

Optimasi teknik isolasi dna virus hepatitis B untuk menganalisis resistensi pada kasus hepatitis B kronik menggunakan metode in-house assay = Optimization of hepatitis B virus dna isolation techniques to be used in the analysis resistance in chronic hepatitis B case using in-house assay

Anugrah Dwi Handayu, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20350792&lokasi=lokal>

Abstrak

Amplifikasi DNA virus hepatitis B (VHB) dari sampel plasma sulit dilakukan apabila kadar DNA VHB <10.000 kopi/ml. Sehingga, langkah awal ekstraksi menjadi penting bagi keberhasilan amplifikasi dan sekuensing. Peningkatan konsentrasi DNA dalam jumlah yang cukup dan berkualitas baik memerlukan metode isolasi yang optimal. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan teknik isolasi DNA yang optimal untuk menghasilkan DNA VHB dalam jumlah yang cukup sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi perubahan genetik gen polimerase VHB terkait resistensi obat antivirus pada kasus hepatitis B kronik. Optimasi prosedur penanganan sampel untuk mengekstraksi partikel DNA VHB dilakukan dengan mengisolasi sampel plasma dengan kadar virus 105 kopi/ml menggunakan delapan perlakuan yang berbeda yaitu 1 ml dan 200 µL plasma disentrifugasi 4000xg selama 20 menit pada suhu 25°C (P1 dan P2), 1 ml dan 200 µL plasma disentrifugasi 16000xg selama 1 jam pada suhu 4°C (P3 dan P4), 1 ml plasma disentrifugasi 21000xg selama 1 jam pada suhu 4°C (P5), 1 ml plasma dalam PEG6000 20% diinkubasi semalaman pada 2-8°C kemudian disentrifugasi 21000xg selama 1 jam pada suhu 4°C (P6), 1 ml plasma dalam PEG6000 20% dan NaCl 0.5M diinkubasi semalaman pada 2-8°C kemudian disentrifugasi 21000xg selama 1 jam pada suhu 4°C (P7), dan 200 µL sampel plasma tanpa penambahan perlakuan (P8). Kadar virus diukur menggunakan kuantitatif realtime PCR, dan hasil dari setiap perlakuan sampel dibandingkan dengan kontrol (P8). Uji simulasi dilakukan pada sampel plasma dengan kadar virus 105; 104; 103 dan 102 kopi/ml yang diberikan perlakuan 3 (P3) yang dipilih berdasarkan hasil sebelumnya, DNA kemudian disekuensing untuk dianalisis mutasi resistensinya terhadap obat antivirus dan hasilnya dibandingkan dengan sampel yang tanpa diberikan perlakuan.

Hasil menunjukkan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi DNA pada rerata sampel yang diisolasi menggunakan P3 jika dibandingkan dengan kontrol (P8). Sedangkan hasil sekuensing untuk analisis mutasi pada gen polimerase terkait resistensi terhadap obat antivirus dapat dilakukan pada sampel dengan kadar virus 105; 104; 103 kopi/ml baik yang diberikan perlakuan maupun tanpa perlakuan. Namun, sampel dengan kadar virus 102 kopi/ml hanya dapat dianalisis mutasi resistensinya pada sampel yang ditambahkan perlakuan 3 (P3).

Kesimpulan: 1 ml plasma yang disentrifugasi 16000xg selama 1 jam pada suhu 4°C (perlakuan 3) merupakan metode isolasi DNA yang mampu meningkatkan perolehan DNA secara optimal dari sampel plasma penderita hepatitis B kronik, sehingga analisis resistensi terhadap obat antivirus menggunakan teknik in-house assay dapat dilakukan pada sampel dengan kadar virus <10.000 kopi DNA/ml.

.....

The amplification of hepatitis B virus DNA from plasma samples is difficult when HBV DNA levels <10.000 copies/ml. Thus, the initial step of extraction become crucial for the success of amplification and

sequencing. Increasing concentrations of DNA in sufficient quantity and good quality need an optimal isolation method. The aim of this study is to obtain an optimal DNA isolation technique and generate HBV DNA in sufficient quantities, so that it can be used to detect genetic changes of HBV polymerase gene related to drugs resistance on chronic hepatitis B. The optimization of sample handling procedure for extracting HBV DNA particles were performed by isolating plasma samples with viral load 105 copies/ml using eight different kinds of treatment are 1 ml and 200 μ L of plasma was centrifuged at 4000 \times g for 20 minutes at 25°C (P1 and P2); 1 ml and 200 μ L of plasma centrifuged at 16000 \times g for 1 hour at 4°C (P3 and P4); 1 ml of plasma centrifuged at 21000 \times g for 1 hour at 4°C (P5); 1 ml of plasma in 20% PEG6000 were incubated overnight at 2-8°C then centrifuged at 21000 \times g for 1 hour at 4°C (P6), 1 ml of plasma in 20% PEG6000 and 0.5M NaCl were incubated overnight at 2-8°C then centrifuged at 21000 \times g for 1 hour at 4°C (P7), and 200 μ L of plasma without treatment (P8). Hepatitis B virus level were measured using quantitative real-time PCR, and the results of each treatment compared to the control samples (P8). Simulation test performed on plasma samples with grading of virus level (i.e 105; 104; 103 and 102 copies/ml) were given treatment 3 (P3) were selected based on previous results, the DNA was sequenced and then analyzed for drugs resistance and the results were compared with samples without treatment.

Result showed that an increasing in average concentration of DNA samples was isolated using the P3 when compared with controls (P8). While the results of sequencing for analysis of mutations in polymerase gene associated with drugs resistance can be performed on samples with virus level 105; 104; 103 copies/ml were given either treatment or no treatment. However, samples with virus level 102 copies/ml can be analyzed only on treatment samples.

Conclusion: 1 ml plasma were centrifuged at 16000 \times g for 1 h at 4°C (treatment 3) is a DNA isolation method that can improve the recovery of optimal DNA from plasma samples of patients with chronic hepatitis B, so that the analysis of drug resistance using in-house assay techniques can be done on samples with virus levels <10,000 copies/ml.