

DETEKSI VIRUS HEPATITIS G BERDASAR DAERAH GENOMA NS3 PADA PENDERITA THALASEMIA

Indeswati Diyatri^{*,*}, Retno Handajani^{***,*}, Soetjipto^{***,*}

ABSTRACT

DETECTION OF HGV RNA BASED ON NS3 GENOME AMONG THALASSEMIA PATIENTS BY PCR

Hepatitis G Virus (HGV) are positive, single stranded RNA, as are those of members of *Flaviviridae*. HGV has been reported as an etiologic agent of post transfusion viral hepatitis. Infection with HGV can be diagnosed by RNA detection by PCR with nested primers deduced from the nonstructural-3 (NS3) region.

Thalassemia patients is a high risk group patients infected with HGV because usually they need multiple transfusions.

In this study we determined HGV RNA by using PCR technique from 10 Thalassemia patients sera. HGV RNA was detected in 5 of 10 (50%) sera from Thalassemia patients. The result of this study seems higher compared with the results from other researchers; it might be caused by the sample size of this study is not quiet enough. Further investigations is needed to investigate the real prevalence of HGV RNA infections among Thalassemia patients.

Keywords: *Detection of HGV, NS3 genome, Thalassemia patients*

* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

** Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

*** Tropical Disease Center Universitas Airlangga

PENDAHULUAN

Walaupun telah banyak dikemukakan bahwa Virus Hepatitis C (VHC) adalah penyebab utama hepatitis pasca transfusi maupun hepatitis karena virus Non-A, Non-B di dunia, namun masih diperlukan penelitian lebih lanjut, mengingat kemungkinan adanya virus-virus penyebab hepatitis selain virus hepatitis A, B, C, D dan E. Baru-baru ini, 2 kelompok studi yang berbeda berhasil mengidentifikasi virus baru penyebab hepatitis, yaitu virus GB tipe C (GBV-C) dan Virus Hepatitis G (VHG). Kedua virus ini diperoleh dari penderita hepatitis yang disebabkan karena virus. Analisis sekuens kedua virus ini menunjukkan bahwa kedua virus ini merupakan isolat yang berbeda dari virus yang sama. Untuk selanjutnya, virus ini disebut VHG. (Leary *et al.*, 1996; Linnen *et al.*, 1996).

VHG termasuk famili Flaviviridae, merupakan suatu virus RNA yang utas positif dengan panjang nukleotida sekitar 9400 basa dan mempunyai daerah *Open Reading Frame* (ORF) yang mengkode suatu poliprotein yang terdiri dari sekitar 2900 asam amino. Struktur genom VHG sebagaimana virus famili Flaviviridae lainnya, terdiri dari 5'UTR, gen-gen yang mengkode protein-protein struktural dan nonstruktural serta 3'UTR, namun daerah gen yang mengkode daerah protein *core* dari VHG hampir tidak didapatkan. (Feucht *et al.*, 1997; Linnen *et al.*, 1996).

Tidak seperti VHC yang mempunyai daerah 5'UTR yang *conserved*, 5'UTR dari VHG tidaklah terlalu *conserved*. Pada daerah NS3 VHG didapatkan daerah yang *conserved*, sehingga sangat baik untuk dipilih sebagai primer. Primer-primer ini kemudian dapat digunakan untuk mengamplifikasi rangkaian nukleotida virus VHG, dalam usaha mendeteksi keberadaan RNA virus tersebut di dalam darah. (Feucht *et al.*, 1997; Linnen *et al.*, 1996).

Adanya RNA VHG menandakan bahwa infeksi VHG sedang aktif pada penderita. Amplifikasi asam nukleat virus dengan PCR merupakan metode yang sangat sensitif dan tidak tergantung antigen-antibodi untuk mendeteksi adanya infeksi virus yang sedang berlangsung. Hasil pemeriksaan PCR yang positif merupakan petunjuk yang kuat dari produksi virus yang sedang aktif dalam tubuh. Dikemukakan bahwa dengan *Reverse Transcription* dan amplifikasi cDNA VHG dengan metoda PCR, RNA VHG dalam serum sudah dapat dideteksi lebih dini. Jadi deteksi RNA VHG masih tetap merupakan pilihan untuk mendeteksi adanya infeksi VHG yang sedang berlangsung, mengingat kit komersial untuk deteksi anti-VHG belum beredar di pasaran.

Seperti halnya VHC, VHG terutama ditularkan secara parenteral melalui transfusi darah dan komponen darah, pemakaian jarum suntik atau alat yang tercemar VHG. Selain itu VHG juga ditularkan secara sporadik. Untuk golongan yang mempunyai risiko tinggi tertular VHG adalah mereka yang menerima transfusi darah dan komponen darah berulang kali, penderita yang sedang menjalani hemodialisis, penderita yang sering mendapatkan suntikan obat-obatan secara intra vena dan petugas kesehatan yang banyak berhubungan dengan darah. (Feucht *et al.*, 1997; Linnen *et al.*, 1996).

Infeksi VHG pada penderita hepatitis dapat bersama-sama virus hepatitis yang lain. Tingkat keparahan hepatitis yang terjadi akibat infeksi VHG masih kontroversial. Hasil penelitian sebagian peneliti menyebutkan bahwa VHG dapat menyebabkan infeksi hepatitis yang berat/*fulminant* dan peneliti lainnya mengemukakan bahwa VHG tidak memperberat perjalanan penyakit hepatitis. Sampai saat ini peran VHG dalam memperberat perjalanan penyakit hepatitis masih diperdebatkan. (Yoshida *et al.*, 1995).

Thalasemia merupakan suatu kelainan genetik yang paling banyak dijumpai di Indonesia, dengan gejala anemia ringan sampai berat dan sampai sekarang belum dapat diterapi kausal selain dengan transfusi darah. Maka penderita thalasemia merupakan kelompok dengan risiko tinggi untuk tertular VHG (Notopuro, 2000).

Penelitian isolasi VHG dengan PCR pada donor darah dan penderita penyakit hati telah membuktikan adanya virus ini di Indonesia. (Handayani dkk, 1994/1995 dan 1995/1996) Mengingat thalasemia merupakan suatu kelainan genetik yang paling banyak dijumpai di Indonesia dan sampai sekarang belum dapat diterapi kausal selain dengan transfusi darah, sedangkan penelitian dengan deteksi viremia VHG dengan PCR pada penderita thalasemia belum pernah dilakukan, maka dirasakan perlu melakukan deteksi viremia VHG pada penderita thalasemia.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk pertimbangan lebih lanjut dalam upaya pencegahan dan pengendalian penularan infeksi VHG pada pengelolaan penderita thalasemia maupun dari sudut pandang kondisi viremia VHG pada penderita thalasemia yang merupakan sumber penularan di dalam keluarga perlu diwaspadai.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan deteksi viremia Virus Hepatitis G (VHG) pada penderita thalasemia, mengingat deteksi viremia VHG pada penderita thalasemia belum pernah dilakukan di Indonesia pada umumnya dan di Surabaya pada khususnya.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan *Cross sectional study*. Sampel darah diambil dari 10 penderita dengan diagnosis thalasemia β yang berobat di Poliklinik Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Diagnosis dilakukan oleh dokter ahli ilmu kesehatan anak yang bertugas di poli klinik rumah sakit tersebut.

Contoh darah yang telah diambil, ditempatkan dalam tabung pemusing untuk mendapatkan serumnya. Serum yang telah dipisah, dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf steril ukuran 1,5 ml secara steril pula dan disimpan pada -80°C sampai saat pemeriksaan RNA VHГ dilakukan.

RNA VHГ diperiksa dengan teknik PCR. Pemeriksaan PCR di sini berdasarkan pada regio NS3 dari genomа VHГ oleh karena regio NS3 merupakan regio yang *conserved* dari VHГ. Adanya RNA VHГ dalam serum dapat dideteksi dengan reaksi *reverse transcription* yang dilanjutkan dengan *nested* PCR dengan tahap-tahap reaksi:

1. Ekstraksi RNA VHГ dari serum: RNA VHГ diekstraksi dari serum dengan menggunakan larutan Trizol yang mengandung phenol. Dalam proses ekstraksi ini juga digunakan kloroform, larutan 3 M sodium asetat (pH 5,2), etanol dan akuades;
2. Sintesis cDNA dari RNA VHГ: pada RNA VHГ dilakukan *reverse transcription* menjadi *complementary DNA* (cDNA). Dalam proses ini digunakan campuran dari: a) larutan dapar Reverse Transcription 10 X; b) enzim Ribonuklease Inhibitor; c) enzim Reverse Transcriptase; d) larutan dNTPs; e) Random primer (heksamer). Sebelum dicampur dengan campuran tersebut di atas, larutan RNA diinkubasikan 65°C selama 3 menit, sesudah dicampur, diinkubasi lagi 42°C selama 60 menit.
3. Reaksi amplifikasi dengan PCR: untuk reaksi amplifikasi cDNA VHГ ini, dilakukan *nested* PCR tahap I dan tahap II, digunakan: a) larutan dapar Tth 10 X; b) enzim Tth DNA Polymerase; c) larutan dNTPs; d) primer GB1 (sense; 5'-ATCCCCTTTTATGGGCATGG-3') pada nukleotida 4269 - 4288 dan GB2 (antisense; 5'-TCTTTGATGAT GGAAGTGTG-3') pada nukleotida 4416 - 4435 untuk PCR I; e) primer GB3 (sense; 5'-CATCCAAGGCGGAGTGCAG-3') pada nukleotida 4335 - 4354 dan GB4 (antisense; 5'- TCTTTACCCC TATAATAGGC-3') pada nukleotida 4398 - 4417 untuk PCR II.

Urutan primer GB1, GB2, GB3 dan GB4 (Katayama *et al.*, 1997) diambil dari daerah genomа NS3 VHГ yang sangat *conserved*, sehingga dapat diharapkan tingkat keberhasilan PCR yang tinggi. PCR tahap I dan II

- masing-masing dikerjakan sebanyak 35 siklus dan digunakan suhu: a) 94° C untuk denaturasi, 1 menit; b) 45° C untuk annealing, 1,5 menit; dan c) 72° C untuk ekstensi, 2 menit.
4. Elektroforesis agar: pada hasil amplifikasi cDNA dari RNA VHГ dilakukan elektroforesis dengan menggunakan agarosa 3% dalam larutan dapar TBE 0,5 X yang mengandung ethidium bromide. cDNA VHГ dari sampel-sampel, kontrol negatif (digunakan akuades), kontrol positif serta marka ($\varnothing$ x 174)/Hae III digest) yang sudah diseparaasi dapat dilihat di bawah sinar ultraviolet.
 5. Pembuatan foto dari hasil gel elektroforesis: untuk dokumentasi hasil elektroforesis, dilakukan pengambilan foto dengan menggunakan Polaroid Polapan 3200 B.

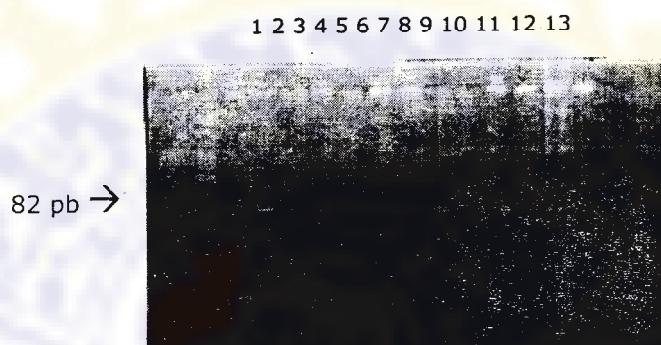
HASIL DAN PEMBAHASAN

Saat ini deteksi infeksi VHГ dapat dilakukan dengan teknik PCR untuk mendeteksi RNA VHГ dan belum ada pemeriksaan serologik untuk deteksi antibodi anti-VHГ yang memuaskan karena infeksi VHГ tidak menunjukkan respon imun yang konsisten. Pemilihan penderita Thalasemia sebagai kelompok sampel dalam penelitian ini adalah karena penderita Thalasemia merupakan salah satu kelompok yang dalam kaitan dengan penyakitnya membutuhkan transfusi darah berulang sehingga tergolong kelompok yang mempunyai risiko tinggi untuk tertular VHГ.

Dari hasil penelitian tentang deteksi virus hepatitis G dari daerah genom NS3 pada penderita Thalasemia ini didapatkan 5 dari 10 sampel serum memberikan hasil pemeriksaan RNA VHГ yang positif.

Hasil yang didapatkan ini berbeda dengan penelitian tentang prevalensi RNA VHГ pada penderita Thalasemia yang dilakukan oleh beberapa peneliti di luar negeri. Zemel *et al.*, (1998), mendapatkan prevalensi sebesar 19,4% dan Yu *et al.*, (2000) sebesar 27%. Prevalensi infeksi VHГ yang dihasilkan oleh para peneliti lain pada populasi yang berbeda juga memberikan hasil yang lebih rendah. Alter *et al.*, (1997)) mendapatkan prevalensi RNA VHГ pada 7 dari 500 (1,4%) donor darah, Wu *et al.*, (1997) sebanyak 1 dari 50 (2%) donor darah, Stark *et al.*, (1996) sebesar 2% donor darah dan Linnen *et al.*, (1996) sebesar 3 dari 779 (1,7%) donor darah. Peneliti lain yaitu Loiseau *et al.*, (1997) mendeteksi RNA VHГ pada 21 dari 500 (4,2%) donor darah dan 21 dari 196 (10,7%) pada penderita yang tidak mempunyai gangguan imunitas yang mendapatkan transfusi berulang. Sedangkan Feucht *et al.*, (1997) mendapatkan prevalensi RNA VHГ sebesar

12 dari 57 (21,1%) pada penerima transfusi darah. Sebagian besar penderita yang terinfeksi oleh VHG menunjukkan kadar ALT yang normal.



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dari RNA VHG pada penderita Thalasemia. 1: marka (ϕ x 174 / Hae III digest); 2 : kontrol negatif; 3 : kontrol positif; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13: sampel, hasil yang positif ditunjukkan dengan pita yang sejajar dengan kontrol positif (82 pb).

Tampak bahwa angka yang didapat pada penelitian ini dibandingkan dengan data-data yang tersebut di atas jauh lebih besar (50%). Hal ini belum dapat dikatakan menunjukkan prevalensi RNA VHG pada penderita Thalasemia mengingat kecilnya jumlah sampel dalam penelitian ini. Untuk mendapatkan prevalensi RNA VHG yang lebih akurat pada penderita Thalasemia diperlukan penelitian lebih lanjut yang melibatkan sampel dalam jumlah yang lebih banyak.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian Deteksi Virus Hepatitis G berdasar daerah Genom NS3 pada penderita Thalasemia sebagai kelompok individu dengan risiko tinggi tertular infeksi VHG didapatkan hasil 5 dari 10 (50%) penderita Thalasemia terinfeksi oleh VHG.

Untuk mengetahui prevalensi RNA VHG pada penderita Thalasemia diusulkan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melibatkan jumlah sampel yang lebih banyak. Mengingat ditemukannya RNA VHG pada penderita Thalasemia yang cukup tinggi pada penelitian ini, maka perlu dilakukan upaya-upaya untuk mencegah penularan VHG melalui transfusi darah yang antara lain dapat dilakukan skrining RNA VHG pada

donor darah. Namun kendala yang dihadapi sampai saat ini adalah belum adanya pemeriksaan serologis untuk deteksi antibodi anti-VHG yang merupakan parameter bahwa seseorang pernah terpapar oleh VHG. Perlu dikembangkan pemeriksaan VHG secara serologik sebab pemeriksaan RNA VHG dengan teknik PCR memerlukan dana yang cukup besar yang tidak mungkin dilaksanakan untuk skrining masal.

DAFTAR PUSTAKA

- Alter, MJ., Nakatsuji Y., Melpolder J., Wages J., Wisley R., Shih JW., and Kim JP. 1997. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl. J. Med.*; 13; 336(11): 747-54.
- Feucht, HH., Zolner, B., Polywka, S., Knodler, B., Schroter, M., Nolte, H., and Laufs, R. 1997. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver diseases, and persons that at risk for Parenteral Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 35: 767-768.
- Handayani, R., Soemarto, R., Suryohudoyo, P., Soetjipto, Lusida, ML., Metraniasih, NM., Adi, P., Nidon, CA. (Rangkuman Penelitian Tahun Pertama dan Tahun kedua, 1994/1995 dan 1995/1996) Studi Genotipe Virus Hepatitis C di Indonesia. Tropical Disease Research Center, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Katayama, Y., Apichartpiyakul, C., Handajani, R., Ishido, S., and Hotta, H. 1997. GB virus C/hepatitis G (GBV-C/HGV) infection in Chiang Mai, Thailand, and identification of variants on the basis of 5'-untranslated region sequences. *Arch. Virol.* 142: 2433-2445.
- Leary, TP., Muerhoff, AS., Simons, JN., Piolt-Matis, TJ., Erker, JC., Chalmers, ML., Schlauder, GG., Dawson, GJ., Desai, SM., and Mushahwar, IK. 1996. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the Flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J. Med. Virol.* 48: 60-67.
- Linnen, J., Wages Jr., J., Zhang-Keck, ZY., Fry, KE., Krawczynski, KZ., Alter, H., Koonin, E., Ballagher, M., Alter, M., Hadziyannis, S., Karayiannis, P., Fung, K., Nakatsuji, Y., Shih, JWK., Young, L., Piatak Jr., M., Hoover, C., Fernandez, J., Chen, S., Zou, J-C., Morris, T., Hyams, KC., Ismay, S., Lifson, JD., Hess, G., Fong, SKH., Thomas, H., Bradley, D., Margolis, H., and Kim, JP. 1996. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*. 271:505-508.
- Loiseau P., Mariotti M., Corbi C., Ravera N., Girot R., Thauvin M., Porlette E., Mariette X., Roudot-Thoraval F., Benbunan M., and Lefrere JJ. 1997. Prevalence of hepatitis G virus RNA in French blood donor and recipients. *Transfusion*, 37(6): 645-50.
- Nigro, G., Taliani, G., Bartmann, U., Vitolo, R., Perrone, Y., Mattia, S., Pisano, P., Petrucellia, Maizi, S., and Midulla, M. 1992. Hepatitis in children with thalassemia major. *Arch. Virol. (Suppl)* 4: 265-267.
- Notopuro, H. 2000. Analisis molekuler variasi genetik talasemia di RSUD Dr. Soetomo. (Disertasi), Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga - Surabaya

- Stark K., Bienzle U., Hess G., Engel AM., Hegenscheid B., and Schluter V. 1996. Detection of the hepatitis G virus genome among injecting drug users, homosexual and bisexual men, and blood donors. *174*(6): 1320-3.
- Wu, RR., Mizokami, M., Cao, K., Nakano, T., Ge, XM., Wang, SS., Orito, E., Ohba, K., Mukaide, M., Hikiji, K., Lau, JYN., Iino, S. 1997. GB virus C/hepatitis G virus infection in southern China. *J. Infect. Dis.* 175: 168-171.
- Yoshida, M., Okamoto, H. and Mishiro, S. 1995. Detection of the GBV-C hepatitis virus genome in serum from patients with fulminant hepatitis of unknown aetiology. *Lancet.* 346: 1131-1132.
- Yu ML., Chuang WL., Wang LY., Dai CY., Chiou SS., Sung MH., Chang CS., Chen SC., Wang CS., Chang TT., and Chang WY. 2000. Status and natural course of GB virus C/hepatitis G virus infection among high-risk groups and volunteer blood donors in Taiwan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15(12): 1404-10.
- Zemel R., Dickman R., Tamary H., Bukh J., Zaizov R., and Tur-Kaspa R. 1998. Viremia, genetic heterogeneity, and immunity to hepatitis G/GB-C virus in multiply transfused patients with thalassemia. *Transfusion*, 38(3): 301-6.
-