

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Teori

##### 1. Hepatitis B

Virus hepatitis B (VHB) adalah virus DNA, suatu prototip virus yang termasuk keluarga *Hepadnaviridae*. Virus ini memiliki DNA yang sebagian berupa untaian tunggal (*single stranded DNA*) dan DNA polimerase endogen yang berfungsi menghasilkan DNA untaian ganda (*double stranded DN, dsDNA*). Virion lengkap HBV terdiri atas suatu struktur berlapis ganda dengan diameter keseluruhan 42 nm. Bagian inti sebelah dalam (*inner core*) yang berdiameter 28 nm dan dilapisi selaput (*envelop*) yang tebalnya 7 nm mengandung dsDNA dengan berat molekul  $1.6 \times 10^6$ . Bagian *envelop* yang mengelilingi *core* terdiri atas kompleks dengan sifat biokimia heterogen, bagian ini mempunyai sifat antigen berbeda dengan antigen *core* (HBcAg) dan disebut antigen permukaan hepatitis B *surface* antigen (HBsAg). HBsAg diproduksi dalam jumlah banyak oleh hepatosit yang terinfeksi dan dilepaskan ke dalam darah sebagai partikel tubuler berdiameter sama yang panjangnya berkisar antara 100-200 nm (Kresno, 2013).

Subtipe utama dari HBsAg yang disebut subtype *adw*, *adr*, *ayw* dan *ayr*. Subtipe *adw* dan *ayw* dijumpai paling sering di seluruh dunia kecuali Asia Tenggara dan Timur, Subtipe *adr* juga sering dijumpai tapi subtype *ayr* jarang ditemukan. Gejala klinik dan perubahan serologi yang terjadi setelah terpapar virus HBV merupakan hasil interaksi antara organisme, virus dan antigen serta antibody spesifik yang sangat kompleks. HBsAg muncul 2-4 minggu sebelum tampak kelainan hati atau 3-5 minggu sebelum tampak gejala klinik. Kadar tertinggi HBsAg seringkali terdapat pada awal penyakit, kadar HBsAg menurun perlahan-lahan dalam waktu 4-6 bulan hingga mencapai kadar yang tidak terdeteksi dengan metode ELISA / CLIA (Kresno, 2013).

Uji antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) pada awalnya disebut dengan uji antigen Australia, dan akhirnya disebut uji antigen terkait hepatitis (HAA). Uji ini dilakukan untuk menentukan keberadaan virus hepatitis B di

dalam darah, baik dalam keadaan akut maupun *carrier*. Lebih kurang 5% individu menderita penyakit selain hepatitis B, akan menunjukkan uji HBsAg positif (Kresno, 2013).

Uji HBsAg ini secara rutin dilakukan pada darah pendonor untuk mengidentifikasi antigen hepatitis B. Transmisi hepatitis B pada transfusi darah sudah hampir tidak terdapat lagi karena dilakukan *screening* HBsAg terhadap darah pendonor dan menolak pendonor yang memiliki riwayat hepatitis. Meskipun insidensi hepatitis B terkait transfusi sudah menurun, tetapi angka kejadian hepatitis B masih tetap meningkat. Pada hepatitis B, antigen dalam serum dapat dideteksi rata-rata 4 sampai 8 minggu setelah berlangsungnya paparan terhadap virus (Kresno, 2013).

## 2. Epidemiologi Hepatitis B

Sekitar 350 juta orang di dunia terinfeksi secara kronis oleh hepatitis B (HBV) yang merupakan penyebab utama sirosis hati dan karsinoma hepatoseluler (HCC). Diagnosis infeksi HBV mengalami revolusi dengan ditemukannya antigen Australia yang sekarang disebut antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) oleh Blumberg pada tahun 1965. Selama decade berikutnya, uji serologis untuk HBsAg serta antigen dan antibody HBV lainnya, diidentifikasi dan uji serologis untuk mendeteksinya pun dilakukan. 35% pasien yang terinfeksi HBV kronis tinggal di Asia dan Pasifik Barat. Penyakit hati terkait HBV adalah alasan utama dilakukannya transplantasi hati (Boyer, Manns and Sanyal, 2012).

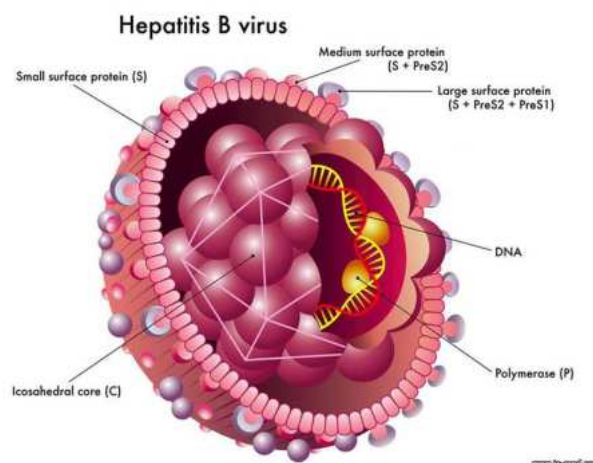
Infeksi hepatitis B disebut sebagai "hepatitis inkubasi panjang". Pada tahun 2006, total 4.713 kasus hepatitis B akut dan bergejala dilaporkan secara nasional di Amerika Serikat. Angka kejadian secara keseluruhan adalah yang terendah yang pernah tercatat dan menunjukkan penurunan sebesar 81% sejak tahun 1990. Setelah memperhitungkan infeksi tanpa gejala dan tidak adanya pelaporan, diperkirakan Sekitar 46.000 infeksi baru terjadi pada tahun 2006. Sekitar 1,25 juta orang di Amerika Serikat menderita infeksi HBV kronis, 20% hingga 30% di antaranya tertular infeksi tersebut pada masa kanak-kanak. Setiap tahun sekitar 3000 hingga 5000 orang meninggal karena sirosis atau

kanker hati yang disebabkan oleh HBV. Tingkat penyakit tertinggi terjadi pada usia 20 hingga 49 tahun (Turgeon, 2009).

Vaksinasi HBV universal pada bayi baru lahir dimulai pada pertengahan tahun 1980an di Taiwan dan diikuti oleh beberapa negara Asia Tenggara. Pada tahun 1991, organisasi kesehatan dunia merekomendasikan integrasi vaksinasi HBV ke dalam program neonatal di negara-negara dengan prevalensi pembawa hepatitis B sebesar 8% atau lebih tinggi. Vaksinasi universal telah mengurangi prevalensi secara signifikan. Prevalensi infeksi HBV kronis pada orang dewasa diperkirakan akan menurun di negara atau wilayah seperti Korea (Boyer, Manns and Sanyal, 2012).

### 3. Etiologi Hepatitis B

Virus hepatitis B (HBV) merupakan contoh klasik dari sebuah virus diperoleh melalui transfusi darah. Antigen Australia, yang sekarang disebut antigen permukaan hepatitis B (HBsAg). Hepatitis B adalah virus DNA kompleks yang termasuk dalam famili *Hepadnaviridae*, genus *Hepadnavirus*. Virus yang utuh adalah partikel bercangkang ganda yang disebut sebagai partikel *Dane*. Ia mempunyai struktur permukaan luar, HBsAg, dan komponen inti dalam, antigen inti hepatitis B (HBcAg). Di dalam inti ini terdapat genom virus, sebuah molekul tunggal asam deoksiribonukleat (DNA) beruntai ganda.



Sumber: Citrawati *et al*, 2019

Gambar 2.1 Ilustrasi virus hepatitis B

Struktur DNA HBV yang unik merupakan salah satu ciri khas *Hepadnavirus*. DNA berbentuk sirkular dan beruntai ganda, namun salah satu

untainya tidak lengkap, sehingga menyisakan daerah untai tunggal atau “celah” yang mencakup 10% hingga 50% dari total panjang molekul (Turgeon, 2009).

#### **4. Penularan Hepatitis B**

Orang-orang yang berisiko terpapar HBV, termasuk anggota kelompok berikut (Turgeon, 2009):

- a. Pria dan wanita heteroseksual.
- b. Pria homoseksual dengan banyak pasangan.
- c. Kontak serumah dan pasangan seksual pembawa HBV.
- d. Bayi yang lahir dari ibu yang terinfeksi HBV.
- e. Pasien dan staf di lembaga kustodian bagi penyandang disabilitas mental.
- f. Penerima produk turunan plasma tertentu (termasuk pasien dengan kelainan koagulasi bawaan).
- g. Petugas kesehatan dan keselamatan publik yang mungkin melakukan kontak dengan darah yang terinfeksi.
- h. Orang yang lahir di daerah endemis HBV dan anak-anaknya.

Virus hepatitis B tampaknya tidak mampu menembus kulit atau selaput lender, oleh karena itu diperlukan perantara agar penyakit dapat menular. Penularan HBV terjadi melalui rute perkutan atau permukosa, dan darah atau cairan tubuh yang menular dapat ditularkan saat lahir, melalui kontak seksual, atau melalui jarum suntik yang terkontaminasi. Infeksi juga dapat terjadi dalam lingkungan kontak pribadi yang dekat dan terus menerus. Sekitar separuh pasien hepatitis B akut mempunyai riwayat paparan parenteral. Paparan parenteral yang tidak terlihat melibatkan kontak intim atau seksual dengan orang yang menularkan penyakit. Penularan antara saudara kandung dan kontak serumah lainnya mudah terjadi melalui penularan dari lesi kulit seperti eksim atau impetigo, berbagi benda yang berpotensi terkontaminasi darah seperti sikat gigi dan silet, dan kadang-kadang melalui gigitan. HBV telah ditemukan dalam air liur, air mani, ASI, air mata, keringat, dan cairan biologis lain dari pembawa HBV (Turgeon, 2009).

#### **5. Pemeriksaan Laboratorium Hepatitis B**

- a. Pemeriksaan *Screening*

1) Pemeriksaan *Imunokromatografi Assay*

Metode *screening* deteksi virus Hepatitis B kualitatif yaitu dengan metode *Immunokromatografi Assay* dengan rapid tes. untuk mendeteksi antigen permukaan virus hepatitis B yang didasarkan pada presipitasi kompleks imun, adanya HBsAg dalam serum merupakan pertanda serologis infeksi hepatitis B (Robani, Mentari and Ustiawaty, 2022). Prinsip dasarnya adalah adanya pengikatan antara antigen dengan antibody pada daerah *test line*, selanjutnya antibody akan berikatan dengan *colloidal gold conjugate*. Komplek yang terbentuk akan bergerak pada membran nitroselulosa. Secara umum, metode imunokromatografi untuk mendeteksi agen infeksi dengan menggunakan antigen/antibody yang dilekatkan pada membran pori atau pada sebuah bantalan strip membran nitroselulosa dengan *one-step* metode atau satu kali langkah pengujian. Pada metode ini, tidak ada langkah pencucian, namun oleh karena bahan yang dipergunakan merupakan bahan yang bersifat absorbansi atau menyerap, maka kelebihan antibody/antigen pada sampel dihilangkan dengan jalan diabsorpsi oleh massa padat berupa membran nitroselulosa (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

Metode rapid mempunyai keuntungan yaitu *user friendly* (mudah dikerjakan), penggunaan sampel sedikit, meskipun ada beberapa jenis reagensia yang membutuhkan sampel banyak seperti pemeriksaan HBsAg. Metode imunokromatografi tidak membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan hasil pemeriksaan. Kelemahannya yaitu penyimpanan reagensia harus sangat hati-hati mengikuti instruksi dari pabrik karena stabilitas reagensia lebih rendah dibandingkan dengan reagensia ELISA meskipun dapat disimpan pada suhu kamar. Hasil pemeriksaan kurang akurat karena tergantung dengan penglihatan mata petugas. Petugas yang satu dengan yang lainnya tentu berbeda (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

2) Pemeriksaan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Prinsip teknik ELISA indikator (label) yang digunakan adalah enzim dan bukan radio-isotop. Kelebihan teknik ELISA adalah: cukup sensitif, reagen mempunyai *half life* yang lebih panjang dibanding reagen RIA, dapat menggunakan spektrofotometer biasa dan mudah dilakukan automatisasi, dan yang paling penting adalah tidak mengandung bahaya radioaktif (Kresno, 2013).

ELISA memberikan pengukuran antigen atau antibodi yang baik secara relatif maupun kuantitatif. ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya antigen yang dikenali oleh antibodi atau dapat digunakan untuk menguji antibodi yang mengenali antigen secara spesifik. Pemeriksaan ELISA ditujukan untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen penanda agen infeksi seperti virus pada sampel darah pendonor. Guna mendeteksi antibodi, maka antigen dilekatkan pada masa padat seperti dasar sumur (*well*) atau sebuah bola padat yang disebut *bead*. Media reaksi pada metode ELISA adalah microplate atau microwell yang berjumlah 96 *well* atau sumur di setiap platennya. Sebelum digunakan plate dilapisi dengan antibodi (*capture antibodies*) yang berperan untuk menangkap molekul atau antigen target. Pelapisan dilakukan dengan penyerapan antibodi pada dasar sumur (*well*). Plate terbuat dari bahan polystyrene yang dimodifikasi sehingga memiliki kemampuan absorpsi yang cukup efisien. Konsentrasi antibodi sangat berhubungan dengan efisiensi penangkapan antigen. Untuk sensitivitas yang tinggi, antibodi yang dipergunakan adalah fraksi dari IgG atau fraksi antibodi monospesifik yang diperoleh dari afinitas kromatografi (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

3) Pemeriksaan *Chemiluminescent Immunoassay* (CLIA)

*Chemiluminescence immunoassay* (CLIA) didasarkan atas hasil reaksi berenergi tinggi yang memproduksi molekul yang berfluoresensi. Energi reaksi yang dilewatkan pada produk tersebut menyebabkan eksitasi dan produksi sinar foton tunggal yang berkilat secara cepat. Banyak sistem *immunoassay* yang menggunakan *chemiluminescence* dengan tujuan mengukur molekul biologik aktif dengan kadar rendah. Produksi sinar dengan latar belakang gelap

memungkinkan deteksi molekul-molekul yang sedang bereaksi dalam jumlah kecil dengan mengukur luaran sinar yang dihasilkan (Kresno, 2013).

Uji HBsAg seri CL adalah *Chemiluminescent Immunoassay* (CLIA) untuk penentuan kuantitatif antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) dalam serum atau plasma manusia. HBsAg lipoprotein glikosilasi dan komponen selubung luar partikel virus hepatitis B (HBV). HBsAg terdapat dalam dua bentuk di dalam darah orang yang terinfeksi HBV, yang satu muncul sebagai protein kapsid yang mengelilingi partikel HBV, bentuk lainnya adalah partikel berbentuk tabung atau bola (~22 nm) yang bersirkulasi bebas di dalam darah, dan tidak menular. Penentu HBsAg "a" adalah target utama uji imunologi dan terdapat pada semua antigen HBs. Heterogenitas HBsAg berasal dari dua pasang determinan yang saling eksklusif: d/y dan w/r, sehingga menghasilkan empat sub tipe utama: adw, ayw, adr, dan ayr. HBsAg merupakan penanda serologis pertama infeksi HBV, yang dapat dideteksi 2 hingga 12 minggu setelah infeksi HBV. Stabil selama beberapa hari hingga minggu sebelum gejala klinis lainnya muncul. Uji HBsAg digunakan sebagai alat bantu diagnosis infeksi HBV atau untuk memeriksa status infeksi HBV. Selain itu, uji HBsAg dapat digunakan untuk memantau kemanjuran terapi anti-HBV (Mindray, 2021).

Metode CLIA dianggap lebih sensitif dibandingkan dengan ELISA. Kelebihan CLIA pada saat deteksi dengan spektrofotometri, pendaran lebih unggul dibandingkan dengan absorbansi karena ukuran absolut dan relatif. *Luminescence* umumnya mengidentifikasi reaksi kimia eksergonik sebagai sumber energi yang paling cocok untuk menghasilkan keadaan tereksitasi elektronik. Metode heterogen adalah uji CLIA yang lebih banyak digunakan. Metode CLIA dapat langsung menggunakan penanda luminofor atau tidak langsung dengan menggunakan penanda enzim, baik metode kompetitif maupun non kompetitif (Cinguanta, Fontana, & Bizzaro, 2017).

#### 1. Prinsip pengujian CLIA

Uji HBsAg seri CL adalah uji sandwich dua tempat untuk menentukan tingkat antigen permukaan hepatitis B.

Pada langkah pertama, sampel, mikropartikel paramagnetik yang dilapisi dengan streptavidin, dan antibodi monoklonal anti-HBs berlabel biotin (IgG

dan IgA mouse) ditambahkan ke dalam bejana reaksi. Setelah inkubasi, mikropartikel paramagnetik yang dilapisi streptavidin berikatan dengan antibodi monoklonal anti-HBs berlabel biotin; HBsAg yang ada dalam sampel berikatan dengan antibodi monoklonal anti-HBs yang diberi label biotin. Kompleks yang terdiri dari mikropartikel paramagnetik-streptavidin-biotin berlabel antibodi monoklonal anti-HBs-HBsAg terbentuk. Mikropartikel paramagnetik ditangkap secara magnetis sementara zat lain yang tidak terikat dihilangkan dengan pencucian.

Langkah kedua, antibodi monoklonal anti-HBs Konjugat (mouse IgG)-alkaline fosfatase (ALP) ditambahkan ke dalam bejana reaksi. Setelah inkubasi, konjugat antibodi monoklonal anti-HBs -ALP berikatan dengan HBsAg dalam kompleks yang ditangkap oleh mikropartikel paramagnetik. HBsAg berikatan dengan antibodi monoklonal anti-HBs berlabel biotin dan konjugat antibodi monoklonal anti-HBs-ALP untuk membentuk sandwich. Mikropartikel paramagnetik ditangkap secara magnetis sementara zat lain yang tidak terikat dihilangkan dengan pencucian.

Langkah ketiga, larutan substrat ditambahkan ke bejana reaksi. Ini dikatalisis oleh konjugat antibodi anti-HBs -ALP dalam kompleks imun yang tertahan pada mikropartikel. Reaksi *chemiluminescent* yang dihasilkan diukur sebagai satuan cahaya relatif (RLU) oleh *photomultiplier* yang terpasang di dalam sistem. Jumlah HBsAg yang ada dalam sampel sebanding dengan satuan cahaya relatif (RLUS) yang dihasilkan selama reaksi. Konsentrasi HBsAg dapat ditentukan melalui kurva kalibrasi (Mindray, 2021).

## 2. Interpretasi Hasil HBsAg metode CLIA

- a) Sampel dengan konsentrasi HBsAg  $<0,05$  IU/mL tidak reaktif dalam uji HBsAg Mindray, dan dianggap negatif untuk infeksi HBV. Sampel ini tidak memerlukan pengujian lebih lanjut.
- b) Sampel dengan konsentrasi HBsAg  $\geq 0,05$  IU/mL dianggap awalnya reaktif.
- c) Spesimen reaktif awal dengan HBsAg  $<1,00$  IU/mL harus dipindahkan ke tabung sentrifugasi dan disentrifugasi pada  $\geq 10.000$  RCF (*Relative Centrifugal Force*) selama 10 menit, kemudian diuji ulang dua kali lipat.



Jika kedua hasil kurang dari 0,05 IU/mL, sampelnya non-reaktif; tidak diperlukan tes lebih lanjut untuk pasien. Jika salah satu hasil tes ulang lebih tinggi dari 0,05 IU/mL, sampel tersebut reaktif berulang, dan pasien dianggap positif terinfeksi HBV. Sampel reaktif berulang serta sampel awalnya reaktif dengan konsentrasi  $\geq 1,00$  IU/mL harus dikonfirmasi sesuai dengan algoritma konfirmasi yang direkomendasikan (Mindray, 2021).

### 3. Kelebihan dan Kekurangan Metode CLIA

CLIA menggunakan “*magnetic microparticle*” berbentuk bola sebagai pembawa antigen dan atau antibodi, permukaan lebih luas, sehingga jumlah antibodi/antigen yang dibawa lebih banyak. Keutamaan CLIA yaitu dalam penggunaan substrat yang memiliki aktifitas tinggi, lebih stabil dan memiliki emisi cahaya lebih tinggi, menghasilkan jumlah cahaya yang lebih banyak, lebih mudah terukur sehingga lebih sensitif. Proses kimia lebih stabil terhadap perubahan suhu dan Ph. Sistem deteksi tidak menggunakan cahaya dari luar. Pengukuran photon dari reaksi *chemiluminescence* menghindari masalah yang berkaitan dengan filter dan pemilihan panjang gelombang (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

Metode CLIA bila dibandingkan dengan metode ELISA lebih unggul karena sistem reseptor ELISA mengukur konsentrasi substansi sangat rendah hingga beberapa nanograms (10<sup>-9</sup> gram). CLIA dapat mengukur konsentrasi substansi dalam femtogram. Pada umumnya, CLIA menggunakan peralatan otomatis sehingga mengurangi kemungkinan kontaminasi dan *human error* (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

Kekurangan metode CLIA yaitu waktu pegerjaan sampel yang lebih cukup lama dibandingkan metode *Immunokromatografi Assay* dengan rapid tes sehingga jika saat terjadi *emergency* metode ini kurang efisien untuk digunakan, serta di beberapa unit donor darah (UDD) di Indonesia belum semua menggunakan metode CLIA dikarenakan tidak efisien secara biaya pada reagent dan consumable yang cukup mahal (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

#### b. Pemeriksaan Penunjang *Gold Standard*

##### 1) Pemeriksaan *Nucleic Acid Testing* (NAT)

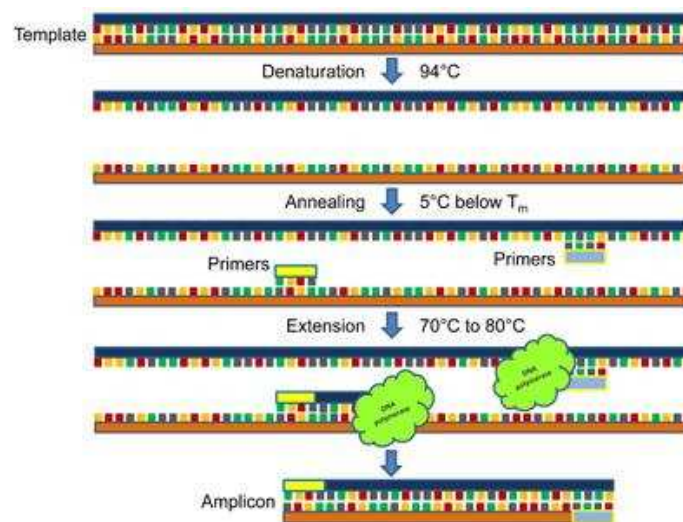
*Nucleic Acid Testing* (NAT) adalah teknologi deteksi keberadaan asam nukleat virus, DNA, atau RNA yang diaplikasikan pada uji saring darah donor. Pada teknologi ini, segmen DNA/RNA yang spesifik dijadikan target dan diamplifikasi secara *in-vitro*. Tahap amplifikasi akan meningkatkan jumlah DNA/RNA spesifik dengan titer yang rendah yang ada pada sampel hingga mencapai titer yang dapat dideteksi. Dampak dari penggunaan uji saring dengan metode ini adalah keamanan darah menjadi semakin meningkat oleh karena DNA/RNA dapat dideteksi jauh sebelum antigen atau antibodi terdeteksi dalam suatu sampel darah yang terinfeksi. Hal ini dapat diartikan bahwa deteksi asam nukleat ini mampu mendeteksi dalam tahap infeksi awal atau *window periode* (WP). *Window periode* atau masa jendela adalah masa dimana agen infeksi telah masuk ke dalam tubuh namun tubuh belum merespon atau belum membentuk antibodi, sehingga pada saat pemeriksaan serologis hasilnya negatif (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

Tes kualitatif dan kuantitatif DNA HBV dalam serum telah dikembangkan untuk mengetahui replikasi virus. Batas sensitifitas dan rentang dinamik dari metoda ini bervariasi tergantung pada tehnik yang digunakan. Penggunaan NAT untuk deteksi DNA HBV pada darah donor ditujukan untuk memperpendek WP infeksi dan mendeteksi kasus infeksi occult HBV. Transmisi infeksi dari karier dengan infeksi HBV khronis fase akhir dapat berkontribusi pada risiko transmisi infeksi HBV melalui transfusi darah, terutama di negara dengan prevalensi sedang dimana uji saring anti-HBc tidak rutin dilakukan. Namun demikian, penggunaan NAT untuk DNA HBV masih tetap kontroversial. Hal ini disebabkan karena ketidakpastian panjangnya WP infeksi pada kejadian infeksi di donor baru dan donor ulang, serta ketidakpastian jumlah minimal inokulum yang dibutuhkan untuk terjadinya transmisi infeksi (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

## 2). Pemeriksaan *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*. Proses PCR bertujuan untuk mendapatkan DNA amplicon, yang melibatkan proses amplifikasi DNA yang terdiri dari beberapa siklus berulang, biasanya 30-40 siklus. Dalam satu siklus PCR, urutan basa nukleotida yang diampifikasi menjadi dua kali lipat dari jumlah awal (Agustiningsih *et al.*, 2020).

Beberapa tahap dalam satu siklus PCR dapat dilihat pada gambar berikut:



Sumber: Lorenz, 2012

Gambar 2.2 Prinsip Pemeriksaan PCR

### a) Denaturasi

Merupakan proses pemanasan untuk memisahkan untai ganda DNA menjadi untai tunggal pada suhu berkisar  $90^{\circ}$  –  $95^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik.

### b) Annealing

Merupakan penempelan primer Reverse dan Forward pada satu untai DNA target, dengan suhu yang digunakan yaitu  $50^{\circ}$ - $60^{\circ}\text{C}$  dan waktu 30-45 detik

### c) 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.

## 3). Pemeriksaan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (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). Uji ini mungkin bermanfaat dalam memastikan infeksi HBV pada pasien dengan hasil yang meragukan. *Real Time PCR* menggunakan transfer energi *fluoresensi-resonansi* untuk mengukur urutan DNA spesifik yang diinginkan dan mengidentifikasi mutasi titik. *Real Time PCR* tidak terlalu rentan terhadap kontaminasi amplicon dan lebih akurat dalam menghitung jumlah salinan DNA (Turgeon, 2009).

Kelebihan dari *Real-Time PCR* meliputi waktu pengerjaan yang lebih cepat, sensitivitas tinggi, dan kemampuan menganalisis secara kuantitatif. Analisis kuantitatif dapat dilakukan menggunakan *Real-Time PCR* dengan hasilnya menyertakan *viral load* (kuantitas) jumlah DNA (Agustiniingsih; *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).

1. Prinsip pengujian Real Time PCR:

DNA HBV diekstraksi dari plasma, diamplifikasi menggunakan amplifikasi waktu nyata dan dideteksi menggunakan probe pewarna reporter fluoresen khusus untuk HBV dan deteksi simultan. Control Internal (IC) khusus HBV, dengan deteksi warna ganda.

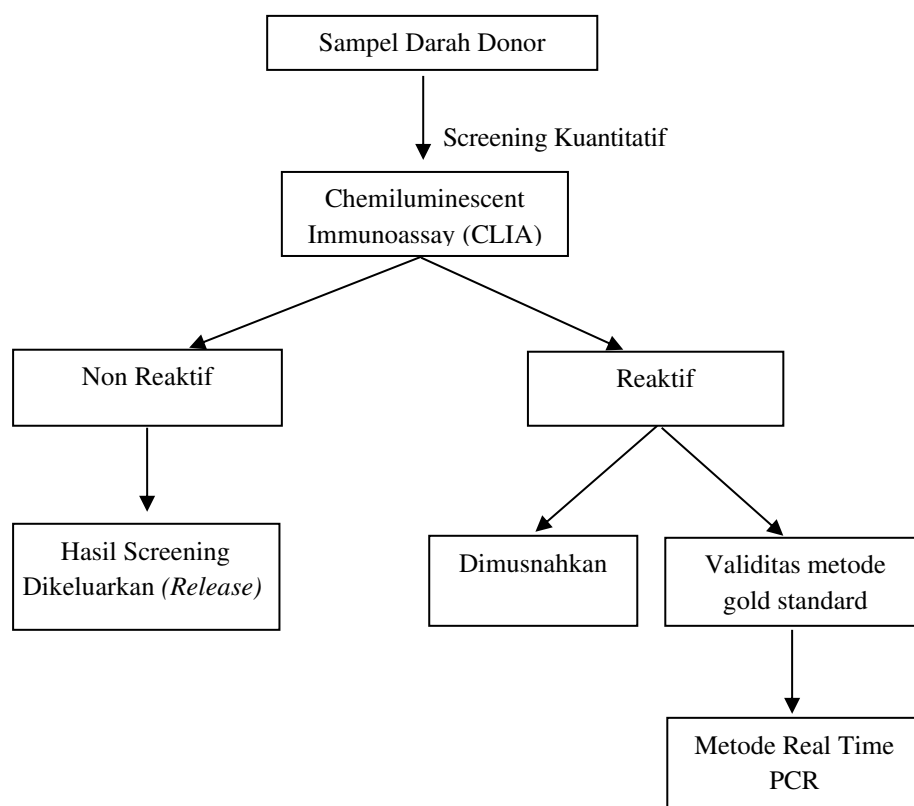
## 2. Interpretasi Hasil HBV Real Time PCR

DNA HBV ditentukan berdasarkan nilai CT dan kurva standar yang dihasilkan dari analisis standar kuantisasi. Konsentrasi DNA HBV dinyatakan dalam IU/ml.

## 3. Kelebihan dan Kekurangan Metode Real Time PCR

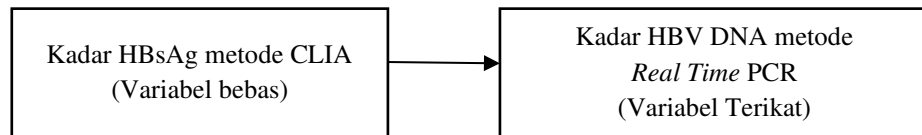
Pemeriksaan Real Time PCR memiliki kelebihan yaitu dianggap sangat peka dengan teknologi amplifikasi DNA, waktu *running* sampel yang dipakai cukup cepat, dan sensitivitas maupun spesifitasnya tinggi. Namun demikian, kekurangan pada pemeriksaan Real Time PCR ini baru dipakai sebagai sarana penelitian, dan belum untuk pemeriksaan rutin dikarenakan memiliki biaya pemeriksaan yang cukup mahal serta pengerjaan yang cukup sulit karena perlu pelatihan / pembelajaran khusus untuk petugas (Supadmi & Purnamaningsih, 2019).

## B. Kerangka Teori



Gambar 2.3 Kerangka Teori

### C. Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Kerangka Konsep

### D. Hipotesis

1. H<sub>0</sub> : Tidak ada perbedaan yang signifikan antara metode CLIA dan Real Time PCR.
2. H<sub>1</sub> : Adanya perbedaan antara metode CLIA dan Real Time PCR.