

UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) UNTUK DETEKSI VIRUS HEPATITIS C.

Lina, M.R. *, Budiman Bela **, dan Dadang S. *

*Puslitbang Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta.

** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

ABSTRAK

UJI PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) UNTUK DETEKSI VIRUS HEPATITIS C.

C. Telah dilakukan penelitian uji teknik PCR untuk mendeteksi adanya virus hepatitis C dalam serum darah. Jumlah sampel serum darah yang digunakan adalah 50 buah berasal dari laboratorium rumah sakit RSCM dan laboratorium PMI. Perlakuan awal sampel untuk mengekstraksi RNA virus dilaksanakan dengan metoda BOOM yaitu menggunakan guanidin tiosianat untuk lisis sel virus dan diatom untuk mengikat RNA virus. Proses *reverse transcription* untuk mensintesis cDNA yang berasal dari RNA virus hasil ekstraksi serum darah, dilakukan dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan RNA-se inhibitor. Amplifikasi cDNA dilaksanakan dengan teknik PCR (*nested PCR*) yaitu dilakukan 2 kali proses PCR untuk tiap sampel dengan menggunakan 2 pasang primer oligonukleotida. Hasil amplifikasi dari proses PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa dan pewarnaan etidium bromida, selanjutnya divisualisasi menggunakan *UV transilluminator*. Dari 50 buah sampel serum darah yang diteliti, menunjukkan adanya virus hepatitis C dalam 13 sampel serum yang dinyatakan dengan adanya pita DNA spesifik pada gel agarosa.

ABSTRACT

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) ASSAY TO DETECT HEPATITIS C VIRUS.

Research on the detection of hepatitis C virus in blood serum using PCR technique has been carried out. Amount of 50 blood serum from laboratory of Indonesia Red Cross (Palang Merah Indonesia - PMI) and RSCM hospital as samples, were used in this research. Lysis of virus cell and extraction of RNA virus as a preliminary treatment of the sample, was done with BOOM method using guanidine thiocyanate and diatomaceous earth, respectively. Syntesis of cDNA from RNA as an extraction product mentioned above, was carried out by means of reverse-transcriptase and RNA-se inhibitor. Amplication of cDNA was done with nested PCR technique that was performed with two times PCR processes using two pairs of oligonucleotide primers for each process. The amplified DNA was detected by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Subsequently, the DNA was visualized with UV transilluminator. Result shows that of 50 blood serum samples, 13 serum were positive for RNA HCV that were performed with the present of spesific DNA band on agarose gel.

PENDAHULUAN

Virus hepatitis C (HCV) ditemukan pada tahun 1989 dan merupakan penyebab utama hepatitis non A non B pasca transfusi (1, 2). Virus ini dapat menyebabkan penyakit liver akut, kronik, sirosis hati yang berpotensi menjadi kanker hati (*hepatocellular carcinoma /HCC*) (3, 4, 5). Pada umumnya infeksi HCV menunjukkan gejala ringan bahkan ada pengidap yang tidak menunjukkan gejala, meskipun demikian 50% dari individu yang terinfeksi terlihat berkembang menjadi hepatitis kronik, dan 20% menjadi sirosis (6). Menurut COLOMBO dkk, NISHIOKA dkk, dan KHAN dkk yang dikutip oleh WIDJAJA (7) dan BRUIX (8), mengemukakan adanya

keterkaitan infeksi HCV dengan kanker hati. Daya penularan penyakit ini sangat tinggi terutama di negara berkembang dan padat penduduknya termasuk Indonesia. Saat ini prevalensi hepatitis C diantara donor darah bervariasi antara 0,1 - 0,3% di Eropa Barat dan Amerika Utara sedangkan di Jepang sampai 1,2%. Hal ini dikemukakan oleh ALTER dalam WIDJAJA (7), sedangkan menurut BUDIHUSODO dkk. (9), prevalensi di Indonesia 0,5 - 3,4% (9). Salah satu faktor penularan HCV antara lain adalah dari organ maupun jaringan yang terinfeksi HCV yang ditransplantasikan (10, 11,12) Hasil penelitian PEREIRA dkk (10) menyatakan prevalensi anti HCV dalam donor darah jenazah adalah 1,8% (13 dari 716 donor).

Pada transplantasi jaringan biologi, faktor-faktor penyebab penyakit setelah transplantasi antara lain karena infeksi kuman dan virus. Oleh karenanya, jaringan biologi tersebut yang berasal dari donor hidup maupun jenazah, harus bebas dari kuman penyakit dan virus seperti HBV, HCV, dan HIV.

Dalam perkembangan Bank Jaringan di Indonesia khususnya Bank Jaringan Riset Batan, sangat diperlukan penelitian sehubungan dengan penyediaan jaringan biologi berkualitas tinggi (13). Penelitian yang sangat perlu dilaksanakan adalah deteksi agen penyebab penyakit khususnya virus (HBV, HCV, HIV) dari donor organ maupun jaringan melalui pemeriksaan darahnya. Deteksi yang biasa dilakukan untuk mengetahui adanya infeksi virus adalah dengan penanda serologi. Pada infeksi HCV, diagnosis didasarkan pada adanya anti HCV dalam serum darah, menggunakan teknik *ELISA* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) yang dapat dilanjutkan dengan teknik *RIBA* (*Recombinant Immunoblot Assay*) untuk meningkatkan spesifitas (3, 14). Cara deteksi yang lebih sensitif dan spesifik adalah dengan mendeteksi RNA HCV dengan teknik *RT - PCR* (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) (6, 10, 14, 15, 16). Metode ini sangat penting terutama pada *window period*, periode dimana telah terjadi infeksi HCV tetapi antibodi belum terbentuk/terdeteksi. Oleh karenanya PCR merupakan metode diagnostik standar untuk infeksi HCV kronik maupun akut misalnya pada pasien yang *immunosupressed* seperti resipien transplantasi ginjal.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi RNA HCV dari Serum Darah. Serum darah yang digunakan berjumlah 50 terdiri dari 25 serum darah dari laboratorium rumah sakit Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) yang telah dideteksi dengan hasil RNA positif secara kuantitatif. Dua puluh lima serum darah yang lain berasal dari laboratorium Palang Merah Indonesia terdiri dari 20 serum positif dan 5 serum negatif HCV berdasarkan hasil deteksi secara serologi menggunakan teknik *ELISA*. Metode yang digunakan untuk ekstraksi RNA serum tersebut di atas adalah metode BOOM menggunakan bufer lisis yang terdiri dari larutan guanidin tiosianat, Tris - HCl, EDTA dan triton X 100 (bufer lisis L6 dan bufer pencuci L2). Sampel darah ditambah dengan bufer lisis L6 dan larutan diatom kemudian divortex, digoyang dan diinkubasi kemudian disentrifugasi 12.000 rpm. Selanjutnya dicuci dengan bufer pencuci L2 dan diendapkan dengan etanol 70% dan

aseton. Pelet dikeringkan dalam *waterbath* pada suhu 56°C 10 menit, kemudian ditambah larutan TE, divortex dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm. Supernatan yang mengandung RNA HCV dipisahkan yang selanjutnya akan digunakan pada proses reverse transkripsi untuk pembuatan cDNA.

Proses Reverse Transkripsi. RNA yang diperoleh diinkubasi pada 56°C selama 10 menit lalu secepatnya dimasukkan ke dalam es. Dari larutan tersebut diatas diambil 5µl dimasukkan ke dalam 20 µl campuran pereaksi untuk proses reverse transkripsi yang terdiri dari 1x larutan bufer, 200 unit *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT)*, 30 unit RNA - se inhibitor, 80 pmol random primer, 0.5 mM masing-masing dNTP, 10 mM larutan dithiothreitol dan air DEPC. Sintesis cDNA dilakukan dengan menginkubasi campuran tersebut di atas pada suhu 37°C selama satu jam dan kemudian dipanaskan pada air mendidih selama satu menit.

Proses Amplifikasi DNA. Proses Amplifikasi dilakukan dengan metode nested PCR menggunakan 2 pasang primer yang didesain dari 5' *Non Coding Region* (NCR). Campuran pereaksi PCR pertama terdiri dari 5 µl larutan cDNA, 50 pmol masing-masing primer dengan sekwens yang telah dipublikasi oleh HOUGHTON yang dikutip oleh WIDJAJA (7) dan (5' CCACCATAGATCTCTCCCCTGT) dan (5' ATACTCGAGGT GCACGGTCTACGA), 0.2 mM masing-masing dNTP, 3 unit Taq polymerase, 1x bufer PCR, 2,5 mM MgCl₂ dan 0,01% gelatin. Jumlah siklus yang dipakai adalah 35 siklus dengan tahap denaturasi 96°C 30 detik, annealing 48°C 45 detik, extension 72°C 60 detik dan extended extension 72°C 6 menit. Proses PCR yang kedua dilakukan dengan mencampur 2 µl hasil PCR yang pertama dengan campuran pereaksi seperti pada proses PCR pertama. Primer oligonukleotida yang digunakan (5'AGATCTTCACGAAGAAAAGCGT) dan (5'CACTCTCGAGCACCCCTATCAGGCAGT). Jumlah siklus yang dipakai 30 siklus dengan kondisi PCR sama dengan proses PCR pertama.

Deteksi DNA Hasil Amplifikasi. Fragmen DNA hasil proses PCR setelah ditambah dengan loading bufer dianalisis dengan teknik elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi agarosa sebesar 1,5% (b/v). Proses elektroforesis dilakukan dalam bufer TBE (Tris-Borat-EDTA) dengan voltase konstan (100 V). Visualisasi DNA yang telah dielektroforesis, dilakukan dengan mewarnai gel dengan larutan etidium bromida dan memaparkan gel di bawah UV transilluminator. Penentuan ukuran berat

molekul fragmen DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan menggunakan penanda berat molekul (marker) Hae III ØX174.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil proses PCR dan deteksinya menggunakan elektroforesis gel agarosa (PCR kualitatif), menunjukkan hanya 5 sampel yang positif HCV dari 25 serum darah yang diperoleh dari laboratorium RSCM (Tabel 1). Sampel tersebut telah dideteksi sebelumnya dengan hasil RNA HCV positif secara kuantitatif menggunakan kit komersial. Hal ini mungkin disebabkan proses ekstraksi RNA, primer oligonukleotida dan cara deteksi produk PCR yang digunakan laboratorium tersebut sensitivitasnya lebih tinggi daripada yang digunakan dalam penelitian ini. CHA *et al.* (17), menyatakan banyak faktor berperan dalam proses RT-PCR, seperti misalnya integritas RNA selama proses isolasi/ekstraksi tergantung pada efisiensi inhibitor RNase dalam

sampel serum. Faktor lain yang lebih penting adalah desain primer sangat mempengaruhi efisiensi proses amplifikasi PCR. Dalam penelitiannya dinyatakan beberapa sampel serum yang positif HCV dengan menggunakan primer yang dirancang dari daerah 5-UT hasilnya negatif dengan pasangan primer lain. Menurut HOSODA (15), yang mengemukakan juga bahwa seleksi lokasi primer sangat penting untuk deteksi HCV dengan PCR Berdasarkan hasil penelitiannya menggunakan primer dari *nonstructural region* genom HCV untuk proses PCR, RNA HCV yang terdeteksi pada pasien dengan nonA nonB hepatitis kronik hanya 60%, sedangkan dengan menggunakan primer dari *noncoding region*, RNA HCV yang terdeteksi = 95%. Kemungkinan lain dari hasil tersebut di atas, sampel serum tersebut telah lama disimpan dalam suhu atau tempat yang tidak sesuai sehingga mempengaruhi virus di dalamnya terutama RNA virus. Dalam uji RT-PCR secara kualitatif seperti yang digunakan dalam penelitian ini, hal penting yang perlu diperhatikan adalah penyimpanan spesimen, penanganan spesimen, dan inhibitor dalam proses PCR (18).

Tabel 1. Hasil deteksi HCV dari sampel darah berasal dari Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo

Kode Sampel	Deteksi dengan PCR Kuantitatif	Deteksi dengan PCR Kualitatif
1.	Positif	Positif
2.	Positif	Negatif
3.	Positif	Negatif
4.	Positif	Negatif
5.	Positif	Negatif
6.	Positif	Negatif
7.	Positif	Negatif
8.	Positif	Negatif
9.	Positif	Positif
10.	Positif	Negatif
11.	Positif	Negatif
12.	Positif	Negatif
13.	Positif	Negatif
14.	Positif	Negatif
15.	Positif	Negatif
16.	Positif	Positif
17.	Positif	Positif
18.	Positif	Positif
19.	Positif	Negatif
20.	Positif	Negatif
21.	Positif	Negatif
22.	Positif	Negatif
23.	Positif	Negatif
24.	Positif	Negatif
25.	Positif	Negatif

Dari 20 sampel serum yang diperoleh dari laboratorium PMI dengan anti HCV positif secara serologi menggunakan teknik *ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* menunjukkan hanya 7 sampel yang positif HCV dengan teknik yang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 2). Untuk kasus seperti ini dapat berarti adanya suatu infeksi di masa lampau atau kemungkinan adanya *intermittent viremia* dan juga karena adanya pola awal viremia yang terlambat (14, 19). Tabel 2 juga menunjukkan hasil positif HCV untuk 1 sampel dengan metode PCR kualitatif yang dilakukan dalam penelitian ini. Sampel tersebut adalah salah satu sampel diantara 5 buah sampel serum yang negatif HCV secara serologi digunakan sebagai pembanding yang berasal dari laboratorium PMI.

Kasus seperti ini telah ditemukan pada penderita-penderita dengan hepatitis menahun dan donor darah (*post transfusional hepatitis*) (14). Viremia dapat terdeteksi dengan adanya anti HCV/ antibodi spesifik dengan metode serologi. Namun, antibodi tersebut terbentuk dalam periode waktu tertentu setelah terjadi infeksi., tergantung dari respon immune dari pasien (7). Menurut CHIEN *et al* yang dikutip oleh HOUGHTON (4), serokonversi anti HCV setelah infeksi adalah 7 sampai 31 minggu. Periode waktu antara terdeteksinya antibodi dengan infeksi HCV adalah 12 minggu (3), dan 15 minggu (20). Hasil penelitian GARSON *et al* (19), menunjukkan antibodi HCV tidak terdeteksi sampai 18 minggu dengan protein C100 HCV, tetapi RNA HCV dengan teknik PCR dapat

dideteksi dalam 4 minggu. Periode dimana antibodi belum terbentuk atau belum cukup untuk dideteksi dengan teknik yang tersedia, akan tetapi sudah terjadi infeksi virus dikenal dengan *window phase/period*. Kasus semacam ini juga dapat terjadi pada pengidap karier HCV yang tidak mempunyai gejala (21). Dari data tersebut dapat dijelaskan hepatitis C dapat ditransmisi dari donor dengan anti HCV negatif.

Tabel 2. Hasil deteksi HCV dari sampel darah berasal dari laboratorium Palang Merah Indonesia

Kode Sampel	Deteksi dengan teknik <i>ELISA</i>	Deteksi dengan PCR Kualitatif
1a.	Positif	Positif
2a.	Positif	Positif
3a.	Positif	Negatif
4a.	Positif	Positif
5a.	Positif	Negatif
6a.	Positif	Positif
7a.	Positif	Negatif
8a.	Positif	Positif
9a.	Positif	Negatif
10a.	Positif	Negatif
11a.	Positif	Positif
12a.	Positif	Negatif
13a.	Positif	Negatif
14a.	Positif	Negatif
15a.	Positif	Negatif
16a.	Positif	Negatif
17a.	Positif	Positif
18a.	Positif	Negatif
19a.	Positif	Negatif
20a.	Positif	Negatif
21a.	Negatif	Negatif
22a.	Negatif	Negatif
23a.	Negatif	Positif
24a.	Negatif	Negatif
25a.	Negatif	Negatif

Hasil RT-PCR dari sample serum darah dan deteksinya dengan teknik elektroforesis gel agarosa, dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil positif HCV diperlihatkan dengan adanya pita DNA spesifik dengan ukuran berkisar 255 bp., terlihat pada lajur 2 yang merupakan sampel positif HCV dari RSCM, dan lajur 10, 11, 12 merupakan sampel positif HCV yang berasal dari laboratorium PMI. Ukuran pita DNA ditentukan dengan marker Φ X174 Hae III (Lajur 1).

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, sensitivitas uji PCR perlu ditingkatkan yaitu dengan menggunakan primer yang lebih sensitif, cara deteksi hasil PCR secara radioaktif,

serta penggunaan pelacak DNA berlabel radioaktif untuk proses hibridisasi hasil PCR.

KESIMPULAN

- *Nested RT-PCR* kualitatif RNA HCV dengan menggunakan primer yang dirancang dari *NCR region* yang digunakan dalam penelitian ini, dapat mendeteksi RNA HCV dalam 5 sampel serum darah dari 25 sampel positif RNA HCV kuantitatif. Teknik ini dapat juga mendeteksi RNA HCV dalam 7 sampel serum dari 20 sampel positif anti HCV dan dalam 1 sampel dari 5 sampel negatif anti HCV secara serologi yang diperoleh dari laboratorium PMI
- Peningkatan sensitivitas deteksi HCV berdasarkan hasil penelitian ini, dapat dilaksanakan antara lain dengan menggunakan primer yang didesain dari daerah genom HCV yang lebih *conserved*, cara deteksi yang lebih sensitif misalnya dengan menggunakan primer berlabel radioaktif, dan penggunaan pelacak DNA berlabel radioaktif untuk proses hibridisasi produk RT-PCR

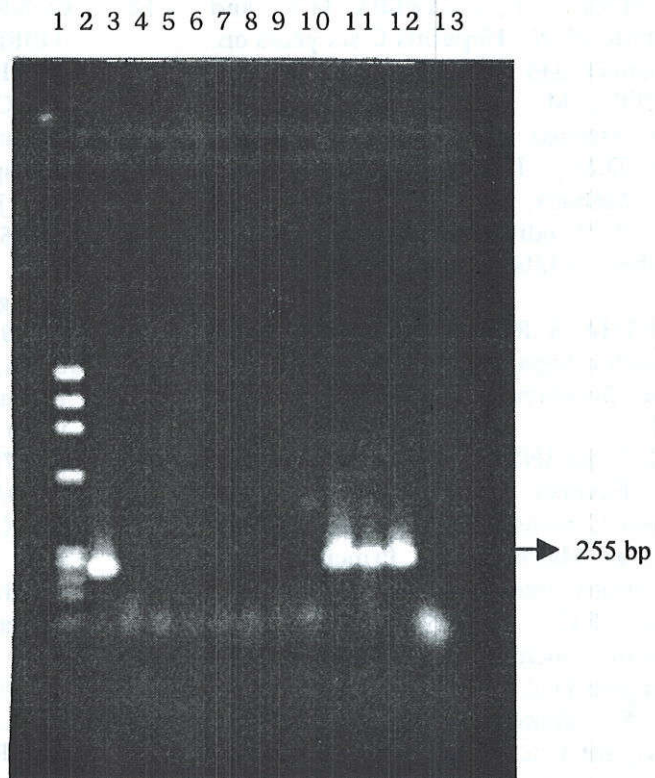
UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Almaida dan Sdr. Rika Heryani atas bantuan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik dan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

1. CHOO, Q.L., KUO, G., WEINER, A.J., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W., and HOUGHTON, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood borne non A, non B viral hepatitis genome. *Science* **244** 359 - 362 (1989).
2. KUO, G., CHOO, Q.L., ALTER, H.J., GITNICK, G.L., REDEKER, A.G. PURCELL, R.H., MIYAMURA, T., DIENSTAG, J.L., ALTER, M.J., STEVEN, C.E., TEGTMEIER, G.E., BONINO, F., COLOMBO, M., LEE, W.S., KUO, C., BERGER, K., SHUSTER, J.R., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W., and HOUGHTON, M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A, non B hepatitis. *Science* **244** 362 - 364 (1989).

3. Van der POEL, C.I., CUYPERS, H.T., and REESINK, H.W. Hepatitis C six years on. *The Lancet* 344 1475 - 1479 (1994).
4. HOUGHTON, M. Hepatitis C virus. In *Fields Virology* vol. 1. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., and Straus, S.E. (eds.), 3rd edition, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia - New York (1996).
5. DALIMARTHA, S. Ramuan tradisional untuk pengobatan hepatitis. Penerbit P.T. Penebar Swadaya, edisi ke dua, Jakarta (1998)
6. WILBER, J.C., JOHNSON, P.J., and URDEA, M.S. Reverse Transcriptase- PCR for hepatitis C virus RNA. In *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., and White, T.J. (eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C. (1993).
7. WIDJAJA, S. Epidemiology of hepatitis B and hepatitis C virus infection in an urban area in Jakarta, Indonesia : A hospital and population based study. Thesis for the degree of Doctor in de Medische Wetenschappen, Leuven (1996).
8. BRUIX, J., BARRERA, J.M., CALVET, X., COSTA, J., VENTURA, M., BRUGUERA, M., CASTILLO, R., ERCILLA, G., SANCHEZ-TAPIAS, J., VALL, M., BRU, C., and RODES, J. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet* ii 1004 - 1006 (1989).
9. BUDIHUSODO, U., SULAIMAN, H.A., AKBAR, H.N. et al Seroepidemiology of HBV and HCV infection in Jakarta, Indonesia. *Gastroenterology* 26 196 - 201 (1991).
10. PEREIRA, B.J.G., MILFORD, E.L., KIRKMAN, R.L., and LEVEY, A.S. Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation . *The New England Journal of Medicine* 325 7 454 - 460 (1991).
11. POTERUCHA, J.J., RAKELA, J., LUM, ENG, L., LEE, C.H., TASWELL, H.F., and WIESNER, R.H. Diagnosis of chronic hepatitis C after liver transplantation by the detection of viral sequences with polymerase chain reaction. *Hepatology* 15 1 42 -45 (1992).
12. CONRAD, E.U., GRETCH, D.R., OBERMEYER, K.R., MOOGK, M.S., SAYERS, M., WILSON, J.J., and STRONG, D.M. Transmission of hepatitis C virus by tissue transplantation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 77-A 2 214 - 224 (1995).
13. NAZLY HILMY. Perkembangan bank jaringan di Indonesia. *Bulletin Batan* (1999).
14. LUSIDA, I., SOEMARTO, dan SOETJIPTO. Reaksi rantai polimerase untuk diagnosis virus hepatitis C.. *Medika* 2 127 - 129 (1997).
15. HOSODA, K., OMATA, M., YOKOSUKA, O., KATO, N., and OHTO, M. Non A, Non B chronic hepatitis is chronic hepatitis C : A sensitive assay for detection of hepatitis C virus RNA in liver. *Hepatology*. 15 5 777 - 781 (1992).
16. HU, K.Q., YU, C.H., and VIERLING, J.M. One step RNA polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus RNA. *Hepatology*. 18 270 - 274 (1993)
17. CHA, T.A., BEALL, E., IRVINE, B., KOLBERG, J., CHIEN, D., KUO, G., and URDEA, M.S. At least five related , but distinct, hepatitis C viral genotypes Exist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89 7144 - 7148 (1992).
17. SIMON, S. Diagnostic tests for hepatitis C. Seminar Nasional : Quality Assurance Programme for Molecular-Based Diagnostis of Hepatitis C and Tuberculosis. Catholic University of Atma Jaya, 19 Juni 2003, di Jakarta.
18. GARSON, J.A., TUKE, P.W., MAKRIS, M., BRIGGS, M., MACHIN, S.J., PRESTON, F.E., and TEDDER, R.S. Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis C virus-contaminated factor VIII concentrates. *The Lancet* 21. 1022 - 1025 (1990).
19. BHANDARI, B.N., and WRIGHT, T.L. Hepatitis C : An overview. *Annu. Rev. Med.* 46 309 - 317 (1995).
20. ZANETTI, A.R., TANZI, E., ZEHENDER, G., MAGNI, E., INCARBONE, C., ZONARO, A., PRIMI, A., CARIANI, E. Hepatitis C virus RNA in Symptomless donors implicated in post-transfusion non A, non B hepatitis. *The Lancet*. 448 - 449 August 18 (1990).



Gambar 1. Fragmen DNA hasil elektroforesis RT-PCR-HCV dari sample serum darah

- Lajur 1 : Marker ϕ X17 HaeIII
- Lajur 2,3,4,5,6,7 : Sampel serum darah dari RSCM
- Lajur 8,9,10,11,12 : Sampel darah dari PMI
- Lajur 13 : Kontrol negatif

DISKUSI :

NELLY (IPB)

Secara umum metode skrining yang digunakan saat ini dibanding PCR, mana yang lebih spesifik, murah dan mudah ?

MARIA LINA R.

Metode yang umum digunakan adalah secara serologi dengan metode Elisa. Metode PCR lebih sensitif dan spesifik terutama jika menggunakan primer yang di desain dari genom HCV yang lebih *conserved* atau dengan primer yang dilabel dengan radioaktif ataupun dengan pelacak DNA berlabel radioaktif. Saat ini teknik PCR lebih mahal dibanding dengan teknik Elisa.

NAZLY HILMY

Apakah sampel darah yang digunakan, telah diuji dengan teknik Elisa dengan hasil negatif. Mengingat tujuan pemakaian untuk mengatasi masalah *window period* ?. Kalau benar sudah diuji berapa persen yang positif PCR, negatif dengan Elisa ?. Hepatitis C dapat menjadi penyebab kanker hati.

MARIA LINA R.

Sampel darah yang digunakan yang diambil dari laboratorium PMI semuanya sudah diuji secara serologi dengan teknik Elisa. Dari 25 sampel yang diambil, 5 sampel negatif HCV. Dengan teknik PCR (*nested PCR*) yang digunakan dalam penelitian ternyata dari 5 sampel negatif HCV tersebut, 1 sampel positif (20 %). Namun angka tersebut perlu dievaluasi lagi menggunakan jumlah sampel negatif HCV yang lebih besar. Hepatitis C kronik akan berkelanjutan menjadi sirosis dan kanker hati apabila virus sudah terintegrasi ke dalam sel hati.

SOBRIZAL

Bagaimana Ibu mendapatkan 2 pasang primer yang digunakan dan berapa besar produknya.

MARIA LINA R.

Primer yang dipakai dalam penelitian ini sesuai dengan primer yang digunakan peneliti terdahulu. Namun, dapat dirancang sendiri menggunakan program atau *software* khusus sehingga dapat ditentukan daerah yang lebih *conserved* dari genom HCV. Besar produk PCR : 255 bp (dengan *inner primer*) 322 bp (dengan *outer primer*)

DARMAWAN DARWIS

Mohon dijelaskan mekanisme reaksi PCR dalam menentukan virus pada darah.

MARIA LINA R.

Mekanismenya :

- Lisis sel virus dalam darah.
- Ekstraksi RNA virus.
- Proses reverse - transkripsi dari RNA menjadi c DNA.
- Proses amplifikasi c DNA hasil proses reverse - transkripsi dengan teknik PCR.
- Deteksi hasil PCR dengan teknik elektroforesis gel agarosa.

