

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESYAHAN.....	iii
PERNYATAAN	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xx
INTISARI	xii
<i>ABSTRACT</i>	xxiii
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.1. Perumusan Masalah	5
1.2. Tujuan Penelitian	6
1.3. Manfaat Penelitian	7
1.4. Keaslian Penelitian	9
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Epidemiologi	13
2.2. Perjalanan Klinis Hepatitis secara alamiah	
2.2.1. Perjalanan klinis Hepatitis virus B	18
2.2.2. Perjalanan klinis Hepatitis virus C	23
2.2.3. Integrasi virus Hepatitis B dan C ke dalam genom manusia	27
2.3. Peran Angiogenesis pada inflamasi kronik hati dan karsinoma hati.....	26
2.4. VEGF dan VEGF reseptor pada inflamasi kronik hati dan karsinoma hati	
2.4.1. Ligan-ligan VEGF dan reseptor-reseptor VEGF	32
2.4.2. Peran Jalur MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) dalam proses Hepatokarsinogenesis	35
2.4.3. Mekanisme proliferasi dan <i>sprouting</i> angiogenesis	37
2.5. Serum VEGF dan soluble VEGFR-2 sebagai petanda serologik angiogenesis	
2.5.1. Faktor Angiogenesis terlarut (<i>Angiogenesis Soluble Factors/</i> <i>ASF</i>)	40
2.5.2. Biomarker angiogenesis serum VEGF dan sVEGFR-2	41
2.6. Gena VEGF (VEGFA) dan pola polimorfisme pada manusia	
2.6.1. Lokasi gena VEGF (VEGFA)	46
2.6.2. Pola polimorfisme gena VEGF pada KHS, Sirosis Hati dan Hepatitis Kronik	46
2.7. Metoda isolasi, amplifikasi dan elektroforesis DNA	
2.7.1. Metoda isolasi DNA	49
2.7.2. Metoda amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR)	51
2.7.3. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	55
2.7.4. Metoda elektroforesis DNA	56

2.7.5. Metoda <i>Sequencing</i> DNA	57
2.7.6. Metoda ELISA untuk pemeriksaan sVEGFR-2	60
2.8. Kerangka Teori	62
2.9. Kerangka Konsep	63
2.10. Landasan Hipotesis	63
2.11. Hipotesis	65
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1. Rancangan Penelitian	67
3.2. Populasi Penelitian	68
3.3. Waktu dan Tempat Penelitian	68
3.4. Jumlah Sampel Penelitian	
3.4.1. Perhitungan jumlah sampel untuk SNPs VEGF	69
3.4.2. Perhitungan jumlah sampel untuk kadar sVEGFR-2 serum	70
3.5. Cara Penelitian	
3.5.1. Kriteria inklusi	71
3.5.2. Kriteria eksklusi	72
3.5.3. Protokol Penelitian	72
3.6. Identifikasi Variabel	74
3.7. Diagram Alir Penelitian	75
3.8. Definisi Operasional	
3.8.1. Karsinoma Hepatoseluler	76
3.8.2. Sirosis Hati	78
3.8.3. Hepatitis Kronik	79
3.8.4. <i>Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor 2</i> (sVEGFR-2)	80
3.8.5. Pemeriksaan ELISA kadar sVEGFR-2	81
3.8.6. Gena VEGF	85
3.8.7. <i>Single Nucleotide polymorphism</i> (SNP) dari gena VEGF	85
3.8.8. Teknik Isolasi DNA	86
3.8.9. Teknik <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	87
3.8.10. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	85
3.8.10. Sequencing DNA.....	90
3.9. Analisa Statistik	92
3.10. Pertimbangan Etik Penelitian	93
BAB IV. HASIL PENELITIAN	
4.1. Karakteristik Data	94
4.1.1. Usia	95
4.1.2. Gender	96
4.1.3. Etiologi penyakit	96
4.1.4. <i>Single nucleotide polymorphism</i> gena VEGF	97
4.1.5. Kadar sNEGFR-2 serum	98
4.1.6. Karakteristik klinis subjek penelitian	98
4.2. Analisis perbedaan variabel antara subjek	100
4.3. Analisis genotip dan alel SNP gena VEGF rs2010963(-634) dan rs699947 (-2578)	101
4.3.1. Kuwalitas hasil sequencing	102

4.3.2. Distribusi Genotipe dan Alel SNP gena VEGF rs 2010963 (-634)	102
4.3.3. Distribusi Genotipe dan Alel SNP gena VEGF rs699947 (-2578)	105
4.4. Analisis Rasio Prevalen genotip dan alel gena VEGF SNP rs2010963 (-634) dan rs699947 (-2578)	108
4.5. Polimorfisme lain di sekitar target sekuen	110
4.6. Analisis kadar sVEGFR-2 serum	
4.6.1. Perbedaan kadar sVEGFR-2	114
4.6.2. Analisis sVEGFR-2 berdasarkan etiologi	116
4.6.3. Analisis sVEGFR-2 berdasarkan jenis kelamin	117
4.6.4. Analisis korelasi antara sVEGFR-2 dengan usia	118
4.6.5. Hubungan antara kadar sVEGFR-2 dengan kriteria klinis	118
4.6.6. Perhitungan nilai titik potong (<i>cutoff point</i>) kadar sVEGFR-2	120
4.6.7. Analisis Rasio Prevalens sVEGFR-2 berdasarkan titik potong klinis	121
4.6.8. Perbedaan kadar sVEGFR-2 serum berdasarkan genotip rs2010963 (-634), rs699947 (-2578) serta polimorfisme disekitarnya.....	122
4.7. Analisis multivariat hubungan antara variabel-variabel dengan kejadian penyakit	
4.7.1. Analisis multivariat variabel subjek karsinoma hepatoseluler dan sirosis	124
4.7.2. Analisis multivariat variabel subjek karsinoma hepatoseluler dan hepatitis kronik.....	127
4.7.3. Analisis multivariat variabel subjek sirosis dan hepatitis kronik	130
4.7.4. Analisis multivariat variabel subjek karsinoma hepatoseluler dan subjek sehat	133
4.7.5. Analisis multivariat variabel subjek sirosis dan subjek sehat.....	135
4.7.6. Analisis multivariat variabel subjek hepatitis kronik dan subjek sehat....	138
BAB V. PEMBAHASAN	
5.1. Karakteristik data	141
5.2. Perbedaan frekuensi SNP gena VEGF rs2010963 (-634/5'UTR) dan rs699947 (-2578/promoter).....	145
5.3. Perbedaan kadar sVEGFR-2 serum.....	141
5.4. Hubungan antara frekuensi polimorfisme rs2010963 (-634/5'UTR) dan rs699947 (-2578/promoter) dengan kriteria klinis	142
5.5. Korelasi antara kadar sVEGFR-2 serum dengan kriteria klinis	153
5.6. Hubungan SNP gena VEGF rs2010963 (-634/5'UTR) dan rs699947 (-2578/ promoter) dengan kejadian penyakit	153
5.7. Hubungan antara titik potong klinis kadar sVEGFR-2 serum dengan kejadian penyakit	156
5.8. Hubungan antara SNP gena VEGF, sVEGFR-2 dan polimorfisme lain dengan faktor prediksi kejadian penyakit	158
5.9. Kebaharuan	160
5.10. Keterbatasan penelitian	160
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	
6.1.1. Kesimpulan primer	162

6.1.2. Kesimpulan sekunder	162
6.2. Saran	155
DAFTAR PUSTAKA	166
RINGKASAN	181
SUMMARY	191
LAMPIRAN	200

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Angka prevalens infeksi Hepatitis B kronik (pembawa HBsAg +) dan hepatitis C kronik (antiHCV +)	14
Gambar 2.	Angka insidensi kanker hati berdasar standarisasi usia pada laki-laki per 100.000 populasi (<i>International Agency for Research on Cancer, IARC</i>)	17
Gambar 3.	Perjalanan klinis alamiah virus hepatitis B	20
Gambar 4.	Titer HBV-DNA berdasarkan fase imun dan HBeAg	20
Gambar 5.	Perjalanan klinis alamiah virus hepatitis B berdasarkan titer HBV-DNA	21
Gambar 6.	Perjalanan klinis alamiah virus hepatitis B berkaitan dengan sirosis dan karsinoma hepatoseluler	21
Gambar 7.	Perjalanan klinis alamiah virus hepatitis C	23
Gambar 8.	Distribusi lokasi integrasi virus hepatitis B pada kromosom manusia	25
Gambar 9.	Distribusi lokasi integrasi virus hepatitis C pada kromosom manusia	27
Gambar 10.	Peran angiogenesis pada inflamasi kronik hati	29
Gambar 11.	Peran angiogenesis pada KHS	30
Gambar 12.	Skema ligan famili VEGF dan reseptor-reseptornya	34
Gambar 13.	Interaksi sinyal VEGF dari famili ligan VEGF yang terikat pada reseptor-reseptor VEGF yang menginduksi kaskade vaskulogegesis, angiogenesis dan limfogenesis	35
Gambar 14.	Interaksi sinyal-sinyal VEGF pada VEGFR-2 yang menginduksi jalur MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK <i>signaling Pathway</i>)	36
Gambar 15.	Mekanisme proliferasi hepatosit pada regenerasi hati	38
Gambar 16.	Mekanisme <i>Sprouting</i> angiogenesis pada regenerasi hati dan KHS	38
Gambar 17.	Potensial angiogenesis soluble factors (ASF) sebagai biomarker	41
Gambar 18.	Dinamika faktor angiogenesis terlarut (ASF)	41
Gambar 19.	Lokasi gena VEGF di kromosom 6p21	46
Gambar 20.	Lokasi 7 SNPs pada gena VEGF	48
Gambar 21.	Skema Polymerase Chain Reaction (PCR)	54
Gambar 22.	Contoh enzym restriksi untuk <i>Restriction fragment lenght polymorphism</i>	56
Gambar 23.	Skema tahapan untuk sequencing DNA dan interpretasi <i>electropherogram</i>	59
Gambar 24.	Kerangka Teori	62
Gambar 25.	Kerangka Konsep Penelitian	63
Gambar 26.	Rancangan Penelitian	67
Gambar 27.	Diagram alir penelitian	75
Gambar 28.	Persiapan reagen pemeriksaan sVEGFR-2 dengan metoda	83

	ELISA	
Gambar 29.	Prosedur ELISA pada pemeriksaan sVEGFR-2	84
Gambar 30.	Elektroferogram dan basa sekuen gena DNA rs699947	92
Gambar 31.	Perincian subjek dan sampel penelitian	94
Gambar 32.	Single nucleotide polimorphysm gena sVEGFR-2 rs2010963 (-634)	103
Gambar 33.	Single nucleotide polimorphysm gena sVEGFR-2 rs699947 (-2578)	106
Gambar 34.	ABI chromatografi dan analisa sekuen (format Fasta) pada delesi basa dilokasi -2549 sebanyak 18 bp	111
Gambar 35.	ABI chromatografi dan analisa sekuen (format Fasta) pada insersi-delesi basa dilokasi -2549 sebanyak 20 bp	112
Gambar 36.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 pada subjek sehat, hepatitis kronik, sirosis hati dan karsinoma hati (KHS)	116
Gambar 37.	Korelasi antara kadar sVEGFR-2 serum dengan usia	118
Gambar 38.	Kurva ROC analisis sVEGFR-2 pada subjek Karsinoma hepatoseluler (KHS), sirosis hati (SH) dan hepatitis kronik	121
Gambar 39.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian KHS pada subjek Sirosis (model 1)	127
Gambar 40.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian KHS pada subjek Hepatitis (model 3)	130
Gambar 41.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian sirosis pada Hepatitis (model 1)	133
Gambar 42.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian KHS pada subjek sehat (model 1)	135
Gambar 43.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian sirosis pada subjek sehat (model 2)	137
Gambar 44.	Kurva ROC dan sensitifitas/spesifisitas titik potong variabel prediksi kejadian hepatitis pada subjek sehat (model 1)	140

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Penelitian-penelitian terkait kadar VEGF dan sVEGFR-2 serum pada Sirosis Hati dan KHS	9
Tabel 2.	Penelitian-penelitian terkait polimorfisme VEGF pada KHS	10
Tabel 3.	Posisi dan lokasi SNP gena VEGF pada karsinoma hepatoseluler	48
Tabel 4.	Urutan basa 7 SNP gena VEGF pada karsinoma hepatoseluler	48
Tabel 5.	Panjang fragmen paska RFLP	56
Tabel 6.	Skor CLIP (<i>Cancer of the Liver Italian Program</i>)	77
Tabel 7.	Okuda <i>staging</i>	77
Tabel 8.	Klasifikasi BCLC <i>staging</i>	78
Tabel 9.	<i>Child-Pugh-Turcotte</i> (CPT) (Goldberg & Chopra, 2009)	79
Tabel 10.	Uji presisi intra dan inter pengukuran sVEGFR-2 darah	85
Tabel 11.	Susunan primer rs699947 dan rs2010963	88
Tabel 12.	Susunan fragmen paska RFLP sekuen rs699947 dan rs2010963	89
Tabel 13.	Distribusi usia subjek penelitian	95
Tabel 14.	Frekuensi gender subjek penelitian	96
Tabel 15.	Frekuensi etiologi penyakit	96
Tabel 16.	Distribusi frekuensi genotip dan alel SNP gena VEGF -634 (rs2010963)	97
Tabel 17.	Distribusi frekuensi genotip dan alel SNP gena VEGF -2578 (rs699947)	97
Tabel 18.	Kadar sVEGFR-2 subjek penelitian	98
Tabel 19.	Kriteria klinis pada subjek KHS	99
Tabel 20.	Kriteria klinis subjek sirosis	99
Tabel 21.	Kriteria subjek hepatitis	100
Tabel 22.	Analisis perbedaan variabel	100
Tabel 23.	Susunan basa primer	101
Tabel 24.	Hasil sekuensing DNA gena VEGF target (rs2010963 dan rs699947)	102
Tabel 25.	Distribusi genotipe dan alel SNP gena VEGF rs2010963 lokasi di -634 pada 182 subjek	103
Tabel 26.	Analisis perbedaan proporsi genotip SNP rs2010963 (-634) antara dua subjek (KHS vs. sirosis, KHS vs. hepatitis, KHS vs. sehat, sirosis vs. hepatitis, sirosis vs. sehat dan hepatitis vs. sehat).	104
Tabel 27.	Perbedaan proporsi alel SNP -634 antara dua subjek (KHS vs. sirosis, KHS vs. hepatitis, KHS vs. sehat, sirosis vs. hepatitis, sirosis vs. sehat dan hepatitis vs. sehat).	105
Tabel 28.	Distribusi genotipe dan alel SNP gena VEGF rs699947 lokasi di -2578	106
Tabel 29.	Analisis perbedaan genotip SNP rs699947 (-2578) antara dua subjek	107
Tabel 30.	Perbedaan distribusi alel gena VEGF SNP rs699947 (-2578) diantara dua subjek	108
Tabel 31.	Analisis rasio prevalen SNP rs2010963 (-634) terhadap	109

	diagnosis	
Tabel 32.	Analisis rasio prevalen SNP rs699947(-2578) terhadap diagnosis	110
Tabel 33.	Distribusi proporsi delesi dan insersi-delesi	111
Tabel 34.	Distribusi proporsi haplotip CCGAGCCC	112
Tabel 35.	Analisis rasio prevalen insersi-delesi (-2547s/d-2526), delesi (-2549) dan haplotip terhadap diagnosis	113
Tabel 36.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 serum	114
Tabel 37.	<i>Post Hoc</i> analisis perbedaan kadar sVEGFR-2	115
Tabel 38.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 berdasarkan etiologi virus	116
Tabel 39.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 berdasarkan jenis kelamin	117
Tabel 40.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 berdasarkan klasifikasi keparahan penyakit	119
Tabel 41.	Rasio Prevalen kejadian penyakit berdasarkan nilai potong klinis sVEGFR- 2 serum	122
Tabel 42.	Perbedaan kadar sVEGFR-2 berdasarkan genotip rs2010963 (-634), rs699947 (-2578) serta polimorfisme disekitarnya	123
Tabel 43.	Analisis multivariat regresi logistik variabel prediksi kejadian KHS pada kelompok subjek KHS-sirosis (metoda <i>backward stepwise</i>)	125
Tabel 44.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian KHS pada subjek Sirosis	126
Tabel 45.	Analisis multivariat regresi logistik variabel prediksi kejadian KHS pada kelompok subjek KHS-Hepatitis (metoda <i>backward stepwise</i>)	128
Tabel 46.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian KHS pada subjek Hepatitis	129
Tabel 47.	Analisis multivariat regresi logistik variabel prediksi kejadian Sirosis subjek hepatitis kronik (metoda <i>backward stepwise</i>)	131
Tabel 48.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian Sirosis pada subjek Hepatitis	132
Tabel 49.	Analisis multivariat logistik regresi variabel prediksi kejadian karsinoma hepatoseluler pada kelompok subjek KHS-sehat (metoda <i>backward stepwise</i>)	134
Tabel 50.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian Karsinoma Hepatoseluler pada subjek sehat	135
Tabel 51.	Analisis multivariat logistik regresi variabel prediksi kejadian sirosis hati pada kelompok subjek sirosis-sehat (metoda <i>backward stepwise</i>)	136
Tabel 52.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian sirosis hati pada subjek sehat	137
Tabel 53.	Analisis multivariat logistik regresi variabel prediksi kejadian hepatitis kronik ada kelompok subjek hepatitis - sehat (metoda <i>backward stepwise</i>)	138
Tabel 54.	Model regresi logistik variabel prediksi kejadian hepatitis kronik pada subjek sehat	139

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Persetujuan mengikuti penelitian	181
Lampiran 2	Status penelitian	192
Lampiran 3	<i>Ethical Clearance</i> dan ijin penelitian	196
Lampiran 4	Daftar Riwayat Hidup	201
Lampiran 5	DNA Gena VEGF(A)	204
Lampiran 6	Hasil dan Lokasi SNPs sequencing dan RFLP DNA target	211

DAFTAR SINGKATAN

antiHCV	<i>Antibody of hepatitis C virus</i>
Anti-HBc	<i>Anti-Hepatitis B core</i>
AASLD	<i>American Association for the Study of the Liver Disease</i>
AFP	<i>Alfa-feto protein</i>
AJH	<i>Aspirasi jarum halus</i>
APASL	<i>Asia Pacific Association for the Study of the Liver</i>
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i>
Ang-1	<i>Angiopoeitin-1</i>
Ang-2	<i>Angiopoeitin-2</i>
APRI	<i>Aspartate aminotransferase platelet ratio index</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
AFP	<i>Alfa-feto protein</i>
ALP-1	<i>Alkaline phosphatase isoenzyme-1</i>
ASF	<i>Angiogenesis soluble factors</i>
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer Group</i>
CPT	<i>Child Pugh Turcotte</i>
CLIP	<i>Cancer of the Liver Italian Program</i>
CV	<i>Coeficient variation</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
ERK	<i>Extracelullar signal-regulated Kinases</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HBeAg	<i>Hepatitis B envelope antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HR	<i>Hazart Ratio</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IK	<i>Interval kepercayaan</i>
INR	<i>International normalized ratio</i>
J-HCC	<i>Japan Hepatocelullar Carcinoma</i>
KHS	<i>Karsinoma Hepatoseluler</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinases</i>
MEK	<i>Mitogen extracelullar kinases</i>
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MMPs	<i>Matrix Metaloproteinase</i>
OR	<i>Odd Ratio</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction fragment lenght polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>