

ISBN 978-979-3558-23-3

**PROSIDING SEMINAR ILMIAH HASIL
PENELITIAN TAHUN 2009**

APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI

Jakarta, 02 Desember 2010



**BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
PUSAT APLIKASI TEKNOLOGI ISOTOP DAN RADIASI
JAKARTA 2011**

- ISBN 978-979-3558-23-3
- Penyunting :
1. Prof. Dr. Ir. Mugiono - PATIR-BATAN
 2. Prof. Ir. Sugiarto - PATIR-BATAN
 3. Prof. Ir. A. Nasroh Kuswadi, M.Sc - PATIR-BATAN
 4. Dra. Rahayuningsih Chosdu, MM - PATIR-BATAN
 5. Dr. Paston Sidauruk - PATIR-BATAN
 6. Dr. Hendig Winarno, M.Sc. - PATIR-BATAN
 7. Dr. Ir. Sobrizal - PATIR-BATAN
 8. Ir. Suharyono, M.Rur.Sci - PATIR-BATAN
 9. Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Toleng - UNHAS
 10. Dr. Nelly Dhevita Leswara - UI
- APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
Jakarta, 02 Desember 2010

SEMINAR ILMIAH HASIL PENELITIAN APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI (2009 : JAKARTA), Prosiding seminar ilmiah hasil penelitian aplikasi isotop dan radiasi, Jakarta, 2 Desember 2010 / Penyunting, Mugiono ... (*et al.*) -- Jakarta : Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, 2011.

i, 451 hal.; ill.; tab.; 30 cm

ISBN 978-979-3558-23-3

I. Isotop - Seminar I. Judul II. Badan Tenaga Nuklir Nasional III. Mugiono

541.388

Alamat : Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49
Kotak Pos 7002 JKSKL
Jakarta 12440
Telp. : 021-7690709
Fax. : 021-7691607
021-7513270
E-mail : patir@batan.go.id
sroji@batan.go.id
Home page : <http://www.batan.go.id/patir>

BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
PUSAT APLIKASI TEKNOLOGI ISOTOP DAN RADIASI
JAKARTA

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa dimana atas berkat dan rahmat Nyalah maka Prosiding Seminar Ilmiah Hasil Penelitian Aplikasi Isotop dan Radiasi tahun 2009 Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami menginformasikan kepada masyarakat tentang hasil kegiatan penelitian PATIR-BATAN berupa buku "Prosiding Seminar Ilmiah Hasil Penelitian Aplikasi Isotop dan Radiasi, tahun 2009", Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, Badan Tanaga Nuklir Nasional (2011).

Penyusun menyampaikan permintaan maaf apabila pada penerbitan ini, masih banyak hal yang kurang sempurna, untuk itu kami sangat mengharapkan saran perbaikan. Tidak lupa pula penyusun juga menyampaikan terima kasih kepada para penulis dan semua pihak yang telah membantu dalam persiapan maupun pelaksanaan penerbitan buku Prosiding tersebut.

Jakarta, 7 Februari 2011

Penyusun,

DAFTAR ISI

Pengantar.....	i
Daftar Isi	iii
Bidang Pertanian	
Pemuliaan tanaman padi untuk mendapatkan varietas unggul nasional dan hibrida; observasi dan uji daya hasil pendahuluan galur mutan asal iradiasi ki 237 dan ki 432 SOBRIZAL, CARKUM, NANA SUPRIATNA, YULIDAR, WINDA PUSPITASARI.....	1
Uji daya hasil dan respon terhadap serangan jamur <i>aspergillus flavus</i> pada galur mutan kacang tanah PARNO DAN SIHONO	7
Uji adaptasi, uji ketahanan terhadap penyakit dan hama penting serta analisis nutrisi galur-galur mutan harapan kedelai umur sedang dan genjah berukuran biji besar HARRY IS MULYANA, ARWIN, TARMIZI DAN MASRIZAL	13
Pemurnian dan pendeskripsian sifat agronomi mutan padi rendah kandungan asam fitat ARWIN, AZRI KUSUMA DEWI, YULIDAR DAN WINDA PUSPITASARI.....	29
Perbaikan genetik tanaman kacang hijau toleran cekaman abiotik (kekeringan) dan biotik melalui teknik mutasi dan bioteknologi YULIASTI, SIHONO DAN SISWOYO	37
Pembentukan populasi dasar padi hitam dengan teknik mutasi SHERLY RAHAYU, MUGIONO, HAMBALI, DAN YULIDAR	45
Peningkatan keragaman genetik bawang merah (<i>allium ascalonicum</i> l.) melalui pemuliaan mutasi ISMIYATI SUTARTO DAN MARINA YUNIAWATI	53
Perbaikan sifat tanaman obat <i>artemisia cina</i> dengan sinar gamma ARYANTI, ULFA TAMIN DAN MARINA YUNIAWATI	61
Observasi galur mutan tanaman jarak pagar (<i>jatropha curcas</i> l.) generasi m1v5 pada tahun ketiga ITA DWIMAHYANI , SASANTI WIDIARSIH, WINDA PUSPITASARI DAN YULIDAR	67

Observasi, seleksi dan uji daya hasil lanjut galur mutan tanaman kapas (<i>Gossypium hirsutum</i> .L) dengan teknik mutasi LILIK HARSANTI, ITA DWIMAHYANI, TARMIZI, SISWOYO DAN HAMDANI	75
Perbaikan varietas padi sawah dengan teknik mutasi MUGIONO, SHERLY RAHAYU, HAMALI, YULIDAR	85
Pengujian ketahanan galur-galur mutan sorgum terhadap lahan masam SOERANTO HUMAN, SIHONO, PARNO DAN TARMIZI	93
Perbaikan varietas padi lokal dan padi gogodengan teknik pemuliaan mutasi : uji daya hasil, serta seleksi galur mutan padi lokal dan padi gogo AZRI KUSUMA DEWI, MUGIONO, HAMBALI, YULIDAR DAN SUTISNA	103
Optimalisasi pemupukan padi sawah hasil litbang batan dengan teknik nuklir HARYANTO	115
Budidaya padi sawah dengan sistem sri dan bahan organik pupuk kandang SETIYO HADI WALUYO	125
Produksi Azofert (Reformulasi Azora) ANIA CITRARESMINI, SRI HARTI S., HALIMAH, ANASTASIA D.	135
Penghematan pupuk dalam sistem pergiliran tanaman di lahan kering/ tadah hujan IDAWATI DAN HARYANTO	143
Uji terap dan uji toksisitas formulasi penglepasan terkendali (fpt) insektisida dimehipo terhadap serangga yang diinokulasikan pada tanaman padi SOFNIE M.CHAIRUL, HENDARSIH, DAN A.N. KUSWADI	153
Uji virulensi isolat <i>beauveria bassiana</i> (balsamo) vuill. (deuteromycotina: hyphomycetes) terhadap hama sayuran (lanjutan) MURNI INDARWATMI, A.N. KUSWADI, DAN INDAH A. NASUTION	165
Perbaikan kualitas lalat buah <i>bactrocera carambolae</i> (drew & hancock) (diptera = tephritidae) mandul untuk pengendalian dengan teknik serangga mandul INDAH ARASTUTI NASUTION, MURNI INDARWATMI DAN A. NASROH KUSWADI	173
Uji kandungan nutrisi sorgum fermentasi untuk mengetahui kemampuannya sebagai pakan ruminansia secara <i>in vitro</i> LYDIA ANDINI, W. TEGUH S., DAN EDY IRAWAN K.	181

Inovasi pakan komplit terhadap fermentasi rumen, pencernaan dan penambahan berat badan pada ternak domba SUHARYONO, C. E. KUSUMANINGRUM, T. WAHYONO DAN D. ANSORI.....	189
Budidaya ikan air tawar yang diberi pakan stimulan dengan pemanfaatan teknik nuklir. ADRIA PM	195
Daun <i>tithonia diversifolia</i> , sebagai penyusun pakan komplit ternak Ruminansia Secara <i>In-Vitro</i> FIRSONI.....	201
Respon imun <i>brucella abortus</i> untuk pengembangan vaksin iradiasi brucellosis BOKY JEANNE TUASIKAL, TRI HANDAYANI, TOTTI TJIPTOSUMIRAT	209
Uji lapang terbatas bahan vaksin fasciolosis untuk ternak ruminansia TRI HANDAYANI, BOKY JEANNE TUASIKAL, T. TJIPTOSUMIRAT.....	219
Bidang Proses Radiasi	
Uji coba produksi tulang xenograf radiasi untuk pemakaian periodontal BASRIL ABBAS.....	229
Sintesis dan karakterisasi <i>injectable</i> komposit hidroksiapatit –pvp-kitosan dengan iradiasi berkas elektron sebagai graft tulang sintetik DARMAWAN DARWIS, LELY H., YESSY WARASTUTI DAN FARAH NURLIDAR	239
Sintesis iradiasi komposit tricalcium fosfat (tcp)- kitosan untuk graft tulang dan karakterisasi sifat fisiko-kimianya ERIZAL, A.SUDRAJAT, DEWI S.P.	245
Metode rt-pcr (<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>) dan hibridisasi dot blot dengan pelacak berlabel ³² p untuk deteksi hcv (<i>hepatitis c virus</i>). LINA, M.R	253
Uji praklinis simplisia mahkota dewa (<i>phaleria macrocarpa</i> (scheff) boerl.) radiopasteurisasi sebagai antidiabetes pada tikus NIKHAM DAN RAHAYUNINGSIH CHOSDU	261

Pengaruh radiopasteurisasi pada simplisia kulit batang mahkota dewa (<i>phaleria macrocarpa (scheff) boerl.</i>) terhadap aktivitas anti kanker (lanjutan) ERMIN KATRIN, SUSANTO DAN HENDIG WINARNO	269
Pembuatan membran elektrolit dengan teknologi proses radiasi untuk direct methanol fuel cell (dmfc) AMBYAH SULIWARNO	279
Formulasi peningkat indeks viskositas minyak lumas sintetis MERI SUHARTINI, RAHMAWATI, I MADE SUMARTI KARDHA HER WINARNI, DEVI LISTINA P	287
Tinjauan membran serat berongga polisulfon untuk hemodialisis KRISNA LUMBAN RAJA, DEWI SEKAR P, NUNUNG, DAN OKTAVIANI	297
Degradasi lignoselulosa serbuk kayu menggunakan radiasi berkas elektron SUGIARTO DANU, DARSONO, MADE SUMARTI KARDHA, DAN MARSONGKO	313
Efektivitas khitosan iradiasi sebagai bahan pengawet makanan GATOT TRIMULYADI REKSO	321
Pengaruh ekstrak rendang iradiasi dosis tinggi terhadap kapasitas antioksidan, proliferasi limfosit dan hemolisis eritrosit manusia ZUBAIDAH IRAWATI ¹ , KAMALITA PERTIWI ² , DAN FRANSISKA RUNGKAT-ZAKARIA ²	329
Cemaran awal dan dekontaminasi bakteri patogen pada sayuran hidroponik dengan iradiasi gamma. HARSOJO.....	341
Aplikasi teknik radiasi dalam penanganan jamur kering IDRUS KADIR DAN HARSOJO	349
Bidang Kebumihan dan Lingkungan	
Teknik nuklir untuk penelitian reservoir dan aliran dua fasa pada lapangan panasbumi lahendong, sulawesi utara DJIJONO, ABIDIN, ALIP, RASI P.	363
Aplikasi dan pengembangan teknologi isotop dan radiasi dalam pengelolaan sumberdaya air di banten DJIONO, ABIDIN, PASTON, SATRIO, BUNGKUS P, RASI P	377

Formulasi konsentrat pupuk organik hayati berbasiskompos radiasi NANA MULYANA, DADANG SUDRAJAT, ENDRAWANTO WIDAYAT,	401
Pengembangan metode pengujian toxin paralytic shellfish poisoning sebagai saxitoxin dengan teknik nuklir WINARTI ANDAYANI , AGUSTIN SUMARTONO DAN BOKY JEANNE TUASIKAL.....	413
Instrumental analisis pengaktifan neutron (inaa) sedimen pesisir pltu suralaya; identifikasi polutan ALI ARMAN, YULIZON MENRY, SURIPTO, DARMAN DAN HARIYONO	421
Studi interkoneksi sungai bawah tanah di bribin – baron, di daerah karst gunung kidul WIBAGIYO, PASTON S. SATRIO.....	431
Studi kinetika karakterisasi biodegradasi bahan organik dari bagase tebu dan limbah nanas TRI RETNO D.L, DADANG SUDRAJAT, NANA MULYANA DAN ARIF ADHARI	441

METODE RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*) DAN HIBRIDISASI DOT BLOT DENGAN PELACAK BERLABEL ^{32}P UNTUK DETEKSI HCV (*HEPATITIS C VIRUS*).

Lina, M.R

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

METODE *NESTED* RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*) DAN HIBRIDISASI DOT BLOT UNTUK DETEKSI HCV (*HEPATITIS C VIRUS*) Infeksi HCV merupakan satu dari 10 penyebab kematian terbesar. Dalam jangka panjang infeksi virus ini dapat berlanjut menjadi sirosis dan kanker hati. Penelitian untuk mendeteksi adanya HCV secara molekuler dalam darah maupun darah positif secara serologi telah dilakukan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 46 plasma darah. Ekstraksi RNA sampel darah dilaksanakan dengan menggunakan kit *RNA viral extraction*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan teknik *nested RT-PCR* (2 kali proses PCR). Proses PCR pertama adalah *one step RT-PCR* dengan menggunakan cDNA, hasil *reverse transcription* dari RNA hasil ekstraksi, sebagai *template*, sedangkan proses PCR ke dua menggunakan produk PCR 1 sebagai *template*. Deteksi hasil *nested RT-PCR* dilakukan dengan teknik elektroforesis gel agarosa. Sebagai konfirmasi hasil *nested PCR* dilakukan teknik hibridisasi dengan pelacak DNA berlabel biotin. Hasil positif HCV dengan *nested RT-PCR* – elektroforesis gel agarosa dinyatakan dengan terbentuknya pita DNA berukuran 259 bp pada gel sebagai produk PCR 2. Dari 46 sampel plasma darah, 36 sampel menunjukkan hasil positif yaitu adanya pita DNA 259 bp, meskipun terdapat juga pita non spesifik (# 259 bp). Hasil negatif HCV diperoleh dari 8 sampel, 7 di antaranya tidak terdapat pita DNA, 3 sampel mempunyai pita DNA non spesifik (# 259 bp). Deteksi HCV dengan *nested RT-PCR*-hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin meskipun menunjukkan hasil positif dan negatif HCV yang sama dengan elektroforesis gel agarosa yaitu masing-masing 38 dan 8 sampel dari 46 sampel yang diteliti, namun pita DNA non spesifik pada gel agarosa tidak terdeteksi dengan teknik hibridisasi dot blot tersebut. Oleh karenanya, teknik hibridisasi dot blot dalam penelitian ini lebih spesifik dibanding elektroforesis gel agarosa untuk deteksi hasil *nested RT-PCR*.

Key Words : HCV, nested RT-PCR, dot blot hybridization, biotin.

PENDAHULUAN

HCV (*Hepatitis C Virus*) adalah virus yang menyebabkan penyakit liver akut, kronik, sirosis hati yang berpotensi menjadi kanker hati. Pada umumnya infeksi HCV menunjukkan gejala ringan ataupun tidak menunjukkan gejala, akan tetapi 60% dari individu terinfeksi, berkembang menjadi hepatitis kronik yang mungkin dapat berkembang menjadi sirosis dan karsinoma hati (1). Pendataan Hepatitis C Nasional yang dibuat oleh Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan, Departemen Kesehatan menyatakan di Indonesia prevalensi HCV sekitar 3% yaitu 6 -7 juta penduduk terinfeksi HCV yang tersebar di 21 propinsi, di antaranya yang tertinggi adalah IDU (Injection Drug User) yaitu di atas 80% (2, 3, 4). Infeksi HCV merupakan salah satu penyebab penyakit pasca transplantasi jaringan biologi. Metode deteksi HCV yang umum dipakai adalah cara

serologi. Kelemahan metode tersebut yaitu adanya hasil positif maupun negatif palsu. karena adanya reaksi silang dari non spesifik antibodi maupun negatif palsu yaitu adanya *window period* (5). Untuk mengatasi masalah tersebut, diperlukan teknik yang lebih sensitif dan spesifik seperti teknik biologi molekuler antara lain teknik biologi molekuler seperti RT-PCR yang dilanjutkan dengan hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida berlabel radioisotop maupun non isotop. Metode ini sangat penting untuk skrining HCV pada darah maupun darah donor jaringan biologi steril radiasi seperti allograft maupun amnion.

Dalam penelitian ini telah dilakukan penerapan teknik biologi molekuler dalam beberapa tahapan untuk mendeteksi HCV. Tahapan pertama yang telah dilakukan adalah teknik *nested RT-PCR* untuk mendeteksi HCV dalam sampel plasma darah Tahapan berikutnya akan dilakukan proses hibridisasi dot blot menggunakan pelacak oligonukleotida berlabel biotin.

Sampel Penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasma darah berjumlah 46 sampel..

Ekstraksi RNA. RNA sampel diekstraksi dengan menggunakan Mini Kit dari *RNA QIAamp Viral Extraction* (Qiagen). Lisis sel virus dalam plasma darah dilaksanakan dengan larutan bufer. RNA virus dalam plasma kemudian dijerat (di *trap*) dengan menggunakan kolom (*QiAmp spin column*) yang dilapisi dengan membran silika gel, ditambah etanol absolut selanjutnya disentrifugasi. RNA pada membran dicuci dengan bufer pencuci dan kemudian dielusi dengan bufer elusi. RNA yang diperoleh dapat disimpan pada freezer suhu -20°C atau -80°C .atau langsung digunakan untuk proses PCR.

Proses Nested- RT (Reverse Transcription) - PCR. *Nested* PCR meliputi 2 kali proses PCR. PCR pertama adalah *one Step RT-PCR* menggunakan kit (Qiagen). Proses *reverse transcription* RNA menjadi cDNA dan amplifikasi cDNA sebagai *template* dilaksanakan dalam 1 tabung. Campuran pereaksi untuk *one step RT-PCR (premix)* seperti penelitian sebelumnya (6). RNA hasil ekstraksi kemudian ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Produk PCR pertama kemudian dipakai sebagai *template* untuk PCR ke dua. Primer dirancang dari bagian *conserved* dari 5' *Non Coding Region* (NCR) dari HCV. Pasangan primer untuk PCR 1 adalah 5' – CCA CCA TAG ATC TCT CCC TGT sebagai *outer sense* primer dan 5' – ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT sebagai *outer anti-sense* primer. Pada proses PCR 2 pasangan primer yang digunakan adalah 5'- AGA TCT TCA CGC AGA AAG CGT dan 5'- CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT masing-masing sebagai *inner sense* dan *inner anti-sense* primer Kondisi proses *reverse transcription (RT)* pada *one step RT-PCR* adalah 50°C , 30 menit, *initial PCR activation step* pada suhu 95°C selama 15 menit..Tahapan selanjutnya adalah proses amplifikasi cDNA yang terdiri dari denaturasi selama 30

detik 96°C, *annealing* pada suhu 48°C, 45 detik dan *extension* pada suhu 72°C, 60 detik, untuk setiap siklus. Jumlah siklus yang diperlukan adalah 35 siklus. *Extended extension* selama 7 menit pada 72°C. Pada proses PCR ke dua, campuran pereaksi yang dipakai terdiri dari 1 x larutan bufer, 0.2 mM masing-masing dNTP, 1 x larutan Q, 0,4 µM tiap *primer*, 1,5 U/50 µl Taq *polymerase*. Produk PCR pertama ditambahkan kemudian ditambahkan ke dalam campuran tersebut sebagai *template*. Tahap proses PCR untuk setiap siklus meliputi denaturasi selama 30 detik pada suhu 96°C, *annealing* pada suhu 42°C selama 45 detik, dan *extension* selama 60 detik pada suhu 72°C. Jumlah siklus adalah 30 siklus dan *extended extension* seperti pada PCR pertama.

Proses elektroforesis. Hasil *nested RT-PCR* dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa.

Hibridisasi dot blot, konyugasi dan visualisasi. Blotting dilakukan dengan menspotkan fragmen DNA hasil *nested RT-PCR* pada membran nilon Hybond N+ menggunakan *dot blotter*. Membran difiksasi dengan pemanasan dan kemudian larutan prehibridisasi (5 x SSPE, 5x larutan Denhardt dan 0,5% SDS) ditambahkan pada membran. Proses hibridisasi dilakukan pada suhu 64°C selama 2 jam menggunakan larutan yang sama setelah ditambah dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin (Biotin-TEG GTC TGC GGA ACC GGT GAG TAC A-3'). Tahap selanjutnya adalah pencucian membran sebanyak 2 kali dengan larutan 2 x SSPE, 0,1% SDS dan 1 kali dengan larutan 1 x SSPE, 0,1% SDS. Proses konyugasi dilaksanakan dengan menambahkan *streptavidin peroksidase* pada membran dalam larutan pencuci sehingga konsentrasi enzim tersebut menjadi 10µg/ml selama 1 jam pada suhu ruang. Pencucian membran dilakukan 4 kali dalam larutan dan suhu yang sama. Deteksi hasil hibridisasi dengan menambahkan larutan ECL (*Enhance Chemiluminescens*) pada membran selama 1 menit. Visualisasi dilakukan dengan memaparkan membran pada hiperfilm dalam kaset selama 1 – 2 jam *overnight* dalam ruang gelap. Film kemudian diproses dengan larutan developer selama 1 – 5 menit dan larutan fixer selama 2 – 5 menit, dicuci dengan air dan dikeringkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

5' *Non Coding Region* (NCR) dari HCV adalah daerah target amplifikasi dari *nested PCR* dalam penelitian ini. Hasil amplifikasi DNA dari proses *one step RT-PCR* (PCR pertama) dan PCR ke dua adalah terdapatnya fragmen/pita DNA pada gel agarosa dari proses elektroforesis yang masing-masing berukuran 324 bp dan 259 bp. Hasil positif HCV dalam spesimen dinyatakan dengan terdapatnya fragmen/pita DNA berukuran 259 bp (Gambar 1).

Tabel 1 menunjukkan hasil *nested RT-PCR* dari 46 sampel plasma darah untuk deteksi HCV dan dari tabel tersebut terlihat 38 sampel positif dan 8 sampel negatif HCV. Pada sampel negatif, 1 sampel mempunyai pita DNA tunggal non spesifik tetapi bukan berukuran 259 bp dan tidak terdapat pita DNA

pada 7 sampel. Dari 38 sampel positif tersebut, beberapa sampel mempunyai hanya pita tunggal 259 bp yaitu :kelompok sampel 1 dan 3 (Gambar 1. gel A, lajur 3, 5, 6) dan sampel yang lain (kelompok sampel 2 dan 4) memperlihatkan selain pita 259 bp juga pita DNA non spesifik (Gambar 1, gel A: lajur 4, 7,8, gel B : lajur 1, 2, 4, 5, 6, dan 8). Beberapa sampel menunjukkan hasil yang berbeda antara PCR 1 dan PCR 2. yaitu pada PCR 1 hasilnya negatif sedangkan hasil PCR 2 positif (kelompok sampel 3 dan 4). Kemungkinan yang menyebabkan adalah *outer primer* tidak berfungsi karena adanya mutasi pada HCV sehingga ada perubahan sekwens pada daerah target primer tersebut. Hal lain yang mungkin menyebabkan adalah sedikitnya kandungan RNA HCV pada sampel tersebut sehingga fragmen DNA yang dihasilkan pada proses *one step RT-PCR* tidak terdeteksi pada gel agarosa . Batas deteksi fragmen DNA dengan teknik elektroforesis gel agarosa dan pewarnaan dengan etidium bromida adalah ≈ 5 ng atau lebih (7, 8). Perbedaan lain yaitu hasil PCR 1 positif tetapi PCR 2 negatif (kelompok sampel 5) Hal yang mungkin menyebabkan adalah daerah target *outer primer* dalam penelitian ini, kurang spesifik untuk deteksi HCV, sehingga diperoleh hasil positif walaupun tidak ada infeksi HCV. Kemungkinan lain sampel terinfeksi HCV akan tetapi virus tersebut telah mengalami mutasi sehingga *inner primer* tidak dapat mengenali daerah targetnya .

Tabel 1 menunjukkan juga hasil deteksi HCV pada 46 sampel plasma darah dengan teknik *nested RT-PCR* - hibridisasi dot blot menggunakan pelacak oligonukleotida berlabel biotin. Hasil positif dan negatif HCV dengan teknik tersebut sama dengan hasil yang terdeteksi dengan teknik *nested RT-PCR*- elektroforesis gel agarosa yaitu masing-masing 38 dan 8 sampel. Hasil positif dan negatif HCV dinyatakan dengan ada atau tidak adanya dot hitam pada film (Gambar 2). Jadi sampel darah tersebut mengandung HCV dengan jumlah yang cukup untuk dapat dideteksi baik dengan teknik elektroforesis maupun hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin. Fragmen DNA produk non spesifik *nested RT-PCR*, yaitu fragmen DNA bukan berukuran 259 bp, terdeteksi dengan teknik elektroforesis tetapi tidak terdeteksi dengan hibridisasi dot blot (Tabel 1, Gambar 1 dan 2). Hal ini menyatakan teknik *nested RT-PCR*-hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin lebih spesifik untuk deteksi HCV. Beberapa penelitian menyatakan penggunaan pelacak DNA berlabel radio isotop lebih sensitif dibanding dengan non isotop. Berdasarkan penelitian Thon *et al* dalam International Atomic Energy Agency (IAEA) – TECDOC-1528 (9) yang menyatakan deteksi hepatitis B virus menggunakan pelacak DNA berlabel radioisotop, 10 kali lebih tinggi dari pada pelacak berlabel biotin.

Hasil penelitian ini masih belum optimal dikarenakan jumlah sampel yang dicoba belum mencukupi maupun penggunaan pelacak DNA berlabel radio isotop belum dilakukan . Oleh karenanya,

penelitian apabila memungkinkan akan dilanjutkan dengan meningkatkan jumlah sampel maupun penggunaan pelacak DNA berlabel radio isotop.

KESIMPULAN

- HCV dalam plasma darah dapat dideteksi dengan metode *nested RT-PCR* - elektroforesis gel agarosa dengan menggunakan primer yang didesain dari daerah NCR dari HCV dan *nested PCR* – hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin
- Metode *nested RT-PCR* – hibridisasi dot blot lebih spesifik daripada *nested RT-PCR* – elektroforesis gel agarosa.

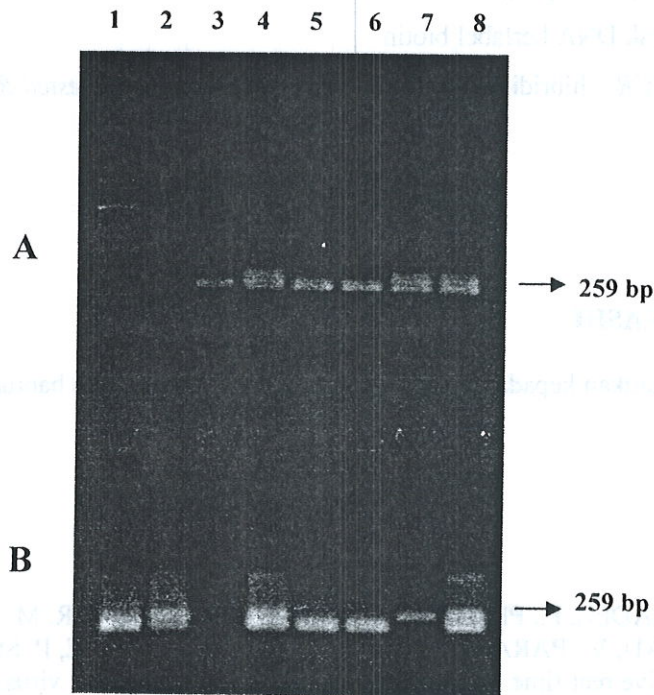
UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ditujukan kepada Sdr. Rika Heryani dan Almaida atas bantuannya dalam penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

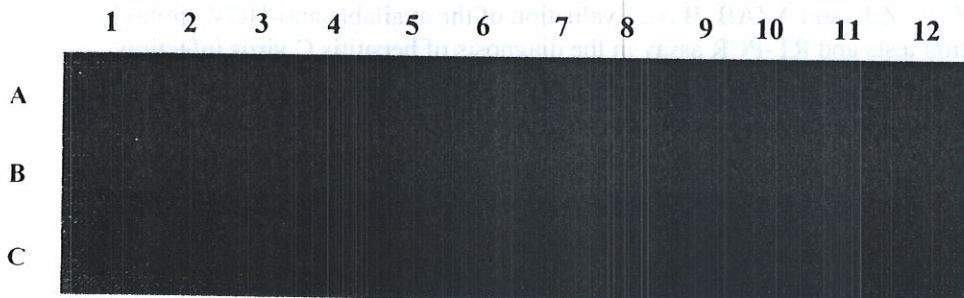
1. KOMUROAN-PRADEL, F., PERRET, M., DEIMAN, B., SODOYER, M., LOTTEAU, V., PARANHOS-BACCALA, G., and ANDRE, P. Strand specific quantitative real-time PCR to study replication of hepatitis C virus genome. *J. Virol. Methods.* **116** (2004) 103 - 106
2. WEB. Tujuh juta penduduk Indonesia terinfeksi Hepatitis C. Available at: http://ilhampatu.com/index.php?option=com_content&task=view&id=316&Itemid=9. Agustus 2009.
3. ADMINISTRATOR. Menkes terima penyerahan pendataan hepatitis C Nasional. Available at : http://cpddokter.com/home/index.php?option=com_content&task=view&id=1367&Itemid=2
4. YAYASAN SPIRITIA. Penanganan HBV dan HCV sebagai koinfeksi HIV. Available at : <http://www.spiritia.or.id/cst/idihivhep1.php>.
5. TASHKANDY, M.A.A., KHODARI, Y.A., IBRAHIM, A. M., DHAFAR, K.O., GAZZAZ, Z.J., and AZAB, B.A.. Evaluation of the available anti-HCV antibody detection tests and RT-PCR assay in the diagnosis of hepatitis C virus infection. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* **18** (2007) 523 – 531.
6. MARIA LINA ROSILAWATI dan BUDIMAN BELA. Teknik *reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)* dan hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA untuk deteksi human immunodeficiency virus (HIV) dalam serum darah. *Universa Medicina* **26** (2007) 111 – 119.

7. SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
8. JENKINS, F.J. Basic methods for the detection of PCR products. Genome Research. 3 (1994) S77 – S82. Available at : <http://genome.cship.org>.
9. IAEA- TECDOC-1528. Organization of a radioisotopes based molecular biology laboratory. Vienna, Austria : IAEA . 2006.



Gambar 1. Hasil Deteksi HCV Sampel Plasma Darah dengan *nested – RT-PCR* dan Elektroforesis Gel Agarosa

- Lajur 1 : *Marker* 100 bp DNA ladder
Gel A Lajur 2 : Kontrol negatif
Lajur 3 s/d 8 : DNA sampel plasma darah
Gel B Lajur 1 s/d 8 : DNA sampel plasma darah



Gambar 2 . Hasil *nested RT-PCR* – hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin dari sampel plasma darah

Dot berwarna hitam : HCV positif

Dot tidak berwarna hitam : HCV negatif

Tabel 1. Hasil *nested RT-PCR* – elektroforesis gel agarosa 46 sampel plasma darah untuk deteksi HCV

Junlah dan Nomor Sampel	Hasil Elektroforesis Produk PCR pertama	Hasil Elektroforesis Produk PCR kedua	Hasil PCR dan hibridisasi dot blot
Kelompok sampel 1 (2 sampel) No 10 dan 12	+	+	+
		Hanya ada pita DNA berukuran 259 bp	Ada dot hitam
Kelompok sampel 2 (32 sampel) No. 1 s/d 4 No. 6, 7, 9, 11 No. 13 s/d 26 No. 32 s/d 34 ; No. 37, 38 No. 42 s/d 46	+	+	+
		ada pita DNA berukuran 259 bp dan pita DNA non spesifik	Ada dot hitam
Kelompok sampel 3 (3 sampel) No. 8, 35, 36	-	+	+
		Hanya ada pita DNA berukuran 259 bp	Ada dot hit
Kelompok sampel 4 (1 sampel) No. 41	-	+	+
		Ada pita DNA berukuran 259 bp dan pita DNA non spesifik	Ada dot hit
Kelompok sampel 5 (1 sampel) No. 40	+	-	-
		Tidak ada pita DNA 259 bp tetapi ada 1 pita non spesifik di atas 259 bp	Tidak ada dot hit
Kelompok sampel 6 (7 sampel) No. 5 No. 27 s.d 31, 39	-	-	-
		Tidak ada pita DNA	Tidak ada dot

Tipe Isotop	Mekanisme	Efektivitas	Kelebihan
Isotop Radioaktif	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual
Isotop Stabil	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual
Isotop Radioaktif	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual
Isotop Radioaktif	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual
Isotop Radioaktif	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual
Isotop Radioaktif	Meningkatkan kandungan gizi dan kualitas produk olahan	+	Meningkatkan daya simpan, meningkatkan daya tahan, meningkatkan daya jual