

DIAGNOSIS MOLEKULER INFEKSI VIRUS HEPATITIS C

Oleh : ALMURDI

Bagian Patologi Klinik FK Unand

I.PENDAHULUAN

Penggunaan pemeriksaan berbasis molekuler di laboratorium telah dimulai sejak 20 tahun yang lalu. Pada metode pemeriksaan konvensional, patogen yang dicurigai dibiakkan terlebih dahulu, setelah diperoleh biakan murni maka dilakukan identifikasi secara mikroskopis, uji biokimia dan imunologi. Namun metode konvensional ini mempunyai banyak keterbatasan terutama pada patogen yang tidak bisa dibiak pada media artificial, patogen yang sulit dibiak, patogen yang mempunyai waktu generasi yang lama, deteksi gen resisten terhadap antibiotik, seperti gen *mec A*, *van A*, *gyr A*, *inh A*, dan gen *rpo B* (Flaws and Buckingham, 2007).

Infeksi virus hepatitis C (VHC) masih merupakan masalah kesehatan, karena mayoritas penderita yang terinfeksi virus ini secara progresif akan menderita hepatitis kronik yang dapat berlanjut menjadi sirosis hepatis dan karsinoma hepatoseluler. Diperkirakan sekitar 200 juta orang telah terinfeksi VHC diseluruh dunia dengan lebih dari 350.000 orang meninggal setiap tahun (Bes *et al.*, 2009; Vasiljevic *et al.*, 2011; Schaefer and Chung, 2012).

Virus hepatitis C merupakan virus RNA genus *Hepacivirus*, berukuran 50 nm, berbentuk sferik dan mempunyai envelop. Virus ini terdiri dari 9600 nukleotida, dibagi dalam 6 genotipe dan lebih 70 subtipe. Virus hepatitis C terdiri dari 3 protein struktural, yaitu protein *core*, envelop E1, dan E2 dan 7 protein nonstruktural (NS) yaitu NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, dan NS5B (Cantaloube *et al.*, 2005; Irshad *et al.*, 2008).

Daerah VHC yang *conserved* telah digunakan sebagai dasar untuk menentukan genotipe yaitu 5'-UTR, C/E1, dan NS5B. Genotipe digunakan untuk menentukan

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

BY

WILLIAM STANTON

1851

The history of the United States is a story of growth and progress. From the first settlers to the present day, the nation has expanded its territory and improved its institutions. The early years were marked by struggle and hardship, but the spirit of freedom and democracy prevailed. The American people have shown a remarkable ability to overcome adversity and build a great nation. The history of the United States is a testament to the power of the human spirit and the values of liberty and justice for all.

penyebaran VHC secara geografis, menentukan prognosis, dan efektivitas pengobatan antivirus. Masing-masing genotipe memperlihatkan respon yang berbeda terhadap interferon dan ribavirin (Murphy *et al.*, 2007; Utama *et al.*, 2010).

Berbagai teknik pemeriksaan untuk menentukan genotipe VHC dapat dilakukan dengan cara *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), menggunakan primer spesifik, dan hibridisasi dengan *probe* oligonukleotida spesifik. Metode rujukan untuk menentukan genotipe virus dapat ditentukan melalui sekuensing langsung (Sistayanarain *et al.*, 2011). Wilkin *et al.*, (2010) menyatakan, di USA 70 % penderita terinfeksi VHC adalah genotipe 1, genotipe 2 sekitar 16 – 19 %, genotipe 3, 8 – 10 %, sisanya 1 – 2 % genotipe lain. Di Mesir prevalensi tertinggi infeksi adalah genotipe 4, di Afrika Selatan genotipe 5 (Ebeid and El-Bakry, 2009; Kamili *et al.*, 2012).

II. Pemeriksaan Laboratorium Infeksi Virus Hepatitis C

Uji diagnostik infeksi VHC dibagi menjadi dua pemeriksaan yaitu tes serologi untuk mendeteksi adanya antibodi dalam serum atau plasma penderita, dan pemeriksaan molekuler untuk mendeteksi adanya virus. Pemeriksaan penyaring untuk deteksi antibodi telah menurunkan risiko penularan infeksi melalui transfusi. Pemeriksaan anti-VHC dengan generasi ketiga dapat mendeteksi antibodi dalam 4 – 10 minggu setelah infeksi (Lauer and Walker, 2001).

European Association for Study of the Liver (EASL) merekomendasi diagnosis hepatitis C sebagai berikut (Craxi *et al.*, 2011) :

1. Diagnosis infeksi VHC berdasarkan deteksi anti-VHC dengan EIA dan RNA VHC dengan metode molekuler yang sensitif.
2. Untuk diagnosis hepatitis C akut, pemeriksaan RNA VHC dibutuhkan karena RNA VHC muncul sebelum anti-VHC terdeteksi.
3. Anti-VHC positif, RNA VHC negatif pasien dengan hepatitis C akut harus diperiksa lagi beberapa minggu kemudian.
4. Hepatitis C kronik harus dibuktikan dengan adanya anti-VHC dan RNA VHC.
5. Pasien immunosupresi perlu pemeriksaan RNA VHC bila hepatitis ditemukan, tapi anti-VHC tidak terdeteksi.

2.1 Pemeriksaan Serologi

Diagnosis infeksi virus hepatitis C umumnya dilakukan dengan mendeteksi adanya antibodi terhadap virus menggunakan *enzyme immunoassay* (Ansaldi *et al.*, 2006; Rustgi, 2007). Deteksi antibodi bukanlah penanda yang reliabel pada fase preserokonversi infeksi, karena *window period* berkisar antara 58 sampai 70 hari. Pemeriksaan untuk mendeteksi anti-VHC tidak dapat membedakan infeksi akut dengan infeksi kronik, maupun *post infection*. Hal ini disebabkan karena IgM anti-VHC kadarnya bervariasi pada infeksi akut sedangkan pada infeksi kronik antibodi ini juga terdeteksi. (Brant *et al.*, 2008; Irshad *et al.*, 2008 ; Ross *et al.* 2010).

Pada pemeriksaan EIA generasi pertama menggunakan epitop regio NS4 (C 100-3) genom VHC, pemeriksaan ini kurang sensitif dan kurang spesifik. Pada pemeriksaan generasi kedua menggunakan format multi antigen, termasuk regio *core*, NS3, dan NS4 sehingga meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas. Pemeriksaan EIA generasi ketiga dilakukan penambahan antigen dari regio NS5 yang menyebabkan spesifisitas menjadi 99% (Lauer and Walker, 2001; Kamili *et al.*, 2012).

Pemeriksaan anti-HCV telah menyebabkan penurunan drastis transmisi terkait transfusi. Pemeriksaan anti-VHC dianjurkan sebagai langkah pertama untuk menyaring infeksi VHC. Anti-VHC biasanya terbentuk 32-46 hari setelah viremia, namun periode sekitar 12-48 minggu sebelum serokonversi dapat terjadi terutama pada individu imunokompromais. Pada kasus ini pemeriksaan RNA VHC dianjurkan pada semua pasien hepatitis akut yang menunjukkan gangguan kekebalan (Maasoumy *et al.*, 2012).

2.2 Pemeriksaan Molekuler

Metode deteksi molekuler mampu mendeteksi adanya fragmen DNA spesifik pada patogen. Deteksi ini meliputi teknik amplifikasi fragmen DNA yang dikenal dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Teknik ini adalah metode *in vitro* untuk amplifikasi fragmen DNA secara enzimatik yang diperkenalkan pada tahun 1985. Pada tahun 1988, dengan penemuan enzim termo stabil *Taq Polymerase* memungkinkan proses otomatisasi PCR (Lo and Chan 2006).

Pemeriksaan RNA virus hepatitis C dengan *reverse transcriptase* PCR adalah metode yang sangat sensitif untuk mendeteksi infeksi VHC dan merupakan baku emas. Amplifikasi asam nukleat dengan PCR merupakan pemeriksaan yang reliabel dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi (Argentini *et al.*, 2009; Maudar *et al.*, 2012).

Pemeriksaan laboratorium untuk mendeteksi RNA VHC dianjurkan dengan metode molekuler yang sensitif dengan batas bawah deteksi < 50 IU/ml (Craxi *et al.*, 2011). Setelah terpapar VHC, asam nukleat virus terdeteksi dalam serum 7 hari kemudian mendahului peningkatan kadar ALT. Kisaran *viral load* berguna sebagai indikator infeksi akut, sedangkan pada infeksi kronik viral load relatif stabil (Fabris *et al.*, 2008; Bossler and Caliendo, 2010).

Pemeriksaan molekuler untuk diagnosis infeksi VHC (Craxi *et al.*, 2011) :

1. Pemeriksaan molekuler kualitatif dapat digunakan untuk konfirmasi diagnosis infeksi VHC. Batas deteksi terendah penting dalam membedakan individu seropositif yang telah sembuh infeksi (tidak terdeteksi RNA VHC) dari penderita seropositif dengan infeksi kronik (persisten RNA VHC).
2. Diagnosis infeksi VHC kronik berdasarkan adanya anti-VHC antibodi dideteksi dengan EIA dan RNA VHC dideteksi dengan pemeriksaan molekuler. Pemeriksaan RNA VHC menggunakan *real-time* PCR dapat mendeteksi RNA VHC dibawah 10 IU/ml dan sampai jumlah 10 juta IU/ml (Craxi *et al.*, 2011). Pada hepatitis C kronik, titer VHC menurun 2-3 log setelah kadar ALT mencapai puncak dan kadar ALT akan menetap selama fase kronik.
3. Bila deteksi RNA VHC digunakan sebagai tes konfirmasi, spesimen RNA negatif harus di uji dengan RIBA, hal ini untuk membedakan hasil *false* positif ELISA dari infeksi sebenarnya (*true infection*). Alternatifnya adalah, pemeriksaan RNA VHC diulang lagi karena hal ini dapat ditemukan pada viremia intermiten. Infeksi VHC seharusnya tidak diputuskan berdasarkan hasil pemeriksaan RNA VHC yang negatif.
4. Pemeriksaan molekuler kualitatif juga digunakan untuk diagnosis infeksi VHC pada bayi baru lahir dari ibu terinfeksi VHC, karena antibodi IgG maternal

dapat melewati plasenta. Bayi ini dapat seropositif dalam 2 tahun kehidupannya. Deteksi RNA VHC dalam plasma atau serum neonatus merupakan diagnostik infeksi.

5. Deteksi RNA VHC dalam plasma atau serum dapat bernilai diagnostik pada individu imunokompromais seperti stadium akhir infeksi HIV, karena respon imun penderita tidak normal terhadap virus dan tidak akan menjadi seropositif.
6. Pemeriksaan RNA VHC kualitatif juga digunakan untuk menentukan respon pengobatan terhadap terapi untuk infeksi VHC karena pemeriksaan ini sangat sensitif dengan batas terendah deteksi antara 5-50 kopi/ml plasma.

A.Pemeriksaan Kualitatif

Pemeriksaan RNA VHC secara kualitatif telah dikembangkan untuk skrining suplai darah, karena RNA VHC dapat dideteksi dalam serum selama *window period* antara infeksi dengan serokonversi. Hal ini disebabkan kebanyakan individu baru saja terinfeksi VHC adalah asimtomatik, pemeriksaan donor darah memungkinkan identifikasi individu berisiko untuk menularkan infeksi VHC yang tentunya tidak terdeteksi dengan pemeriksaan serologik.

➤ Metode *Nested* PCR

Kadar rendah target dapat mencegah PCR regular bekerja. *Nested* PCR adalah modifikasi untuk meningkatkan sensitifitas dan spesifisitas reaksi. Pada *nested* PCR, dua pasang primer digunakan untuk amplifikasi target tunggal dalam 2 PCR *run* terpisah. Pasangan primer kedua di desain untuk berikatan dengan templat yang berikatan dengan pasangan pertama, akan mengamplifikasi produk PCR pertama pada amplifikasi tahap kedua. Amplifikasi kedua akan secara spesifik meningkatkan jumlah produk yang diinginkan. Pada *seminested* PCR satu dari primer tahap kedua sama dengan primer tahap pertama (Buckingham and Flaws, 2007).

➤ Metode PCR Multiplek

Lebih dari satu pasang primer digunakan agar amplifikasi multipel terjadi secara simultan dalam menghasilkan produk PCR. Multiplek PCR khusus digunakan dalam menentukan tipe dan identifikasi organism tertentu. Pola ukuran produk akan spesifik terhadap tipe tertentu. Multipel organisme menjadi target PCR multiplek pada laboratorium mikrobiologi klinik, sebagai contoh organisme penyebab penyakit menular seksual dapat ditentukan dengan PCR multiplek hanya menggunakan satu *swab* genital (Buckingham and Flaws, 2007; Shemis *et al.*, 2012).

B. Pemeriksaan Kuantitatif

Kuantitatif *viral load* berguna untuk mengukur jumlah virus dalam darah. Pemeriksaan ini memberikan informasi awal *viral load*, reduksi jumlah virus saat terapi, dan respon virologi menetap, yang didefinisikan sebagai tidak terdeteksinya VHC dengan PCR selama 6 bulan setelah berhenti terapi (Wilkins *et al.*, 2010).

Teknik *real-time* diakui sebagai metode pilihan untuk diagnosis dan pemantauan infeksi HCV, karena kuantifikasi berlangsung selama fase eksponensial dari reaksi amplifikasi, dan reaksi terjadi dalam sistim tertutup sehingga mencegah kontaminasi *carry-over* dan meningkatkan spesifisitas. Prinsip RT-PCR adalah untuk mendeteksi sintesis ampikon selama reaksi PCR dan menghindari hasil positif palsu karena kontaminasi (Chevaliez and Pawlotsky, 2012).

Real-time PCR adalah proses amplifikasi menggunakan metode PCR, produk PCR dapat dianalisa selama proses amplifikasi dan analisa terjadi bersamaan selama proses reaksi, menggunakan pewarnaan DNA dan *probe* fluoresensi. DNA dapat dikoleksi dari tabung yang sama di dalam instrumen yang sama tanpa ada transfer sampel, penambahan reagensia atau gel separasi (Roche, 2004; Lo and Chan, 2006).

Metode ini diawali dengan penambahan etidium bromide (EtBr) ke dalam PCR regular, karena EtBr menginterkalasi terhadap DNA untai ganda dan fluoresens, hal ini dapat digunakan untuk monitor akumulasi produk PCR selama *real-time*. Keuntungan metode ini adalah kemampuan menentukan jumlah templat awal secara akurat. Pengukuran kuantitatif ini dilakukan dengan nyaman dan cepat tanpa

penambahan templat kompetitor atau kontrol internal multipel. Sejumlah parameter bermakna seperti jumlah kopi gen, *viral load*, *tumor load*, efek pengobatan diukur dengan mudah dengan metode ini (Buckingham and Flaws, 2007).

III. Polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction adalah suatu teknik amplifikasi DNA secara *in vitro*, teknik ini membutuhkan templat untai ganda yang mengandung DNA target yang akan diamplifikasi, enzim DNA polimerase, nukleosida trifosfat, dan sepasang primer oligonukleotida. Proses PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing mempunyai tiga tahap berurutan, yaitu denaturasi templat, *annealing* pasangan primer pada untai ganda DNA target dan polimerisasi. Denaturasi DNA templat pada temperatur antara 90-95 C untuk memisahkan kedua untai DNA genom secara sempurna, sehingga kedua primer dapat menempel setelah penurunan temperatur. Pada tahap kedua temperatur diturunkan antara 37-60 C sehingga kedua primer menempel pada untai DNA target. Setelah primer menempel pada DNA target, DNA polimerase akan mengkatalisis penambahan nukleotida pada suhu 72 C yang merupakan temperatur optimum enzim Taq DNA polimerase (Killeen, 2004; Lo and Chan, 2006).

Proses sintesis molekul RNA menggunakan DNA sebagai templat disebut transkripsi, sintesis ini di katalisis oleh enzim RNA polimerase. Proses yang merupakan kebalikan proses transkripsi yang mampu mensintesis molekul DNA untai tunggal menggunakan RNA sebagai templat disebut *reverse* transkripsi dan dikatalisis oleh enzim *reverse transcriptase*. Molekul DNA untai tunggal tersebut dapat dibuat menjadi untai ganda dengan bantuan enzim DNA polimerase (Retnoningrum, 1997; Haddad and Baldwin, 2010).

3.1 Komponen PCR

a. Primer

Primer adalah komponen kritikal PCR, karena primer menentukan spesifisitas PCR. Primer di desain mengandung sekuen homolog terhadap *regio* yang akan di analisis. Primer merupakan oligonukleotida pendek rantai tunggal yang mempunyai

urutan komplemen dengan DNA templat yang akan diperbanyak. Primer pada umumnya berukuran antara 20 – 30 basa. Pemilihan urutan primer sangat menentukan keberhasilan PCR, beberapa pertimbangan dalam pemilihan primer antara lain panjang oligonukleotida, temperatur *melting*, komposisi nukleotida, sekuens primer hanya hadir satu kali pada templat DNA, dan tidak membentuk struktur sekunder dengan primer pasangannya (Buckingham and Flaws, 2007; Li and Brownley, 2010).

b. DNA Templat

Templat adalah DNA untai ganda atau tunggal. Pada sampel klinik, templat berasal dari genom pasien, DNA mitokondria, virus, bakteri, jamur atau parasit yang menginfeksi pasien yang menjadi target amplifikasi. Sejumlah 100 ng – 1 ug DNA genom cukup untuk amplifikasi. Ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (bp). Hasil amplifikasi yang efisien adalah antara 100-400 bp. Kemurnian DNA target sangat penting, karena dapat mempengaruhi reaksi amplifikasi dan dapat menghambat kerja enzim DNA polimerase (Buckingham and Flaws, Fatchiyah, 2011).

c. Deoksiribonukleotida Trifosfat

Nukleotida terdiri atas tiga komponen, yaitu molekul gula (deoksiribosa), basa dan gugus fosfat. Tulang punggung molekul DNA terdiri atas gugus fosfat dan gula yang letaknya bergantian, dan terdapat satu basa yang melekat pada molekul gula. Untaian ganda DNA terdiri atas 2 untai gula fosfat dan pasangan basa yang terletak diantara kedua untai. Urutan basa pada untai DNA tidak identik, melainkan komplemen yaitu basa purin berpasangan dengan basa pirimidin, sitosin dengan guanin, timin dengan adenin (Retnoningrum, 1997; Chandar and Vizeli, 2010).

d. DNA Polimerase

Ketika Kary Mullis pertama kali melakukan PCR, ia menggunakan DNA polimerase yang diisolasi dari *E. coli*. Setiap kali sampel didenaturasi, temperatur yang tinggi merusak enzim ini, akibatnya setiap kali proses denaturasi selalu ditambahkan DNA polimerase *E. coli* (Buckingham and Flaws, 2007).

Enzim Taq DNA polimerase adalah enzim yang stabil sampai temperature 95 C, sehingga tidak rusak pada tahap denaturasi. Enzim ini berasal dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Biasanya untuk setiap 100 ul volume reaksi ditambahkan 2,0-2,5 unit Taq polimerase, walaupun penggunaan 1 unit enzim Taq DNA polimerase sudah optimum untuk melakukan PCR dengan jumlah siklus reaksi 20-25 kali. Untuk siklus yang lebih banyak sebaiknya digunakan unit yang lebih besar (Lo and Chan, 2006; Fatchiyah, 2011).

e. Bufer

Bufer standar untuk PCR tersusun atas 50 mM , 10 mM Tris-Cl (pH 8,3) dan 1,5 mM MgCl₂. Bufer standar ini akan bekerja dengan baik untuk cetakan DNA dan primer dengan kondisi tertentu. Konsentrasi ion Mg dalam bufer PCR merupakan faktor yang sangat kritikal, karena dapat mempengaruhi proses *annealing* primer, suhu disosiasi untai cetakan DNA, dan produk PCR. Ion Mg yang bebas bila terlalu rendah, biasanya tidak menghasilkan produk akhir PCR, bila terlalu banyak akan menghasilkan produk PCR yang tidak diinginkan (Fatchiyah, 2011).

Komponen lain yang perlu ditambahkan adalah gelatin atau BSA (bovine serum albumin) sebanyak 0,1% dan non-ionik deterjen Tween 20 sebanyak 0,05-0,1 % untuk mempertahankan kestabilan enzim Taq DNA polimerase. Konsentrasi Mg yang sangat tinggi akan menyebabkan produk PCR yang non spesifik, kadar Mg yang sedikit akan menyebabkan produk PCR yang rendah (Yuwono, 2006; Buckingham and Flews, 2007).

f. Thermal Cycler

PCR pertama kali dilakukan menggunakan beberapa *water bath* yang membutuhkan temperatur untuk masing-masing langkah. Tabung dipindahkan dari satu temperatur ke temperatur yang lainnya dengan tangan. Sebelum ditemukan enzim termostabil, pada setiap tahap setelah denaturasi perlu ditambahkan enzim yang baru. Cara ini mengonsumsi banyak waktu, banyak kesalahan dan risiko kontaminasi (Lo and Chan, 2006; Buckingham and Flaws, 2007).

Automatisasi PCR dikembangkan oleh Perkin Elmer sebagai pemegang paten asli. Pada saat ini telah diproduksi berbagai macam tipe alat PCR dari berbagai perusahaan. Alat ini secara tepat meregulasi suhu dan siklus waktu yang dibutuhkan untuk reproduksibilitas dan keakuratan reaksi amplifikasi (Fatchiyah, 2011).

3.2 Pemeriksaan VHC dengan PCR

Materials and methods

Serum samples were obtained from 50 blood donors and clinical laboratory for anti-HCV positive using third-generation HCV enzyme immunoassay in West Sumatera, between June until December 2013. Blood samples were collected from each patient then separate into sera and stored at -80° C until use for viral RNA extraction.

Viral RNA extraction and RT-PCR

Serum samples that had been stored at -80° C were retrieved for analysis. HCV RNA was extracted from 140 ul serum or plasma using QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Inc) according to the manufacturer's protocol and stored at -80° C until further analysis.

RT-PCR was performed using one-step RT-PCR kit (Invitrogen, Inc) . The NS5B region was amplified by PCR with forward primers NS5B-1 : 5'-TATGAYACCCGYTGCTTTGAC-3' and reverse primers NS5B-2 : 5'-GAGGAGCAAGATGTTATCAGCTC-3'¹⁰. DNA amplification was performed for 40 cycles each consisting of 94° C for 15 s, 55° C for 30 s, and 72° C for 60 s in a thermal cycler (Biorad, Inc). The last cycle was followed by a 5-min extension step at 72 C. One microliter of amplicons was used for second-round PCR using Go Taq Green (Promega). The following cycling parameters were used for 35 cycles.

DNA purification and sequencing

Amplicons were purified by using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc) and analyzed by ethidium bromide agarose gel electrophoresis. Samples showing

a band of the appropriate size (449 bp), were further analyzed by DNA sequencing in Macrogen, Korea Republic.

HCV genotyping was based on NS5B, the reference sequences were retrieved from the DNA Data Bank. The sequences were aligned using Geneous software.

Daftar Pustaka

- Ansaldi F, Bruzzone B, Testino G, Basetti M, Gasparini R and Crovari P. 2006. Combination hepatitis C virus antigen and antibody immunoassay as a new tool for early diagnosis of infection. *J of Viral Hepatitis*. 13;5-10.
- Argentini C, Genovese D, Dettori S and Rapicetta M. 2009. HCV genetic variability : from quasispecies evolution to genotype classification. *Future Microbiol*. 4(3):359-373.
- Bes M, Esteban JI, Casamitjana N, Piron M, Quer J, Cubero, M et al. 2009. Hepatitis C virus-specific T-cell responses among recombinant immunoblot assay-3-indeterminate blood donors: a confirmatory evidence of HCV exposure. *Transfusion*; 49 : 1296-1305.
- Bossler AD and Caliendo AM. 2010. Molecular methods in diagnosis and monitoring of infectious disease. 1309-1337.
- Brant LJ, Hurrelle, M, Balogun, MA, Klapper P and Ramsey ME. 2008. Where are people being tested for anti-HCV in England ? Results from sentinel laboratory surveillance. *J Viral Hepatitis*. 15 : 729-739.
- Buckingham L and Flaws ML. 2007. Molecular diagnostics. Fundamentals, Methods, & Clinical applications. FA. Davis company. Philadelphia.
- Cantaloube JF, Gallian P, Attoui H, Biagini P, Micco PD, and de Lamballerie X. 2005. Genotype distribution and Molecular epidemiology of hepatitis C virus in blood donors from southeast France. *J of Clin Microbiol*. 3624-3629.
- Chandar N and Viselli S. 2010. Cell and Molecular Biology. Lippincott Williams & Wilkins. Tokyo.
- Chevaliez S and Pawlotsky JM. 2012. Virology of hepatitis C virus infection. *Best Practice & Research Clin Gastroenterol*. 26:381-389.
- Craxi A, Pawlotsky JM, Wedemeyer H, Bjoro K, Flisiak R, Forn X et al. 2011. EASL Clinical Practice Guidelines; Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatol*; 55:245-264.

- Ebeid ME and El-Bakry KA. 2009. Cellular immune response to infection by different genotypes of hepatitis C virus. *Indian J of clin Biochem*; 24 (3); 234-240.
- Fabris P, Fleming VM, Giordani MT and Barnes E. 2008. Acute hepatitis C : Clinical aspects, diagnosis, and outcome of acute HCV infection. *Current Pharm.Des.* 14: 1661-1665.
- Fatchiyah. 2011. Amplifikasi DNA dalam : Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Flaws ML and Buckingham L. 2007. Detection and identification of microorganisms. In : *Molecular diagnostics. Fundamentals, Methods, & Clinical applications.* FA. Davis company. Philadelphia.
- Haddad F and Baldwin KM. 2010. Reverse transcription of the ribonucleic acid : The first step in RT-PCR assay. *Springer Protocols.* Humana Press. New York.
- Irshad M, Khushboo I, Sing S, and Sing S. 2008. Hepatitis C virus : A review of immunology aspect. *Int Rev Immunol.* 27 : 497-517.
- Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, and Hayden TM. 2012. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clin Inf Dis* 5(1):43-48.
- Killeen AA. 2004. Molecular diagnoses of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus, in : *Principles of Molecular Pathology.* Humana Press. New Jersey. P 309-325.
- Lauer GM and Walker BD. 2001. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* Vol 345;1:41-52.
- Li K and Brownley A. 2010. Primer Design for RT-PCR. Nicola King (ed), *RT-PCR Protocols:Second Edition, Methods in Molecular Biology,* vol 630:271-299.
- Lo YMD and Chan KCA. 2006. Introduction to the Polymerase Chain Reaction. From: *Method in Molecular Biology,* vol 336: *Clinical Applications of PCR.* Humana Press Inc.
- Maasoumy B and Wedemeyer H. 2009. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clin Gastroenterol.* 26:401-412.
- Maudar KK, Gandhi P, Mishra PK, Varshney S, Punde R, Bhargav A. 2012. Novel approach for quantitation of hepatitis C virus in liver cirrhosis using real-time reverse transcriptase PCR. *J Gastrointest Surg.* 16:142-147.

- Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R and Sabbah S. 2007. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol*; 45(4): 1102-12.
- Retnoningrum DS. 1997. Kumpulan makalah kursus PCR. UBI Teknologi Farmasi. Bandung.
- Ross RS, Viazov S, Salloum S, Hilgard P, Gerken G and Roggendorf M. 2010. Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification. *J Clin Microbiol*. 48(4): 1161-68.
- Rustgi VK. 2007. The epidemiology of hepatitis C infection in United States. *J Gastroenterol*. 42 : 513- 521.
- Schaefer EA and Chung RT. 2012. Anti hepatitis C virus drug in development. *Gastroenterology*; 142(6): 1340-1350.
- Shemis MA, El-abd DM, Ramadan DI, El-Sayed MI, Guirgis BS, Saber MA, et al. 2012. Evaluation of multiplex nested polymerase chain reaction for routine hepatitis C virus genotyping in Egyptian patients. *Hepat Mon*; 12(4): 265-270.
- Sistayanarain A, Kunthalert D and Vipsoongnern Y. 2011. A shift in hepatitis C virus genotype dominance in blood donor samples from Thailand. *Mol Biol Rep*. 38:4287-4290.
- Utama A, Tania NP, Dhenni R, Gani RA, Hasan I, Sanityoso A., et al. 2010. Genotype diversity of hepatitis C virus in HCV-associated liver disease patients in Indonesia. *Liver Int* ; 1152-1159.
- Vasiljevic N, Veljkovic N, Kosec T, Ma XZ, Glisic S, Prljic J, et al. 2011. A bioinformatics approach to identify natural autoantibodies from healthy blood donors sera reactive with the HCV NS5A-derived peptide by immunoassay. *Viral Immunol*. 24(2): 69-76.
- Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, and Schade RR. 2010. Hepatitis C : Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 81 (11) : 1351-56.
- Yuwono T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Penerbit Andi Yogyakarta.