

**SEORANG PENDERITA HEPATITIS KRONIK B DAN C
DENGAN MUTASI PADA GEN P53 KODON 249
PADA JARINGAN HATI**

I Wayan Eka Saputra, Stephanus Gunawan, Zainul Muttaqin, Soewignjo Soemoharjo.
Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK Unud/RSUD Mataram

ABSTRACT

CHRONIC HEPATITIS B AND C CASE WITH MUTATION OF GENE P53 CODONE 249 IN THE LIVER TISSUE

Role of gene P53 as a tumor suppressor gene in generating primary liver cancer is very important primarily in cell growth regulation and apoptosis. By using AS-PCR method, the gene mutation can be recognized. It has been reported a chronic hepatitis B and C case with experiencing mutation of gene P53 Codone 249 in liver tissue of a 33 years old male with anti HCV positive, HBsAg positive, on the liver biopsy indicated of chronic hepatitis without cirrhotic features and malignancy signs. On AS-PCR examination found mutation on gene P53 codone 249. This finding was expected to be an early warning sign for occurrence of primary liver cancer, so that, early intervention could be performed.

Keyword : Gene P53, Chronic Hepatitis

PENDAHULUAN

Menurut penelitian sekitar 90-95% dari KHP (kanker hati primer) disebabkan oleh infeksi virus hepatitis B dan C. Diperkirakan ada sekitar 450 juta penduduk sebagai kronik karier hepatitis B dan 200 juta sebagai karier hepatitis C.^{1,2}

Proses terjadinya KHP pada infeksi virus hepatitis B ada tiga tingkat yaitu : Inisiasi, Promosi, dan Progresi.³ Pada tahap inisiasi terjadi integrasi antara genom virus hepatitis B kedalam genom hepatosit. Pada tahap promosi mulai terjadi ekspansi klonal dari sel-sel yang telah terangsang dalam tahap inisiasi. Pada tahap progresi sel-sel yang telah mengalami transformasi keganasan akan mengalami replikasi lebih lanjut. Pada penderita dengan hepatitis B kejadian KHP bisa langsung terjadi tanpa melalui proses sirosis, tetapi untuk hepatitis C selalu melalui proses sirosis.^{3,4}

Peran dari gen p53 yang merupakan *tumor suppressor gen* dalam terjadinya KHP sangat penting baik dari pengaturan pertumbuhan sel dan proses apoptosis.² Infeksi virus hepatitis B dan C menghambat gen tersebut dan sering terjadi mutasi pada gen tersebut. Khusus pada KHP sering terjadi mutasi pada kodon 249 gen p53, hal ini diduga sebagai salah satu pemicu terjadinya KHP.

Adanya mutasi gen p53 banyak didapatkan pada jaringan hati yang mengalami keganasan. Dulu dengan metoda SSCP (*single-stranded conformational polymorphism*) mutasi gen p53 hanya didapatkan pada jaringan ganas dan tidak bisa dideteksi pada jaringan yang belum mengalami keganasan. Namun dengan metode yang lebih canggih seperti AS-PCR (*allele-specific polymerase chain reaction*) beberapa peneliti melaporkan terdeteksinya mutasi gen p53 pada jaringan hati yang belum mengalami keganasan.⁵⁻⁷

Dengan metode AS-PCR terbuka kemungkinan untuk melakukan deteksi dini dari keganasan hati dengan cara mendeteksi adanya mutasi gen p53 pada penderita-penderita sirosis hati dan penderita hepatitis kronis. sehingga terbuka kemungkinan untuk melakukan intervensi lebih dini terhadap kejadian KHP seperti misalnya pemberian obat anti virus lebih awal.

Saat ini telah tersedia banyak obat-obatan yang digunakan pada pasien hepatitis kronik B dan C, misalnya dengan interferon (IFN) alfa dan PEG IFN alfa, analog nukleosida (lamivudin, ribavirin), dan analog nukleotida (adefovir, entekavir) sehingga makin banyak dilakukan pengobatan anti viral untuk penderita-penderita hepatitis kronik B dan C.^{1,8-11} Pengobatan ini terbukti bisa menghambat progresifitas penyakit serta menurunkan viral load pada sebagian besar pasien.

Berikut ini adalah suatu kasus dengan hepatitis kronik B dengan HBsAg (+) dan hepatitis C dengan HCV-RNA (+) yang pada pemeriksaan AS-PCR terdapat mutasi pada gen p53 pada kodon 249 dimana pada biopsy dari liver belum ada tanda-tanda keganasan atau chirroisis.

KASUS

Seorang laki-laki 33 tahun ras Cina pekerjaan wiraswasta datang ke Internis dengan keluhan kepala terasa berat sejak 1 bulan. Kepala terasa berat ini terutama dirasakan setiap pagi hari dan mulai berkurang pada siang dan malam hari. Tetapi akhir-akhir ini kepala terasa berat dirasakan hampir setiap hari. Penderita juga mengeluh lemah pada badan yang juga dirasakan sejak 1 bulan. Terasa pegal-pegal pada seluruh badan kadang disertai flu, dan badan sumer-sumer. Kadang-kadang penderita juga mengeluh mual-mual tapi tidak sampai muntah. Terasa tidak enak di bagian ulu hati seperti terasa penuh berisi makanan. Penderita juga mengeluh perut kanan atas terasa sebah, tidak pernah mengeluh mata kuning, tidak pernah mengeluh kencing warna

seperti air teh. Penderita tidak pernah menderita penyakit yang sama sebelumnya. Penderita mempunyai kebiasaan minum-minuman beralkohol, kebiasaan memakai narkoba dengan jarum suntik serta narkoba jenis yang diminum. Tetapi sejak penderita sakit, penderita sudah berhenti minum-minuman keras dan memakai narkoba.

Pada pemeriksaan fisik didapatkan penderita dengan kesadaran kompos mentis, keadaan umum baik, pada lengan penderita tampak tatto, status gizi penderita baik, tekanan darah 120/80 mmHg, nadi 80 x/menit regular, isi cukup, respirasi 18 x/mnt, dengan temperatur aksila 36,2^o C. pada pemeriksaan mata pada konjungtiva palpebra tidak ada anemi, sklera tidak icterus, tidak ada odema palpebra. Pada pemeriksaan THT tidak ditemukan kelainan. Pemeriksaan dada tampak simetris, suara nafas vesikuler, ronchi tidak ada, wheezing tidak ada. Suara jantung S1 dan S2 tunggal, murmur tidak ada. Pemeriksaan abdomen tidak tampak distensi, bising usus normal, hepar dan lien tidak teraba. Pemeriksaan ekstremitas hangat dan tidak ditemukan edema.

Dari pemeriksaan laboratorium tanggal 23 Nopember 2005 didapatkan SGOT 165 U/l, SGPT 119 U/l, bilirubin total 0,84 mg/dl, bilirubin direk 0,13 mg/dl, glukosa puasa 85 mg/dl, kolesterol total 179 mg/dl, kolesterol LDL 140 mg/dl, kolesterol HDL 34 mg/dl, TG 107 mg/dl, asam urat 8,4 mg/dl.

Pada tanggal 26 Nopember 2005 diperiksa HBsAg (+), anti HCV (+), serum kreatinin 0,9 mg/dl, ureum 29 mg/dl. Dari pemeriksaan darah lengkap didapatkan WBC 12,3 /ul, HGB 14,9 g/dl, PLT 182 x10³ /ul. USG abdomen didapatkan hasil liver ukuran membesar, permukaan rata tepi tajam, *echoparenchyme* meningkat *diffuse*, tidak tampak nodul, *liver kidney contrast* (+), lain-lain kesan normal. Kesan USG adalah *fatty liver*. Dari pemeriksaan imunoserologi tanggal 28 Nopember 2005 didapatkan anti HCV reaktif, anti HBc IgM non reaktif, HBeAg reaktif, anti HBe non reaktif. Pada tanggal 30 Nopember 2005 pemeriksaan *protrombin time* 11,7 detik, INR 0,7. HCV-RNA (+)

1,61 x 10³ IU/ml, pada tanggal 2 Desember dilakukan Biopsi hati pemeriksaan mikroskopis didapatkan jaringan hepar dengan portal triads, sel hepar dengan *balloning degeneration* dan *focal necrosis*, lobulus hepar sebagian besar masih baik, pada daerah portal sudah ada moderate *piece meal necrosis* dan moderate *portal infiltrate of inflammatory cells (grade 3)*, sudah ada fibrosis periportal dan belum ada *portal to portal fibrosis (stage 1)*. Sirosis tidak ada, tidak ada tanda-tanda keganasan. Kesimpulan diagnosis PA adalah kronik hepatitis (B dan C) with moderate *piece-meal necrosis* dan moderate *portal infiltrate (inflammatory grade 3) with fibrotic portal tracts (stage 1)*.

Pada jaringan biopsi hepar telah dilakukan AS-PCR dengan hasil adanya mutasi pada gen p53 pada kodon 249.

Penderita diterapi dengan PEG INF alfa 80 mg/minggu, ribavirin 6 tablet/hari, 3TC 100 mg/hr. Terapi ini diberikan selama 6 bulan. Selama masa pengobatan penderita tidak menunjukkan intoleransi terhadap obat-obatan anti virus tersebut.

Berdasarkan evaluasi ulangan dalam 1 bulan terapi dilakukan pemeriksaan pada tanggal 11 Januari 2006 dengan HCV-RNA virus tidak terdeteksi. Pada tanggal 6 Juli 2006 dilakukan pemeriksaan HBsAg (+), HBeAg (+), SGOT 25 U/L, SGPT 32 U/L.

HCV-RNA kualitatif (-), tapi HBsAg masih (+) dengan SGPT dan SGOT masih dalam batas normal sehingga pada tanggal 6 Juli 2006 3TC di hentikan pemberiannya. Pada evaluasi ulangan tanggal 7 Agustus 2006 didapatkan kadar SGPT 91,9 U/L, SGOT 51,3 U/L. Pemeriksaan USG abdomen kesan tidak jauh berbeda dengan USG sebelumnya yaitu *fatty liver*.

PEMBAHASAN

Pada kasus ini didapatkan penderita dengan infeksi kronik hepatitis B dan C. Pada pemeriksaan laboratorium dengan anti HCV yang (+), dengan HBsAg yang (+), USG didapatkan kesan *fatty liver*. Berdasarkan

hasil dari biopsi liver didapatkan kesan hepatitis kronik dan belum ada tanda sirosis dan keganasan. Pada pemeriksaan AS-PCR dilaporkan terjadi mutasi pada gen p53 di kodon 249. Dengan adanya mutasi pada gen p53 ini pada jaringan hati yang belum mengalami keganasan apakah bisa sebagai petunjuk bahwa ada suatu proses hepatocarsinogenik yang nantinya penderita ini akan mengarah ke KHP. Pengobatan pun telah dilakukan dengan pemberian antiviral dan imunomodulator seperti PEG interferon alfa 80 mg/minggu, ribavirin 6 tablet/hari, 3TC 100 mg/hari. Dalam masa pengobatan satu setengah bulan terjadi konversi anti HCV dari (+) menjadi (-) atau tidak terdeteksi.

Secara umum pengobatan hepatitis kronik B dan C dengan antiviral bertujuan untuk.^{3,9,12}

- Menghentikan replikasi virus
- HBsAg dan HCV RNA yang negatif
- Keluhan yang menghilang
- Proses peradangan hati yang membaik
- Tingkat penularan yang kurang
- Mencegah terjadinya sirosis dan KHP
- Masa harapan hidup yang meningkat

Pada saat ini dikenal 2 kelompok terapi untuk hepatitis virus kronik yaitu: kelompok imunomodulasi dan kelompok terapi antiviral.

Untuk kelompok imunomodulasi salah satunya yang sering dipakai adalah IFN. IFN adalah kelompok protein intra seluler yang normal ada dalam tubuh dan diproduksi oleh berbagai macam sel. Beberapa kasiat IFN adalah khasiat antiviral, imunomodulator, anti proliferasi dan anti fibrotik. IFN tidak memiliki khasiat antiviral langsung tetapi merangsang terbentuknya berbagai macam protein efektor yang mempunyai kasiat antiviral.⁸⁻¹⁰

Untuk kelompok terapi antiviral yang sering digunakan adalah golongan lamivudin (3TC = 3'-thiacytidine) yang merupakan suatu analog nukleosida.⁸⁻¹¹

Pengobatan dengan antiviral pada kasus ini telah

sesuai dengan beberapa rekomendasi terapi antiviral pada virus hepatitis B dan C.

Terapi untuk hepatitis kronik B dari pasien ini dengan antiviral hanya diberikan bila penderita menunjukkan HBeAg yang positif dan kadar VHB yang tinggi (diatas 10^5 kopi/ml). Disamping itu obat-obatan antiviral juga diberikan bila ALT > 2 kali harga normal tertinggi.^{12,13} Pada kasus ini didapatkan dengan HBeAg (+), HBsAg (+), ALT > 2X normal.

Pertimbangan terapi anti viral pada pasien hepatitis C hanya diberikan kalau penderita HCV RNA (+) serta peningkatan ALT diatas 2 kali harga normal. Pasien anti HCV (+) belum tentu HCV RNA nya juga positif. Anti HCV yang positif dengan HCV RNA yang negatif menunjukkan adanya infeksi hepatitis C dimasa lalu (*post infection*).¹²⁻¹⁴ Pada kasus ini didapatkan dengan Anti HCV (+), HCV RNA (+), ALT > 2X normal.

Adanya infeksi gabungan virus hepatitis B dan C meningkatkan risiko kejadian sirosis hati dan KHP.¹ Risiko kejadian KHP pada penderita hepatitis kronik B sendiri 25 – 35 kali lebih tinggi dibanding akibat peradangan non virus. Tapi dengan adanya gabungan infeksi ini kejadiannya bisa mencapai 130 kali lebih tinggi.^{1,2}

Banyak penelitian yang menunjukan bahwa pada 50-60% penderita KHP menunjukkan adanya mutasi gen p53 terutama dalam bentuk mutasi dari AGG→AGT pada kodon 249 gen tersebut. Gen p53 mengkode protein p53 yang mempunyai 3 fungsi utama dalam sel yaitu reparasi DNA, apoptosis, dan penghambat pertumbuhan sel. Ketidak mampuan melaksanakan fungsi tersebut akan berakibat kacaunya pertumbuhan sel yang selanjutnya menjelma menjadi sel kanker.⁵⁻⁷ Terdapat 2 mekanisme tidak berfungsinya p53 yaitu pada level genetik terjadi mutasi titik dalam sekuens gen p53 dan pada level protein terjadi inaktivasi fungsi p53 oleh onkoprotein. Beberapa protein onkogen yang dihasilkan oleh virus dan diketahui mempengaruhi fungsi p53

adalah protein E6 oleh HPV tipe 16 pada kanker serviks dan protein X oleh virus hepatitis B pada karsinoma hati.

Namun sampai sekarang belum jelas benar peranan mutasi gen p53 dalam proses karsinogenik. Hal ini antara lain disebabkan karena dengan metode deteksi gen p53 yang lazim dipakai seperti SSCP hanya dapat mendeteksi mutasi tersebut pada jaringan yang sudah mengalami kanker.

Peng *et al.*⁵ pada tahun 1999 melaporkan bahwa dengan metode AS-PCR, mutasi gen p53 dapat dideteksi pada jaringan yang belum mengalami KHP terutama pada kasus-kasus hepatitis kronik dan sirosis.⁵ Deteksi awal dari mutasi gen p53 pada kasus hepatitis kronik B dan C mungkin akan mengubah protokol pemberian obat anti virus yaitu dengan mempertimbangkan parameter baru berupa status p53 disamping parameter biokimia dan virologik. Sementara itu dengan mempelajari hubungan antara mutasi dan ekspresi gen p53 dengan parameter-parameter virologik dan biokimia mungkin akan dapat menjelaskan proses munculnya KHP pada penderita hepatitis kronik B dan C.⁵⁻⁷

Pada kasus ini secara histopatologi belum terjadi shirrossis dan KHP tapi sudah ada mutasi pada gen p53 di kodon 249. Apakah hal ini bisa sebagai peramal akan mengarah ke kejadian KHP sehingga perlu dilakukan intervensi lebih dini.

KHP sangat berkaitan dengan *viral load*. Semakin tinggi *viral load* kejadian KHP akan semakin meningkat. Maka *viral load* ini harus diturunkan dengan terapi antiviral yang efektif

Pemberian kombinasi terapi antiviral pada hepatitis B yaitu pemberian IFN dan lamivudin tidak memberikan manfaat berlebih dibandingkan dengan terapi tunggal interferon saja. Tapi dengan adanya infeksi gabungan dengan hepatitis C pemberian terapi kombinasi beberapa anti viral bisa dipertimbangkan.

Tujuan terapi antiviral pada kasus ini adalah untuk mengurangi viral load secara cepat pada pasien yang sudah mengalami mutasi pada gen p53 di kodon 249 dengan harapan kejadian KHP bisa di cegah.^{9,10,12,14}

RINGKASAN

Telah dilaporkan seorang laki-laki 33 tahun dengan hepatitis kronik B HBsAg (+) serta HBeAg (+) dan hepatitis C dengan HCV RNA (+). Yang pada pemeriksaan Patologi Anatomi didapatkan gambaran berupa kronik hepatitis B dan C dengan *moderate piecemeal necrosis* dan *moderate portal infiltrate grade 3* dengan *fibrotic portal tract stage 1* sesuai kriteria Metavir tetapi belum ada tanda-tanda sirosis atau keganasan.

Pada kasus ini dari sediaan beku biopsi hepar dengan metode AS-PCR telah terjadi mutasi pada gen p53 di kodon 249. Penderita telah mendapatkan terapi PEG IFN, lamivudin dan ribavirin

Dengan dijumpai adanya infeksi gabungan hepatitis kronik B dan C, HBsAg (+), HBeAg (+), anti HCV (+), HCV RNA (+), adanya mutasi pada gen p53 ini diharapkan bisa sebagai diagnosa dini dari kemungkinan akan terjadinya KHP. Karena *viral load* yang tinggi merupakan faktor risiko tinggi untuk terjadi KHP. Sehingga pencegahan bisa dilakukan lebih dini seperti pemberian anti virus yang efektif lebih awal dengan harapan bisa mengurangi *viral load* dalam jaringan hati.

DAFTAR RUJUKAN

1. Wands, Jack R. Prevention of hepatocellular carcinoma. *The N Eng J Med* 2004;7(351):1567-0.
2. Tao C, John ML. Evaluation of quantitative PCR and branched-chain DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1977-80.
3. Soewignjo S, Gunawan S. Hepatitis virus B dan karsinoma hepatoseluler. Hepatitis virus B. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1999.p.86-7.
4. Wanless IR, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis: morfologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(11):15999-607.
5. Peng XM, Yao CL, Chen XJ. Codon 249 mutations of p53 gene in non-neoplastic liver tissues. *World J of Gastroenterology* 1999; 5(4):324-6.
6. Park YM, Yoo YD, Paik SY, Kim BS, Tabor E. Mutation of tumor suppression gene p53 in hepatocellular carcinomas from Korea. *Experimental and Molecular Medicine* 1996;28(4): 173-9.
7. Lee H, Kim HT, Yun Y. Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem.* 1998;31(273): 19786-91.
8. Poernomo BS. Interferon treatment for chronic hepatitis B focus: pegylated interferon alfa 2 a for treatment strategy and aiming sustained remission. Denpasar: SUDEMA 2; 2006.p.58.
9. Abdurachman SA. Hepatitis virus kronik. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I. Edisi ketiga. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 1996p. 262-70.
10. Hernomo K. Long-term treatment of chronic HVB with antiviral drug. Surabaya: Pusat Gastro Hepatologi Surabaya Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr Sutomo Surabaya SUDEMA 2; 2006.p.53-6.
11. Chung RT, Podolsky DK. In: Braunwald E, Hauster SL, Fauci AS, Longo DL, Jameson JL, editors. *Cirrhosis and its complications. Harrison's principles of internal medicine 16th ed.* New York: Mc Graw Hill Co; 2005.p.1858-69.
12. Dienstag JL, Isselbacher KJ. In: Braunwald E, Hauster SL, Fauci AS, Longo DL, Jameson JL, editors. *Chronic hepatitis. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed.* New York: Mc Graw Hill Co; 2005.p.1844-55.

13. Soewignjo S. Kesalahan umum (*common mistake*) dalam pengobatan anti viral pada hepatitis kronik B dan C. Denpasar: SUDEMA2; 2006.p.101-5.
14. Hu K. A practical approach to management of chronic hepatitis B. *Int J M* 2005;4:30-50.

A2 5' GGGTC AGCGG CAAGC AGAGG 14175-14156

Produk amplifikasi kemudian dianalisa pada 2% gel agarose dan diamati dengan pengecatan ethidium bromide dan penyinaran UV.



TATA CARA PERLAKUAN JARINGAN BIOPSI HATI DENGAN METODE AS-PCR

Karakteristik kasus

Bahan berupa biopsi hati beku yang merupakan biopsi hati dari pasien pengidap virus hepatitis kronik B dan C yang dilakukan di Klinik Biomedika Mataram.

Ekstraksi DNA

DNA jaringan hati diekstrak dengan menggunakan larutan TriZol (Invitrogen). Untuk jaringan dalam blok paraffin terlebih dahulu dilakukan deparafinisasi menggunakan xylol dan ethanol, kemudian diperlakukan dengan proteinase K (Peng, 1999).

PCR alela spesifik

Prosedur AS-PCR merupakan modifikasi dari teknik semi nested PCR sebagaimana dilakukan oleh Peng (1999). Mula-mula dilakukan PCR menggunakan primer S1 dan A1. Kemudian produk dari PCR I tersebut direamplifikasi menggunakan nested primer S2 dan A2 atau S3 dan A2. Adapun urutan susunan primer dan posisinya adalah sebagai berikut

S1 5' GGCGA CAGAG CGAGA TTCCA
13890-13909

A1 5' GATTC TCTTC CTCTG TGCGC
14534-14515

S2 5' TGGGC GGCAT GAAACGGAGT
14055-14074

S3 5' TGGGC GGCAT GAAACGGAGG
14055-14074

Biopsi Hati dengan histokimia

