sedangkan pada inti virus terdapat HBcAg dan pada nukleokapsid terdapat HBeAg. (Dienstag,2008)

VHB memilih “bersembunyi” di dalam hati dan sel-sel lain dan tidak memproduksi virus-virus baru yang bisa menginfeksi orang lain, atau memproduksi dalam jumlah yang kecil sedemikian hingga tidak bisa ditemukan di dalam darah. Orang-orang dengan kondisi seperti ini disebut sebagai karier. Pada saat sistem imunitas penderita menurun, virus di dalam tubuh terus menerus bereplikasi yang dapat selanjutnya menginfeksi hati dan menular pada orang lain. Pada kedua kasus ini, HbsAg akan tetap positif. Tes berikutnya dapat membantu membedakan antara kedua kondisi tersebut. (Cahya, 2015)



Gambar 1 : Struktur Virus Hepatitis B (James A Perkins,2000)

2.1.1 Etiologi Hepatitis B

Hepatitis B virus merupakan jenis virus DNA untai ganda, dengan ukuran sekitar 42 nm yang terdiri dari 7 nm lapisan luar yang tipis dan 27 nm inti di dalamnya. VHB dapat tetap inaktif ketika disimpan pada suhu 30-32°C selama paling sedikit 6 bulan dan ketika dibekukan pada suhu -15°C dalam 15 tahun. (WHO, 2002)

Virus ini memiliki tiga antigen spesifik yaitu antigen *surface*, *envelope* dan *core*. Hepatitis B *surface* antigen (HBsAg) merupakan kompleks antigen yang ditemukan pada permukaan VHB, dahulu disebut dengan Australia(Au) antigen atau *hepatitis associated antigen* (HAA). Adanya antigen ini menunjukkan infeksi akut atau karier kronis yaitu lebih dari 6 bulan. Hepatitis B *core* antigen (HbcAg) merupakan antigen spesifik yang berhubungan dengan 27 nm inti pada VHB (WHO,2002). Antigen ini tidak terdeteksi secara rutin dalam serum penderita infeksi VHB karena hanya berada di hepatosit. Hepatitis B *envelope* antigen (HBeAg) merupakan antigen yang lebih dekat hubungannya dengan *nukleokapsid* VHB. Antigen ini bersirkulasi sebagai protein yang larut di serum. Antigen ini timbul bersamaan atau segera setelah HBsAg, dan hilang beberapa minggu sebelum HBsAg hilang (Price&Wilson, 2005). Antigen ini ditemukan pada infeksi akut dan pada beberapa karier kronis. (Mandal & Wilkins, 2006)

2.1.2 Masa inkubasi VHB

Masa inkubasi VHB sekitar 15 – 180 hari (\pm 6 bulan) dengan rata-rata 60 – 90 hari, dimana setelah 2 minggu menginfeksi, HBsAg dalam darah penderita sudah mulai terdeteksi. (Sudoyo *et al.*, 2009).

Semakin tua umur penderita maka semakin besar kemungkinan menjadi kronis sehingga mempunyai potensi menjadi sirosis (pengkerutan jaringan), keadaan ini masih akan berlanjut menjadi karsinoma hepatoseluler. (Yatim, 2007)

2.1.3 Penularan Hepatitis B

Cara penularan VHB pada anak-anak, remaja dan orang dewasa dapat terjadi melalui beberapa cara, yaitu kontak dengan darah atau komponen darah dan cairan tubuh yang terkontaminasi melalui kulit yang terbuka seperti gigitan, sayatan, atau luka memar. Virus dapat menetap diberbagai permukaan benda yang berkontak dengannya selama kurang lebih satu minggu, tanpa mengurangi kemampuan infeksiya. Virus hepatitis B tidak dapat melewati kulit atau barrier membran mukosa, virus sebagian akan hancur ketika melewati barrier. Kontak dengan virus terjadi melalui benda-benda yang biasa kontak dengan darah atau cairan tubuh manusia, misalnya sikat gigi, alat cukur, atau alat pemantau dan alat perawatan penyakit diabetes. Risiko juga didapatkan pada orang yang melakukan hubungan seks tanpa pengaman dengan orang yang tertular, berbagi jarum saat menyuntikkan obat, dan tertusuk jarum bekas. (WHO, 2002; Mustofa & Kurniawaty, 2013)

Virus dapat diidentifikasi di dalam sebagian besar cairan tubuh seperti saliva, cairan semen, ASI, dan cairan rongga serosa dimana cairan tersebut

merupakan penyebab paling penting misalnya ascites. Kebanyakan orang yang terinfeksi tampak sehat dan tanpa gejala, namun bisa saja bersifat infeksius. (WHO, 2002)

Virus hepatitis B adalah virus yang berukuran besar dan tidak dapat melewati plasenta sehingga tidak menginfeksi janin kecuali jika telah ada kerusakan atau kelainan pada barier maternal-fetal seperti pada amniosintesis. Namun wanita hamil yang terinfeksi VHB tetap dapat menularkan penyakit kepada bayinya saat proses kelahiran. Bila tidak divaksinasi saat lahir akan banyak bayi yang seumur hidup terinfeksi VHB dan banyak yang berkembang menjadi kegagalan hati dan kanker hati di masa mendatang. (WHO, 2002)

Hepatitis B adalah satu-satunya penyakit menular seksual yang dapat diproteksi dengan vaksin. Darah bersifat inaktif saat beberapa minggu sebelum muncul gejala pertama dan selama fase akut. Sifat inaktif pada setiap orang yang mengalami infeksi kronis bervariasi mulai dari infeksius tinggi (HBeAg positif) sampai sedikit infeksius (anti-Hbe positif). Semua orang berisiko terinfeksi. Hanya orang yang telah divaksinasi lengkap atau orang yang punya antibodi anti-HBs atau telah terinfeksi VHB yang kebal terhadap infeksi VHB. Pasien yang banyak mengalami infeksi menetap oleh VHB adalah orang dengan immunodefisiensi kongenital atau dapat termasuk infeksi HIV, orang dengan immunosupresi, dan pasien yang menjalani terapi obat immunosupresif seperti steroid serta orang yang menjalani perawatan hemodialisis. Infeksi VHB kronis terjadi pada 90% janin yang terinfeksi saat kelahiran, 25-50% anak-anak usia 1-5 tahun, dan 1-5% pada anak usia lebih dari 5 tahun dan dewasa. (WHO, 2002)

2.1.4 Manifestasi Klinis Hepatitis B

Infeksi VHB memiliki manifestasi klinik yang berbeda-beda bergantung pada usia pasien saat terinfeksi, status imun, dan derajat penyakit. Fase inkubasi yang terjadi selama 6 – 24 minggu, gejala yang timbul pada pasien dapat merasa tidak baik atau dengan mungkin mual, muntah, diare, anoreksia, dan sakit kepala. Pasien dapat menjadi kekuningan, demam ringan, dan hilangnya nafsu makan. Terkadang infeksi VHB tanpa gejala kekuningan dan gejala yang nyata yang dapat diidentifikasi dengan deteksi biokimia atau serologi virus spesifik pada darah penderita. (WHO, 2002)

Perjalanan penyakit hepatitis B dapat berkembang menjadi hepatitis akut maupun hepatitis kronis. Hepatitis B akut terjadi jika perjalanan penyakit kurang dari 6 bulan sedangkan hepatitis B kronis bila penyakit menetap, tidak menyembuh secara klinis atau laboratorium, atau pada gambaran patologi anatomi selama 6 bulan. Hepatitis B akut memiliki gejala yang perlahan yaitu ditandai dengan gejala hilang nafsu makan, diare dan muntah, letih (malaise), rasa sakit pada otot, tulang sendi, demam ringan, dan rasa tidak nyaman pada perut bagian atas. (Mustofa & Kurniawaty,2013) Setelah 2 – 6 hari urin menjadi gelap, tinja menjadi lebih pucat, dan timbul ikterus. (Mandal & Wilkins, 2006)

Banyak pasien dewasa pulih dari infeksi VHB, namun 5 – 10 % akan tidak total bersih dari virus akibat gagal memberikan tanggapan imun yang adekuat sehingga terjadi infeksi hepatitis B perisiten, dapat bersifat karier inaktif atau hepatitis kronis yang tidak menunjukkan gejala, tapi infeksi ini tetap menjadi

sangat serius dan dapat mengakibatkan kerusakan hati atau sirosis, kanker hati dan kematian (WHO, 2002; Hazim, 2010).

Banyaknya jumlah virus yang menginfeksi dan usia pasien yang terinfeksi merupakan faktor penting yang menentukan hepatitis B akut atau kronis. Hanya sedikit infeksi VHB akut yang terlihat secara klinis. Kurang dari 10% anak dan 30 – 50 % dewasa dengan infeksi VHB akut yang mengalami penyakit ikterik. Banyak kasus hepatitis B akut yang subklinis. Bentuk akut sering mengalami perbaikan spontan setelah 4 – 8 minggu sakit. Banyak pasien mengalami perbaikan tanpa akibat yang signifikan dan tanpa rekuren. (WHO, 2002)

2.1.5 Replikasi Virus Hepatitis B

Menurut WHO (2002), terdapat tiga fase replikasi virus yang terjadi selama infeksi VHB terutama pada pasien dengan hepatitis B kronis, yaitu :

1. Fase replikasi tinggi.

Pada tahap ini HBsAg, HBeAg dan DNA virus dapat terdeteksi di serum. Kadar aminotransferase (ALT/AST) meningkat, dan aktivitas inflamasi nyata secara histologis. Pada fase ini, risiko menjadi sirosis tinggi.

2. Fase replikasi rendah.

Tahap ini mulai hilangnya HBeAg, menurun atau hilangnya konsentrasi DNA VHB, dan mulai tampak anti-Hbe. Secara histologi tampak penurunan aktivitas inflamasi yang jelas. Pemeriksaan serologi mengalami serokonversi seperti DNA VHB dan HBeAg mulai tergantikan oleh antibodi.

3. Fase non replikasi.

Penanda replikasi virus tidak ada dan inflamasi berkurang.

Pemeriksaan DNA dari virus diperlukan sebagai pertanda yang paling sensitif terhadap replikasi virus serta menunjukkan derajat penularan yang tinggi. DNA VHB dapat dijumpai pada serum dan hati setelah HBsAg menghilang, khususnya pada pasien dalam terapi antiviral, sebagai indikator yang baik untuk kadar viremia dan pada beberapa penelitian berkorelasi dengan kadar transaminase (ALT/AST) serum serta paralel dengan HBsAg. (Yeh, 2002)

Karier hepatitis B merupakan individu dengan hasil pemeriksaan HBsAg positif pada sedikitnya dua kali pemeriksaan yang berjarak 6 bulan, atau hasil pemeriksaan HbsAg positif tetapi IgM anti-HBc negatif dari satu spesimen tunggal. (Price & Wilson, 2005)

2.1.6 Diagnosis Hepatitis B

Evaluasi awal pasien dengan VHB kronis harus mencakup riwayat menyeluruh dan pemeriksaan fisik, dengan penekanan khusus pada faktor – faktor risiko untuk riwayat terinfeksi, penggunaan alkohol, dan riwayat keluarga dari infeksi VHB dan kanker hati. (Anna *et al.*, 2009)

Tabel 2. Evaluasi Pasien Dengan Infeksi Kronis Virus Hepatitis B

<p>Evaluasi awal</p> <ol style="list-style-type: none">1. Riwayat pemeriksaan fisik2. Riwayat keluarga dengan penyakit hati3. Pemeriksaan laboratorium untuk menilai kondisi penyakit hati - darah lengkap, panel hepatitis dan prothrombin time4. Tes replikasi virus VHB—HBeAg/anti-HBe, VHB DNA5. Tes untuk menyingkirkan virus yang bisa menginfeksi bersama - anti VHC dan anti HIV6. Uji saring dengan pemeriksaan AFP untuk stadium awal dan pasien resiko tinggi disertai pemeriksaan USG7. Pertimbangan biopsi hati untuk mengetahui stadium penyakit hati - untuk pasien yang dijumpai dengan kriteria hepatitis kronik. <p>(Sumber asli: Anna dkk, 2009)</p>

Diagnosis infeksi hepatitis B kronis didasarkan pada pemeriksaan serologi, petanda virologi, biokimiawi dan histologi. (Suharjo, 2006)

Pemeriksaan laboratorium pada VHB terdiri dari:

1. Pemeriksaan Biokimia

Stadium akut VHB ditandai dengan AST dan ALT meningkat > 10 kali nilai normal, serum bilirubin normal atau hanya meningkat sedikit, peningkatan Alkali Fosfatase (ALP) > 3 kali nilai normal, dan kadar albumin serta kolesterol dapat mengalami penurunan. Stadium kronik VHB ditandai dengan AST dan ALT kembali menurun hingga 2 – 10 kali nilai normal dan kadar albumin rendah tetapi kadar globulin meningkat. (Hardjoeno, 2007)

2. Pemeriksaan Serologis

Indikator serologi awal dari VHB akut dan kunci diagnosis penanda infeksi VHB kronis adalah HBsAg, dimana infeksi bertahan di serum > 6 bulan (EASL,2009). Pemeriksaan HBsAg berhubungan dengan selubung permukaan virus. Sekitar 5 – 10 % pasien, HBsAg menetap di dalam darah yang menandakan terjadinya hepatitis kronis atau *carrier* (Hardjoeno, 2007).

3. Pemeriksaan Molekuler

Pemeriksaan molekuler menjadi standard pendekatan secara laboratorium untuk deteksi dan pengukuran DNA VHB dalam serum atau plasma. Pengukuran kadar secara rutin bertujuan untuk mengidentifikasi *carrier*, menentukan prognosis, dan monitoring efikasi pengobatan antiviral.

Metode pemeriksaan molekuler antara lain :

- a. *Radioimmunoassay* (RIA) mempunyai keterbatasan karena waktu paruh pendek dan diperlukan penanganan khusus dalam prosedur kejadian limbahnya.
- b. *Hybrid Capture Chemiluminescence* (HCC) merupakan teknik hibridisasi yang lebih sensitif dan tidak menggunakan radioisotop karena sistem deteksinya menggunakan substrat *chemiluminescence*.
- c. Amplifikasi signal (metode *branched DNA / bDNA*) bertujuan untuk menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi hanya dari beberapa target molekul asam nukleat.

d. Amplifikasi target (metode *Polymerase Chain Reaction/PCR*) telah dikembangkan teknik *real-time PCR* untuk pengukuran DNA VHB. Amplifikasi DNA dan kuantifikasi produk PCR terjadi secara bersamaan dalam suatu alat pereaksi tertutup (Hardjoeno, 2007).

Pemeriksaan amplifikasi kuantitatif (PCR) dapat mendeteksi kadar VHB DNA sampai dengan 10^2 kopi/mL, tetapi hasil dari pemeriksaan ini harus diinterpretasikan dengan hati – hati karena ketidakpastian arti perbedaan klinis dari kadar VHB DNA yang rendah. Berdasarkan pengetahuan dan definisi sekarang tentang hepatitis B kronik, pemeriksaan standar dengan batas deteksi 10^5 - 10^6 kopi/mL sudah cukup untuk evaluasi awal pasien dengan Hepatitis B kronis. Untuk evaluasi keberhasilan pengobatan maka tentunya diperlukan standar batas deteksi kadar VHB DNA yang lebih rendah dan pada saat ini adalah yang dapat mendeteksi virus sampai dengan $< 10^4$ kopi/mL (Setiawan *et al*, 2006).

2.2 HBsAg

HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) merupakan suatu protein antigen dimana antigen tersebut dapat menjadi indikator awal dari hepatitis B akut dan sering kali (digunakan untuk) mengidentifikasi orang-orang yang terinfeksi sebelum gejala-gejala muncul. HBsAg dapat dideteksi pada cairan tubuh yang terinfeksi dan menghilang dari darah selama masa pemulihan. Pada beberapa orang (khususnya mereka yang terinfeksi adalah anak-anak atau mereka yang memiliki sistem kekebalan tubuh yang lemah, seperti pada penderita AIDS), infeksi kronis dengan VHB dapat terjadi dan HBsAg tetap positif.

2.3 ELISA

Enzim-Linked immune sorbent assay (ELISA) atau dalam bahasa Indonesiannya disebut sebagai uji penentuan kadar *immunosorben taut-enzim*, merupakan teknik pengujian serologi yang didasarkan pada prinsip interaksi antara antibodi dan antigen. Pada awalnya, teknik ELISA hanya digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi keberadaan antigen maupun antibodi dalam suatu sampel seperti dalam pendeteksian antibodi IgM, IgG, dan IgA pada saat terjadi infeksi. Namun seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, teknik ELISA juga diaplikasikan dalam bidang patologi tumbuhan, kedokteran, dll. (Pandu, 2012) Teknik ELISA pertama kali diperkenalkan pada tahun 1971 oleh Peter Perlmann dan Eva Engvall.

Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah reaksi antigen-antibodi (Ag – Ab) dimana setelah penambahan konjugat yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat akan terjadi perubahan warna. Perubahan warna ini yang akan diukur intensitasnya dengan alat pembaca yang disebut spektrofotometer atau *ELISA reader* dengan menggunakan panjang gelombang dan waktu tertentu. (Hausmann *et al.*, 2007) Ikatan antigen-antibodi yang terbaik terjadi pada suhu 37°C selama 1-2 jam. Waktu pembacaan absorbansi pada setiap pabrikan tergantung dari kadar antibodi yang digunakan, sehingga terjadi variasi waktu pembacaan absorbansi. Bila kadar antibodi rendah perlu waktu inkubasi yang lebih lama. (Handojo, 2003)

Secara umum, pemeriksaan ELISA melalui 5 tahapan yaitu :

1. Melapisi (*coating*) *well polysterene* ELISA *plate* dengan antigen.
2. *Bloking unbound site* (antigen non target) untuk mencegah terjadinya false positif.
3. Penambahan antigen primer dalam *well*.
4. Penambahan antibodi sekunder yang dikonjugasikan dengan enzim.
5. Penambahan substrat yang akan bereaksi dengan enzim dan akan menghasilkan warna. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi antara antigen dengan antibodi (positive reaction). (Wikipedia, 2015)

2.3.1 Kelebihan dan kekurangan metode ELISA

Kelebihan metode ELISA antara lain :

1. Teknik pengerjaan relatif sederhana
2. Relatif ekonomis (karena jenis antibodi yang digunakan hanya satu saja, sehingga menghemat biaya untuk membeli banyak jenis antibodi)
3. Hasil memiliki tingkat sensitivitas yang cukup tinggi.
4. Dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen walaupun kadar antigen tersebut sangat rendah (hal ini disebabkan sifat interaksi antara antibodi atau antigen yang bersifat sangat spesifik)
5. Dapat digunakan dalam banyak macam pengujian.

Kekurangan metode ELISA antara lain :

1. Jenis antibodi yang dapat digunakan pada uji dengan teknik ELISA ini hanya jenis antibodi monoklonal (antibodi yang hanya mengenali satu antigen)

2. Harga antibodi monoklonal relatif lebih mahal daripada antibodi poliklonal, sehingga pengujian teknik ELISA ini membutuhkan biaya yang relatif mahal.
3. Pada beberapa macam teknik ELISA, dapat terjadi kesalahan pengujian akibat kontrol negatif yang menunjukkan respon positif yang disebabkan inefektivitas dari larutan *blocking* sehingga antibodi sekunder atau antigen asing dapat berinteraksi dengan antibodi bertaut enzim signal dan menimbulkan signal.
4. Reaksi antara enzim signal dan substrat berlangsung relatif cepat, sehingga pembacaan harus dilakukan dengan cepat (pada perkembangannya, hal ini dapat diatasi dengan memberikan larutan untuk menghentikan reaksi).

2.3.2 Macam-Macam Metode ELISA.

Dewasa ini, teknik ELISA telah berkembang menjadi berbagai macam jenis teknik. Perkembangan ini didasari pada tujuan dari dilakukannya uji dengan teknik ELISA tersebut sehingga dapat diperoleh hasil yang optimal. Berikut ini adalah beberapa macam teknik ELISA yang relatif sering digunakan, antara lain :

1. ELISA *Direct*

Teknik ELISA ini merupakan teknik ELISA yang sederhana, karena menggunakan suatu antibodi spesifik (monoklonal) untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi antigen pada sampel yang diuji.

2. ELISA *Indirect*

Teknik Elisa ini juga merupakan teknik ELISA yang sederhana, hanya saja dalam teknik ELISA *Indirect*

3. ELISA *Sandwich*

4. ELISA *Biotin Sterptavidin* (Jenis ELISA Modern)

5. ELISA Kompetitif

6. ELISA *Multiplex*

2.3.3 Kejadian perlakuan waktu pembacaan absorbansi

Komponen reagen yang terpenting dalam uji ELISA antara lain :

1. Immunosobent

Immunosorbent dalam uji ELISA adalah *well* atau wadah yang sudah dilapisi oleh antigen atau antibodi.

2. Konjugat

Konjugat merupakan antigen atau antibodi yang terikat dengan enzim

3. Substrat

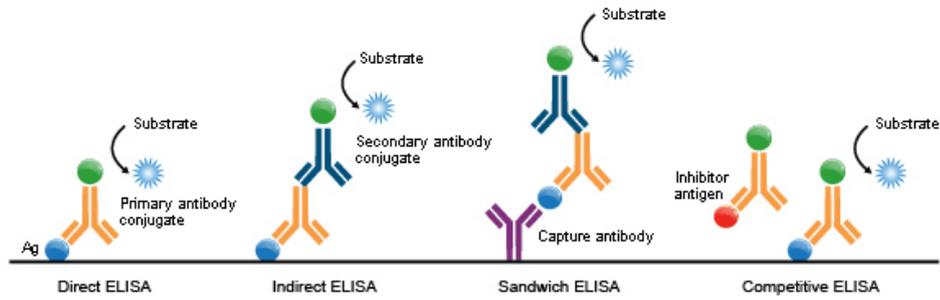
Substrat merupakan aktifitas kimiawi yang penambahannya dilakukan pada ruang gelap (tidak ada cahaya lampu), karena substrat sangat mudah terpengaruh oleh cahaya.

4. Kontrol

5. *Sample diluent*

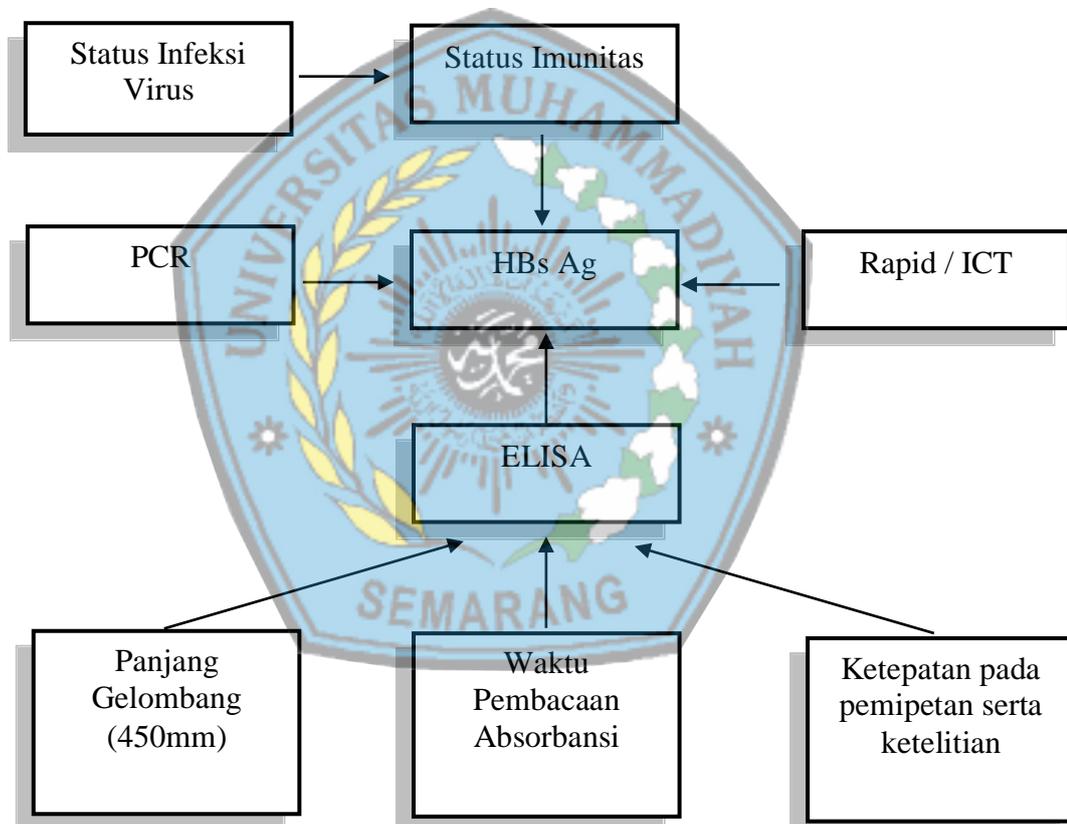
6. *Wash solution*

7. *Stop Solution*



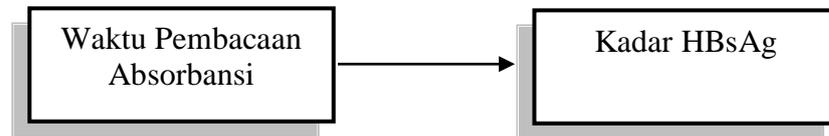
Gambar 2 : Macam – macam metode ELISA

2.4 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka teori perbandingan titer HBs Ag dengan variasi pembacaan absorbansi pada ELISA reader.

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka konsep perbandingan titer HBs Ag dengan variasi pembacaan absorbansi pada ELISA reader

2.6 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dipaparkan sebelumnya, hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Terdapat perbedaan titer HBsAg berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 20 menit dan 30 menit pada ELISA reader.
2. Terdapat perbedaan titer HBsAg berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 20 menit dan 40 menit pada ELISA reader.
3. Terdapat perbedaan titer HBsAg berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 30 menit dan 40 menit pada ELISA reader.
4. Terdapat perbedaan titer HBsAg berdasarkan waktu pembacaan absorbansi 20 menit, 30 menit dan 40 menit.