Identifikasi Anti Hepatitis C Virus Positif dan HCV *Ribonucleic Acid* Positif di Palang Merah Indonesia Kabupaten Tuban Jawa Timur

(Identification of Positive Anti Hepatitis C Virus and Positive HCV Ribonucleic Acid at Palang Merah Indonesia Kabupaten Tuban Jawa Timur)

Anas Jatikusuma
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
E-mail: anasjatikusuma1@gmail.com

ABSTRAK

Di Indonesia, 6,6–7 juta orang mengidap penyakit Hepatitis C. HCV ditularkan umumnya melalui parenteral termasuk transfusi darah. Sehingga uji saring pada darah donor merupakan hal yang harus diperhatikan. Sehubungan dengan hal tersebut, dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui frekuensi RNA HCV yang terdeteksi pada darah donor dengan Anti HCV positif. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan darah donor dari PMI sebagai objek penelitian. Pendekatan yang digunakan adalah retrospektif. Rancangan penelitian yang digunakan ditinjau dari aspek waktu termasuk rancangan cross sectional. Populasi penelitian adalah seluruh darah donor yang terkoleksi di PMI Kabupaten Tuban Jawa Timur dan sampel adalah darah donor yang terkoleksi bulan Agustus-September 2016. Hasil penelitian dari tiga sampel reaktif Anti HCV dengan metode CMIA, satu sampel terdeteksi mengandung RNA HCV saat diperiksa dengen metode PCR menggunakan primer HC 15-16 & HC 32-23-34 (sampel nomor 103), dan dua sampel (sampel nomor 102 dan 103) terdeteksi mengandung RNA HCV saat diperiksa dengan metode PCR menggunakan primer UTR 3–4. Kesimpulan penelitian ini jumlah RNA HCV yang terdeteksi pada darah donor dengan anti HCV positif sebanyak dua sampel (sampel nomor 102 dan 103).Uji saring darah donor PMI Kabupaten Tuban dengan menggunakan metode CMIA sudah baik.

Kata kunci: *darah donor, Anti HCV, RNA HCV*

ABSTRACT

In Indonesia, 6.6 to 7 million people suffer from hepatitis C. HCV is transmitted mostly by parenteral including blood transfusion. Therefore, this research aimed to determine the frequency of detectable HCV RNA in blood donors with Anti-HCV positive. This study was a laboratory observational research that used blood donors from PMI as research objects. This study was cross sectional research. The population was the collected blood donor in PMI Tuban East Java and the sample was the August-September 2016 collected blood donor. The results showed three samples of Anti-HCV reactive when examined by the method CMIA (sample number 101,102,103), one sample contain HCV RNA when examined by PCR using the primers HC 15-16 and 32-23-34 (sample number 103), and two samples (sample numbers 102 and 103) contain HCV RNA when examined by PCR using primers UTR 3–4. In conclusion, the number of detectable HCV RNA in blood donors with anti-HCV positive in two samples (sample numbers 102 and 103). Screening test of donor blood PMI Tuban using CMIA have good quality.

Keywords: *blood donor, Anti HCV, RNA HCV*

PENDAHULUAN

Virus Hepatitis C (HCV) adalah virus RNA yang mempunyai *enveloped*, termasuk dalam genus *Hepacivirus* dan famili *Flaviviridae*.[1] HCV merupakan penyebab utama penyakit hati akut dan kronis, kanker hati, dan kegagalan hati.[2] Sekitar 3% populasi dunia telah terinfeksi HCV. Lebih dari 170 juta individu menjadi karier HCV dan mempunyai risiko yang tinggi untuk berkembang menjadi sirosis hati dan/atau kanker hepatoseluler. Di Indonesia, 6,6–7 juta orang mengidap penyakit Hepatitis C.[3] Tiga sampai 4% individu yang terinfeksi kronik berkembang menjadi kanker hepatoseluler yang fatal. Kanker hepatoseluler yang disebabkan oleh HCV merupakan indikasi untuk dilakukan transplantasi hati.[4] Sampai saat ini juga belum ditemukan vaksin HCV.[5] Hal ini terjadi karena HCV merupakan quasi species yang sering mengalami mutasi. Selain itu transmisi HCV bisa secara langsung dari sel ke sel yang terlindungi dari antibodi.[5] Dari penjelasan di atas dapat disimpulkan HCV masih menjadi masalah kesehatan di dunia.

Pada umumnya infeksi HCV ditularkan secara horizontal melalui parenteral dihubungkan dengan tindakan penggunaan jarum suntik yang terkontaminasi, cuci darah, tato, tindik dan transfusi darah yang lolos dari skrining.[6] Selain melalui parenteral, infeksi HCV secara

horizontal bisa melalui hubungan seksual.[7] Infeksi HCV juga bisa menular secara vertikal dari ibu ke anak.[8]

Uji saring dalam transfusi darah merupakan hal yang penting. Beberapa penyakit lain dapat ditularkan melalui darah. Uji saring yang dilakukan Palang Merah Indonesia (PMI) dalam transfusi darah adalah uji saring untuk *Hepatitis B Virus* (HBV), *Hepatitis C Virus* (HCV), sifilis, dan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Metode uji saring HCV terhadap anti-HCV yang digunakan adalah *Enzyme Immunoassay* (EIA), *Rapid Test*, dan *Nucleic Acid Testing* (NAT). Uji saring yang disarankan WHO adalah NAT.[9] Namun untuk uji saring NAT hanya ada di beberapa unit PMI dan lebih mahal. PMI Kabupaten Tuban menggunakan *Chemiluminescence Microparticle Immunoassay* (CMIA) dan *Rapid Test*. CMIA memiliki spesifisitas 98% dan sensitivitas sama dengan EIA. Uji CMIA tidak dapat membedakan infeksi aktif dan infeksi yang telah berakhir. Sehingga untuk konfirmasi diperlukan pemeriksaan RNA.

Berdasarkan hasil Surveilans Hepatitis C oleh Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan pada tahun 2010-2011 yang dilaksanakan di 21 Provinsi, 53 rumah sakit, 49 laboratorium dan 26 Unit Transfusi Darah (UTD) PMI, dengan jumlah 1.825.823 sampel, kasus positif 29.480 orang, jumlah kasus terbanyak didapatkan pada golongan umur 20–40 tahun sebanyak 58,5% sedangkan proporsi menurut jenis kelamin menunjukkan bahwa pada kelompok laki-laki 83% dan 17% pada perempuan. Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi RNA HCV yang terdeteksi pada darah donor dengan Anti-HCV positif.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan yang terkoleksi bulan Agustus–September tahun 2016 sebanyak 103 sampel sebagai objek penelitian. Pendekatan yang digunakan adalah *retrospective cross sectional*. Variabel yang diteliti adalah RNA HCV yang terdeteksi pada darah donor dengan Anti HCV positif. Sampel darah donor sudah diperiksa Anti HCV dengan uji saring CMIA kemudian diperiksa ulang menggunakan metode EIA. Sampel yang Anti HCV reaktif CMIA dilakukan ektraksi RNA HCV menggunakan kit QIAGEN, sintesis cDNA, dan amplifikasi dengan PCR. Hasil amplifikasi ini kemudian divisualisasi dengan metode elektroforesis yang menggunakan bufer TBE 0,5X dan menggunakan gel agarose 2% yang mengandung *ethidium bromide*, kemudian dilakukan visualisasi dengan Ultra Violet (UV) transiluminator. Marker yang digunakan 100bp DNA *ladder*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Jumlah sampel darah donor pada penelitian ini adalah 103 sampel darah donor bulan Agustus 2016 sampai bulan September 2016 PMI Kabupaten Tuban. Nilai rentang usia pendonor adalah 17-59 tahun dan rata-rata usia pendonor adalah 32 tahun. Mayoritas pendonor berjenis kelamin pria sebanyak 72 (69,9%).

Pemeriksaan anti HCV pada 103 sampel darah donor oleh PMI Kabupaten Tuban menggunakan metode CMIA (*Chemilunescent Microparticle Immunoassay*) yang mempunyai spesifisitas 99,20–99,70% dan sensitivitas 96,77–99,9%. Hasil pemeriksaan menunjukkan 3 sampel reaktif (sampel nomor 101,102, dan 103).

Hasil pemeriksaan konfirmasi anti HCV 90 sampel darah donor (sampel nomor 1–90) di ITD menggunakan metode *Enzyme Immunoassay* (EIA) generasi 4 dengan spesifisitas 99,8% dan sensitivitas 100%. Hasil pemeriksaan menunjukkan tidak ada sampel yang reaktif. Hasil pemeriksaan EIA generasi 4 mengonfirmasi hasil pemeriksaan CMIA dari PMI (100% sama).

Hasil pemeriksaan ulang anti HCV 13 sampel darah donor (sampel nomor 91–103) di laboratorium swasta menggunakan metode *Enzyme Immunoassay* (EIA) generasi 3 dengan spesifisitas 99% dan sensitivitas 99% menunjukkan 1 sampel reaktif, yaitu sampel nomor 103. Hasil pemeriksaan EIA generasi memiliki hasil reaktif yang lebih kecil dibandingkan pemeriksaan CMIA yaitu 8% dibanding 24%.

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan PCR (deteksi RNA HCV) pada tiga sampel dengan Anti HCV positif (sampel nomor 101, 102, 103). Pemeriksaan PCR *first round* menggunakan pasang primer 166/167

Tabel 1. Ringkasan Hasil Uji PCR

No.	Primer				
	1st *round*	2nd *round*	2nd *round*	1st *round*	2nd *round*
	166–167	HC 32–23–34	HC 15–16	UTR 1–2	UTR 3–4
101	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	+
103	-	+	+	-	+

Tabel 2. Ringkasan Hasil Uji CMIA, EIA dan PCR

Uji	Sampel		
	101	102	103
CMIA	+	+	+
EIA	-	-	+
HCV RNA	-	+	+

yang menarget daerah NS5B menunjukkan hasil negatif. Kemudian dilanjutkan PCR *second round* menggunakan pasang primer HC 15-16 dan HC 32-23-34 menunjukkan amplifikasi pada satu sampel, yaitu sampel nomor 103 (gambar 5.1). Pemeriksaan PCR *first round* menggunakan pasang primer UTR 1–2 yang menarget daerah 5' UTR menunjukkan hasil negatif. Kemudian dilanjutkan PCR *second* round menggunakan pasang primer UTR 3–4 menunjukkan amplifikasi pada dua sampel, yaitu sampel nomor 102 dan 103 (gambar 5.2). Ringkasan hasil PCR dapat dilihat pada Tabel 1. Dan ringkasan hasil uji CMIA, EIA, dan PCR bisa dilihat pada Tabel 2.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini jumlah darah donor dengan HCV reaktif adalah 3 (2,9%) pada uji saring PMI Kabupaten Tuban dengan metode CMIA (*chemiluminescent microparticle immunoassay*) (Architect; Abbot, Germany). Sedangkan jumlah darah donor dengan HCV reaktif pada Januari 2008–Desember 2012 di PMI kota Semarang adalah 821 (14,1%) darah donor.

Tingkat penularan hepatitis C mengalami penurunan karena perkembangan uji saring untuk identifikasi virus. Sebelum ada uji saring, 0,45% dari seluruh darah transfusi tertular HCV. Presentase ini menurun menjadi 0,03% dengan ditemukannya tes anti HCV generasi pertama pada tahun 1990.[13] Tes anti HCV generasi kedua menurunkan presentase tersebut lebih jauh karena mampu mengidentifikasi infeksi kronis dengan lebih akurat (meningkatkan sensitivitas) dengan cara memperpendek *window period*. *Nucleic Acid Amplification Test* menurunkan risiko penularan menjadi sekitar 1 dari 1,5 juta transfus.[14] Infeksi HCV pada darah donor biasanya disebabkan penggunaan obat intravena, walaupun penularan nosokomial juga teridentifikasi.

Metode CMIA menggunakan konjugat akridinium yang terlabel sebagai sistem deteksi. CMIA dirancang untuk mendeteksi antibodi protein struktural dan nonstruktural pada genom HCV (NS3, NS4, core). Rini dkk. melaporkan dari hasil penelitian uji saring antigen dan antibodi Hepatitis C Virus pada darah donor menunjukkan pemeriksaan antibodi HCV CMIA tidak memenuhi kriteria standar untuk digunakan sebagai uji saring darah donor. Hal tersebut disebabkan karena pemeriksaan CMIA memiliki nilai sensitivitas 100%, spesifisitas 89%, nilai duga positif 76%, dan nilai duga negatif 100%. Pada penelitian ini dari tiga sampel dengan HCV reaktif didapatkan dua sampel yang mengandung RNA HCV. Pada pemeriksaan anti HCV didapatkan positif palsu. Hal ini dapat terjadi ketika penderita sudah sembuh secara total. Negatif palsu pada pemeriksaan antibodi HCV dapat terjadi ketika *window period* karena anti HCV baru terdeteksi 30–60 hari sesudah infeksi. Sehingga diperlukan tes konfirmasi pada RNA HCV.[10]

Tiga sampel darah yang reaktif terhadap anti HCV dilakukan konfirmasi dengan metode *nested-PCR*. Hasil yang didapat menunjukkan 1 sampel mengandung RNA HCV dengan menggunakan primer HC15-16 yang mempunyai target pada daerah NS5B HCV. NS5 merupakan salah satu protein non-struktural virus hepatitis C yang mengode *polymerase* dan memungkinkan virus untuk bereplikasi. Daerah NS5 juga merupakan target yang penting untuk pengembangan agen terapi antivirus. Beberapa penelitian melaporkan bahwa daerah NS5B dapat digunakan untuk menentukan genotip dan subtipe dari virus hepatitis C serta efektif untuk mempelajari epidemiologi molekuler dari virus hepatitis C.[11,12,13]

Virus Hepatitis C memiliki tujuh genotipe utama dan lebih dari 50 subtipe. Genotipe tidak berubah selama infeksi dan tidak harus diuji lagi. Genotipe HCV diklasifikasikan menjadi 1a, 1b, 2a, 2b, 3 dan 4. Genotipe HCV ini bervariasi di seluruh dunia. Genotipe 1b merupakan genotipe yang paling tinggi jumlahnya di dunia. Genotipe 2 dan 3 memberikan respons yang baik terhadap terapi interferon, sedangkan genotipe 1 tidak memberikan respons yang baik.[14]

SIMPULAN

Jumlah RNA HCV yang terdeteksi pada darah donor darah dengan Anti HCV positif sebanyak 2 sampel dari 3 sampel (66%).

SARAN

Uji saring darah donor PMI Kabupaten Tuban dengan menggunakan metode CMIA sudah baik. Tetapi dapat dipertimbangkan untuk juga melakukan uji RNA HCV pada darah donor untuk memperkecil risiko positif palsu dan negatif palsu. Terutama pada fase *window period* dan fase *recovery*. Salah satu metode uji saring yang peneliti sarankan adalah NAAT (*Nucleic Acid Amplification Testing*) seperti yang sudah digunakan PMI Kota Surabaya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lindenbach, BD.; Murray, CL.; Thiel, HJ.; Rice, CM. Fields Virology. Knipe,M.; Howley, PM., editors. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: 2013. p. 712-746.
2. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. Hati international: official journal of the International Association for the Study of the Hati. 2009; 29 (Suppl 1):74–81. [PubMed: 19207969]
3. Anggorowati N, Yano Y, Heriyanto DS, et al. Clinical and Virological of Hepatitis B or C Virus Co-Infection with HIV in Indonesian Patients. Journal of Medical Virology 2012;84:857-865.
4. Testino G, Sumberaz A, Leone S, Borro P. Recurrent hepatitis C and non-alcoholic fatty hati disease in transplanted patients: a review. *Minerva Med* 2013; 104: 225-232 [PMID:23514999]

5. Pawlotsky JM. Treatment of chronic hepatitis C: current and future. Curr Top Microbiol Immunol. 2013; 369:321–42. [PubMed: 23463207].
6. de Oliveira T, Pybus OG, Rambaut A, Salemi M, Cassol S, Ciccozzi M, et al. Molecular epidemiology: HIV-1 and HCV sequences from Libyan outbreak. Nature. 2006;444(7121):836–7.
7. Jafari S, Copes R, Baharlou S, Etminan M, Buxton J. Tattooing and the risk of transmission of hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. cvfdcvfcvf2010;14(11):e928–e940.
8. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. J Infect Dis. 2005;192(11):1880–9.
9. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. AASLD practice guidelines: diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology 2009;49:1335–74.
10. Thomson EC, Fleming VM, Main J, Klenerman P, Weber J, Eliahoo J, et al. Predicting spontaneous clearance of acute hepatitis C virus in a large cohort of HIV-1-infected men. Gut. 2011;60(6):837–45.
11. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology. 2007;132(7):2557–76.
12. Irshad M, Dhar I. Hepatitis C virus core protein: an update Irshad M et al. Diagnosis and pathogenesis of HCV WJG|www.wjgnet.com 7905 November 28, 2013|Volume 19|Issue 44| on its molecular biology, cellular functions and clinical implications. *Med Princ Pract* 2006; 15: 405-416 [PMID: 17047346 DOI: 10.1159/000095485]
13. King, AMQ.; Lefkowitz, E.; Adams, MJ.; Carstens, EB. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier; London: 2011. Lindenbach BD, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. Fields virology. Philadelphia:Lippubcott Williams and Wilkins, 2001: 991–1041
14. Pawlotsky JM, et al: Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. Hepatology 2000; 32: pp. 654-659