

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analitik dengan desain *cross-sectional*, yaitu untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan distribusi genotipe dan sub tipe VHB pada berbagai manifestasi klinis hepatitis B kronis.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini berlangsung selama 10 bulan. Penjaringan penderita hepatitis B kronik aktif, sirosis dan HCC dilakukan di salah satu praktek dokter ahli penyakit dalam dan beberapa rumah sakit di Pekanbaru, sedangkan kelompok donor darah dijaring di Palang Merah Indonesia (PMI) Cabang Pekanbaru yaitu donor darah dengan hasil pemeriksaan HBsAg positif. Selanjutnya dilakukan pengambilan darah pada setiap subyek penelitian untuk selanjutnya dibawa ke Laboratorium Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Riau untuk dilakukan pemeriksaan lebih lanjut.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah seluruh penderita hepatitis B kronis yang ada di Pekanbaru. Sampel penelitian ini diperoleh berdasarkan metode *sampling from consecutive admissions* yang terdiri dari donor darah, hepatitis B kronik aktif, sirosis dan hepatoma. Seluruh subyek penelitian terlebih dahulu menandatangani *inform consent* sebelum dilibatkan dalam penelitian ini.

Definisi operasional penelitian :

1. Donor darah adalah darah yang dijaring melalui Palang Merah Indonesia Cabang Pekanbaru dengan hasil pemeriksaan HBsAg positif. Pemeriksaan HBsAg di PMI dilakukan dengan metode *immunochromatography*.

2. Penderita hepatitis B kronis aktif adalah penderita yang terdeteksi HBsAg positif selama lebih dari 6 bulan dan disertai peningkatan kadar enzim transaminase serum.
3. Penderita HCC dan sirosis didiagnosis berdasarkan gambaran klinis, *Ultrasonography* (USG), dan pemeriksaan seromarker penanda tumor seperti α -feto protein (AFP) dan alkalin fosfatase.
4. Genotipe VHB adalah variasi genetik VHB yang ditentukan berdasarkan analisis gen S VHB, yang terdiri dari genotipe A, B, C, D, E, F, G, H
5. Subtipe VHB adalah serotipe HBsAg yang ditentukan berdasarkan analisis asam amino pada posisi 122 dan 160, yaitu terdiri dari adw, ayw, adr dan ayr.

3.4 Cara Kerja

Pengumpulan Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa serum penderita hepatitis B kronis diperoleh dari pemisahan darah tanpa antikoagulan menggunakan metode sentrifugasi. Selanjutnya serum disimpan pada suhu -20°C sampai proses pemeriksaan selanjutnya.

Isolasi DNA VHB

VHB diisolasi dari serum sampel dengan menggunakan DNA-zol (Invitrogen). Mula-mula 100 μl serum dimasukkan dalam 1000 μl DNA-zol, lalu divorteks dengan kecepatan penuh selama 2 menit. Selanjutnya ditambahkan isopropanolol dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 6 menit. Supernatan yang ada dibuang dan DNA dipresipitasi dengan menambahkan etanol 75%. Presipitat DNA VHB dilarutkan kembali dalam 50 μl aquabides.

Amplifikasi DNA VHB

Amplifikasi DNA VHB dilakukan dengan menggunakan bagian dari gen S dengan metode nested *polymerase chain reaction* (nested PCR). Pada PCR putaran pertama digunakan *primer forward* P7 (5'-GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC-3' ; posisi 256-278) dan *primer*

reverse P8 (5'-CGG TAT AAA GGG ACT CAG GAT-3' ; posisi 796-776) yang akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 540 *base pairs* (bp). Jika tahap pertama amplifikasi PCR negatif, maka dilakukan PCR tahap kedua dengan *primer forward* HBS1 (5'-CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG-3'; posisi 455-474) dan *primer reverse* HBS2 (5'-AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA-3'; posisi 713-694) yang akan menghasilkan fragmen DNA yang berukuran 258 bp.⁴

Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR sprint (Thermo USA) dalam 50µl volume reaksi, dengan kondisi PCR yang telah dioptimasi dengan keseluruhan amplifikasi sebanyak 35 siklus, yang terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap *annealing* pada suhu 50 °C selama 50 detik dan tahap ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit, diakhiri dengan tahap ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit.

Reaksi PCR menggunakan *PCR Core System* (Promega, Madison, WI, USA) terdiri dari 20 mM TrisHCl (pH 8,4), 50mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 unit Taq DNA polimerase, 0,5µM masing-masing primer, 0,2 µM masing-masing dNTPs (dATP, dTTP, dCTP,dGTP) dan 10µl cetakan DNA.

Deteksi Produk PCR

Deteksi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2 % yang diwarnai dengan ethidium bromida untuk selanjutnya diamati di bawah iluminator sinar ultraviolet.

Analisis Genotipe dan Subtipe VHB

Selanjutnya dilakukan sekuensing produk PCR menggunakan metode *dye-labelled terminators* menggunakan mesin ABI Prism 377A *Applied Biosystems*. Analisis genotipe VHB dilakukan dengan cara membandingkan sikuen gen S yang diperoleh pada penelitian ini dengan gen S yang telah dipublikasi pada GenBank menggunakan program BLAST. Program ini akan menghitung homologi dari sekuens yang dibandingkan. Genotipe ditentukan berdasarkan homologi pada gen S yang lebih dari 96%. Susunan nukleotida gen S kemudian dikonversi menjadi susunan asam amino. Subtipe VHB ditentukan berdasarkan analisis residu asam amino pada posisi 122 dan 160.

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini disajikan dalam statistik deskriptif. Selanjutnya untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan distribusi genotipe dan sub tipe VHB pada berbagai manifestasi klinis hepatitis B kronis dilakukan uji statistik variabel katagorik untuk 2 kelompok tidak berpasangan yaitu untuk uji Fisher dan dianggap bermakna jika $p < 0.05$.

Bagan Alir Penelitian

