

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Teori

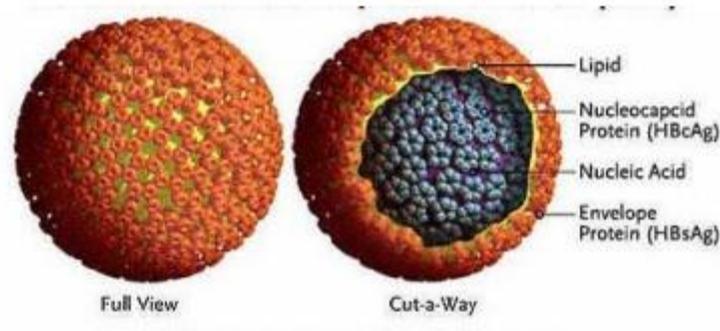
##### 1. DNA

DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) adalah materi genetik yang terdapat dalam tubuh makhluk hidup dan dapat diekstraksi dengan berbagai metode isolasi/ekstraksi DNA. Tujuan isolasi DNA adalah untuk mendapatkan DNA murni yang bebas protein dan komponen sampel lainnya (Lio *et al.*, 2021).

Isolasi DNA melibatkan beberapa langkah untuk memisahkan DNA dari komponen-komponen sel seperti lipid, protein, dan RNA. Prinsip kerja isolasi dan purifikasi DNA terdiri dari lima langkah, yaitu: pemecahan membran sel, penghilangan protein, penghilangan RNA, presipitasi DNA, pengukuran kemurnian dan kuantitas DNA. DNA sebagai pembawa informasi genetik dalam kehidupan, terletak di dalam inti sel dan tersusun teratur membentuk kromosom. Oleh karena itu, untuk memperoleh DNA diperlukan langkah-langkah khusus yang biasanya dilakukan di laboratorium khusus (Puspitaningrum *et al.*, 2018).

##### 2. HBV DNA

HBV DNA adalah pengukuran langsung dari *viral load* menggunakan Hepatitis B Virus DNA mencerminkan tingkat aktivitas replikasi virus. Deteksi DNA HBV sebagai indikator replikasi aktif dan konsentrasi tinggi HBV DNA terkait dengan progresi penyakit yang lebih cepat dan resiko lebih tinggi terhadap karsinoma hepatoseluler. Selain itu, uji DNA HBV bermanfaat dalam evaluasi klinis rutin untuk menentukan pasien yang memerlukan terapi antiviral dan untuk memantau respons terhadap pengobatan yang diberikan (Song & Kim, 2016).



Sumber: (Maharani & Noviar, 2018)

Gambar 2.1 Struktur virus Hepatitis B

Virus Hepatitis B (VHB) merupakan virus DNA terkecil yang berasal dari genus Orthohepadnavirus, famili Hepadnaviridae, dengan diameter 40-42 nm. Masa inkubasi bervariasi dari 15 hingga 180 dan rata-rata inkubasi adalah 60 hingga 90 hari. Virus ini memiliki protein envelope lipoprotein pada bagian luarnya, sedangkan bagian dalamnya berupa nukleokapsid atau inti. Genom virus hepatitis B berbentuk molekul DNA sirkular beruntai ganda yang terdiri dari 3200 nukleotida. Genomnya berbentuk lingkaran dan mengandung empat *Open Reading Frame* (ORF) yang saling tumpang tindih sebagian, termasuk protein envelope yang dikenal sebagai selubung HBsAg seperti *large* HBs (LHBs), *medium* HBs (MHBs), dan *small* HBs (SHBs), yang disebut gen S. Gen S merupakan target utama respon imun dari host, dengan lokasi utama pada asam amino 100-160 (Maharani & Noviar, 2018).

Penularan Hepatitis B Virus (HBV) disebabkan oleh kontak langsung dengan darah atau cairan organik yang terinfeksi. Jalur utama penyebarannya melibatkan aktivitas seksual, transmisi dari ibu yang terinfeksi kepada bayinya selama atau segera setelah kelahiran, serta secara parenteral seperti transfusi darah. Risiko penularan transfusi darah terus dikurangi dengan menerapkan langkah-langkah keamanan, termasuk pemilihan donor berdasarkan evaluasi perilaku risiko, serta

skrining serologis untuk HBsAg dan antibodi terhadap protein inti (anti-HBc) (Candotti & Laperche, 2018).

### 3. *Whole blood*

*Whole blood* (darah lengkap) merupakan salah satu bagian dari komponen darah yang umumnya dimanfaatkan untuk keperluan transfusi. Penggunaan *whole blood* biasanya untuk transfusi pada situasi perdarahan masif, seperti perdarahan akut, syok hipovolemik, dan operasi besar dengan volume perdarahan melebihi 1500 ml (Halim *et al.*, 2019).



Sumber: (Maharani & Noviar, 2018)

Gambar 2.2 *Whole blood*

Darah lengkap terdiri dari komponen seperti sel darah merah, leukosit, trombosit, dan plasma darah. Satu kantong *whole blood* berisi 350 ml darah dan 49 ml antikoagulan. *Whole blood* diberikan kepada pasien dengan perdarahan akut dan masif serta kehilangan darah lebih dari 25-30% dari total volume darah. Darah lengkap tidak dianjurkan untuk digunakan pada pasien dengan anemia kronis nonmonomerik atau pasien yang hanya membutuhkan sel darah merah. Proses penyimpanan darah harus memenuhi standar dengan antikoagulan CPDA-1 (*Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1*) pada suhu penyimpanan 2–6°C. Penggunaan CPDA dapat memperpanjang masa penyimpanan darah dalam kantong hingga 28-35 hari. Hal ini bertujuan untuk menjaga fungsi darah dalam mengangkut oksigen, memastikan dextrose tidak cepat habis, dan mengurangi pertumbuhan

bakteri. Ketika darah siap untuk ditransfusi, maka harus disimpan sesuai dengan golongan darah, jenis darah, dan tanggal kedaluwarsa, sesuai dengan prinsip first-in-first-out (First Expired First Out, FEFO) (Widyaswara *et al.*, 2023).

#### 4. Deteksi Asam Nukleat atau Materi Genetik

Metode ini digunakan untuk mendeteksi materi genetik atau asam nukleat virus. Salah satu metode yang paling umum untuk mendeteksi asam nukleat adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan sekuensing. Beberapa kelemahan dari metode ini mencakup proses persiapan sampel yang melibatkan beberapa tahapan, memerlukan staff yang terlatih, dan harus dilakukan setidaknya di laboratorium BSL-2. Namun cara ini mempunyai kelebihan seperti waktu pengerjaan yang relatif cepat sekitar 4-6 jam, sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, serta kemampuan mendeteksi virus sejak awal infeksi atau masa inkubasi.

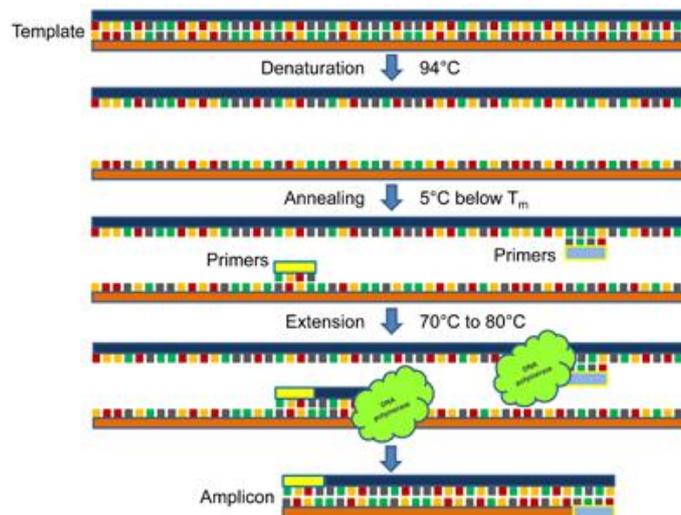
##### a. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah metode untuk menggandakan template DNA atau complementary DNA (cDNA) secara *in vitro* menggunakan enzim Taq Polymerase. Beberapa komponen yang umumnya diperlukan untuk metode dan proses PCR antara lain:

- 1) *Taq Polymerase* merupakan enzim DNA polymerase yang bersifat stabil pada rentang suhu yang berbeda. Berfungsi untuk membentuk untai DNA komplementer pada template DNA
- 2) MgCl<sub>2</sub> berfungsi sebagai penyedia ion yang diperlukan untuk reaksi enzimatik.
- 3) *dNTP's* (*deoxynucleotide triphosphates*) adalah bahan penyusun nukleotida untuk membentuk untai DNA baru yang mengandung *adenin, cytosine, guanine dan thymine*.
- 4) *Buffer* berfungsi menjaga pH optimal untuk kerja enzim

- 5) *Primers* merupakan komplemen yang spesifik terhadap DNA target, berupa oligonukleotida pendek. Primer bersifat spesifik terhadap DNA target dan terdiri dari dua jenis primer yaitu:
- Forward primer*: Menempel pada DNA anti-sense
  - Reverse primer* : Menempel pada DNA sense
- 6) *Template DNA* adalah DNA atau cDNA yang diamplifikasi.
- b. Proses PCR

Proses PCR bertujuan untuk mendapatkan DNA amplicon, yang melibatkan proses amplifikasi DNA yang terdiri dari beberapa siklus berulang, biasanya 30-40 siklus. Beberapa tahap dalam satu siklus PCR dapat dilihat pada gambar berikut:



Sumber: (Lorenz, 2012)

Gambar 2.3 Prinsip Pemeriksaan PCR

1) Denaturasi

Merupakan proses pemanasan untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal pada suhu berkisar 90° – 95°C selama 60 detik.

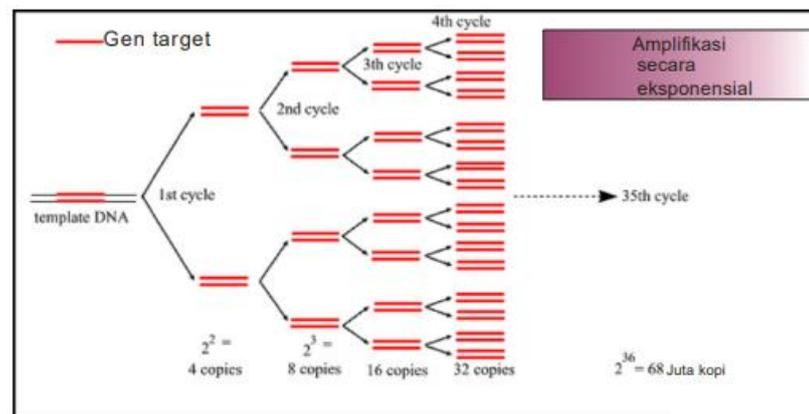
2) Annealing

Merupakan penempelan primer Reverse dan Forward pada satu untai DNA target, dengan suhu yang digunakan yaitu 50°-60°C dan waktu 30-45 detik

### 3) Elongasi

Merupakan perpanjangan untai DNA baru oleh enzim Taq Polymerase menggunakan dNTP's (*adenine, cytosine, guanine dan thymine*). Biasanya suhu yang digunakan adalah  $72^{\circ}\text{C}$  dengan waktu 1-2 menit.

Dalam satu siklus PCR, urutan basa nukleotida yang diamplifikasi menjadi dua kali lipat dari jumlah awal, sehingga menghasilkan  $2^n$  DNA target dalam setiap n siklus PCR. Metode ini cukup sensitif, membutuhkan waktu yang singkat dan dapat menghasilkan jutaan salinan DNA (*amplicon*) (Agustiningsih; *et al.*, 2020).



Sumber: (Kusuma, 2010)

Gambar 2.4 Proses Amplifikasi dalam PCR

### 5. *Real-Time PCR*

*Real-Time PCR* merupakan hasil pengembangan PCR konvensional yang memungkinkan pemantauan amplifikasi DNA selama proses amplifikasi berlangsung (*real time*). Amplifikasi DNA dideteksi melalui pancaran sinar fluoresensi sebagai indikator amplifikasi DNA. Sinyal fluoresensi yang dipancarkan berbanding lurus dengan jumlah amplicon atau produk PCR. Melalui perekaman jumlah emisi fluoresensi pada setiap siklus, maka dimungkinkan untuk memonitor reaksi PCR pada fase eksponensial, yaitu fase ketika jumlah produk PCR meningkat berbanding lurus dengan jumlah

templat target (DNA sampel) sehingga *Real-Time PCR* bersifat kuantitatif (Artika, 2023).

Kelebihan dari *Real-Time PCR* meliputi waktu pengerjaan yang lebih cepat, sensitifitas tinggi, dan kemampuan menganalisis secara kuantitatif. Analisis kuantitatif dapat dilakukan menggunakan *Real-Time PCR* dengan hasilnya menyertakan *viral load* (kuantitas) jumlah DNA (Agustiningsih; *et al.*, 2020). Tes *viral load* kuantitatif adalah tes laboratorium yang dapat mengukur kuantitas DNA yang terdeteksi pada DNA target. *Viral load* berguna untuk mengidentifikasi tahap infeksi, prognosis penyakit, dapat memantau perkembangan pengobatan, menentukan terapi pencegahan dan dapat melihat tingkat keparahan penyakit (Pandey *et al.*, 2023).

#### 6. Lama Penyimpanan Serum

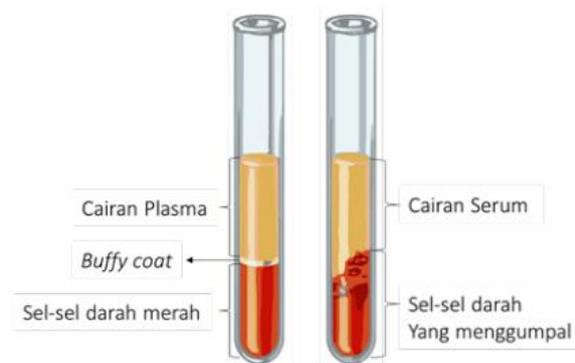
Serum merupakan bagian dari plasma yang tidak mengandung fibrinogen dan prekursor pembekuan lainnya yang telah terpakai selama proses pembekuan (Santi *et al.*, 2019). Penelitian ini menggunakan darah yang diambil dari vena pada lengan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung EDTA dan disentrifugasi untuk memisahkan sel darah dan serum. Untuk menjaga kondisi agar tidak mengalami kerusakan, maka sampel biasanya ditempatkan di dalam lemari pendingin (*refrigerator*) dengan suhu 2-8°C. Penundaan dalam melakukan pemeriksaan dapat mengakibatkan perubahan hasil uji karena darah memiliki sifat yang rentan rusak jika dibiarkan dalam kondisi yang tidak ideal. Selama penyimpanan, sel-sel darah mengalami perubahan biokimiawi, biomekanis, dan reaksi imunologis, yang dapat menyebabkan kerusakan struktural/morfologis yang dikenal sebagai *storage lesion* (Fitria *et al.*, 2017).

Hasil pengukuran kuantitas atau kadar DNA dan kualitas atau kemurnian menunjukkan bahwa penundaan dalam pengolahan sampel serum mengakibatkan penurunan kuantitas DNA. Penyimpanan yang lama merupakan salah satu faktor yang dapat merusak sel darah dan

DNA. Penurunan kadar dan kemurnian DNA akibat lamanya penyimpanan dapat terjadi karena degradasi baik secara alami maupun mikroorganisme (Lio *et al.*, 2021).

## 7. Plasma

Plasma darah adalah komponen terbanyak pada *whole blood*, terhitung sekitar setengah dari seluruh komponennya. Plasma darah adalah cairan matriks ekstraseluler yang bening dan berwarna agak kekuningan. Komposisinya mengandung berbagai zat, termasuk air (92%), sedangkan 8% sisanya terdiri dari glukosa, lemak, protein, vitamin, hormon, enzim, antibodi, karbon dioksida, dan mineral lainnya. Warna kuning yang terdapat pada plasma darah merupakan pigmen warna yang dihasilkan dari proses penguraian sel darah merah yang sudah tua yaitu bilirubin, serta adanya pigmen karotenoid, hemoglobin, dan protein iron transferrin. Protein yang umumnya terdapat dalam plasma darah meliputi protein albumin, globulin, dan fibrinogen (Rosita *et al.*, 2019).



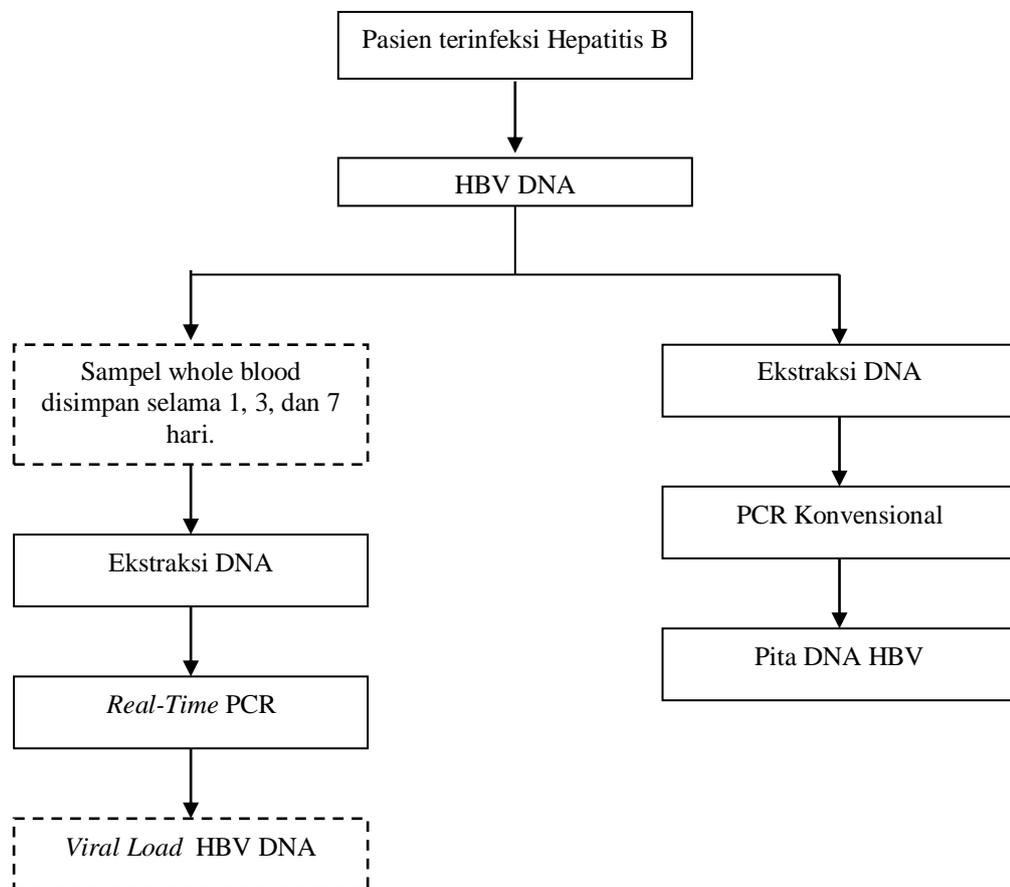
Sumber: (Rosita *et al.*, 2019)

Gambar: 2.5 Plasma Darah dan Serum Darah

Plasma dan serum memiliki komposisi yang berbeda. Plasma darah diperoleh dengan cara memisahkan cairan ekstraseluler dari komponen darah lainnya menggunakan prinsip sentrifugasi berdasarkan perbedaan berat molekul. Setelah proses sentrifugasi, plasma darah akan berada di urutan teratas dan dapat digunakan untuk keperluan diagnostik medis, termasuk analisis diagnostik penyakit

kanker. Keduanya dibedakan berdasarkan ada tidaknya zat pembekuan darah (fibrinogen). Plasma darah diperoleh tanpa menghilangkan komponen pembekuan darah yaitu fibrinogen, sedangkan serum diperoleh dengan cara koagulasi fibrinogen secara alami yang dilanjutkan dengan pemisahan dari cairan ekstraseluler. Antikoagulan seperti *Etylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) biasanya ditambahkan selama pemisahan plasma untuk mencegah penggumpalan darah (Rosita *et al.*, 2019).

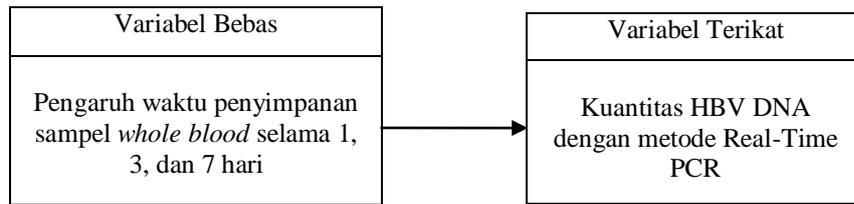
## B. Kerangka Teori



### Keterangan:

- : Diteliti  
 \_\_\_\_\_ : Tidak diteliti

### C. Kerangka Konsep



### D. Hipotesis

**H<sub>0</sub>:** Tidak ada pengaruh waktu penyimpanan sampel *whole blood* terhadap kuantitas HBV DNA dengan metode *Real-Time* PCR.

**H<sub>a</sub>:** Ada pengaruh waktu penyimpanan sampel *whole blood* terhadap kuantitas HBV DNA dengan metode *Real-Time* PCR.