

Teknik *reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA untuk deteksi *human immunodeficiency virus* (HIV) dalam serum darah

Maria Lina Rosilawati^{*a} dan Budiman Bela^{**}

ABSTRAK

LATAR BELAKANG

Teknik biologi molekuler seperti teknik *reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-PCR) *dot blot hybridization* dengan pelacak DNA berlabel biotin dapat mendeteksi *human immunodeficiency virus* (HIV) dalam serum darah. Teknik ini selanjutnya dapat diterapkan untuk skrining HIV donor jaringan biologi terutama dari Bank Jaringan Riset Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), seperti amnion, *allograft* steril radiasi, melalui darahnya. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan sensitivitas metode RT-PCR hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin dan RT-PCR elektroforesis gel agarosa untuk deteksi HIV.

METODE

Penelitian ini menggunakan serum darah dari Rumah Sakit Ketergantungan Obat (RSKO) Fatmawati. Jumlah serum yang dipakai sebanyak 55 sampel terdiri dari 5 sampel negatif HIV hasil uji serologi dengan *rapid test* dan 50 sampel dengan *enzyme linked immunoassay* (ELISA). Ekstraksi RNA HIV sampel darah dilaksanakan menggunakan kit *RNA viral extraction* sedangkan teknik *one step* RT-PCR digunakan untuk amplifikasi DNA.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan pada 55 sampel yang diuji baik dengan teknik RT-PCR elektroforesis gel agarosa maupun RT-PCR hibridisasi *dot blot*, 43 sampel positif mengandung HIV. Hasil RT-PCR hibridisasi *dot blot* jauh lebih jelas dibanding dengan RT-PCR-elektroforesis gel agarosa. Hal ini terlihat munculnya *dot* hitam tebal pada film sedangkan pada gel agarosa pita DNA tampak tipis untuk beberapa sampel positif HIV yang sama

KESIMPULAN

Teknik RT-PCR hibridisasi *dot blot* dengan pelacak DNA berlabel biotin lebih sensitif dibanding dengan RT-PCR elektroforesis gel agarosa untuk mendeteksi HIV.

Kata Kunci : HIV, RT-PCR, hibridisasi *dot blot*, serum darah

* Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN)

** Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

Korespondensi

^aDra. Maria Lina Rosilawati, M.Biomed
Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN)
Jl. Cinere Pasar Jumat
PO BOX 7002 - JKSKL
Jakarta 12070
Email:
marialinarosilawati@yahoo.com

Universa Medicina 2007; 26: 111-9.

Use of reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) and dot blot hybridization with biotinylated labeled DNA probe techniques to detect human immunodeficiency virus (HIV) in blood serum

Maria Lina Rosilawati^a and Budiman Bela****

ABSTRACT

* Center for the Application of Isotopes and Radiation Technology, National Nuclear Energy Agency.

** Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

Correspondence

^aDra. Maria Lina Rosilawati,
M.Biomed
Center for the Application of Isotopes and Radiation Technology, National Nuclear Energy Agency
Jl. Cinere - Pasar Jumat
PO. Box 7002 JKSKL
Jakarta 12070.
Phone: 7690709 ext. 214

Email:
marialinarosilawati@yahoo.com

Universa Medicina 2007; 26: 111-9.

BACKGROUND

Human immunodeficiency virus (HIV) in blood serum can be detected by means of molecular biology techniques such as reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) and dot blot hybridization with a biotinylated labeled DNA probe. The techniques subsequently can be applied to screen HIV from blood of biological tissues such as radiation sterilized amnions and allografts especially from National Nuklir Energy Agency Research Tissue Bank. Purpose of this research is, to detect HIV by comparing the sensitivity of the RT-PCR- dot blot hybridization with a biotinylated labeled DNA probe and RT-PCR-agarose gel electrophoresis methods.

METHODS

Samples used in this research were blood sera from Fatmawati Drug Dependent Hospital. The amount of the samples were 55 blood sera consisted of 5 negative and 50 positive HIV samples which were analysed with the rapid test and enzyme linked immunoassay (ELISA) serological assays, respectively. HIV RNA in blood serum was extracted by means of RNA viral extraction kit while one step RT-PCR technique was performed for DNA amplification process.

RESULTS

Results of this research revealed that the HIV positive could be detected on 43 of 55 samples either by RT-PCR agarose gel electrophoresis or RT-PCR dot blot hybridization techniques. The detection result of RT-PCR dot blot hybridization appeared much more clear than RT-PCR agarose gel electrophoresis techniques. Several samples with positive HIV appeared as thick black dots on the film whereas on agarose gel the same samples performed as thin DNA bands.

CONCLUSION

Based on the results obtained, the RT-PCR dot blot using biotinylated labeled probe techniques are more sensitive than RT-PCR agarose gel electrophoresis techniques to detect HIV in blood serum.

Keywords : HIV, RT-PCR, dot blot hybridization, blood serum

PENDAHULUAN

Human immunodeficiency virus (HIV) adalah penyebab acquired immunodeficiency

syndrome (AIDS), yang merusak sistem kekebalan tubuh sehingga tubuh mudah diserang penyakit lain. Ada 2 tipe HIV yaitu HIV-1 dan HIV-2, akan tetapi sebagian besar

infeksi disebabkan HIV-1 karena tipe tersebut lebih virulen.⁽¹⁾ Sejak ditemukannya, virus tersebut menjadi perhatian dunia karena sindrom yang ditimbulkan dan meningkatnya jumlah pengidap. Berdasarkan data WHO/UNAIDS tahun 2006, dinyatakan 39,5 juta orang hidup dengan HIV dan diperkirakan 8,6 juta orang terdapat di Asia dengan sekitar 960.000 orang terinfeksi baru HIV pada tahun 2006, di antaranya 630.000 orang meninggal akibat AIDS.⁽²⁾ Di Indonesia infeksi HIV cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Sampai akhir September 2006 dilaporkan jumlah penderita AIDS ada 6987 orang dan 1651 (23,63%) di antaranya meninggal dunia. Jumlah pengidap HIV dan AIDS yang dilaporkan lebih sedikit dibanding kondisi sebenarnya. Departemen Kesehatan mengestimasi tahun 2006 jumlah orang tertular HIV di Indonesia antara 169.000 – 216.000 di mana 46% adalah *injection drug user* (IDU).⁽³⁾ Baru-baru ini PBB memperkirakan pengidap HIV-AIDS di Indonesia telah mencapai 180.000 orang.⁽⁴⁾

Untuk mengetahui apakah seseorang mengidap HIV diperlukan pemeriksaan penunjang di laboratorium. Metode deteksi yang dapat digunakan untuk pemeriksaan tersebut antara lain teknik *enzyme linked immunoassay* (ELISA), *Western Blot*, dan *immunofluorescence assay*.^(5,6,7) Teknik tersebut mendeteksi antibodi terhadap HIV. Kelemahan metode tersebut tidak dapat mendeteksi virus pada *window period*, suatu periode di mana seseorang telah terinfeksi HIV tetapi tubuh belum membentuk antibodi yaitu sekitar 2–4 minggu, bahkan kadang-kadang sampai 3 bulan sehingga berdasarkan uji untuk mendeteksi antibodi, hasilnya negatif.⁽⁸⁻¹¹⁾ Pada periode tersebut, pengidap dapat merupakan sumber penularan HIV. Virus dapat dideteksi dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dalam periode tersebut, meskipun dalam jumlah kecil.^(8,12,13) Sehubungan dengan penyediaan

jaringan biologi steril radiasi seperti *allograft* maupun amnion oleh Bank Jaringan Riset Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), metode deteksi ini juga sangat diperlukan untuk penyediaan jaringan yang aman apabila ditransplantasikan ke resipien.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Penelitian Simonds *et al*,⁽¹⁴⁾ menyatakan organ maupun jaringan dari donor seorang yang meninggal dengan HIV negatif secara serologi yang kemudian ditransplantasikan, 7 orang resipien terinfeksi HIV-1 setelah transplantasi. Hasil autopsi dari penderita AIDS menunjukkan adanya infeksi HIV dalam plasma dan sumsum tulang belakang tetapi dalam fragmen tulang yang sudah diproses virus tidak terdeteksi. Hasil proses PCR memperlihatkan adanya DNA HIV dalam *allograft* tersebut yang telah diproses.⁽¹³⁾ Metode *reverse transcription – polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan hibridisasi menggunakan pelacak DNA spesifik adalah metode deteksi alternatif berdasarkan adanya RNA HIV, dapat mendeteksi adanya virus dalam darah secara langsung baik secara kualitatif (ada atau tidak virus dalam darah)⁽¹²⁾ maupun kuantitatif (jumlah virus/jumlah *copy* RNA dalam darah).^(15,16) Beberapa penelitian menyatakan metode deteksi HIV yang sensitif dan spesifik adalah PCR yang dilanjutkan dengan teknik hibridisasi menggunakan pelacak DNA spesifik.^(12,17)

Tujuan penelitian adalah menguasai metode deteksi HIV dalam serum darah hasil uji serologi, dengan teknik RT-PCR & hibridisasi *dot blot* berlabel biotin. Teknik ini selanjutnya akan diterapkan untuk deteksi HIV dalam sampel darah jaringan biologi.

BAHAN DAN METODE

Sampel penelitian

Sampel berupa serum darah yang diperoleh dari Rumah Sakit Ketergantungan Obat (RSKO) Fatmawati, Jakarta. Jumlah sampel adalah 5

serum darah negatif HIV dengan pemeriksaan serologi secara *rapid test* dan 50 serum positif HIV secara ELISA. Serum disimpan pada suhu 4°C di laboratorium rumah sakit tempat pengambilan sampel lebih dari 30 jam. Hal ini dikarenakan pengambilan sampel darah secara bertahap disesuaikan dengan jumlah pasien yang ada dan juga keterbatasan fasilitas laboratorium rumah sakit. Sampel yang sudah terkumpul (10-15 sampel per minggu) dikirimkan ke laboratorium PATIR-BATAN kemudian disimpan pada suhu -20°C (sekitar 3-4 bulan) sebelum dilakukan proses ekstraksi RNA.

Ekstraksi RNA

Ekstraksi RNA dilaksanakan dengan menggunakan *Mini Kit* dari RNA *QIAamp Viral Extraction* (Qiagen, Jerman). Sel virus dalam serum darah dilisis dengan larutan bufer lisis yang antara lain mengandung guanidine tiosianat dengan pH 6,4. Pengikatan RNA virus dilakukan dengan memasukkan sel virus yang telah dilisis dalam serum ke dalam *QIAamp spin column* yang dilapisi dengan membran *silica gel*, ditambahkan etanol absolut selanjutnya disentrifugasi. RNA pada membran dicuci dengan bufer pencuci yang antara lain mengandung guanidine hidroklorida, sodium azida dan kemudian dielusi dengan bufer elusi yaitu air bebas RNase ya mengandung sodium azida. RNA yang diperoleh dapat disimpan pada *freezer* suhu -20°C.

Proses RT-PCR

Teknik RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit *one step* RT-PCR (Qiagen). Proses *reverse transcription* RNA menjadi cDNA dan amplifikasi cDNA dilaksanakan dalam 1 tabung. Campuran pereaksi RT-PCR (*premix*) terdiri dari 1x larutan bufer, 0,4 mM masing-masing dNTP, 1x larutan Q, 0,6 µM tiap primer, 20 unit *RNase inhibitor*, 2,0 µl *One*

Step RT-PCR *enzyme mix* dan air bebas RNase. RNA hasil ekstraksi kemudian ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Kontrol positif yang digunakan adalah plasmid pNL43 (klon HIV subtype B) sedangkan *premix* dan bufer elusi dipakai sebagai kontrol negatif. Volume *master mix* tersebut adalah 50 µl. *Primer* yang digunakan adalah Hi-976C (3'- TCT GCA GCT TCC TCA TTG ATG G- 5') dan Hi-853F (3'- CAG CAT TAT CAG AAG GAG CCA C- 5') yang dirancang oleh B, peneliti Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Primer tersebut dirancang dari bagian yang *conserved* pada daerah gag genom HIV-1 (suatu gen yang menyandi protein *nukleocapsid* HIV) berasal dari 8 strain HIV yang dianggap mewakili setiap tipe. Tahap amplifikasi meliputi proses *reverse transcription* selama 30 menit pada suhu 37°C, *initial PCR activation step* pada suhu 95°C selama 15 menit. Tahapan selanjutnya untuk setiap siklus terdiri dari denaturasi selama 30 detik 94°C, *annealing* pada suhu 56°C, 30 detik dan *extension* pada suhu 72°C, 45 detik. Jumlah siklus yang diperlukan adalah 40 siklus. *Extended extension* selama 7 menit pada suhu 72°C merupakan tahap akhir dari proses PCR.

Proses elektroforesis

Hasil RT-PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1,5% dalam larutan buffer *Tris-Borat-EDTA* (TBE). Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan *UV transilluminator* setelah gel diwarnai dengan larutan etidium bromida.

Hibridisasi dot blot, konjugasi dan visualisasi

Fragmen DNA hasil PCR setelah didenaturasi dengan pemanasan, dispotkan pada membran nilon Hybond N+ menggunakan *dot blotter*. DNA pada membran difiksasi dengan pemanasan pada suhu 80°C selama 2 jam dan kemudian dilakukan proses

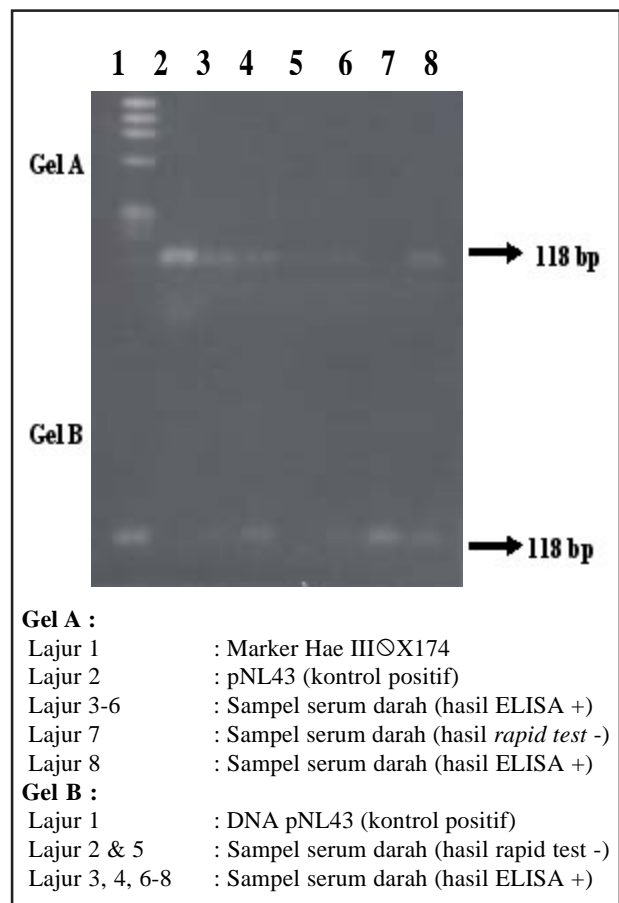
prehibridisasi dalam larutan 5x SSPE, 5x larutan Denhardt dan 0,5% SDS. Proses hibridisasi dilakukan pada suhu 50°C selama 1-2 jam dengan menggunakan larutan yang sama yang ditambah dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin [Biotin - TEG - TDG GRG GAC AYC ARG SAG CHA TRC A-3'; D(AGT), R(AG), Y(CT), S(GC), H(ACT)] sehingga konsentrasi pelacak tersebut menjadi 10 pmol/ml. Pelacak tersebut juga dirancang oleh peneliti yang sama yang merancang primer dalam penelitian ini. Membran selanjutnya dicuci 2 kali dengan larutan 2 x SSPE, 0,1% SDS dan 1 kali dengan larutan 1 x SSPE, 0,1% SDS. Proses konjugasi 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. Hasil hibridisasi dideteksi dengan menambahkan larutan *Enhance Chemiluminescens* (ECL) pada membran selama 1 menit. Visualisasi dilakukan dengan memaparkan membran pada *hiperfilm* dalam kaset selama 1-2 jam 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

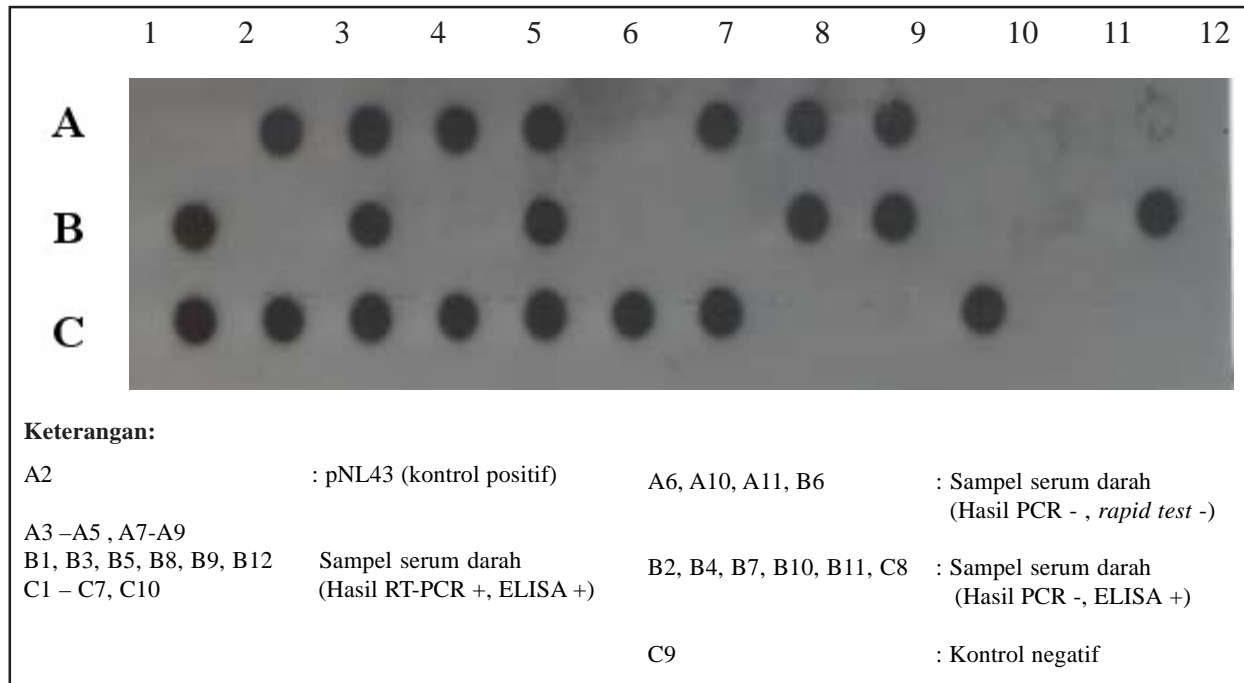
Hasil RT-PCR DNA sampel serum darah dan kontrol positif (pNL43) dengan primer oligonukleotida Hi-976C dan Hi-853F dapat dilihat pada Gambar 1. Dari 50 sampel serum darah yang positif secara ELISA, 43 sampel dan kontrol positif (pNL43) menunjukkan hasil RT-PCR positif yaitu adanya fragmen/pita DNA berukuran 118 bp pada hasil elektroforesis gel agarosa. (Gambar 1: gel bagian atas (A), lajur 2-6, 8;

(B) lajur 1, 3, 4, 6-8). Fragmen DNA berukuran tersebut tidak tampak pada hasil negatif RT-PCR (Gambar 1: gel A, lajur 7; gel B, lajur 2 & 5). Sampel negatif secara *rapid test* juga menunjukkan hasil negatif dengan RT-PCR.

Pelacak oligonukleotida dalam penelitian ini dirancang dari sekuen DNA spesifik yang terletak di dalam fragmen DNA hasil RT-PCR dengan primer Hi- 976C dan Hi- 853F. Hasil RT-PCR yang dilanjutkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Hasil RT-PCR dan elektroforesis gel agarosa DNA pNL43 dan sampel serum darah dengan primer Hi 976 dan Hi 853



Gambar 2. Hasil RT-PCR dan hibridisasi dot blot dengan pelacak oligonukleotida berlabel biotin

Dot berwarna hitam pada film menunjukkan hasil positif HIV, sedangkan tidak adanya dot berwarna hitam menunjukkan tidak adanya HIV pada sampel darah (Gambar 2: Dot A6, A10, A11, B2, B4, B6, B7, B10, B11, C8, C9). Dari 50 sampel darah positif dengan pemeriksaan ELISA, 43 sampel (86%) menunjukkan hasil positif dengan RT-PCR akan tetapi fragmen/pita DNA hasil RT-PCR pada beberapa sampel positif terlihat tipis pada gel agarosa (Gambar 1: gel A, lajur 5, 6 : gel B, lajur 3, 6). Jumlah sampel yang sama, 43 sampel menunjukkan juga hasil positif dengan metode RT-PCR yang dilanjutkan dengan hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin, akan tetapi terlihat semua hasil positif menunjukkan dot hitam tebal termasuk pita DNA yang terlihat tipis pada gel agarosa tersebut di atas (Gambar 2: Dot A9, B3, B8, C2). Ketebalan dot DNA pada film dan pita DNA pada gel agarosa menunjukkan jumlah

virus. Makin tebal dot atau pita DNA makin banyak jumlah virus yang terdeteksi.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini terlihat 7 dari 50 sampel serum darah positif HIV dengan teknik ELISA, menunjukkan hasil negatif HIV menggunakan baik dengan teknik RT-PCR elektroforesis gel agarosa maupun dengan RT-PCR hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin. Beberapa faktor yang mempengaruhi ketidaksesuaian hasil deteksi HIV secara serologi dan molekuler antara lain kemungkinan karena penyimpanan spesimen setelah pengambilan darah, jenis spesimen, primer yang digunakan pada RT-PCR. Adanya antibodi yang bereaksi silang dengan antigen *host* atau antigen dari virus-virus yang terkait, juga menyebabkan hasil positif palsu secara serologi.⁽¹⁷⁾ Penurunan

RNA HIV terjadi 30 jam setelah pengambilan darah pada suhu ruang (20 -23 °C) dan stabil dalam plasma pada suhu tersebut selama 24 jam.^(18,19) Untuk menghindari degradasi RNA HIV penyimpanan plasma darah dilakukan pada 4°C selama 30 jam atau -70 atau -80°C untuk jangka lama sampai 1 tahun.^(16,20) RNA HIV paling stabil dalam plasma dibanding dalam darah (*whole blood*) dan serum.⁽²⁰⁾ Penurunan RNA HIV dalam plasma darah yang disimpan pada -20°C dan -80°C dalam 12 minggu penyimpanan, tidak menunjukkan perbedaan nyata.⁽²⁰⁾ Jenis spesimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah serum darah. Spesimen yang paling baik untuk pemeriksaan RT-PCR adalah plasma darah karena mengandung RNA HIV 30–80% lebih banyak dari pada serum.⁽²⁰⁾

Menurut Sebire *et al*⁽¹⁶⁾ jumlah RNA HIV dalam serum 50% lebih kecil dari plasma karena banyak virion terjebak dalam jalinan fibrin dari bekuan darah saat proses pemisahan darah dengan serum. Sensitivitas dan spesifisitas teknik deteksi HIV secara molekuler seperti RT-PCR sangat ditentukan oleh primer yang digunakan. Primer yang dipakai dalam penelitian ini adalah Hi-976C & Hi-853F dari daerah yang *conserved* pada gen gag HIV. Dalam penelitian ini terlihat sensitivitas baik metode RT-PCR & elektroforesis gel agarosa maupun RT-PCR & hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin adalah 86% apabila dibandingkan dengan metode ELISA. Meskipun demikian dilihat dari ketebalan pita DNA hasil elektroforesis dibandingkan dengan dot hitam hasil hibridisasi *dot blot* pada beberapa sampel yang sama, menunjukkan teknik hibridisasi *dot blot* lebih sensitif. Sensitivitas RT-PCR dengan menggunakan *primer* daerah yang *conserved* pada gen gag tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan *primer* dari gen pol (protease) yaitu masing-masing 80,8 dan 65,4%. Tingkat sensitivitas tersebut diperoleh dengan membandingkan metode deteksi HIV

tersebut dengan pemeriksaan serologi secara *rapid test*.⁽²¹⁾ Pemeriksaan HIV berdasarkan deteksi antibodi seperti ELISA mempunyai kelemahan karena dapat memberikan hasil positif atau negatif palsu. Reaksi silang antibodi dari infeksi virus DNA, hepatitis karena alkohol, vaksinasi influenza, vaksinasi hepatitis B dapat memberikan hasil positif palsu.^(22,23,24)

Penelitian Gasasira *et al*⁽²⁵⁾ menunjukkan perkembangan respon imun yang kurang terhadap malaria pada orang-orang dengan usia muda, sangat memungkinkan adanya stimulasi sel B nonspesifik yang memproduksi antibodi yang bereaksi silang dengan antigen HIV-1 pada keadaan tidak ada infeksi HIV.

Metode RT-PCR elektroforesis dan RT-PCR hibridisasi *dot blot* merupakan metode deteksi HIV yang sangat diperlukan untuk mengatasi keterbatasan metode ELISA terutama pada *window period*. Sehubungan dengan penyediaan jaringan biologi seperti amnion, *allograft* steril radiasi, diperlukan jaringan yang berkualitas tinggi, aman jika ditransplantasikan antara lain bebas HIV.

Menurut Fideler *et al*,⁽¹²⁾ Hilmy dan Lina,⁽²⁶⁾ *allograft* dari donor yang terinfeksi HIV yang diiradiasi sinar gamma sampai dengan 25 kGy, dosis yang direkomendasikan *International Atomic Energy Agency* (IAEA) untuk produk kesehatan tidak merusak gen HIV. DNA HIV masih terdeteksi dengan menggunakan teknik yang sensitif dan spesifik seperti PCR, tetapi tidak terdeteksi pada dosis 30 dan 40 kGy. Jumlah sampel negatif secara serologi dalam penelitian ini sangat terbatas, sehingga belum ditemukan pengidap HIV dalam keadaan *window period*, yang akan membuktikan teknik RT-PCR & elektroforesis gel agarosa dan RT-PCR & hibridisasi *dot blot* dengan pelacak berlabel biotin lebih sensitif dari metode ELISA.

Dari penelitian ini terlihat deteksi RT-PCR dengan hibridisasi *dot blot* menggunakan

pelacak berlabel biotin lebih sensitif dibanding dengan elektroforesis gel agarosa dengan pewarnaan larutan etidium bromida. Teknik tersebut juga dapat digunakan untuk mendeteksi HIV dalam sampel dengan jumlah banyak sehingga sangat efisien untuk studi *surveillance*. Beberapa penelitian membuktikan penggunaan pelacak DNA berlabel radioisotop pada proses hibridisasi ternyata lebih sensitif dan prosedur yang digunakan lebih sederhana dibandingkan dengan pelacak DNA non isotop.⁽²⁷⁾ Oleh karenanya, penggunaan pelacak DNA berlabel radioisotop (³²P) pada proses hibridisasi *dot blot* untuk deteksi HIV akan digunakan pada penelitian selanjutnya.

KESIMPULAN

Deteksi HIV dengan teknik RT-PCR hibridisasi *dot blot* menggunakan pelacak DNA berlabel biotin pada sampel serum darah ternyata lebih sensitif dibanding dengan RT-PCR elektroforesis gel agarosa menggunakan pewarnaan larutan etidium bromida. Pemilihan sampel berupa plasma, penyimpanan pada suhu yang tepat, kemungkinan akan lebih meningkatkan sensitivitas deteksi HIV secara molekuler.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada dr. Elly Watty, Sp.PK, RSKO Fatmawati atas bantuannya dalam penyediaan sampel darah. Kepada Sdr. Rika Heryani dan Almaida, PATIR-BATAN atas bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. O'Brien WA, Pomerantz RJ. HIV infection and associated disease. In: Nathanson N, Ahmed R, Scarano FG, Griffin DE, Holmes KV, Murphy FA, et al, editors. *Viral pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publisher; 1997. p. 815-36.
2. World Health Organization / UNAIDS. AIDS Epidemic Update, Report on the global AIDS epidemic. Last updated June 28, 2007. Available at: <http://www.avert.org/aroundworld.htm>. Accessed July 1, 2007.
3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Peringatan Hari AIDS Sedunia 2006. "Stop AIDS: Saatnya Melayani!!". Available at: <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=2353>. Accessed November 29, 2006.
4. Indo IDI. HIV AIDS, 2005. Available at: http://www.idionline.org/infoidi_isi.php?news_id=946. Accessed April 26, 2006.
5. World Health Organization / UNAIDS. HIV assay: operational characteristics (Phase1) Report 15 Antigen/Antibody ELISAs; 2004.
6. Kleinmans S, Busch MP, Hall L, Thomson R, Glynn S, Galahan D, et al. False positive HIV-1 test result in a low risk screening setting of voluntary blood donation. *JAMA* 1998; 280: 1080-5.
7. Lane HC. Human immunodeficiency virus. In : Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM, editors. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 5th ed. Washington D.C.: ASM Press; 1997. p. 763-809.
8. Abravaya K, Esping C, Hoenle R, Gorzowski J, Perry R, Kroeger P, et al. Performance of a multiplex qualitative PCR LCx assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M subtypes, group O, and HIV-2. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 716-23.
9. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. AIDS and other immunodeficiencies. In: *Kuby Immunology*. 4th ed. New York: W.H Freeman and Company. 2000. p. 485.
10. Legge A. Direct HIV testing of donated blood is inevitable. *BMJ* 1997; 314: 1433.
11. Lackritz EM, Satten GA, Aberle-Grasse J. Estimated risk of transmission of human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med* 1995; 333: 1721-5.
12. Fidler BM, Vangsness Jr CT, Moore T, Li Z, Rasheed S. Effect of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. *J Bone Joint Surg* 1994; 76-A: 1032-5.
13. Salzman NP, Psallidopoulos M, Prewett AB. Detection of HIV in bone allografts prepared from AIDS autopsy tissue. *Clin Orthop* 1993; 292: 384.

14. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield SRN, Conley LJ, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type I from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992; 326: 726-32.
15. Dickover RE, Herman SA, Saddiq K, Wafer D, Dillon M, Bryson YJ. Optimization of specimen-handling procedures for accurate quantitation of level of human immunodeficiency virus RNA in plasma by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1070-3.
16. Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 493-8.
17. Kwok, Sninsky JJ. PCR detection of human immunodeficiency virus type I proviral DNA sequences. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1993. p. 309-15.
18. Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, Margolis D, Starkey C, Carroll R, et al. Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, vacutainer PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995; 35: 1562-6.
19. Elbeik T, Nassos P, Kipnis P, Haller B, Ng VL. Evaluation of the vacutainer PPT plasma preparation tube for use with the Bayer VERSANT assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3769-71.
20. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, Bremer J, Carroll R, Cassol S, et al. Determination of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1471-9.
21. Fatmawati DN. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) sebagai uji alternatif untuk deteksi infeksi human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Tesis). Jakarta: Program Pendidikan Dokter Spesialis I, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia; 2006.
22. Anonymous. Human immunodeficiency virus (AIDS). *Bremancos Diagnostic. Inc.* Available at: <http://www.bremancos.com>. Accessed June 19, 2004.
23. Mylonakis E, PaLiou M, Lally M, Flanigan TP, Rich JD. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am J Med* 2000; 109: 568-76.
24. Pasquier C, Sandres-Saune K, Mansury JM, Puissant B, Viraben R, Spenato N, et al. Virological exploration of individuals with discordant HIV screening tests. *J Clin Virol* 2004; 30: 218-23.
25. Gasasira AF, Dorsey G, Kanya MR, Havlir D, Kiggundu M, Rosenthal PJ, et al. False-positive results of enzyme immunoassay for human immunodeficiency virus in patient with uncomplicated malaria. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3021-4.
26. Hilmy N, Lina M. Effect of ionizing radiation on viruses, proteins and prions. In: Phillips GO, von Versen R, Strong DM, Nather A, editors. *Advances in tissue banking*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2001. p. 358-75.
27. International Atomic Energy Agency (IAEA). *Organization of radioisotopes based molecular biology laboratory (IAEA-TECDOC-1528)*. Vienna, Austria: IAEA; December 2006.