



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Deteksi Infeksi Hepatitis C pada Donor Darah Sukarela di PMI Sleman Yogyakarta Menggunakan Metode Molekular

Detection of Hepatitis C Infection in Voluntary Blood Donors at PMI Sleman Yogyakarta Using Molecular Methods

Hartalina Mufidah^{1*}, Handriani Kristanti², Dewi Nur Anggraeni³, Ayu Tri Agustin¹

¹Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas dr. Soebandi, Jember

²Program Studi Teknologi Bank Darah, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Wira Husada, Sleman

³Program Studi Teknologi Bank Darah, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Wira Husada, Sleman

*Korespondensi Penulis : hartalina18@gmail.com

Received: 29 Juni 2024

Accepted: 29 Juni 2024

Published: 30 Juni 2024

Abstrak

Latar Belakang: Hepatitis C masih menjadi salah satu masalah kesehatan utama di dunia. Hampir 500.000 kematian dilaporkan setiap tahun sebagai konsekuensi dari komplikasi terkait HCV. Salah satu risiko penularan virus hepatitis C yaitu melalui transfusi darah. Enzyme Chemiluminescence Immunoassay merupakan salah satu metode standar dalam pelayanan darah untuk mendeteksi HCV dalam darah donor. Namun metode ini masih terdapat keterbatasan deteksi ketika HCV dalam fase window periode. Oleh karena itu metode molekular seperti PCR dapat dilakukan untuk mendeteksi materi genetik HCV. **Tujuan:** Untuk mendeteksi infeksi Hepatitis C pada donor darah sukarela di PMI Sleman Yogyakarta menggunakan metode molekular

Metode: Rancangan penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan desain studi cross-sectional. Penelitian ini dilakukan mulai bulan September 2022-Februari 2023. Lokasi penelitian dilaksanakan di PMI Sleman, Yogyakarta. Sampel dalam penelitian ini adalah darah donor sukarela yang tercatat di PMI Sleman pada tahun 2022. Sampel tersebut telah melalui uji IMLTD metode ECHLIA sebanyak 45 orang dengan hasil non-reaktif. Teknik sampling penelitian ini menggunakan purposive sampling. Teknik analisis data dalam penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif. Sampel darah selanjutnya dilakukan pemeriksaan menggunakan metode Real Time PCR/qPCR.

Hasil: Sampel No.3 menunjukkan adanya kurva amplifikasi dan melewati garis threshold pada nilai Ct/Cq = 24,29, namun hasil ini menunjukkan hasil negatif. Hal ini karena kurva amplifikasi yang menunjukkan positif HCV muncul pada Ct 29,46, 29,30, 28,48, 28,22, 31,09, 33,78, dan 36,87.

Kesimpulan: Semua sampel darah donor non-reaktif IMLTD metode ECHLIA menunjukkan hasil negatif karena tidak ditemukan materi genetik HCV menggunakan metode qPCR.

Kata Kunci: Donor darah; IMLTD; HCV; qPCR; Real-time PCR

Abstract

Background: Hepatitis C remains one of the major health problems in the world. Nearly 500,000 deaths are reported each year as a consequence of HCV-related complications. One of the risks of transmission of the hepatitis C virus is through blood transfusions. Enzyme Chemiluminescence Immunoassay is one of the standard methods in blood services to detect HCV in donor blood. However, this method still has limitations in detecting HCV when it is in the window phase of the period. Therefore, molecular techniques such as PCR can be performed to detect HCV genetic material.

Purpose: To detect Hepatitis C infection in voluntary blood donors at PMI Sleman Yogyakarta using the molecular method **Methods:** The design of this study is descriptive research with a cross-sectional study design. This research was conducted from September 2022 to February 2023. This research was carried out at PMI Sleman, Yogyakarta. The sample in this study is voluntary donor blood recorded at PMI Sleman in 2022. The sample has undergone the IMLTD test of the ECHLIA method for 45 people with non-reactive results. The sampling technique of this study uses purposive sampling. The data analysis technique in this study uses a descriptive approach. Blood samples were examined using the Real-Time PCR/qPCR method.

Results: Sample No.3 showed the presence of an amplification curve and crossed the threshold line at the value of Ct/Cq = 24.29, but this result showed a negative result. It is because the amplification curve that shows positive HCV appears at Ct 29.46, 29.30, 28.48, 28.22, 31.09, 33.78, and 36.87.



Conclusions: All blood samples of non-reactive IMLTD donors using the ECHLIA method showed negative results because the genetic material of HCV was not found using the qPCR method.

Keywords: Blood donation; TTIs; HCV; qPCR; Real-Time PCR

PENDAHULUAN

Virus hepatitis C adalah virus RNA dari famili Flaviviridae dan berantai tunggal (1). Infeksi virus hepatitis C (HCV) merupakan masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia dengan sero-prevalensi sekitar 3% dari populasi dunia. Lebih dari 135 Juta infeksi hidup di Cina, Mesir, India, Pakistan, Nigeria, dan Rusia (2). Hampir 500.000 kematian dilaporkan setiap tahun sebagai konsekuensi dari komplikasi terkait HCV (3).

Manifestasi klinik utama dari infeksi virus Hepatitis C adalah progresi menjadi sirosis hati dan komplikasinya (4). Individu yang terinfeksi HCV dapat menjadi carriers kronis kemudian berkembang menjadi penyakit hati kronis, sirosis dan dapat mengalami kematian akibat sirosis tersebut (5). Dari ketiga jenis Hepatitis (A,B,C), Hepatitis C menyumbang tingkat kematian tertinggi pada tahun 2014 yaitu 5 kematian per 100.000 populasi (6).

Salah satu risiko penularan virus hepatitis C yaitu melalui transfusi darah dan telah ditemukan kasus sebanyak 90%. Presentase kasus HCV pada donor darah di Indonesia tahun 2016 sebesar 0,41%. Oleh karena itu diagnosis HCV dalam darah donor sangat penting (7). Enzyme Chemiluminescence Immunoassay atau ECLIA merupakan salah satu metode standar dalam pelayanan darah untuk mendeteksi HCV dalam darah donor. Namun metode ini masih terdapat keterbatasan deteksi ketika HCV dalam fase window periode. Oleh karena itu metode molekular seperti PCR dapat dilakukan untuk mendeteksi RNA HCV (8).

Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi infeksi Hepatitis C pada donor darah sukarela di PMI Sleman Yogyakarta menggunakan metode molekular.

METODE

Rancangan penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan desain studi cross-sectional. Penelitian ini dilakukan mulai bulan September 2022-Februari 2023. Lokasi penelitian dilaksanakan di PMI Sleman, Yogyakarta. Populasi penelitian adalah seluruh darah donor sukarela yang tercatat di PMI Sleman pada tahun 2022 dan telah melalui uji IMLTD metode ECHLIA. Sampel dalam penelitian ini adalah darah donor sukarela yang tercatat di PMI Sleman pada tahun 2022. Sampel tersebut telah melalui uji IMLTD metode ECHLIA sebanyak 45 orang dengan hasil non-reaktif. Pengambilan sampel penelitian ini dengan teknik purposive sampling. Teknik analisis data dalam penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif.

Sampel darah sisa uji IMLTD metode ECHLIA disimpan ke dalam cool box kemudian ditransport ke Laboratorium Prodi Teknologi Bank Darah Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Wira Husada. Sampel darah selanjutnya dilakukan pemeriksaan menggunakan metode Real Time PCR/qPCR. Prosedur pemeriksaan



yang dilakukan yaitu isolasi RNA (Zymo quick-RNA Miniprep Plus Kit 50 prep), sintesis cDNA (SMOBIO ExcelRT Reverse Transcription Kit II), dan preparasi deteksi sampel menggunakan qPCR. Prosedur qPCR dilakukan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada.

Penelitian ini dilakukan bersarkan Surat Keterangan Kelaikan ETIK Nomor 223/KEPK/STIKES-WHY/IX/2022.

Isolasi RNA

Keseluruhan tahap isolasi RNA dilakukan pada suhu ruang dan kecepatan sentrifugasi 10.000-16.000 x g selama 30 detik. Tambahkan 200 µl RNA Shield™ (konsentrat 2X) secara langsung ke dalam 200 µl sampel darah dan kemudian dihomogenisasi. Setiap 400 µl reagen/campuran darah, ditambahkan 8 µl Proteinase K dan kemudian campur hingga merata, dan lakukan inkubasi pada suhu kamar (20-30° C) selama 30 menit. Setelah dilakukan inkubasi, vortex sampel dan sentrifuge dengan kecepatan maksimal selama 2 menit untuk memisahkan pelet debris. Kemudian setelah sentrifuge selesai pindahkan supernatan ke dalam tube nuclease-free yang baru. Tambahkan isopropanol dengan volume yang sama (1:1) dan kemudian aduk rata. Pindahkan campuran ke dalam Zymo-Spin™ IIICG Column 4 (hijau) ke dalam Collection Tube dan dilakukan sentrifuge, cairan yang ada di bagian bawah tube dibuang, dan lanjutkan proses pemurnian (purifikasi). (D1) Cuci matriks kolom dengan 400 µl RNA Wash Buffer dan kemudian disentrifuge. (D2) Pindahkan matriks kolom ke dalam tube nuclease-free yang baru dan tambahkan 5 µl DNase I (1U/ µl), dan 75 µl DNA Digestion Buffer, dan campurkan. Tambahkan campuran langsung ke dalam matriks kolom. (D3) Inkubasi matriks kolom pada suhu ruang (20-30° C) selama 15 menit. Tambahkan 400 µl RNA Prep Buffer ke dalam matriks kolom dan sentrifuge, cairan yang ada di bagian bawah tube dibuang. Tambahkan 700 µl RNA Wash Buffer ke dalam matriks kolom dan sentrifuge, cairan yang ada di bagian bawah tube dibuang. Tambahkan 400 µl RNA Wash Buffer dan sentrifuge selama 1 menit untuk menghilangkan buffer sebelumnya. Kemudian pindahkan matriks kolom ke dalam tube nuclease-free yang baru. Tambahkan 100 µl DNase/RNase-Free Water langsung ke matriks kolom dan sentrifuge. Simpan RNA dalam keadaan beku yaitu -20°C

Sintesis cDNA

Sintesis cDNA menggunakan SMOBIO ExcelRT Reverse Transcription Kit II yang terdiri dari Rtase Mix, RT Buffer (DTT/dNTPs), Oligo (dT)/ Random Primer Mix, dan DEPC-Treated H₂O. Kondisi PCR berdasarkan protokol SMOBIO ExcelRT Reverse Transcription Kit II.

Prosedur qPCR

Deteksi sampel cDNA menggunakan qPCR dilakukan secara duplo dengan total 64 sampel. Sebanyak 13 sampel dikeluarkan karena mengalami kontaminasi. Master mix qPCR yang digunakan yaitu SensiFAST



SYBR No-ROX. Komposisi master mix qPCR dan kondisi qPCR berdasarkan protokol SensiFAST SYBR No-ROX. Primer forward yang digunakan yaitu FW: AGCGTCTAGCCATGGCGTT dan primer reverse RV: GCAAGCACCTATCAGGCAGT dengan ukuran ampikon 238 base pairs (bp) (9).

Intepretasi Hasil qPCR

Sampel dinyatakan positif apabila kurva amplifikasi melewati garis treshold dengan adanya nilai Cq/Ct. Sampel dinyatakan negatif apabila kurva amplifikasi tidak melewati garis treshold sampai siklus akhir, nilai Cq/Ct=N/A.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Responden

Total responden dalam penelitian sebanyak 30 orang dan disajikan pada Tabel 1. Responden pendonor yaitu termasuk ke dalam usia produktif. Persentase terbesar yaitu pada usia 26 – 35 tahun sebesar 38%, dan pada usia 46 – 55 tahun sebesar 31%, pada usia muda 17 – 25 tahun sebesar 11%, pada usia pra lansia 56 – 65 tahun sebesar 11%, persentase terendah pada 36 – 45 tahun sebesar 9%. Dominansi responden pendonor yaitu memiliki jenis kelamin laki-laki sebesar 80%. Status pendonor memiliki peringkat terbesar pada pendonor berulang sebesar 73% dan pendonor baru sebesar 23%.

Tabel 1. Karakteristik Responden Donor Darah Di PMI Sleman Tahun 2022

Karakteristik	n	%
Umur (Tahun)		
17-25	5	11
26-35	17	38
36-45	4	9
46-55	14	31
56-65	5	11
Jenis kelamin		
Laki-laki	36	80
Perempuan	9	20
Status donor		
Baru	12	23
Berulang	33	73

Prosedur Isolasi RNA, Sintesis cDNA, dan qPCR

Proses isolasi merupakan komponen kunci dalam deteksi asam nukleat. Hal ini berdampak pada reabilitas dan reproduibilitas target amplifikasi (10). Sampel darah terlebih dahulu dihomogenkan dengan



EDTA yang berfungsi sebagai antikoagulan (11). Isolasi RNA menggunakan Quick-RNA Miniprep Plus Kit terdiri dari 2 (dua) tahap yaitu (1) preparasi sampel dan (2) purifikasi RNA.

Tahap preparasi sampel dengan penambahan DNA/RNA Shield, Proteinase K dan Isopropanol 99%. DNA/RNA Shield merupakan medium transport dan penyimpanan RNA yang berfungsi menjaga integritas dan ekspresi gen di dalam sampel pada suhu ruang dan menginaktivasi agen infeksius seperti virus, bakteri, fungi, dan parasit. Proteinase K berfungsi menginaktivasi protein kontaminan selama preparasi sampel yang dapat mendegradasi RNA. Isopropanol berfungsi untuk menghilangkan molekul air dalam larutan RNA sehingga RNA akan terpresipitasi (12).

Tahap purifikasi RNA dilakukan dengan menambahkan RNA Wash Buffer, DNase I, DNA Digestion Buffer, RNA Prep Buffer, dan DNase/RNase-Free Water. RNA Wash Buffer berfungsi untuk menghilangkan kontaminan seperti enzim-enzim. DNase I berfungsi mendegradasi sejumlah genom DNA yang dapat menyebabkan hasil signal positif palsu pada proses reverse transcriptase. DNA Digestion Buffer berfungsi untuk mendegradasi DNA. RNA Prep Buffer berfungsi untuk memurnikan RNA. DNase/RNase-Free Water berfungsi untuk mencegah degradasi reagen-reagen RNA dan oligonukleotida. Keseluruhan tahap preparasi sampel dan purifikasi RNA dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan RNA dari komponen lainnya berdasarkan berat molekul. Hasil isolat RNA dalam DNase/RNase-Free Water disimpan pada suhu -20°C .

Penelitian ini menggunakan primer dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Clancy et al (2008) dalam Zhauli et al., 2016 dan dalam penelitian tersebut menyatakan bahwa untuk mendeteksi virus HCV dengan gen non-coding region, primer forward yang digunakan yaitu FW:AGCGTCTAGCCATGGCGTT, primer reverse yang digunakan yaitu RV:GCAAGCACCTATCAGGCAGT. Dalam penelitian Glancy et al (2008) dalam Zhauli et al., 2016 menunjukkan bahwa primer ini dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan seluruh genotip HCV, primer ini dapat mendeteksi pada wilayah 5' yang tidak diterjemahkan dari virus RNA.

Pemeriksaan HCV Metode qPCR

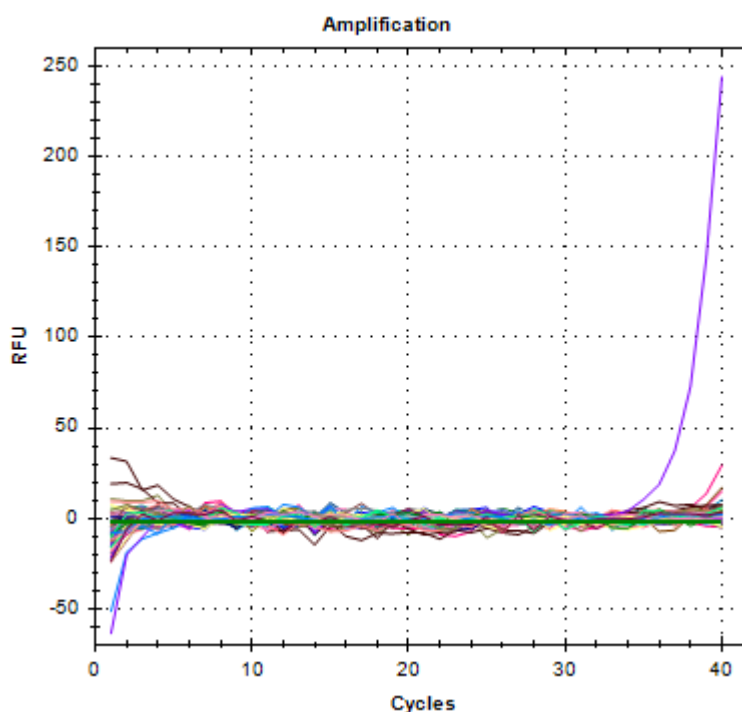
Hasil pemeriksaan infeksi HCV metode qPCR disajikan pada Tabel 2. Deteksi HCV menggunakan metode qPCR pada sampel darah dalam penelitian ini menunjukkan hasil negatif. Kurva amplifikasi sampel No.3 menunjukkan adanya kenaikan dan melewati garis threshold pada nilai $C_t/C_q = 24,29$, namun hasil ini tidak sejalan dengan penelitian Zauli et al., 2016 yang menunjukkan bahwa kurva amplifikasi yang menunjukkan positif HCV muncul pada C_t 29.46, 29.30, 28.48, 28.22, 31.09, 33.78, dan 36.87 (9). Oleh karena itu semua sampel darah donor non-reaktif IMLTD metode ECHLIA menunjukkan hasil negatif karena tidak ditemukan materi genetik HCV menggunakan metode qPCR.



Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Infeksi HCV dengan Metode qPCR

Kode Sampel	Cq	Cq Mean
1	3,1	3,1
1	37,61	37,61
3	24,29	24,29
3	35,04	35,04
5	32,36	32,36
5	23,87	23,87
6	20,26	20,26
6	30,94	30,94
7	1,28	1,28
7	2,76	2,76
8	22,34	22,34
8	26,81	26,81
9	26,57	26,57
9	25,39	25,39
12	36,19	36,19
12	32,22	32,22
15	26,22	26,22
15	38,12	38,12
16	39,26	39,26
16	13,43	13,43
17	31,47	31,47
17	28,81	28,81
20	26,42	26,42
20	34,18	34,18
21	32,81	32,81
21	31,2	31,2
24	35,17	35,17
24	27,19	27,19
26	24,63	24,63
26	24,82	24,82
27	36,1	36,1
27	2,78	2,78
28	36,26	36,26
28	21,1	21,1
30	26,29	26,29
30	24,19	24,19
32	26,67	26,67
32	34,27	34,27
33	2,55	2,55

33	2,96	2,96
35	1,79	1,79
35	36,59	36,59
37	37,61	37,61
37	29,02	29,02
38	37,28	37,28
38	12,87	12,87
39	21,34	21,34
39	25,57	25,57
40	34,35	34,35
40	22,1	22,1
41	33,12	33,12
41	35,2	35,2
42	38,99	38,99
42	34,77	34,77
44	23,95	23,95
44	14,95	14,95
45	29,21	29,21
45	36,25	36,25
48	32,61	32,61
48	29,17	29,17



Gambar 1. Grafik Amplifikasi qPCR HCV

KESIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa tidak ditemukan kejadian infeksi Hepatitis C dari 32 sampel darah pendonor PMI Sleman Yogyakarta berdasarkan hasil pemeriksaan HCV metode qPCR secara duplo. Perlu dilakukan konfirmasi kualitas DNA menggunakan elektroforesis sebelum dilakukan qPCR.

ACKNOWLEDGEMENTS

Terima Kasih Kepada Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Wira Husada yang telah memfasilitasi penelitian ini. Kami juga mengucapkan terima kasih Kepada Ketua PMI Kabupaten Sleman dan teknisi UDD yang telah mengizinkan pengumpulan sampel dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Butt F, Shahid M, Hassan M, Tawakkal F, Amin I, Afzal S, et al. A review on hepatitis C virus: role of viral and host-cellular factors in replication and existing therapeutic strategies. *Egypt Liver J* [Internet]. 2022;12(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s43066-022-00232-w>
2. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34):7824–40.
3. WHO. Global hepatitis report, 2017. World Health Organization; 2017.
4. Chaudhari R, Fouda S, Sainu A, Pappachan JM. Metabolic complications of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2021;27(13):1267–82.
5. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* [Internet]. 2014;61(1):S58–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012>
6. Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *BMC Med*. 2014;12(1):1–24.
7. Firdaus R. Current molecular methods for the detection of hepatitis C virus in high risk group population: A systematic review. *World J Virol*. 2015;4(1):25.
8. Marwaha N, Sachdev S. Current testing strategies for hepatitis C virus infection in blood donors and the way forward. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):2948–54.
9. Zauli DAG, Menezes CLP de, Oliveira CL de, Mateo ECC, Ferreira AC de S. In-house quantitative real-time PCR for the diagnosis of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(4):987–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.008>
10. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*. 2017;8(FEB):1–9.
11. Turista DDR, Puspitasari E, Kurnanda F. The Potential Use of EDTA as an Alternative to Defibrination in Preparing Blood Agar Plates with Human AB Blood Type on *Staphylococcus aureus* Culture. *Indones J Med Lab Sci Technol*. 2019;1(1):64–71.
12. Shaomianah S. Variasi Presipitasi Pelarut pada Ekstraksi RNA dengan Metode Trizole dan Pengaruh terhadap Kemurnian RNA. *Media Kedokt Hewan*. 2020;31(1):33.

