



Deteksi Virus Hepatitis A di Lingkungan

Subangkit¹, Ersa Malika Mulki², Mursinah¹

¹ Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar kesehatan

² UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

*E-mail : mursinah_my@yahoo.com

Info Artikel

Kata kunci:

Environment sample, HAV, RT PCR

Abstrak

Introduction. Hepatitis A virus (HAV) is a significant waterborne human pathogen. More than 140 viruses are known to be excreted in faeces by infected persons including HAV. Detection of virus is very important for management. The objective of study is to identify concentration methods for virus isolation from environment sample and type of PCR to detect HAV. **Method:** Literature review was conducted using electronic database: google scholar with key words Detection of Hepatitis A in an environment, its journal published in 2000 – 2019. Only article in English included in study. **Results:** Environmental samples can be processed to detect HAV. Virus can be detected after water samples had been concentrated. The concentrate then tested with PCR (Qualitative, quantitative real-time RT-PCR or Nested PCR) to detect the presence of HAV in environmental samples. The real-time RT-PCR technique is more efficient, faster, no need for post-PCR confirmation of amplified product, no correlation between viral contamination and bacterial indicators. The detection rate for nested RT-PCR was lower than quantitative real-time RT-PCR because of low viral loads and the presence of inhibitors that can affect nested RT-PCR. Real-time PCR was more sensitive than nested RT-PCR and it could enumerate HAV RNA.

How to Cite: Subangkit, Mulki, E. M., & Mursinah. (2020). Deteksi Virus Hepatitis A (HAV) di Lingkungan. *Prosiding Seminar Nasional Sains 2020*, 1(1): 152-157.

PENDAHULUAN

Virus hepatitis A (HAV) merupakan virus RNA tidak berselubung, berukuran 27-32 nm diameter dan masuk dalam *Hepatovirus*, family *Picornaviridae*. Virus ini lama tumbuh pada kultur sel dan jarang mengakibatkan kerusakan sel pada kultur sel. (Hollinger & Emerson., 2001). Virus ini stabil pada lingkungan setidaknya selama 1 bulan. (McCaustland, Bond, Bradley, Ebert, & Maynard, 1982) dan lebih tahan pada pemanasan dan inaktivasi klorin dibandingkan polio. Inaktivasi HAV memerlukan pemanasan makanan >85°C selama 1 menit dan disinfeksi permukaan memerlukan kontak setidaknya 1 menit dengan Natrium hipoklorit 1:100 (misalnya pemutih) dimana polio diinaktivasi pada 72°C selama 15 detik dengan pemutih dilusi 1:125 selama 30 detik. (Strazynski & Becker, 2002; Weber, Barbee, & Sobsey, 1999).

Lebih dari 140 tipe virus enterik ditemukan pada air limbah. HAV merupakan salah satu virus enteric yang dapat ditransmisikan secara fecal oral routes melalui kontak orang ke orang secara erat atau menelan makanan atau air yang terkontaminasi. Makanan atau air yang terkontaminasi dihubungkan dengan kejadian luar biasa. (Fiore, 2004). HAV dapat mudah menontaminasi lingkungan karena partikel virus yang diekskresi orang terinfeksi baik bergejala atau tidak, dan dapat mencemari air yang ada di lingkungan seperti sungai, danau atau sumber air lain. (Rosa, Pourshaban, Iaconelli, & Muscillo, 2010).

Jumlah virus enteric pada air permukaan atau lautan sering sangat rendah untuk terdeteksi pada sampel yang tidak terkonsentrasi. Sehingga jumlah air yang banyak harus diproses. (Lipp, Lukasik, & Rose, 2001). Kehadiran enterovirus di lingkungan adalah bahaya kesehatan masyarakat bahkan ketika sangat sedikit partikel virus yang hadir. Deteksi virus dari lingkungan perlu dilakukan untuk dapat melakukan tindakan pencegahan di masyarakat secara cepat dan tepat. Pengambilan

sampel di lingkungan harus dilakukan dengan jenis sampel yang tepat, cara konsentrasi yang tepat dan cara pemeriksaan. Sampel yang mengandung virus perlu diproses terlebih dahulu agar dapat dilakukan pemeriksaan secara baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi metode konsentrasi untuk isolasi virus dari sampel lingkungan dan jenis pemeriksaan molekular untuk mendeteksi HAV.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi literature dengan menggunakan database elektronik melalui google dan google scholar dengan menggunakan kata kunci: deteksi hepatitis A pada lingkungan. Kriteria inklusi pada studi yaitu jurnal yang dipublikasi pada tahun 2000-2019 dan berbahasa Inggris. Kriteria eksklusi adalah jurnal yang tidak menampilkan metode konsentrasi sampel lingkungan secara detil dan hanya menyitasi studi sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 24 jurnal tentang hepatitis A pada lingkungan terkumpul dalam studi ini. Dua jurnal dieksklusi sehingga jurnal yang direview berjumlah 20.

Sampel lingkungan yang diambil untuk diperiksa bisa berasal dari kanal, air kemasan komersil, air limbah lingkungan (belum diproses atau sudah diproses, air pantai) maupun rawa. Sampel lingkungan untuk dapat dideteksi HAV harus dilakukan proses terlebih dahulu dengan metode konsentrasi tertentu.

a. Prinsip proses konsentrasi (Lipp et al., 2001)

Di perairan laut dan permukaan lainnya, jumlah virus enterik sering terlalu rendah untuk dideteksi dalam sampel yang tidak terkonsentrasi. Karena itu air harus dipadatkan dengan adsorpsi / filtrasi dan elusi (desorpsi) sebelum analisis. Partikel virus berukuran kecil, sehingga interaksi muatan dioptimalkan untuk mempertahankan enterovirus pada filter elektrostatis, bukan penangkapan mekanis.

Saat ini, tersedia filter bermuatan negatif dan bermuatan positif yang masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan tertentu. Kebanyakan virus enterik bermuatan negatif yang dapat mengadsorpsi langsung ke filter bermuatan positif (mis. 1MDS Virosorb; CUNO, Meriden, CN). Namun, filter-filter ini relatif mudah menyumbat, tidak efektif ketika pH di atas 8,0, dan memiliki tingkat pemulihan yang buruk untuk virus di perairan laut. Filter bermuatan negatif memiliki kapasitas lebih besar untuk adsorpsi virus di perairan laut dan perairan dengan kekeruhan tinggi, bahan organik dan pH. Namun, membutuhkan pra-pengondisian air untuk memfasilitasi adsorpsi virus. Tipe filter electronegatif yang digunakan adalah filter Filterite (Filterite Corp., Timonium, MD

b. Metode Konsentrasi

b.1. Konsentrasi sampel sungai dan air laut dengan filtrasi aliran tangensial PrepScale (Rosa et al., 2007)

Sampel sebanyak 10 liter dikumpulkan menggunakan tangki lalu diproses dalam 1 hari. Proses konsentrasi dilakukan dengan filtrasi menggunakan cartridge polysulfone, (type PTHK) berukuran 0.23 m² dilengkapi pompa peristaltic, adapters (Millipore Corporation, Bedford, MA). Proses dilakukan untuk mendapatkan elusi 100 ml .

b.2. Metode konsentrasi dengan filtrasi menggunakan membran bermuatan negatif. (Katayama, Shimasaki, & Ohgaki, 2002)

Dua liter sampel dikumpulkan untuk mendeteksi HAV. Sampel difiltrasi dengan membran bermuatan negatif (Millipore, Burlington, MA USA). Hasil filtrasi dibilas dan dielusi kemudian dipadatkan menggunakan Centriprep Y - 50 Concentrator (Millipore) untuk mendapatkan volume akhir 2 ml.

Metode Katayama digunakan sebagai metode melakukan konsentrasi pada beberapa penelitian dan mendapatkan efisiensi recovery virus Human adenoviruses (HAdV) dan HAV dari berbagai jenis sumber air. Efisiensi recovery terbaik didapatkan dari effluent air suling (*distilled*

water) dan pengolahan air limbah (100%) dan pada lagoon rekreasi untuk HAV (100%).(Rigotto, Kolesnikovas, Moresco, Simões, & Barardi, 2009; Livia Melo Villar, de Paula, Diniz-Mendes, Lampe, & Gaspar, 2006)

b.3. Metode ultracentrifugasi (Pina-Pedrero, Jofre, Emerson, Purcell, & Gironés, 1998; Prado, Gaspar, & Miagostovich, 2014)

Empat puluh ml sampel limbah diultracentrifugasi (229,600 x g selama 1 jam pada 4°C) untuk mendapatkan pellet dari semua partikel virus bersama dengan materi yang tersuspensi. Sedimen diresuspensi dengan penambahan buffer, pH 9.5, pada es selama 30 min, suspense solid dibuang dengan sentrifugasi (12,000 3 g selama 15 menit. Virus pada supernatant dipeletkan dengan ultrasentrifugasi (229,600 3 g selama 1 jam pada 4°C), . Teknik konsentrasi ini cukup rendah untuk mendapatkan kuman enterik termasuk HAV.(Prado et al., 2014)

b.4. Metode adsorpsi-elusi menggunakan filter atau membran dilanjutkan dengan speedVac reconcentration (Kittigul et al. 2005).

Satu liter sampel dijadikan pH 3,5 dengan 1 N HCl dan *aluminum chloride* kemudian dikocok lembut pada suhu ruang setidaknya 30 menit lalu digunakan membran filter bermuatan negatif berdiameter 47 mm diameter , kemudian dicuci dan ditambahkan elusi dengan 2,9% tryptose phosphate broth pH 9,0. Elusi diatur agar menjadi pH 7-7,4. Lalu sampel direkonsentrasi dengan *speedVac centrifugation* (Savant Instruments, Farmingdale, NY) selama 5 jam sehingga mendapatkan 1-5 ml sampel. (Kittigul et al., 2000).(Kittigul, Uthaisin, Ekchaloemkiet, Utrarachkij, & Luksamijarukul, 2006).

c. Ekstraksi asam nukleat

Berbagai protocol ekstraksi dapat digunakan. Saat ini berbagai metode menggunakan kit komersil tersedia untuk purifikasi asam nukleat sehingga realibilitas, reproducibility dan mudah digunakan. Kebanyakan kit berdasarkan pada lisis guanidinium dan penangkapan asam nukleat pada *column* atau *bead silica*, disebut metode Boom.(Boom et al., 1990)

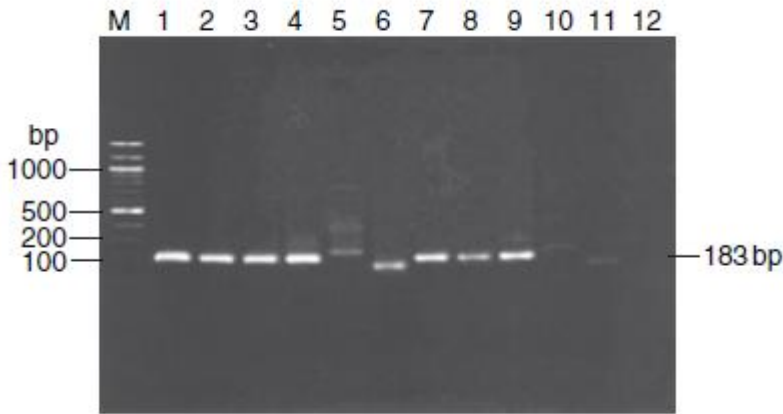
d. Deteksi Virus

Deteksi virus yaitu dengan menumbuhkan pada sel kultur atau deteksi genom virus dengan teknik amplifikasi molecular dengan PCR. PCR khususnya real time PCR digunakan secara luas karena cepat, sensitif, *reproducibility*, dan minimilisasi kontaminasi. (Bosch et al., 2011).

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) melibatkan tahap RNA virus ditranskripsi terbalik mejadi untai complementary DNA (cDNA) sebelum PCR dan sukses memonitor air untuk kontaminasi RNA virus enterik. (Pusch et al., 2005). Kelemahan pemeriksaan molecular yaitu kemungkinan hasil negatif palsu karena adanya inhibitor, konsentrasi virus yang rendah dan prosedur ekstraksi.(Bosch et al., 2011) .

d.1. Uji PCR kualitatif

Pada nested PCR, amplikon bisa didapatkan antara lain dari wilayah VP3-VP1 *junction* pada kapsid dengan primer HAV-2389 (5'-GGA AAT GTC TCA GGT ACT TTC TTT G-3') dan HAV-2232 (5'TCA ACA ACA GTT TCT ACA GA 3'). Metode RT-nested PCR (Kittigul et al., 2000) menggunakan positif kontrol HAV strain HM 175. Produk nested PCR fragmen 183 basepair didapatkan pada gel. (Abdullah, 2012; Kittigul et al., 2006). Bergantung pada primer yang digunakan, produk nested yang dihasilkan juga bisa berbeda, misalnya pada studi di Tunisia mendapatkan fragmen 222-bp untuk VP3/VP1 *junction*(Ouardani, Turki, Aouni, & Romalde, 2016; Livia Melo Villar et al., 2006).

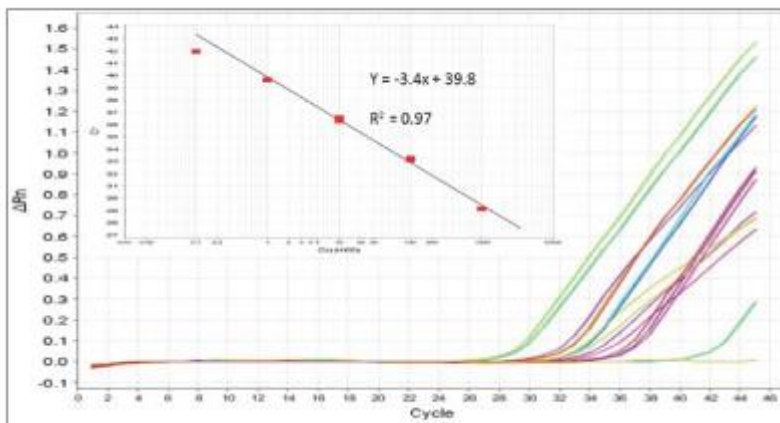


Gambar 1. Deteksi HAV pada sampel air dengan RT-nested PCR.(Kittigul et al., 2000)
 Keterangan: M, DNA marker; 1,HAV kontrol positif; 2–4 dan 5, 6, produk RT PCR dengan dilusi 1:5 sebelum amplifikasi nested PCR HAV positif dan HAV negatif, berurutan 7–9 dan 10, 11, produk RT-PCR sampel dengan dilusi 1 : 100 dengan hasil HAV positif dan HAV negatif; 12, nested PCR negatif kontrol. Produk nested PCR HAV sebesar 183 panjang basa/basepairs..

d.2. Uji PCR kuantitatif

Uji real-time RT–PCR menggunakan probe dan primer tertentu. Prinsip pemeriksaannya hampir sama dengan PCR kualitatif. Hasil pemeriksaan ditunjukkan dengan curva standar. Spesifisitas, jangkauan deteksi virus dan sensitifitas real-time RT-PCR assays sangat bergantung pada urutan target dari primer dan probe.

Real-time RT-PCR membuat deteksi qualitative dan quantitative sehingga memungkinkan melakukan analisis kajian risiko bahaya untuk beberapa aksi kesehatan masyarakat.(Bosch et al., 2011). Qualitative real-time PCR menghasilkan positif atau negatif dan sangat cocok untuk memeriksa material yang tidak mungkin terkontaminasi virus. Quantitative real-time PCR diperlukan untuk sampel misalnya kerang yang mungkin mengandung virus dan derajat kontaminasi perlu diperjelas.



Gambar 2. Contoh kurva standard dan amplifikasi HAV.(Sibanda & Okoh, 2013)

e. Perbandingan hasil deteksi HAV pada sampel air lingkungan menggunakan PCR kualitatif dan PCR kuantitatif

Studi di Tunisia mendapatkan dengan teknik nested RT PCR, genom HAV terdeteksi 53, 9% (46/27) air limbah. Rerata HAV lebih tinggi di air limbah yang belum diolah 66, 9% dibanding yang sudah diolah (40.7%).(Ouardani et al., 2016). Studi lain di Thailand dengan nested PCR mendapatkan (6/40 sampel positif dari rawa, 15%) dan dari saluran l(3/30 sampel, 10%). Hasil negatif didapatkan dari kontainer untuk air minum dan penggunaan rumah tangga.(Kittigul et al., 2000) . Studi di Brasil, dengan nested RT-PCR, HAV RNA terdeteksi pada 16 / 50 (32%) sampel

limbah dan delapan (16%) nya ditemukan di limbah yang diolah. Dengan realtime PCR, HAV RNA terdeteksi pada 46/50 (92%) sampel dan 24nya pada yang sudah diolah (L.M. Villar et al., 2007).

Keuntungan penggunaan uji real time PCR yaitu dapat dikalkulasikan konsentrasi virus berdasarkan jenis sampel, misalnya konsentrasi HAV di limbah yang belum diolah atau sudah diolah. (Ouardani et al., 2016; L.M. Villar et al., 2007). Uji PCR kualitatif lebih sensitive terhadap inhibitor dibanding kuantitatif PCR. (Livia Melo Villar et al., 2006). Studi di Brasil mendapatkan pemeriksaan PCR secara kuantitatif. HAV terdeteksi pada empat tipe sampel (air yang ada di taman nasional, air pantai, air keran dan salah satu minuman kemasan komersil) yang diuji dengan metode konsentrasi yang berbeda. Metode konsentrasi sedikit berpengaruh pada deteksi HAV sedangkan dengan PCR kualitatif metode konsentrasi berperan terhadap hasil karena HAV RNA tidak terdeteksi dengan sampel air dari pantai. (Livia Melo Villar et al., 2006). RT-PCR sangat sensitif untuk deteksi HAV dalam sampel air. Konsentrasi virus yang rendah di air sangat memungkinkan perbaikan metode konsentrasi asi untuk isolasi HAV dari sampel air. tidak ada metode tunggal yang dianggap superior karena selalu mempertimbangkan efisiensi, robustness, kekonstanan performans, biaya dan kompleksitas. Karakteristik kinerja harus terus dimonitor. (Bosch et al., 2011)

Keterbatasan uji molekuler kuantitatif yaitu tidak dapat membedakan virion yang aktif dan tidak aktif, jadi adanya partikel virus tidak selalu mengindikasikan ancaman sesungguhnya untuk manusia. (Rosa et al., 2010).

PENUTUP

Uji RT-PCR kualitatif dan kuantitatif dapat digunakan untuk mendeteksi HAV dalam sampel lingkungan, lebih efisien, lebih cepat, tidak perlu konfirmasi pasca-PCR untuk memperkuat produk. Sampel lingkungan dapat diproses untuk mendeteksi HAV. Uji PCR real-time lebih sensitif daripada nested RT-PCR, dapat menghitung RNA HAV dan sedikit terpengaruh oleh metode konsentrasi sampel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim virologi laboratorium Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan masukan dan saran terkait penulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. (2012). Molecular Detection of Hepatitis A Virus in Wastewater in Jeddah Province, Kingdom of Saudi Arabia. *apply science research*, 8, 1-9.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M., Jansen, C., Dillen, P. M. E., & Noordaa, J. J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *Journal of clinical microbiology*, 28, 495-503. doi: 10.1128/JCM.28.3.495-503.1990
- Bosch, A., Sanchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., Le Guyader, S., . . . Sellwood, J. (2011). Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. *Food Analytical Methods*, 4, 4-12. doi: 10.1007/s12161-010-9161-5
- Fiore, A. E. (2004). Hepatitis A Transmitted by Food *Clinical Infectious Diseases*, 38, 705–715.
- Hollinger, F. B., & Emerson, S. U. (2001). Hepatitis A virus. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields virology*, (Vol. 4). New York, N.Y.: Lippincott Williams & Wilkins, .
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Applied and environmental microbiology*, 68, 1033-1039. doi: 10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002
- Kittigul, L., Raengsakulrach, B., Siritantikorn, S., Kanyok, R., Utrarachkij, F., Diraphat, P., . . . Vathanophas, K. (2000). Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and water samples. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 31, 41-46.

- Kittigul, L., Uthaisin, A., Ekchaloemkiet, S., Utrarachkij, F., & Luksamijarulkul, P. (2006). Detection and characterization of hepatitis A virus in water samples in Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(6), 1318-1323. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02876.x
- Lipp, E. K., Lukasik, J., & Rose, J. B. (2001). Human Enteric Viruses and Parasites in the Marine Environment *Methods in Microbiology* (Vol. 30, pp. 559-588).
- McCausland, K. A., Bond, W. W., Bradley, D. W., Ebert, J. W., & Maynard, J. E. (1982). Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *Journal of clinical microbiology*, *16*(5), 957-958.
- Ouardani, I., Turki, S., Aouni, M., & Romalde, J. L. (2016). Detection and Molecular Characterization of Hepatitis A Virus from Tunisian Wastewater Treatment Plants with Different Secondary Treatments. *Applied and environmental microbiology*, *82*(13), 3834-3845. doi: 10.1128/AEM.00619-16
- Pina-Pedrero, S., Jofre, J., Emerson, S., Purcell, R., & Gironés, R. (1998). Characterization of a Strain of Infectious Hepatitis E Virus Isolated from Sewage in an Area where Hepatitis E Is Not Endemic. *Applied and environmental microbiology*, *64*. doi: 10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998
- Prado, T., Gaspar, A. M. C., & Miagostovich, M. P. (2014). Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*, 343-349.
- Pusch, D., Oh, D. Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., . . . Schreier, E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, *150*(5), 929-947. doi: 10.1007/s00705-004-0467-8
- Rigotto, C., Kolesnikovas, C., Moresco, V., Simões, C., & Barardi, C. (2009). Evaluation of HA negatively charged membranes in the recovery of human adenoviruses and hepatitis A virus in different water matrices. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*, 970-974.
- Rosa, G., Fontana, S., Grazia, A., Iaconelli, M., Pourshaban, M., & Muscillo, M. (2007). Molecular Identification and Genetic Analysis of Norovirus Genogroups I and II in Water Environments: Comparative Analysis of Different Reverse Transcription-PCR Assays. *Applied and environmental microbiology*, *73*, 4152-4161. doi: 10.1128/AEM.00222-07
- Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2010). Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, *46*, 266-273. doi: 10.4415/ANN_10_03_07
- Sibanda, T., & Okoh, A. I. (2013). Real-time PCR quantitative assessment of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Tyume River located in the Eastern Cape Province, South Africa. *Water SA*, *39*, 295-304.
- Strazynski, M., & Becker, B. (2002). Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.*, *74*, 73-78.
- Villar, L. M., De Paula, V. S., Diniz-Mendes, L., Guimarães, F. R., Ferreira, F. F. M., Shubo, T. C., . . . Gaspar, A. M. C. (2007). Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(2), 168-173. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02164.x
- Villar, L. M., de Paula, V. S., Diniz-Mendes, L., Lampe, E., & Gaspar, A. M. C. (2006). Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples. *Journal of Virological Methods*, *137*(2), 169-176. doi: https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.06.008
- Weber, D. J., Barbee, S. L., & Sobsey, M. D. (1999). The effect of blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. *Control Hosp. Epidemiol*, *20*, 821-827.