

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. DNA

DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) merupakan asam nukleat yang berfungsi menyimpan dan mentransfer informasi genetik. Informasi ini diterjemahkan untuk menjalankan berbagai fungsi dalam tubuh. Bagian terkecil dari DNA yang membawa informasi genetik disebut dengan gen. Ukuran gen berbeda-beda, tergantung jenis informasi yang dikandungnya untuk membentuk protein tertentu. DNA terdiri dari tiga komponen utama yaitu gula pentosa, asam fosfat dan basa nitrogen (Effendi, 2020).

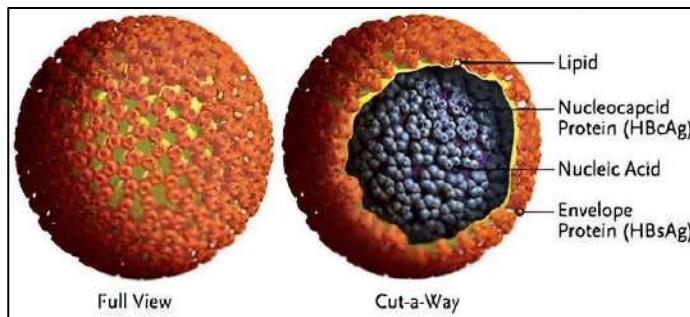
Struktur DNA berbentuk heliks ganda yang terdiri dari dua untai polinukleotida. Kedua rantai ini saling terhubung melalui ikatan hidrogen yang lemah. Ikatan ini terbentuk antara pasangan basa nitrogen, yaitu basa purin dan pirimidin. DNA mempunyai beberapa fungsi, yaitu mengidentifikasi gen untuk menentukan garis keturunan sehingga dapat diteruskan ke generasi berikutnya, mengontrol perkembangan dan metabolisme tubuh, dan berfungsi untuk informasi genetik dan sifat lahir dapat ditemukan melalui pemeriksaan DNA (Effendi, 2020).

2. HBV DNA

HBV DNA adalah pengukuran langsung jumlah virus atau *viral load* Hepatitis B. Virus DNA mengukur tingkat aktivitas virus. Deteksi HBV DNA sebagai tanda replikasi aktif dan tingkat tinggi HBV DNA terkait dengan perkembangan yang lebih cepat dan risiko yang lebih tinggi. Uji HBV DNA berguna dalam penilaian untuk mengetahui respon terhadap pengobatan yang diberikan (Song and Kim, 2016).

Virus Hepatitis B adalah penyebab peradangan pada organ hati. Virus ini adalah anggota dari genus Orthohepadnavirus family Hepadnavirus, dengan materi genetik berupa DNA yang berukuran sangat kecil 40-42 nm yang terdiri dari partikel bulat dan mempunyai selubung fosfolipid (Siswanto, 2020). Masa inkubasi bervariasi antara 15 sampai

180 hari tetapi rata-rata inkubasi 60 hingga 90 hari. Bagian dalam virus ini terdiri dari inti atau nukleokapsid dan bagian luaranya terdiri dari protein envelope lipoproteoin. Genom virus Hepatitis B terdiri dari molekul DNA beruntai ganda yang terdiri dari 3.200 nukleotida (Maharani dan Noviar, 2018).



Sumber : (Maharani and Noviar, 2018)

Gambar 2. 1 Bagian virus Hepatitis B

Penularan dari virus Hepatitis B ditularkan melalui jalur parental, seksual dan vertikal yang diakibatkan dengan adanya kontak fisik secara langsung dengan darah dan cairan tubuh seperti air liur, air mata, cairan serebrospinal, asiter, cairan sperma dan air susu ibu dari tubuh penderita penyakit Hepatitis B (Siswanto, 2020). Diagnosis klinis Hepatitis B akut ditentukan dengan terdeteksinya HbsAg dan anti-HBc serta keberadaan DNA HBV. Sedangkan diagnosis infeksi Hepatitis B kronis ditegakkan berdasarkan keberadaan HbsAg selama lebih dari 6 bulan (Song and Kim, 2016).

Untuk mendeteksi virus Hepatitis B, ada dua jenis tes yang bisa digunakan, yaitu tes serologi dan tes molekuler. Tes serologi bertujuan mengetahui respons kekebalan tubuh terhadap virus Hepatitis B dengan memeriksa sejumlah antigen dan antibodi. Sementara itu, tes molekuler digunakan untuk memastikan keberadaan virus Hepatitis B dan menghitung jumlah virus yang ada dalam tubuh (*viral load*). Karena infeksi Hepatitis B kronis sering kali tidak menunjukkan gejala (*asintomatik*), diperlukan metode diagnostik sehingga cepat dan akurat untuk mendeteksi infeksi ini (Christian *et al.*, 2024).

3. Isolasi Darah Kering (*dried blood spots*)

Dried Blood Spots (DBS) adalah metode alternatif untuk mengumpulkan dan menyimpan sampel darah dengan cara meneteskan darah pada kertas saring (Maliza dkk, 2021). Teknik ini digunakan untuk berbagai keperluan, seperti diagnosis medis, pemantauan kadar obat dalam tubuh dan analisis genetik (Choi *et al.*, 2014). Metode ini sangat berguna di industri farmasi, rumah sakit dan pusat penelitian terutama ketika hanya tersedia sampel darah dalam jumlah sedikit, lokasi pengambilan sampel sulit dijangkau, pemrosesan serta pengiriman sampel (Supandi, 2016).

DBS juga dapat menjaga kualitas asam nukleat, protein dan asam amino (Borremans, 2014). Metode DBS digunakan untuk pengumpulan dan analisis darah lebih mudah digunakan dibandingkan *venipuncture* karena darah diambil dari tumit atau ujung jari. Keuntungan menggunakan metode DBS yaitu :

- a. Sampel diambil dengan menggunakan lancet steril dari ujung jari atau tumit, sehingga mudah diambil tanpa tenaga *phlebotomist*.
- b. Volume sampel yang diperlukan sedikit, sehingga memudahkan pengambilan pada anak-anak dan bayi.
- c. Analit lebih stabil daripada penyimpanan di *freezer*.
- d. Pengiriman dan penyimpanan lebih murah sehingga tidak perlu *ice box* atau *dry ice*.
- e. Memberikan keamanan karena patogen tidak aktif dalam kondisi kering, yang dapat mengurangi risiko kontaminasi (Supandi, 2016).

4. Kertas Saring (*Whatman*)



Sumber : (Cytivalifesciences, 2023)
Gambar 2. 2 kertas saring *whatman* No.3

Kertas saring *Whatman* adalah kertas selulosa yang dibuat dengan menggunakan persentase alfa-selulosa yang tinggi. Kandungannya merupakan tanda konsistensi dan kualitasnya yang tinggi karena alfa selulosa denggap sebagai bentuk selulosa yang paling stabil (*Whatman*, 2013). Kertas saring *Whatman* berfungsi untuk memisahkan endapan atau menyaring larutan yang akan dianalisa di laboratorium (Andalusi dan Ratih, 2021). Kertas saring *Whatman* memiliki serangkaian filter kualitatif yang diperkuat dengan air yang dikenal karena memberikan kekuatan basah yang tinggi dan lebih baik karna mengandung sejumlah resin yang stabil secara kimia (*Whatman*, 2013).

Terdapat dua jenis kertas saring, yaitu kertas saring kualitatif digunakan untuk penyaringan dalam analisis kimia kualitatif dan kertas saring kuantitatif digunakan untuk analisis kimia kuantitatif. Terdapat beberapa tingkatan kertas saring dan terbagi menjadi beberapa tingkatan menurut retensi partikel, ketebalan dan berat. Salah satu jenis kertas yaitu kertas saring *Whatman* No.3 yang memiliki kapasitas pori 6 μm , sangat baik untuk penyimpanan dapat menahan endapan yang lebih besar dan daya serap yang tinggi sehingga jenis kertas saring ini cocok digunakan untuk menyaring partikel halus (*Whatman*, 2013). Dalam menganalisis sampel di laboratorium kertas saring memiliki beberapa keuntungan yaitu:

- a. Mudah digunakan
- b. Biaya relatif murah
- c. Volume sampel yang dibutuhkan sedikit
- d. Dapat digunakan untuk menyimpan dan mengawetkan spesimen saat dikirim ke laboratorium
- e. Efektif dalam memisahkan partikel halus dari cairan (Smit *et al.*, 2014).

5. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Salah satu metode yang menggunakan proses sintesis enzimatis untuk mengamplifikasi atau memperbanyak DNA secara *in vitro* adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Agustiningsih dkk, 2020). Prinsip dasar PCR adalah memperbanyak fragmen DNA dengan enzim polymerase pada suhu tinggi yang dilakukan secara berulang (Nurhayati,

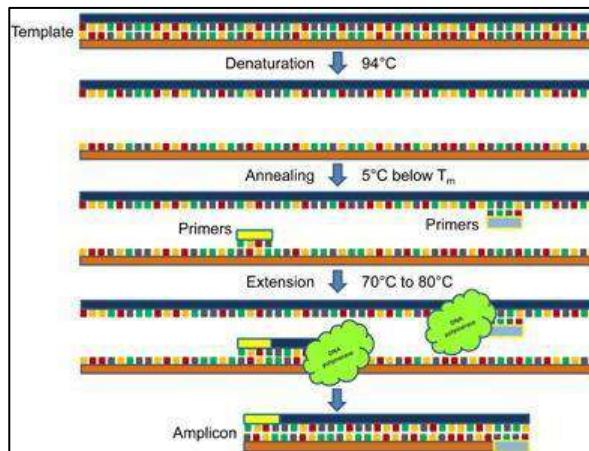
2017). Analisis genetik, rekayasa genetik, diagnosis klinis dan analisis forensik karena sangat akurat dalam penggadaan DNA. Kelebihan menggunakan PCR adalah suhu yang bisa tinggi dan rendah dengan cepat, PCR juga bekerja dengan komponen dalam jumlah yang sedikit (Novel, 2010).

a. Komponen utama Pada proses PCR yaitu :

- 1) DNA *Template* atau cetakan, yaitu fragmen DNA untuk dilipat gandakan.
- 2) *Primers*, yaitu DNA utas tunggal atau oligonukleotida pendek yang komplementer dengan template *primer* DNA target dan membatasi reaksi pemanjangan rantai atau *polimerase* DNA. *Primer* terdiri dari dua jenis yaitu :
 - a) *Forward primer* : ujung 5'-fosfat dari oligonukleotida memiliki sekuen yang sama dengan salah satu rantai DNA catakan.
 - b) *Reserve primer* : oligonukleotida yang memiliki sekuen DNA yang sama pada ujung 3'OH rantai DNA yang lain.
- 3) *dNTP's (deoxynucleotida trifosfat)*, yaitu nukleotida yang membentuk dan menghasilkan untaian DNA baru. *dNTP's* mempunyai empat macam DNA yaitu, *adenin*, *cytosine*, *guanin*, dan *thymine*.
- 4) *Taq polymerase*, yaitu enzim yang mengkatalis *polymerase* nukleotida menjadi sebuah untaian DNA. *Polymerase* ini bersifat stabil pada suhu yang sangat tinggi.
- 5) *Buffer*, yaitu berfungsi untuk menjaga kestabilan pH agar bisa berjalan lebih optimal agar enzim dapat bekerja.
- 6) $MgCl_2$, yaitu berperan sebagai penyedia ion yang diperlukan untuk reaksi enzim (Agustiningsih dkk, 2020).

b. Proses PCR

Pada proses PCR melibatkan beberapa tahapan berulang biasanya 30-40 siklus. Terdapat tiga tahapan dalam proses PCR yaitu :



Sumber : (Lorenz, 2012)

Gambar 2. 3 Prinsip Pemeriksaan PCR

1) Denaturasi

Denaturasi merupakan tahapan awal pada proses PCR. Tahapan ini berfungsi untuk memisahkan untai DNA ganda menjadi untai DNA tunggal dengan proses pemanasan. Proses ini berlangsung selama 60 detik pada suhu 90^0 - 95^0 C.

2) Annealing

Annealing merupakan tahapan lanjutan dari tahap denaturasi, dimana pada tahap ini kedua primer (*forward primer* dan *reverse primer*) akan menempel pada rantai DNA target. Tahap ini berlangsung selama 30-45 detik pada suhu 50^0 - 60^0 C.

3) Elongasi

Elongasi merupakan tahapan akhir pada proses PCR dimana pada tahap ini untaian DNA baru terjadi perpanjangan, dimulai dari posisi primer yang terikat pada urutan basa nukleotida yang terletak di ujung 5' hingga ujung 3' dari untai DNA tunggal. Proses berlangsung 1-2 menit pada suhu 72^0 C (Agustiningsih dkk, 2020).

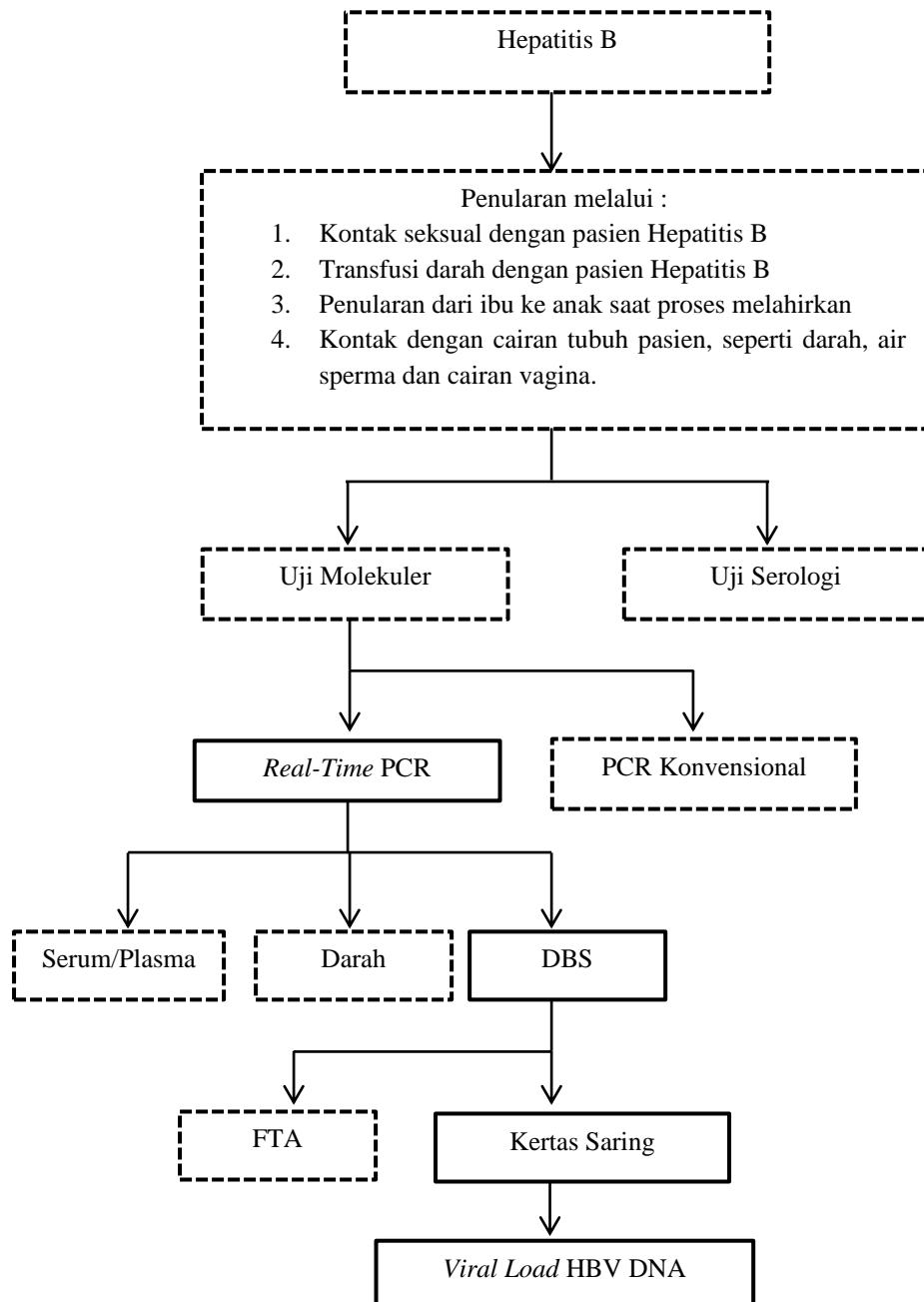
6. Real-Time PCR

Real-Time PCR merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah DNA pada awal reaksi, yang dapat mendeteksi dan menyajikan perkembangan secara *real-time* (Artika, 2022). Teknik ini menggunakan metode amplifikasi DNA yang dapat dianalisis dengan menggunakan *fluoregenic probe* dengan menggunakan

alat *thermal cycler* yang dilengkapi dengan detektor untuk membaca sinyal fluoresensi dan mengubahnya menjadi sinyal digital yang dapat dibaca oleh komputer (Agustiningsih dkk, 2020).

Kelebihan *real-time* PCR dibandingkan dengan PCR konvensional yaitu memiliki sensititas tinggi, akurat dan waktu penggerjaan yang lebih cepat dalam mengukur dan menganalisis secara kuantitatif. *Real-Time* PCR memungkinkan analisis kuantitatif dengan hasilnya yang menyertakan *viral load* jumlah DNA (Agustiningsih dkk, 2020). *Viral load* dapat mengukur jumlah DNA yang terdeteksi pada DNA target. *Viral load* digunakan untuk mengidentifikasi tahap infeksi, dapat memantau perkembangan pengobatan, menentukan terapi pencegahan dan mengetahui tingkat keparahan penyakit (Pandey *et al.*, 2023).

B. Kerangka Teori



Keterangan :

- : Diteliti
- - - - : Tidak diteliti

C. Kerangka Konsep

Variabel Independen

Variasi waktu penyimpanan 1, 3, dan 7 hari.

Variabel Dependen

Jumlah *viral load* pada pasien positif Hepatitis B menggunakan *Real-Time PCR*

D. Hipotesis

H_0 : Tidak ada perbandingan variasi waktu penyimpanan sampel terhadap *Viral Load* pada pasien positif Hepatitis B yang diisolasi menggunakan kertas saring *Whatman No.3*.

H_a : Ada perbandingan variasi waktu penyimpanan sampel terhadap *Viral Load* pada pasien positif Hepatitis B yang diisolasi menggunakan kertas saring *Whatman No.3*.