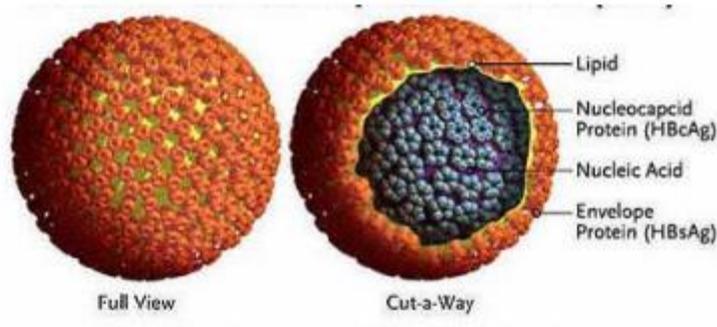


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. HBV DNA

HBV DNA merupakan pengukuran langsung dari *viral load* Hepatitis B Virus DNA mengetahui tingkat aktivitas replikasi virus. Deteksi HBV DNA sebagai indikator replikasi aktif dan konsentrasi tinggi HBV DNA terkait dengan progresi yang lebih cepat dan resiko yang lebih tinggi. Uji HBV DNA bermanfaat dalam evaluasi untuk menentukan respons terhadap pengobatan yang diberikan (Song & Kim, 2016).



Sumber: (Maharani dan Noviar 2018)

Gambar 2.1 Struktur HBV DNA

Virus Hepatitis B (HBV) adalah virus DNA terkecil yang berasal dari genus *Orthohepadnavirus*, famili *Hepadnaviridae*, dengan diameter 40-42 nm. Masa inkubasi bervariasi dengan rata-rata inkubasi 60 hingga 90 hari. Virus ini memiliki protein envelope lipoprotein pada bagian luar, sedangkan pada bagian dalam berupa nukleokapsid atau inti. Genom virus Hepatitis B berbentuk molekul DNA sirkular beruntai ganda yang terdiri dari 3200 nukleotida (Maharani & Noviar, 2018)

Diagnosis hepatitis B (HBV) melibatkan tanda-tanda kerusakan hati. Tes darah yang dapat mendeteksi virus Hepatitis B dalam tubuh meliputi pemeriksaan HBsAg (antibody permukaan Hepatitis B) dan HBcAb (antibodi inti Hepatitis B). Hepatitis B akut diagnosis klinisnya diidentifikasi terdeteksinya HBsAg dan anti-

HBc dapat dideteksi dan terdapat DNA HBV. Sedangkan Hepatitis B kronis diagnosis infeksi ditegakkan berdasarkan persistensi HBsAg selama lebih dari 6 bulan (Song & Kim, 2016).

2. Isolasi Darah kering (*dried blood spots*)

Isolasi darah kering adalah proses isolasi DNA dari sampel darah telah dikeringkan pada kertas saring whatman atau media lainnya. Isolasi darah kering (*dried blood spots*) digunakan untuk mengambil dan menyimpan sampel pada kertas saring (Maliza dkk, 2021). Penerapan metode ini telah dimanfaatkan untuk skrining diagnostik, diagnosa medis, pemantauan obat, dan analisis genetik (Choi dkk. 2014). Penggunaan metode ini dapat memberikan proses pengumpulan darah dengan mudah seperti pengambilan dari tumit atau ujung jari. Keuntungan dalam menggunakan metode ini diantaranya sebagai berikut:

- a. Mudah dalam pengambilan sampel dapat dilakukan tanpa tenaga *phelebotomist* karena sampel diambil pada ujung jari atau tumit dengan menggunakan lancet steril.
- b. Volume sampel yang digunakan sedikit, hal ini dapat memudahkan untuk pengambilan pada anak-anak dan bayi.
- c. Analit lebih stabil dibandingkan penyimpanan pada *freezer*.
- d. Biaya lebih murah dalam proses pengiriman dan penyimpanan sehingga tidak memerlukan *dry ice* atau *ice box*.
- e. Memberikan keamanan karena dalam keadaan kering patogen menjadi tidak aktif sehingga dapat mengurangi resiko infeksi.

(Supandi 2016)

3. Kertas saring (*whatman*)

Kertas saring adalah salah satu bahan berbentuk tipis biasanya digunakan untuk menyaring larutan dan memisahkan endapan larutan yang akan dianalisis dilaboratorium (Andalusi & Irfanudin, 2021). Terdapat banyak jenis kertas saring yang berbeda dan ketebalan serta porinya bervariasi (Smit dkk, 2014). Salah satu jenis kertas saring yaitu kertas saring (*whatman*) No.3 adalah kertas saring yang memiliki

kapasitas pori 6 μm dapat digunakan sebagai tempat penyimpanan yang sangat baik, dapat menahan endapan lebih banyak dan daya serap yang lebih tinggi sehingga cocok digunakan untuk penyaringan partikel-partikel halus (Whatman 2013). Beberapa keuntungan menggunakan kertas saring dalam menganalisis sampel laboratorium yaitu sebagai berikut:

- a. Kertas saring pada harganya murah (beberapa kertas saring seperti FTA yang diolah harganya sangat mahal).
- b. Hanya memerlukan volume sampel sedikit.
- c. Dapat sebagai tempat penyimpanan dan pengawetkan spesimen dalam pengiriman kelaboratorium (Smit dkk, 2014).



Sumber: Cytivalifesciences, 2023

Gambar 2.2 kertas saring *whatman* No.3

4. Deteksi Materi Genetik

Metode ini digunakan untuk mendeteksi materi genetik atau asam nukleat virus. Metode yang digunakan untuk mendeteksi asam nukleat adalah metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan *sequencing*. Metode ini memiliki beberapa kelemahan antara lain memerlukan beberapa tahapan perparasi sampel, petugas terlatih, dan harus dilakukan difasilitas laboratorium yang setidaknya memiliki *Biosafety Level 2*. Sementara kelebihan metode ini adalah pengerjaannya relatif cepat sekitar 4-6jam, metode sensitif dan spesifik yang dapat mendeteksi virus sejak tahap awal infeksi atau masa inkubasi (Agustiningasih dkk, 2020).

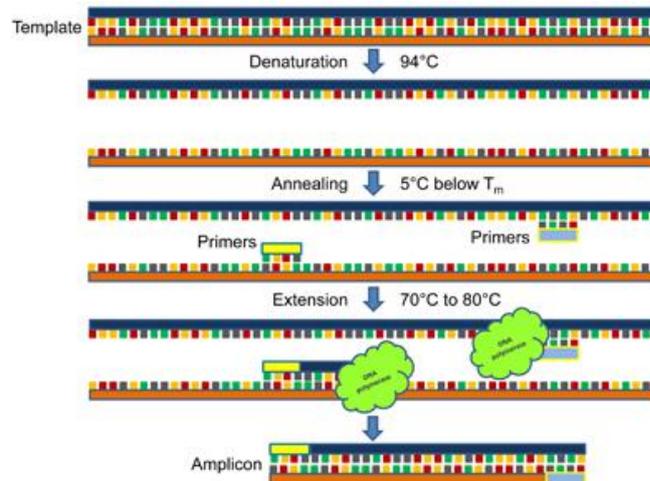
a. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah metode amplifikasi DNA *template* atau komplementer (cDNA) secara *in vitro* menggunakan *Taq polymerase*. Beberapa komponen yang dibutuhkan pada metode PCR antara lain:

- 1) *Taq polymerase* adalah DNA *polymerase* 1 yang stabil pada rentang suhu yang luas. Fungsinya untuk membentuk untaian DNA yang bersifat komplementer terhadap *template* DNA.
- 2) $MgCl_2$ berperan sebagai penyedia ion yang diperlukan untuk reaksi enzim.
- 3) *dNTP's (deoxynucleotida trifosfat)* merupakan bahan nukleotida yang membentuk dan menghasilkan untaian DNA baru yang mengandung *adenin, cytosine, guanine, dan thymine*.
- 4) Fungsi buffer adalah menjaga pH optimal agar enzim dapat bekerja.
- 5) *Primers* adalah pelengkap dari DNA target dan ada dalam bentuk oligonukleotida pendek. *Primer* bersifat spesifik terhadap DNA target terdiri dari 2 jenis primer yaitu sebagai berikut:
 - a) *Forward primer*: Menempel pada DNA anti-sense.
 - b) *Reverse primer*: Menempel pada DNA sense.
- 6) *Template* DNA adalah DNA atau cDNA yang akan digandakan (amplifikasi) (Agustiningsih dkk, 2020).

b. Proses PCR

Tujuan dari proses PCR adalah untuk menghasilkan amplicon DNA dan amplifikasi DNA terdiri dari beberapa siklus berulang. Biasanya 30 hingga 40 siklus. Beberapa tahapan siklus PCR ditunjukkan pada gambar dibawah ini:



Sumber: Lorenz, 2012

Gambar 2.3 Prinsip Pemeriksaan PCR

1) Denaturasi

Suatu proses pemanasan yang memisahkan untai DNA ganda menjadi untai DNA tunggal. Suhu yang dibutuhkan untuk proses denaturasi sekitar 90°C - 95°C dan waktu 60 detik.

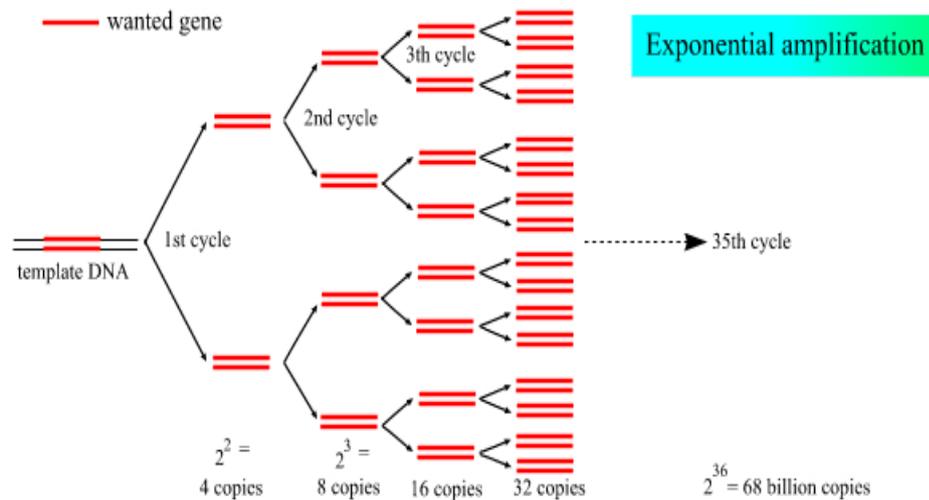
2) Annealing

Penempelan *primer Reverse* dan *Forward* ke untai DNA tunggal pada suhu 50°C - 60°C selama 30-40 detik.

3) Elongasi

Enzim *taq Polymerase* menggunakan dNTP (*adenin, cytosine, guanine, dan thymine*) untuk memanjangkan untaian DNA baru pada suhu 72°C selama 1-2 menit.

Urutan basa nukleotida yang diamplifikasi dalam satu siklus PCR akan menjadi dua kali lipat dari jumlah awal, sehingga diperoleh DNA target 2^n kali lebih banyak dalam setiap siklus PCR. Cara ini sangat sensitif karna hanya membutuhkan waktu singkat dan dapat menghasilkan jutaan salinan DNA (Agustiningsih dkk, 2020).



Sumber: Labcito, 2023

Gambar 2.4 Proses Amplifikasi PCR

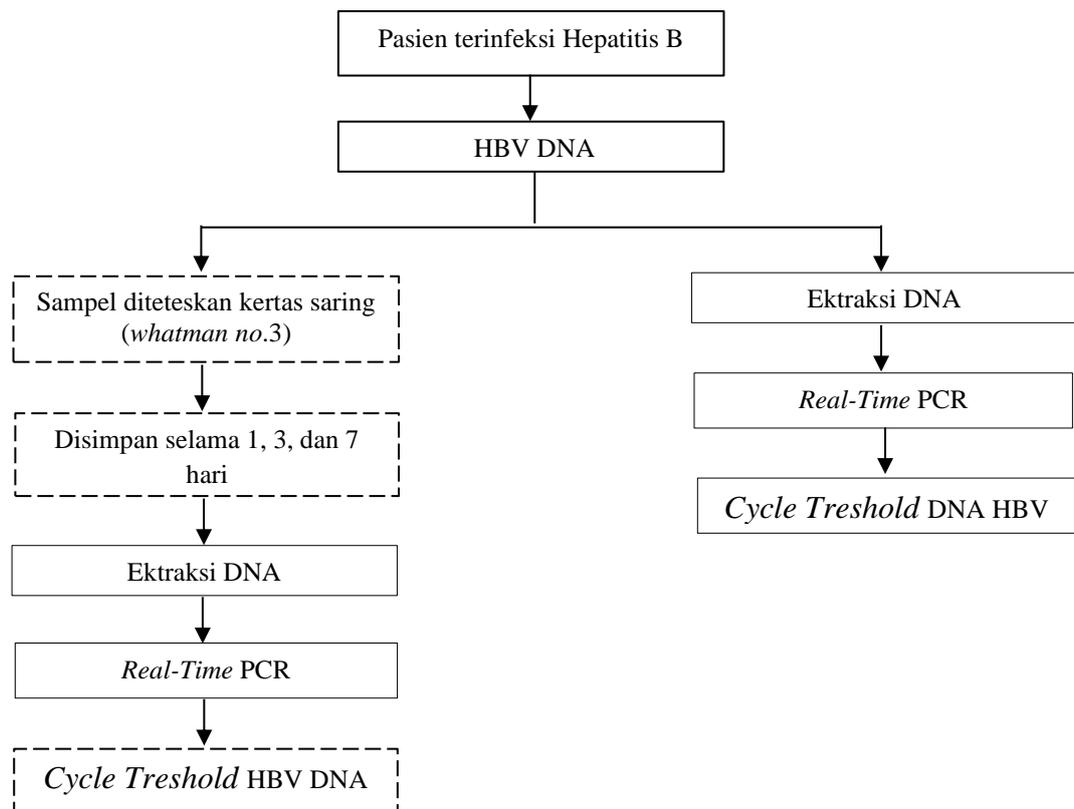
5. *Real-Time* PCR

Real-Time PCR merupakan suatu teknik amplifikasi DNA yang menggunakan *fluorogenic probe* di tiap siklusnya sehingga produk amplifikasi dapat langsung dianalisis (Agustiningsih dkk, 2020). Teknik *Real-Time* PCR merupakan hasil pengembangan PCR konvensional yang dapat melakukan pemantauan amplifikasi DNA secara langsung (*Real-Time*). Proses amplifikasi DNA dideteksi berdasarkan sinar fluoresensi yang digunakan sebagai indikator amplifikasi DNA. Sinyal fluoresensi yang terpancar berbanding lurus dengan jumlah amplicon atau produk PCR (Artika 2023). Pada PCR ini, *thermal cycler* dilengkapi oleh detektor yang membaca sinyal fluoresensi menjadi sinyal digital dan dapat dianalisis oleh komputer, sehingga tidak memerlukan proses elektroforesis untuk interpretasi hasil (Agustiningsih dkk, 2020).

Kelebihan dari *Real-Time* PCR yaitu waktu pengerjaan lebih cepat, memiliki sensitifitas tinggi, sedangkan kekurangannya yaitu memerlukan *thermal cycler* yang dilengkapi kamera detektor sehingga memerlukan biaya yang relatif lebih mahal. Hasil akhir *Real-Time* PCR adalah berupa nilai *Cycle Threshold* (CT), yaitu perpotongan antara garis *threshold* dan kurva amplifikasi. Nilai CT ditentukan oleh sinyal fluoresensi yang terdeteksi di atas *threshold*. Garis *threshold* adalah

garis yang berada di atas *baseline* sinyal fluoresensi. Sampel dengan nilai CT dibawah *cut off* menandakan target virus ada di dalam sampel yang diamplifikasi, sedangkan sampel dengan nilai CT di atas *cut off* atau tidak terbentuk kurva amplifikasi diartikan sebagai tidak ditemukannya target virus di dalam sampel tersebut. Semakin rendah nilai CT, maka semakin awal sinyal terdeteksi, dan semakin banyak pula DNA template yang terkopi (Agustiningsih dkk, 2020).

B. Kerangka Teori



Keterangan:

----- : Diteliti

————— : Tidak diteliti

C. Kerangka Konsep

Variabel Independen

1. Variasi waktu Penyimpanan 1, 3, dan 7 hari.
2. kertas saring *whatman no.3*

Variabel Dependen

Nilai CT (*Cycle Threshold*)
HBV DNA menggunakan
Real-Time PCR

D. Hipotesis

Ho: Tidak ada perbandingan variasi waktu penyimpanan sampel terhadap Nilai CT (*Cycle Threshold*) HBV DNA yang diisolasi menggunakan kertas saring *Whatman No.3*.

Ha: Ada perbandingan variasi waktu penyimpanan sampel terhadap nilai CT (*Cycle Threshold*) HBV DNA yang diisolasi menggunakan kertas saring *Whatman No.3*.