

Metode *Nucleic Acid Test* untuk Uji Saring Virus Hepatitis B pada Darah Donor dengan Hepatitis B *Occult*

Ulfah Suryani^{1*}, Vivi Setiawaty²

¹Program Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Indonesia

²Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, Indonesia

*Email : ulfah.suryani@yahoo.com

Abstract

HBsAg is the primary screening at the Blood Transfusion Unit (UTD) in Indonesia. Blood with HBsAg negative still have potential to transmit the Hepatitis B Virus (HBV) infection. To improve blood safety, examination needs to be done is the detection of HBV DNA in window period. This study aim to determine the NAT can detect HBV DNA positive in blood donors with Occult Hepatitis B (HBO). A cross-sectional study on 4973 blood samples from the donor 4 UTD: DKI Jakarta, Tangerang district and municipality, Depok. Examination of HBsAg, anti - HBc, anti - HBs done UTD while NAT, quantitative and qualitative PCR, performed at the Eijkman Institute for Molecular Biology . Quantitative and qualitative PCR performed to measure viral load that is used as a confirmation of HBV were detected by the method of NAT. A 20 of 4973 subjects (0.4%) had negative results and NAT multiplex HBsAg positive. 16 of the 20 subjects of HBsAg negative and positive discriminatory NAT. Results of the examination of anti-HBc anti-HBs negative and positive / negative feedback only one subject (6.25%), 9 samples positive anti-HBc and anti-HBs negative (56.25%), the results of anti-HBc and anti- HBs positive 5 samples (31.25%). The results of qualitative and quantitative PCR obtained three samples (18.75%) are not detectable, 6 (37.5%) samples showed results of a high viral load and 7 samples (43.75%) showed low detection. The NAT assay which was performed as a screening of donor blood parameters are effective to detect HBV DNA in blood donors with HBO.

Key words. *Hepatitis B occult, Nucleic Acid Test, Blood Donor*

Abstrak

HBsAg merupakan pemeriksaan utama di Unit Transfusi Darah (UTD) di Indonesia. Darah HBsAg negatif masih berpotensi menularkan infeksi Virus Hepatitis B (VHB). Untuk meningkatkan keamanan darah, perlu dilakukan pemeriksaan yang dapat mendeteksi DNA VHB pada *window period*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemeriksaan *Nucleic Acid Test* (NAT) dalam mendeteksi DNA VHB pada darah donor dengan *Hepatitis B Occult* (HBO). Penelitian potong lintang terhadap 4973 sampel darah donor dari 4 UTD, yaitu DKI Jakarta, kota dan kabupaten Tangerang, kota Depok. Pemeriksaan HBsAg, anti-HBc, anti-HBs dilakukan UTD sedangkan NAT, PCR kuantitatif dan kualitatif, dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman. Pemeriksaan PCR kuantitatif dan kualitatif dilakukan untuk menghitung *viral load* yang digunakan sebagai konfirmasi VHB yang berhasil dideteksi dengan metode NAT. Sebanyak 20 dari 4973 subjek (0,4%) mempunyai hasil HBsAg negatif dan NAT multiplex positif. 16 dari 20 subyek HBsAg negatif dan NAT *discriminatory* positif. Hasil pemeriksaan anti-HBc negatif dan anti-HBs positif/negatif didapatkan hanya satu subyek (6,25%), 9 sampel anti-HBc positif dan anti-HBs negatif (56,25%), hasil pemeriksaan anti-HBc dan anti-HBs positif 5 sampel (31,25%). Hasil pemeriksaan PCR kualitatif dan kuantitatif didapatkan 3 sampel (18,75%) tidak terdeteksi, 6 (37,5%) sampel menunjukkan hasil *viral load* yang tinggi dan 7 sampel (43,75%) menunjukkan *low detection*. Pemeriksaan NAT sebagai parameter uji saring darah donor efektif untuk mendeteksi DNA VHB pada darah donor dengan HBO.

Kata kunci: *Hepatitis B Occult, Nucleic Acid Test, Donor Darah*

Pendahuluan

Transfusi darah merupakan tindakan medis berisiko, Salah satu risiko transfusi adalah penularan infeksi menular lewat transfusi darah (IMLTD). Di Indonesia, sesuai dengan peraturan yang ada wajib melakukan uji saring IMLTD pada semua kantong darah yang dikumpulkan terhadap HIV, virus hepatitis B, virus hepatitis C dan sifilis.^{1,2} Dalam upaya menjaga keamanan darah donor dari infeksi virus hepatitis B (VHB), setiap kantong darah donor diuji saring terhadap *hepatitis B Surface Antigen* (HBsAg) sejak tahun 1985. Bila hasil uji saring HBsAg negatif maka darah tersebut dianggap aman untuk ditransfusikan. Namun, banyak peneliti menemukan bahwa darah dengan hasil uji saring HBsAg negatif saja tidak dapat dinyatakan aman, karena darah donor dengan HBsAg negatif masih dapat mengakibatkan infeksi VHB pada penerimanya.³

Beberapa penelitian menemukan bahwa darah dengan hasil uji saring HBsAg negatif saja tidak dapat dinyatakan aman, karena darah donor dengan HBsAg negatif dapat mengakibatkan infeksi VHB seperti hasil penelitian di India sebanyak 14,6% dan di Inggris sebanyak 0,57% penerima darah HBsAg negatif masih terinfeksi VHB.^{4,5} Sehingga beberapa negara menambahkan parameter serologi terhadap antibodi terhadap *hepatitis B core antigen* (anti-HBc) sebagai petanda paparan terhadap VHB dan antibodi terhadap *hepatitis B surface antigen* (anti-HBs) sebagai petanda respon imun terhadap infeksi VHB ke dalam uji saring donor. Darah dengan anti-HBc titer rendah disertai anti-HBs titer tinggi (>100 IU/L) diperbolehkan untuk transfusi.^{6,7,8} Namun demikian, uji saring serologi anti-HBc dan anti-HBs masih tetap tidak dapat menghilangkan kemungkinan didapatnya darah yang tidak aman dari donor dalam *window period* pre-serokonversi. Untuk itu perlu dilakukan deteksi keberadaan DNA

VHB sebagai cara yang lebih pasti untuk mengetahui darah donor infeksius atau tidak terhadap VHB.^{7,9}

Pada kebanyakan infeksi VHB akut pada orang dewasa ternyata HBsAg menghilang diikuti dengan terbentuknya anti-HBs, *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)-VHB tetap ada walaupun dalam jumlah kecil, baik dalam sirkulasi ataupun dalam hati.⁸ Demikian juga setelah penyembuhan dari hepatitis B kronis, DNA-VHB masih terdapat di sel hati.¹⁰ Keadaan DNA-VHB ditemukan dalam hati atau serum dari seseorang dengan HBsAg negatif, disertai atau tanpa adanya anti-HBs disebut dengan infeksi hepatitis B *occult* (HBO).^{8,9} Dari penelitian terdahulu yang dilakukan di Indonesia, prevalensi donor dengan HBO berkisar antara 8-10%.^{7,8} Dengan berkembangnya ilmu dan teknologi biologi molekuler, saat ini telah ditemukan teknologi deteksi DNA yang lebih cepat, sehingga uji saring molekuler untuk donor darah dalam jumlah besar dan waktu singkat sangat mungkin dilakukan. Uji saring molekuler yang dimaksud adalah tes kualitatif DNA VHB yang secara simultan dikombinasikan dengan tes terhadap *Ribonucleic Acid* (RNA) HIV dan virus hepatitis C yang dikenal dengan *Nucleic Acid Test* (NAT) "Multiplex". Tes NAT VHB dengan sensitivitas yang tinggi akan menurunkan *window period* yang tertinggal oleh tes HbsAg.^{10,11} Pemeriksaan molekuler lain yang sering digunakan untuk diagnosa infeksi VHB adalah metoda *Polymerase Chain Reaction Real Time* (PCR-RT) yang mampu mendeteksi *viral load*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pemeriksaan *Nucleic Acid Test* (NAT) dalam mendeteksi DNA VHB pada darah donor dengan *Hepatitis B Occult* (HBO).

Metode

Penelitian ini merupakan studi *cross-sectional* untuk menentukan parameter uji saring darah donor yang paling efektif untuk meningkatkan keamanan darah terhadap infeksi VHB. Subyek penelitian adalah sampel darah donor yang dipilih secara acak di UTD PMI dengan kriteria inklusi adalah sampel dengan hasil uji saring tidak reaktif terhadap HBsAg, anti-HIV, anti-HCV dan sifilis.

Pengambilan sampel darah donor dilakukan bersamaan dengan pengambilan darah yang disumbangkan baik didalam gedung UTD dan pada kegiatan mobil unit yang diselenggarakan oleh UTD PMI DKI Jakarta, Kota Tangerang, Kota Depok dan Kabupaten Tangerang. Donor darah bisa merupakan donor baru maupun donor ulang.

Pemeriksaan sampel dilakukan di Unit Transusi Donor Darah Pusat (UTDP) dan Lembaga Biologi Molekul Eijkman (LBME) dari Maret 2013 – Juni 2014. Pemeriksaan antibodi HBsAg pada sampel penelitian dilakukan dengan menggunakan metoda *Enzyme Immuno Assay* (EIA).

Reagen EIA HBsAg yang digunakan adalah Hepanostika Biomeriux®. Pemeriksaan untuk mengetahui adanya penanda anti-HBc dan anti-HBs dilakukan dengan teknik *Electro chemiluminescence Immuno Assay* (ECLIA) berdasarkan prinsip *sandwich*, dengan mengikuti prosedur yang disertakan dalam reagen. Reagensia yang digunakan adalah ADVIA Centaur XP 3947 dari Siemens dan Architect anti-HBs. Pemeriksaan untuk mengetahui adanya virus dilakukan dengan pemeriksaan molekular *Nucleid Acid Test* (NAT) dan dikonfirmasi dengan realtime RT-PCR.

Penelitian telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Indonesia No.783/H2. F1/VII/2013

Hasil

Hasil pemeriksaan EIA HBsAg dan NAT Multipleks secara paralel pada 4.973 bahan penelitian di Laboratorium uji saring IMLTD UTD PMI Pusat. Hasil pemeriksaan EIA HBsAg dan NAT Multipleks dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. EIA HbsAg dan NAT Multipleks

No	Asal Sampel	Total sampel	HBsAg (-) NAT (-)	HBsAg(-) NAT (+)	HBsAg (+) NAT (-)	HBsAg (+) NAT (+)
1	Kota Jakarta	2012	1993	4	0	15
2	Kota Tangerang	2081	2020	13	8	40
3	Kota Depok	178	173	1	0	4
4	Kab. Tangerang	702	693	2	0	7
	Total	4973	4879	20	8	66
	%	100	98.11	0.40	0.16	1.33

Sebanyak 20 sampel penelitian yang menunjukkan hasil pemeriksaan EIA HbsAg negative dan NAT Multipleks positif, hanya 16 sampel penelitian yang dapat dilanjutkan ke pemeriksaan NAT *discriminatory*, oleh karena 4 sampel

penelitian lainnya tidak memiliki volume yang mencukupi.

Hasil pemeriksaan NAT *discriminatory* tertera pada Tabel 2. Hasil pemeriksaan EIA pada Tabel 1 menunjukkan bahwa 4879 sampel berasal dari pendonor yang benar-benar tidak terinfeksi oleh

VHB, sedangkan 20 sampel lainnya menunjukkan bahwa darah tersebut berasal dari pendonor dengan infeksi hepatitis B *occult* (HBO). HBsAg positif dan NAT multipleks negatif pada delapan

sampel, menunjukkan sampel tersebut berasal dari pendonor dengan infeksi kronis VHB. HBsAg dan NAT multipleks positif menunjukkan darah tersebut berasal dari donor yang terinfeksi VHB.

Tabel 2. NAT Discriminatory

No	Asal sampel	Total sampel HBsAg (-) NAT Multipleks (+)	Total sampel yang periksa NAT <i>Discriminatory</i>	HBsAg (-) NAT VHB (+)	HBsAg (-) NAT VHB (-)
1	Kota Jakarta	4	2	2	0
2	Kota Tangerang	13	12	12	0
3	Kota Depok	1	1	1	0
4	Kab. Tangerang	2	1	1	0
	Total (%)	20	16 (80)	16 (100)	0

Hasil pemeriksaan NAT *discriminatory* pada 16 sampel penelitian menunjukkan seluruh sampel mengandung DNA VHB. Pemeriksaan anti-HBc dan anti-HBs pada 16 sampel HBsAg negatif dan NAT VHB positif menunjukkan hasil anti-HBc dan anti-HBs negatif pada satu sampel (6,25%); anti-HBc positif pada sembilan sampel (56,25%), anti HBs positif pada satu sampel (6,25%) serta anti-HBc dan anti-HBs positif pada lima sampel (31,25%).

Pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa jumlah *viral load* hanya dapat ditentukan pada enam sampel, yakni sampel nomor 1 sd 6; jumlah *viral load* tidak dapat ditentukan pada tiga sampel, yakni sampel nomor 10,15 dan 16; dan *viral load* berada dibawah sensitivitas alat pada 7 sampel, yakni sampel nomor 7 ,8, 9, 11, 12, 13 dan14. Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa DNA VHB tidak terdeteksi pada 3 dari 16 sampel (18,75%), meskipun hasil anti-HBc reaktif.

Tabel 3. Viral Load

No.	Sampel	NAT VHB	Serologi		Viral Load*	
			anti-HBc	anti-HBs	Copy/ml	IU/ml **
1	4391B	Positif	Reaktif	Non Reaktif	6,66 x 10 ³	8,66 x 10 ²
2	0181B	Positif	Reaktif	Reaktif	4,30 x 10 ³	5,59 x 10 ³
3	1204 A	Positif	Reaktif	Reaktif	3,35 x 10 ⁷	4,36 x 10 ⁷
4	1800A	Positif	Reaktif	Reaktif	3,95x10 ⁷	5,13 x 10 ⁷
5	1587A	Positif	Non Reaktif	Reaktif	2,23 x 10 ¹	2,29x10 ¹
6	4531B	Positif	Reaktif	Non reaktif	2,29 x 10 ²	2,98 x 10 ²
7	4011A	Positif	Reaktif	Reaktif	<37,3	<50
8	4391A	Positif	Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
9	4970A	Positif	Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
10	5742A	Positif	Reaktif	Non reaktif	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
11	37604A	Positif	Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
12	2575BA	Positif	Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
13	3445A	Positif	Non Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
14	6335BA	Positif	Reaktif	Non reaktif	<37,3	<50
15	9445A	Positif	Reaktif	Reaktif	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi
16	8036A	Positif	Reaktif	Non Reaktif	Tidak terdeteksi	Tidak terdeteksi

Pembahasan

Darah dari donor yang HBO, meskipun titer DNA VHB-nya rendah, dampak pemberian darahnya masih memerlukan kajian, oleh karena daya infeksi VHB sebagaimana juga virus lainnya tergantung pada dua faktor utama, yakni dosis infeksius dan kompetensi kekebalan *host*.¹² Mempertimbangkan volume materi infeksius pada transfusi darah, baik darah lengkap maupun komponen darah, anggapan bahwa infeksi akan terjadi jika ditemukan VHB DNA umumnya dapat diterima. Hal ini diperkuat dengan temuan pada penelitian sebelumnya yang menunjukkan tingginya risiko infeksi VHB pasca transfusi dibandingkan dengan risiko infeksi HCV atau HIV pasca transfusi. Lebih lanjut penelitian menunjukkan adanya risiko infeksi VHB melalui transfusi darah asal donor HBO pada fase resolusi hepatitis akut, yaitu saat DNA VHB mulai menghilang dan HBsAg menjadi negatif.

Hasil pemeriksaan NAT *discriminatory* menunjukkan hasil positif untuk VHB pada seluruh 16 sampel (100%). Tingginya prevalensi infeksi VHB pada pendonor darah Indonesia sejalan dengan tingginya prevalensi HBsAg positif di masyarakat (rata-rata 9,4%) yang menyebabkan Indonesia oleh WHO dikategorikan ke dalam negara dengan tingkat endemisitas medium hingga tinggi. Hal ini juga bisa dikaitkan dengan baru dimulainya vaksinasi hepatitis B di Indonesia, yakni sekitar 30 tahun yang lalu, sementara kelompok usia donor darah yang tertinggi adalah usia 31-50 thn (56%) dan usia 51-60 thn (17%) sehingga risiko untuk mendapatkan donor dengan *window period* infeksi VHB cukup tinggi.

Untuk meningkatkan keamanan darah dari infeksi VHB, beberapa negara dengan tingkat endemisitas infeksi VHB rendah seperti Amerika dan Jepang menambahkan parameter anti-HBc dalam uji saring darah donornya.¹³ Pada

penelitian ini, sebagaimana tampak pada profil serologi di Tabel 2, darah yang paling aman untuk ditransfusikan adalah darah dari kelompok anti-HBc negatif dengan atau tanpa anti-HBs, yaitu sebesar 6,25%. Individu dengan anti-HBc negatif dianggap tidak terinfeksi VHB karena anti-HBc merupakan parameter paparan terhadap VHB.¹⁴ Sementara itu, darah dari kelompok anti-HBc positif dengan anti-HBs negatif yang besarnya 56,25% masih diragukan keamanannya karena darah tersebut berasal dari donor yang pernah terpapar VHB dan belum membentuk kekebalan. Anti-HBc merupakan antibodi pertama yang muncul di dalam darah pasca infeksi, biasanya mulai terdeteksi pada minggu ke 6-8 pasca infeksi. Mula-mula IgM anti-HBc muncul dan akan mendominasi selama 6 bulan pertama dan setelah itu bentuk IgG anti-HBc akan mendominasi. IgM anti-HBc merupakan petanda serologik hepatitis B akut atau hepatitis B kronik fase reaktivasi.¹⁵ Pada *window period* juga didapat IgM anti-HBc positif, namun pada penelitian ini hanya dilakukan pemeriksaan anti-HBc kuantitatif.

Ditemukannya anti-HBc dengan atau tanpa anti-HBs pada 14 dari 16 (87,5%) sampel HBsAg negatif dan NAT VHB positif menunjukkan bahwa pada kondisi dimana HBsAg negatif, baik parameter DNA VHB maupun anti-HBc dapat digunakan untuk menetapkan status keamanan darah. Namun demikian, anti-HBc sebagai parameter paparan terhadap VHB negatif belum bisa menentukan bahwa darah aman, hal ini ditunjukkan dengan hasil pemeriksaan anti-HBc negatif pada 2 dari 16 (12,5%) sampel HBsAg negatif dan NAT positif. Adanya anti-HBs pada darah donor yang merupakan parameter penyembuhan dari infeksi VHB sama sekali tidak dapat dijadikan acuan keamanan darah terhadap VHB. Hal ini ditunjukkan dari ditemukannya anti-HBs positif pada 6 dari

16 (37,5%) sampel HBsAg negatif dan NAT VHB positif. Parameter DNA VHB merupakan parameter yang paling efektif untuk menentukan keamanan darah donor. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Sastri yang melakukan pemeriksaan anti-HBc dan DNA VHB pada 100 sampel donor darah asal Unit Tranfusi Darah PMI Kota Padang yang sudah lolos uji saring HBsAg. Hasil penelitiannya menunjukkan DNA VHB lebih tinggi ditemukan pada individu dengan anti-HBc positif daripada individu dengan anti-HBc negatif.¹⁶

Pemeriksaan DNA VHB terhadap 16 bahan penelitian, didapatkan hasil DNA VHB tidak terdeteksi pada 3 dari 16 sampel (18,75%), meskipun hasil anti-HBc reaktif. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah virus masih jauh dibawah sensitifitas hitung alat yang digunakan. Sebanyak 7(37,5%) sampel ,yakni sampel nomor 7, 8, 9, 11, 12, 13 dan 14 menunjukkan hasil *viral load* dibawah 50 IU/mL (*low detection*) dan 5 sampel menunjukkan hasil anti-HBc reaktif, artinya mungkin saja pendonor sudah mempunyai riwayat terpajan oleh VHB karena anti-HBc merupakan parameter paparan terhadap VHB.¹⁷ Sebanyak enam sampel (43,75%) dapat dideteksi *viral load*nya positif sehingga dilakukan pemeriksaan lanjutan PCR kualitatif, dan didapatkan nilai *viral load* tertinggi pada 2 sampel yaitu nomor 3 dan 4 sebesar $5,13 \times 10^7$ dan $4,36 \times 10^7$ IU/mL. Kedua sampel tersebut menunjukkan hasil serologi anti-HBc dan anti-HBs reaktif, sehingga hal ini menunjukkan pendonor tersebut berada pada fase infeksius.

Kesimpulan

Pemeriksaan NAT sebagai parameter uji saring darah donor efektif untuk mendeteksi DNA VHB pada darah donor dengan HBO.

Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan deteksi HBsAg dan HBV DNA secara parallel sebagai pemeriksaan skrining darah donor untuk meningkatkan keamanan darah donor dari infeksi HBV.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih untuk masukan dan dukungan penuh dari Dr. dr. Yuyun SM. Soedarmono, MSc dan dr. Meta Dewi Theja, M.Biomed, PhD. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada dr. Sumarti, M.Kes, Direktur Unit Transfusi Darah PMI Kab Bekasi untuk rekomendasi yang diberikan dan Prof. dr. David Handojo Muljono, SpPD, PhD, Kepala Laboratorium Hepatitis di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk melakukan penelitian di lembaga tersebut.

Daftar Rujukan

1. WHO Aide Memoire for National Health Programmes, Blood Safety. Blood Transfusion Safety Department of Essential Health Technologies World Health Organization 1211 Geneva 27, Switzerland.
2. Peraturan Pemerintah No. 7 tahun 2011 tentang Pelayanan Darah.
3. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 241/Menkes/SK/IV/2006 tentang Standar Pelayanan Laboratorium Kesehatan Pemeriksa HIV dan Infeksi Oportunistik.
4. Annual Report Red Cross of Indonesia 2013
5. Panigrahi R, Biswas A, Datta S. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Virology Journal*.2010;7:204-206.
6. Schödel F, Peterson D, Zheng J. Structure of Hepatitis B Virus Core and e-Antigen: A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *The Journal of Biological Chemistry*;1993;268(15):1332-37.
7. Thedja MD, Roni M, Harahap AR. Occult hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered

- antigenicity of the hepatitis B virus surface protein. *Hepatology*. 2010;4:608-14.
8. Soedarmono YS. Keamanan darah Transfusi terhadap virus Hepatitis B di Indonesia: Kegagalan deteksi serologi dan dasar molekulnya. Jakarta:FKUI; 2010.
 9. Said ZNA. An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. Apr 21, 2011;17(15):1927–38.
 10. Soedarmono YS, Lusinanto A, Indonesia individual donation screening experience with the improvement sensitivity Ultrio-Plus[®] reagent on Procleix[®] Tigris[®] System for detection of HIV, HCV, and HBV nuclei acid. *Vox Sanguinis*. 2012;103:258.
 11. Reesink HW, Engelfriet CP, Hen G. Occult hepatitis B infection in blood donors. *Vox Sanguinis*. 2008;94:153-66.
 12. Hollinger FB. Occult hepatitis B virus infection; A covert operation. *J Viral hepat*. 2010; 17(1):1-15.
 13. Kann M. Structural and Molecular Virology: Hepatitis B virus, human virus guides Dalam: lai CL and Locarnini S, penyunting. London. Internat med press. 2002:9-41.
 14. Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminar in liver disease*. 2004; 24. (Suppl 1):3-10.
 15. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Mol Biorev*. 2000; 64:51-68.
 16. Sastri S. Uji Anti-HBc pada donor darah yang sudah lolos skrining pada unit tranfusi darah PMI cabang Padang. 2008.
 17. Chiou HL, Lee TS, Kuo J. Altered antigenicity of 'a' determinant variant of hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 1997; 78:2639-45.

