

# Artikel

## TINJAUAN KEPUSTAKAAN

# Biologi Molekuler Hepatitis C dan Aplikasi Diagnostiknya

Dr. Suwarso PhD

Laboratorium Patologi Klinik, Seksi Virologi-immunologi,  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### PENDAHULUAN

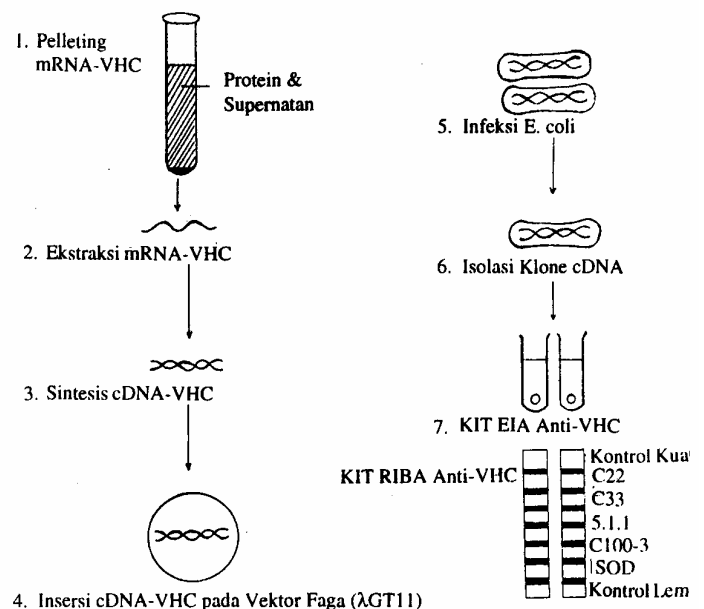
Sejak tersedianya test diagnostik (1975) untuk hepatitis virus A (HVA) dan hepatitis virus B (HVB), maka menjadi jelas bahwa mayoritas kasus hepatitis post-transfusi (HPT) tidak disebabkan oleh virus hepatitis A (VHA) ataupun B (VHB), juga tidak disebabkan oleh virus-virus hepatotropik lain seperti virus Cytomegalo (CMV) dan Epstein-Barr (EBV)<sup>(1)</sup>. Meskipun waktu itu nama virus hepatitis C (VHC) telah diusulkan untuk menggantikan nama HPT (HNANB = Hepatitis Non-A, Non-B)<sup>(2,3,4)</sup>, namun karena metode serologi konvensional yang digunakan (pada waktu itu merupakan satu-satunya metode yang diandalkan) tidak mampu mendeteksi adanya antigen atau antibodi virus penyebab, maka nama VHC usulan Choo et al. yang dapat diterima setelah mereka pada tahun 1989 secara rekombinan pada Bakteriofage  $\lambda$ gt 11 berhasil mengisolasi sebagian genom virus penyebab HPT dan regio NS4 yang mengkode pengkodean protein antigen 5.1.1 dan plasma penderita HNANB kronik<sup>(5)</sup>.

Kini seluruh genom dan protein antigen yang dikodonya telah berhasil diisolasi dan disintesis secara rekombinan pada vektor Bakteriofage atau Plasmid. Analisis serologik memperlihatkan bahwa antigen-antigen tersebut bereaksi dengan serum penderita HNANB dan sejak itu pula diketahui bahwa VHC merupakan penyebab pokok Karsinoma Hepatoseluler (KHS) di negara-negara maju seperti Amerika, Eropa, Jepang dan merupakan penyebab pokok untuk kasus-kasus Hepatitis Kriptogenik di Itali<sup>(5)</sup>.

Teknik rekombinan ini diawali dengan pengisolasian mRNA (sumber gen yang mengkode protein antigen VHC) yang ada dalam pelet dan plasma Chimpanzee yang bertiter infeksius tinggi ( $\geq 10^8$  CID/ml). Oleh enzim *Reverse Transcriptase*, dari setiap isolat mRNA niaterial infeksius akan dibentuk atau dikopi satu single strand DNA homolog atau DNA komple-

menternya (ss-cDNA). Seterusnya olekenzim DNA-Polimerase akan diproduksi banyak ss-cDNA yang secara spontan akan membentuk double-heliksnya (ds-cDNA). Kode-kode genetik pengkodean antigen VHC yang sekarang ada di ds-cDNA, selanjutnya direkonstruksi atau direkombinasi dengan fragmen DNA yang dapat bereplikasi dengan cepat yakni DNA dari vektor plasmid atau bakteriofage (? 1). Akhirnya dengan memasukkan vektor-vektor ini ke dalam jamur (*Saccharomyces cerevisiae*) atau bakteri inangnya (*E. coli*) akan dihasilkan klon-klon yang memproduksi protein antigen VHC dalam jumlah yang berlebihan (**Gambar 1**).

Gambar 1. Isolasi mRNA Virus Hepatitis C dan Pemproduksi KIT EIA/RIBA-Anti-VHC secara Rekombinan



Dipresentasikan pada simposium sehari tentang "Deteksi Awal & Penanggulangan Hepatitis B dan C dalam Peningkatan Sumber Daya Manusia". Solo (PAPDI). 18 Juni 1994.

Protein Antigen hasil rekayasa genetik (rekombinan) ini akhirnya digunakan sebagai alat untuk mendeteksi antibodi yang ada dalam sirkulasi darah penderita HVC, dapat secara ELISA (*Enzynze linked immunoassay*) atau RIBA (*Recombinant immunoblotassay*) (**Gambar 1**).

Mengingat bahwa VHC merupakan virus hepatitis yang pertama yang dapat dideteksi dengan cara molekuler biologi, maka dalam artikel ini akan diterangkan molekuler biologi VHC dan aplikasi diagnosis nya.

**STRUKTUR VIRION DAN SIFAT-SIFATNYA**

VHC merupakan virus yang berenvelope, yang menginfeksi sel hati dengan perubahan-perubahan tubuler sitoplasma. Dari studi filtrasi diketahui bahwa virion atau virus utuh yang menginduksi perubahan tubuler sitoplasma memiliki diameter < 80 nm<sup>(6)</sup> atau antara 30–60 nm<sup>(7)</sup>, dan dengan elektron mikroskop 36–62 nm<sup>(8)</sup>. *Buoyant density* virion yang diukur dengan gradien densitas sukrosa adalah 1,14–1,18 g/cm<sup>3</sup><sup>(8)</sup>, dan 1,30–1,36 g/cm<sup>3</sup> dengan CsCl<sup>(6)</sup>. Dari dan hasil analisis sedimentasi disimpulkan bahwa koefisien sedimentasi VHC <200S<sup>(8)</sup>.

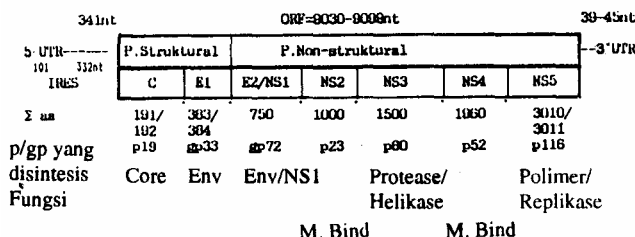
VHC merupakan virus yang berenvelope karenanya infeksiivitasnya dapat ditiadakan dengan pelarut-pelarut lemak seperti kloroform dan beta-Propiolakton atau dengan pemanasan 60°C selama 30 menit<sup>(6)</sup>.

**STRUKTUR DAN FUNGSI GENOM VIRUS**

Seperti terlihat pada gambar 2, VHC merupakan virus-virus *single strand* RNA (ss-RNA). Genomnya bertipe *positive-strand* RNA dengan panjang kurang lebih 9400 nukleotida (nt). Genom terbagi dalam tiga bagian: dua bagian berupa regio yang tidak ditranslasi (UTR = *untranslation regio*) yakni 5'-UTR di ujung 5, 3-UTR di ujung 3, dan satu bagian merupakan regio yang ditranslasi yang disebut *open reading frame* (ORF). Regio-regio yang tidak ditranslasi terletak pada kec ujung genom VHC, dengan demikian kedua UTR tersebut mengapit regio yang ditranslasi (ORF).

ORF memiliki panjang 9030–9099 nt (membentang mulai dan nt 342). Di dalam ORF inilah disimpan kode-kode genetik untuk peng sintesaan 7–9 protein antigen virus, berturut-turut adalah protein antigen struktural *core* dan struktural *envelope-1*, masing-masing disimpan di ORF di regio C dan E1; protein antigen non-struktural-1 atau *envelope-2* (NS1/E2), non-struktural-2, -3, -4 (4a, 4b) dan -5 (5a, 5b), masing-masing disimpan di regio NS1/E2, NS2, NS3, NS4 (NS4a, NS4b) dan NS5 (NS5a, NS5b)<sup>(9,10)</sup>. Keseluruhan protein antigen yang dikode oleh ORF ini tersusun dan 3010–3011 aa.

**Gambar 2. Susunan Genom Virus Hepatitis C dan Produk Antigennya**

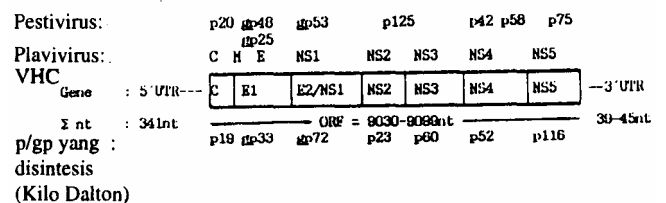


5-UTR merupakan bagian, genom VHC tempat proses pembacaan (translasi) kode-kode genetik dimulai. Dia memiliki panjang 341 nt dan merupakan rantai yang sangat *conserved*, artinya berbagai jenis genom VHC di berbagai negara (USA, Australia, Italia, Jepang, Argentina, Afrika Selatan dan Taiwan) memiliki rantai 5-UTR yang identik<sup>(11)</sup>. Lokasi 5-UTR tepat *upstream* (di depan) ORF, dan memiliki peranan yang sangat penting dalam proses replikasi atau peng sintesaan protein antigen virus. Di dalam replikasi atau peng sintesaan protein virus, 5-UTR berperan sebagai regulator (pengatur replikasi virus), hal ini didukung dengan sifat-sifatnya sangat *conserved*, letaknya yang direk *upstream* dan ORF, memiliki kodon-kodon inisiator AUG (kode-kode genetik untuk mengawali atau menginisiasi replikasi atau peng sintesaan protein antigen virus) dan memiliki kode-kode genetik untuk IRES (*internal ribosome entry site*) yakni kode-kode genetik yang memungkinkan mRNA virus berikatan dengan ribosom pembuat protein-protein (polipeptida) antigen virus di sel hati.

Letak IRES pada 5' UTR ini membentang dari nt 101–332, sedang codon inisiatornya (AUG) pada posisi nt 76 (AUG-76), 87 (AUG-87), 206 (AUG-206), 333 (AUG-333). Dari empat kodon inisiator yang dimiliki oleh VHC, ternyata kodon yang ke-IV, yang digunakan oleh VHC untuk mengawali replikasi atau peng sintesaan proteinnya. Hal ini dimungkinkan, sebab rantai 5'- dan 3'-UTR yang mengapit ORF mengandung berturut-turut struktur 'Cap' dan 'Poly-A', yang merupakan petunjuk bagi ribosom untuk memilih kodon AUG yang dapat digunakan sebagai *start-codon*, agar diperoleh peng sintesaan protein antigen virus yang efisien<sup>(12)</sup>.

Selanjutnya atas dasar kemiripan susunan regio struktural (C, E1) dan non-struktural (NS2-NSS), memperlihatkan bahwa genom VHC mirip dengan genom virus dan famili Plavi- atau Pesti-virus (**Gambar 3**). Hanya saja gp48 pada Pestivirus dan Protein M (Matriks) pada Plavivirus menghilangkan pada VHC. Dengan demikian masuk akal bahwa genom regmo struktural VHC adalah lebih pendek daripada genom regio struktural Pesti- dan Plavivirus. Sedang regio NS2-NS5 dari ketiga virus relatif memiliki panjang yang identik.

**Gambar 3. Struktur genom VHC dibanding dengan Plavi- dan Pestivirus.** gp = Glikoprotein, P = Protein, C = Core, M = Matriks, E = Envelope, NS=Non-struktural, aa= Asam amino, nt =Nukletida, 5' & 3' = untranslasi regio (UTR) (Modifikasi dari Choo. et.al. 1990).



**PROTEIN ANTIGEN VIRUS DAN ANTIBODINYA**

Protein (polipeptid) antigen virus yang dikode oleh ORF genom VHC kini secara rekombinan telah dapat dipurifikasi dan

ditentukan masing-masing arti klinisnya. Protein antigen *core* yang berhasil dipurifikasi adalah GOR, CP9, JCC, Po dan C22-3. Aspek klinis antibodi yang ditujukan pada antigen-antigen ini merupakan petanda (*marker*) infeksius. Kecuali antibodi terhadap antigen GOR, antibodi-antibodi terhadap antigen-antigen *core* lainnya hampir 90% dapat terdeteksi dalam sirkulasi darah penderita HVC kronis, dan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) umumnya dapat diketahui bahwa serum-serum mereka memiliki RNA-VHC (Gambar 4). Peran antibodi terhadap antigen-antigen *core* ini adalah membantu diagnosis VHC pada kasus-kasus anti-C 100-3 (Ab terhadap antigen NS3-NS4) negatif, yang pendeteksian RNA-VHC belum dikerjakan. Kecuali antigen GOR, peng sintesaan antigen CP9, JCC, Po dan C22-3 ada di bawah pengaruh kode-kode genetik yang ada di dalam regio C dan ORF genom VHC. Antigen GOR merupakan auto-antigen sintetik yang dikode oleh rantai genom sel hospes dan tampaknya dia merupakan antigen nuklear sel hospes.

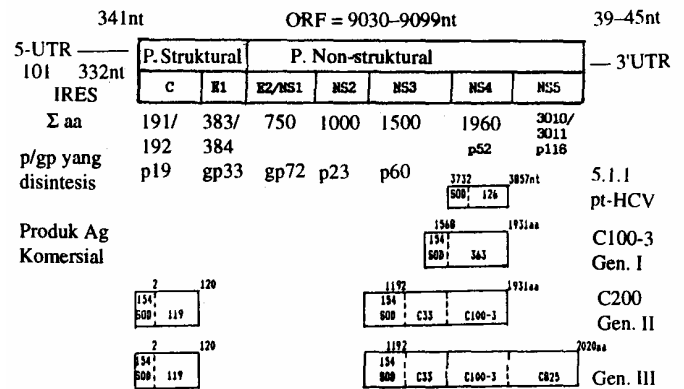
Protein Envelope-i merupakan protein yang terglykosilasi (Glikoprotein =gp)dengan beratmolekul 33 Kilo Dalton (gp33), dikode oleh regio E1. Protein ini merupakan selubung terluar VHC dan dinominasikan merupakan antigen yang dapat menginduksi antibodi yang dapat menetralkan virus. Dengan demikian merupakan novel antigen untuk mengembangkan vaksin.

Protein E2/NS1 juga merupakan protein yang terglykosilasi dengan berat molekul 72 Kilo Dalton (gp72), dikode oleh regio E2/NS 1 dan genom VHC. Protein ini merupakan selubung kedua seperti pestivirus, atau protein npn-struktural- 1 terluar seperti Plavivirus. Adanya regio yang hypervariable pada regio E2/NS1, ini menandakan bahwa protein atau antigen yang dikodenyanya merupakan protein atau antigen yang dapat menginduksi antibodi yang dapat menetralkan virus. Tapi nyatanya antibodi terhadap antigen-E2 (Anti-E2) ini, lebih dan 50% terdeteksi pada penderita-penderita HVC kronik, dan menghilang pada penderita-penderita HVC yang berespon terhadap terapi interferon (Yokosuka et al. 1993). Dengan demikian antibodi-E2 merupakan *marker* replikasi VHC.

Protein NS2, NS3, NS4 dan NS5 merupakan protein non-struktural dengan berat molekul berturut-turut 23kd (p23), 60kd (p60), 52kd (p52) dan 116kd (p116), dikode berturut-turut oleh regio NS2, NS3, NS4 dan NS5 genom VHC. p23 dan p52 memiliki fungsi membran binding, p60 merupakan enzim protease/helikase yang digunakan untuk sintesa protein virus, sedang p116 merupakan enzim polimerase/reflikase yang berfungsi di dalam reflikasi genom VHC (Gambar 2). Sebagai alat diagnostik, produk antigen-antigen yang dikode oleh regio ini telah tersedia secara komersial, dan dan Kit-diagnostik generasi lama ke generasi yang lebih baru sensitivitas dan spesifisitasnya selalu ditingkatkan dengan cara mengkombi nasikan antigen-antigen ini. Pada EIA-Anti-HCV generasi-I, yakni EIA untuk mendeteksi adanyaanti-HCV-C100-3 digunakan kombinasi protein antigen yang berhasil diisolasi oleh Choo et al. yakni Ag 5.1.1 (Ag yang dikode oleh regio NS4) dengan protein antigen yang dikode oleh sebagian regio NS3; Pada EIA generasi-II yakni EIA untuk mendeteksi antibodi-HCV-C200, protein antigen yang dikombinasikan pada Ag 5.1.1 tidak hanya protein Ag yang dikode oleh

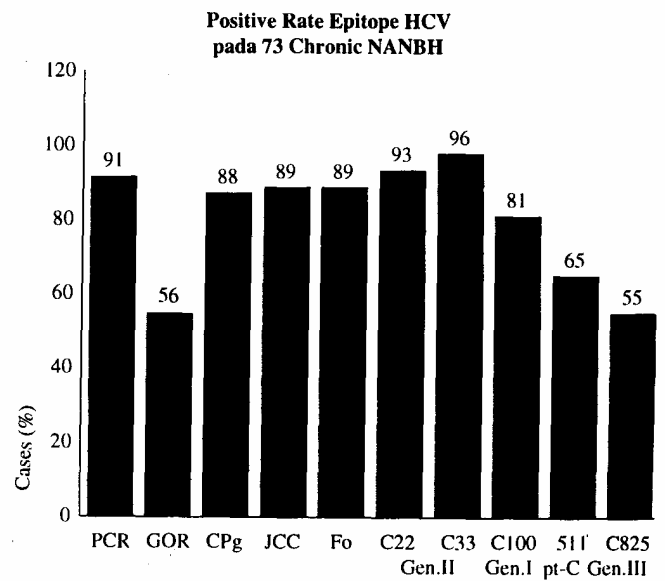
sebagian regio NS3, tapi sudah dengan protein Ag yang dikode oleh seluruh regio NS3 dan akhirnya pada EIA generasi terbaru/generasi-III (mendeteksi adanya anti-HCV-C825) protein Ag yang dikode oleh regio NS5 ditambahkan (Gambar 4).

Gambar 4. Susunan Genom Virus Hepatitis C dan Produk Antigen Komersialnya



Antibodi-antibodi terhadap protein-protein antigen ini merupakan *marker* infeksius, sebab banyak terdapat pada penderita-penderita HVC kronik (Gambar 5).

Gambar 5. Positive rate epitope HCV dengan test konfirmasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Modifikasi dari Yatsuhashi et al.(1993).



### TIBE, SUB-TIBE DAN DISTRIBUSI VIRUS

Sejak genom VHC berhasil dianalisis<sup>(5)</sup>. Kini minimal di dunia secara genotipeada 7 tipe pokok VHC, yakni VHC I-VII (Tabel 1). Masing-masing tipe berdasarkan pada persamaan (homolog) nukleotida yang menyusun regio genomnya (homolog nt <72% signifikan berbeda) kemudian dapat dibagi lagi ke dalam 2-3 sub tipe (a-c). Prevalensi sub-tipe tampak ber-

variasi antara daerah geografik yang berbeda. VHC-I (subtipe 1a) yang berhasil diisolasi dan chimpanzee yang diinfeksi oleh faktor VIII konsentrat yang menyebabkan HNANB pada resipiennya (penderita hemofilia) banyak terdapat di USA, Australia dan negara-negara Eropa Barat. VHC-I (1a) ini umumnya merupakan VHC yang ditemukan pada penderita-penderita hemodialisis. VHC- 1a tidak diketemukan pada 52 penderita hepatitis kronik dan sirosis hati, tapi sebaliknya umum pada penderita-penderita yang dihemodialisis<sup>(9)</sup>. Di Yogyakarta kami menemukan bahwa VHC-subtipe-1a merupakan VHC yang mayoritas terdapat pada pasien-pasien hemodialisis<sup>(10)</sup>. VHC-II (1b) banyak terdapat di Jepang, Korea, Taiwan, China, dan di Indonesia merupakan subtipe yang paling umum ditemukan (48%) pada penderita-penderita penyakit hati kronis dan umumnya merupakan subtipe yang berespon jelek terhadap terapi interferon. Sub-tipe Ic (HC-G9, Td-6?), sejauh ini merupakan subtipe yang spesifik ada di Indonesia; Subtipe ini lebih banyak ditemukan pada penderita-penderita sirosis hati dan pada hepatitis kronis (34% vs 20%). VHC-III (2a) dan IV (2b) merupakan VHC yang berespon baik terhadap Interferon. Tipe 2a banyak terdapat di Jepang dan di Indonesia tercatat >20% sebaliknya tipe 2b terdapat di Jepang dan tidak ditemukan di Indonesia. VHC-V (3a) di Thailand, Inggris, Brazil dan sejauh ini tidak ada di Indonesia, VHC-VI (3b) di Thailand dan Jepang, VHC-VII (4a) di Afrika Selatan<sup>(9)</sup>.

**Tabel 1. Tipe dan Subtipe VHC**

Tipe	Subtipe	Genotipe	Isolat	Keterangan
1	A	I	USA	Hemodialisis
	B	II	Eropa	
			Australia Indonesia	
2	C	III	Jepang	Hepatitis kronis Kebal interferon
	A		Korea	
			Taiwan China Indonesia	
3	B	IV	Indonesia	Sirosis hati Peka interferon
	A		Jepang	
			Indonesia	
4	B	VI	Jepang	Peka interferon
	A		V	
			Thailand Inggris Brazil	
4	B	VII	Thailand	Afrika Selatan
			Jepang	

Telah diketahui bahwa virus-virus RNA mudah sekali untuk mutasi secara spontan<sup>(13)</sup>. Karenanya masuk akal jika perbedaan tipe dan virulensi ini muncul pada VHC. Adanya perbedaan tipe ini karena di antara VHC yang berhasil diisolasi memiliki perbedaan panjang atau adanya substitusi pada jumlah nukleotida yang menyusun rantai genomnya (tapi dan kebanyakan isolat yang ada, hanya regio *Core* dan NS3 yang konservasi). Selanjutnya perbedaan subtipe ini memegang peran pula dalam berat ringannya hepatitis dan respon terhadap terapi interferon.

Aspek klinis lain dengan adanya subtipe adalah timbulnya infeksi multipel, yakni satu individu mengalami infeksi berulang oleh VHC. Jadi adanya infeksi multipel pada seseorang perlu mendapat perhatian yang serius, sebab mayoritas (>50%) individu yang terinfeksi oleh VHC dengan beda tipe, penyakitnya akan berjalan kronis dan umumnya di dalam tubuh penderita ini akan terdeteksi lebih dari satu tipe VHC.

Mengingat bahwa awal timbulnya kasus dan terdeteksinya VHC adalah dan pemakaian darah dan produk-produknya seperti faktor-faktor pembekuan yang biasa digunakan pada kasus-kasus hemophilia, immunoglobulin yang diberikan untuk kasus-kasus immunisasi pasif, dan bahkan vaksin-vaksin yang berasal dari donor plasma, pemakaian bahan-bahan ini perlu lebih selektif.

#### KEPUSTAKAAN

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. N. Engl. J. Med. 1975; 292: 767-70.
2. Prince AM, Brotman B, Grady GF et al. Long incubation posttransfusion without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. Lancet 1974; 2: 241-246.
3. Shirachi R, Tateda A, Shiraishi H, Kikuchi K, Ishida N. "Hepatitis C" antigen in NANB-postransfusion hepatitis. Lancet 1978; 2: 853-856.
4. Villarejos VM, Provovs PJ, Ittensohn OL, McLean AA, Hilleman MR. Seroprevalence investigations of human hepatitis caused by A, B and a possible third virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1976; 152: 524-528.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne NANB-viral hepatitis genome. Science. 1989; 244: 359-62.
6. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Eberti W, Maynard JE. Posttransfusion NANBH in Chimpanzees: Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is small, enveloped virus. Gastroenterol. 1985; 88: 773-79.
7. He LF, Ailing D, Popkin T, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. J. Infect. Dis. 1978; 156: 636-40.
8. Hollinger FB. Non-A, non-B hepatitis viruses. In: Field BN, Knipe DM. Eds. Virology, second ed. Vol. 2. New York: Raven Press 1990; 2: 2239-2273.
9. Hotta H., Handajani R, Lusida MI, Widawati, Doi H, Miyajima H, Homma M. Subtype analysis of hepatitis C virus in Indonesia on the basis of NS5b region sequences. 2nd Nat Congr Indonesian Society for Clinical Pathology (PDS PATKLIN), Surabaya Januari, 29-31, 1994.
10. Hotta H, Doi H, Hayashi T, Mariyam, Lusida INI, Widawati, Homma M. Sequence analysis of hepatitis C virus obtained from Indonesia patients and identification of novel sequence variants. Viral Hepatitis and Liver Disease. 1994 (in press).
11. Hari JH, Shyamala V, Richman KH et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C virus RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88: 1711-15.
12. Kohara KT, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. J. Virol. 1992; 66: 1476-1483.
13. Domingo E, Martinez-Salas E et al. The Quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: Biological relevance-a review. Gene 1985; 40: 1-8.
14. Yatsuhashi H, Inokuchi K, Inoue O et al. The clinical significance of reactivity to individual epitopes of the hepatitis C viral genome. Gastroenterol. Jpn. 1993; 28. (Suppl. 5): 6-11.