

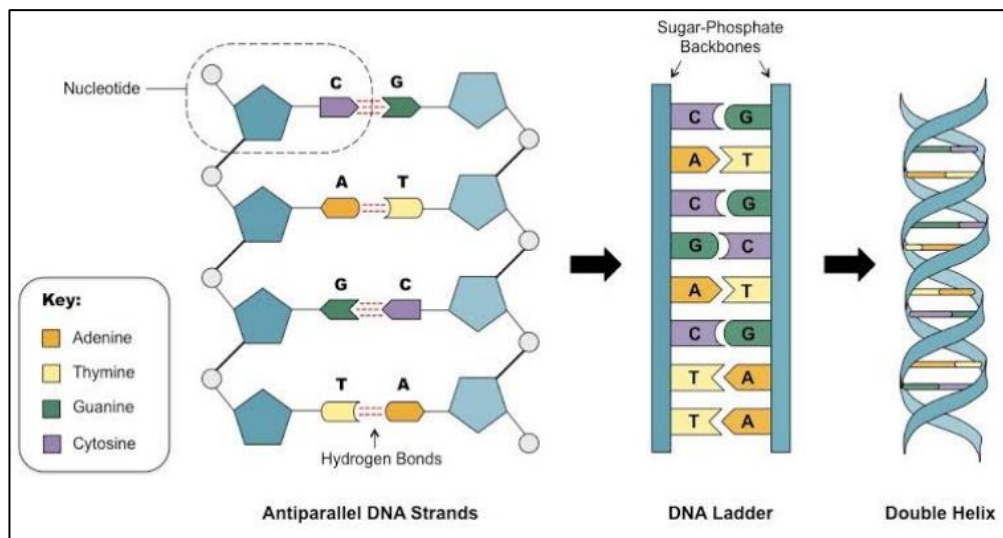
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA)

DNA (*Deoxyribo nucleic Acid*) adalah makromolekul yang tersusun oleh nukleotida. DNA berperan dalam membawa informasi genetik yang menentukan sifat-sifat yang diturunkan. Setiap nukleotida tersusun atas tiga komponen utama, yaitu fosfat, gula pentosa, dan juga basa nitrogen. Pada DNA memiliki empat jenis basa nitrogen, yaitu adenine (A), cytosine (C), guanine (G), dan thymine (T). Molekul DNA terbentuk atas empat nukleotida yang saling terhubung membentuk rantai polinukleotida, dengan basa nitrogen yang melekat pada tulang punggung yang terdiri dari gula pentosa dan fosfat. Dua rantai polinukleotida tersebut saling terikat melalui ikatan hidrogen antara pasangan basa nitrogen: adenine (A) berpasangan dengan thymine (T), dan guanine (G) berpasangan dengan cytosine (C). Kedua rantai ini berpilin membentuk struktur heliks ganda yang merupakan fondasi penyusunan informasi genetik pada organisme (Nikmatullah dkk., 2023).



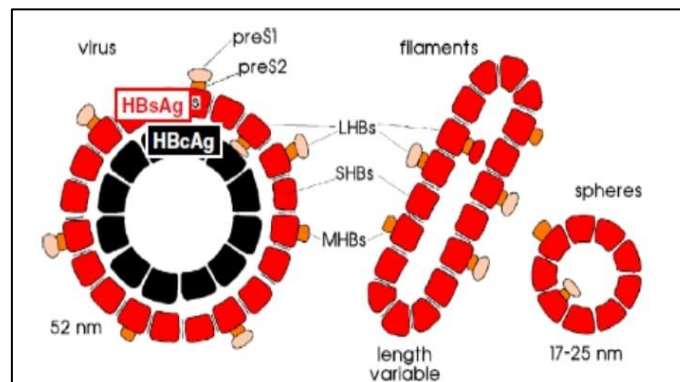
Sumber : Asypini, 2019

Gambar 2. 1 Struktur DNA.

2. HBV DNA

Hepatitis B Virus (HBV) merupakan virus yang tergolong dalam famili Hepadnaviridae yang dapat menyebabkan infeksi sementara ataupun terus-menerus. Jika tidak diobati, infeksi HBV kronis menyebabkan kerusakan hati parah yang berujung pada karsinoma hepatoseluler (kanker hati) (Yulia, 2019).

Individu yang terinfeksi virus hepatitis B, apabila sampel darahnya diperiksa dengan menggunakan mikroskop elektron, akan terlihat tiga bentuk partikel yang berbeda. Pertama, terdapat partikel berbentuk bulat yang berdiameter 20-22 nm. Kedua, partikel berbentuk batang yang berdiameter 20 nm dengan panjang 50-250 nm, kedua bentuk partikel tersebut tidak mengandung asam nukleat dan diduga hanya merupakan lapisan lipoprotein luar dari virus Hepatitis B (HBV). Bentuk ketiga, terdapat partikel yang berdiameter 42 nm dan partikel ini mengandung asam nukleat, yang merupakan virion lengkap dari HBV dan disebut partikel Dane (Yulia, 2019).



Sumber : Jalaluddin, 2018

Gambar 2. 2 Struktur Molekuler virus hepatitis B

Partikel Dane adalah struktur yang kompleks, di mana lapisan terluarnya mengandung lipid dan tiga jenis polipeptida dari gen S, yaitu protein permukaan *large* (L), *middle* (M), dan *small* (S), yang juga dikenal sebagai pre-S1, pre-S2, dan HBsAg (antigen permukaan hepatitis B). Di dalamnya, terdapat lapisan yang disebut nukleokapsid yang berdiameter 27 nm. Nukleokapsid ini berisi protein inti atau hepatitis B *core* antigen (HBcAg), DNA virus Hepatitis B, dan enzim DNA *polymerase*. DNA virus

hepatitis B berbentuk sirkuler dan terdiri dari dua utas DNA ganda (Jalaludin, 2018).

3. PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Polimerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik molekuler yang digunakan guna memperbanyak DNA secara *in vitro* yang dilakukan secara enzimatik menggunakan enzim polimerase pada suhu tinggi yang dilakukan secara berulang-ulang (Mursyidin, 2024). PCR memiliki kemampuan untuk mengenali urutan DNA secara spesifik dan kemudian dengan cepat serta tepat membuat banyak salinan DNA. Teknik ini dapat memperbanyak sekuens DNA yang awalnya sedikit menjadi jumlah yang lebih banyak. Proses penggandaan DNA menggunakan PCR sangat akurat, sehingga sering digunakan dalam berbagai bidang seperti analisis genetik, diagnosis medis, rekayasa genetik, dan analisis forensic (Hidayat, 2019). PCR melibatkan 3 tahapan, yaitu tahap pemisahan utas DNA atau denaturasi yang dilakukan pada suhu tinggi (94-95°C), tahap *annealing* atau penempelan primer yang dilakukan pada suhu 50-60°C dan langkah terakhir yaitu pemanjangan primer menjadi utas baru DNA dengan enzim DNA polimerase yang dilakukan di suhu 72°C (Setyawati dkk., 2021).

Proses PCR membutuhkan oligonukleotida pendek (primer DNA) dimana perannya sangat penting dalam memulai proses PCR. Setelah berlangsungnya pemisahan utas ganda menjadi utas tunggal pada DNA, temperatur akan menurun dan pada saat itu juga primer akan menempel pada utas tunggal yang sudah dipisahkan (Puspitaningrum dkk., 2018).

Hingga sekarang, teknologi PCR telah berkembang bersamaan dengan perkembangan pada bidang biologi molekuler. PCR dimanfaatkan guna mengidentifikasi penyakit genetik, infeksi yang disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti virus, jamur, bakteri, parasit dan lain-lain (Nurhayati, 2017).

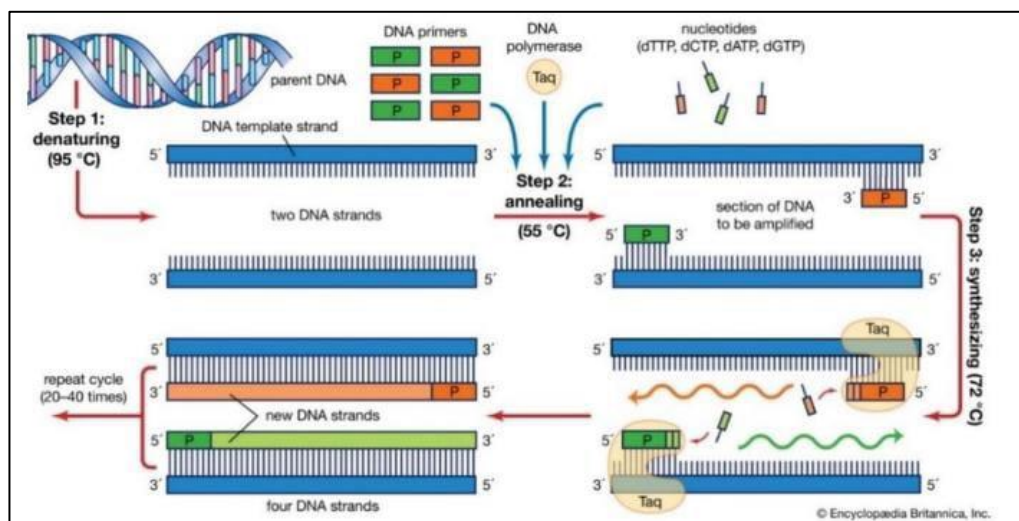
a. Prinsip Dasar PCR

Pada dasarnya prinsip dasar PCR serupa dengan proses replikasi DNA yang terjadi pada sel (*in vivo*). Pada proses PCR, untai ganda DNA akan

direaksikan dengan komponen PCR seperti enzim DNA polymerase, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTPs), $MgCl_2$, dan primer yang akan mengawali proses sintesis DNA (Agustiningsih dkk., 2020). PCR diawali ketika utas ganda DNA terpisah saat proses denaturasi, lalu dilanjutkan dengan proses penempelan primer pada masing-masing utas tunggal yang kemudian akan diperpanjang dengan enzim DNA polimerase hingga terbentuknya utas DNA yang baru. PCR memperbanyak cetakan DNA yang jumlahnya sedikit dengan mengalami berbagai siklus amplifikasi hingga jumlah perbanyakan DNA menjadi berjuta kali lipat (Nurhayati, 2017).

b. Tahapan Proses PCR

Proses perbanyakan DNA melibatkan beberapasiklus berulang yang biasanya terjadi dalam 30-40 siklus. Satu siklus PCR terdiri dari 3 tahapan, yaitu tahap denaturasi, annealing dan yang terakhir elongasi (Agustiningsih dkk., 2020).



Sumber: Hidayat, 2020

Gambar 2. 3 Siklus dalam PCR

1) Denaturasi utas ganda DNA

Denaturasi DNA adalah proses memisahkannya utas ganda menjadi suatu utas tunggal dengan menggunakan suhu tinggi. Pada tahap ini, penting untuk memisahkan utas cetakan DNA dengan sempurna. Denaturasi adalah proses yang berlangsung dengan sangat cepat. Waktu standar yang digunakan antara 0 hingga 60 detik dengan suhu yang digunakan yaitu berkisar antara 94-95°C (Mursyidin, 2024).

2) *Annealing*

Tahapan *Annealing* adalah tahap penempelan primer terhadap cetakan DNA. Proses *annealing* berlangsung dalam waktu yang cepat dimana waktu yang biasanya digunakan yaitu antar 30 hingga 60 detik. Suhu *annealing* bergantung pada kandungan GC primer dan perlu disesuaikan. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi dapat menghalangi primer untuk menempel yang menyebabkan sintesis DNA tidak terjadi, sedangkan jika suhu terlalu rendah, primer dapat menempel secara tidak spesifik. Suhu *annealing* yang umum digunakan berkisar antara 50-55°C (Mursyidin, 2024).

3) Ekstensi/Elongasi

Tahapan ketiga pada amplifikasi PCR yaitu tahap ekstensi atau elongasi. Pada tahap ini, DNA polimerase akan membuat utas DNA baru dengan memperpanjang ujung 3' dari primer. Taq Polymerase dapat menambahkan 6 hingga 100 basa perdetik dalam kondisi yang ideal. Waktu yang digunakan untuk mengamplifikasi tiap 1kb (1000bp) DNA yaitu 60 detik. Suhu yang umum digunakan dalam tahap elongasi adalah 72°C. Suhu ini hampir mencapai suhu optimal untuk Taq Polymerase, yaitu 75°C (Mursyidin, 2024).

4. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu teknik untuk memisahkan molekul yang berdasarkan bentuk, ukuran, dan berat molekul dengan menggunakan medan listrik. Medium yang digunakan biasanya berbentuk gel. Faktor-faktor seperti ukuran molekul, konsentrasi gel, kekuatan medan listrik, dan lain-lain mempengaruhi kecepatan perpindahan molekul. Semakin besar ukuran molekul, maka semakin lama perpindahannya, begitu pula sebaliknya (Novel, 2010).

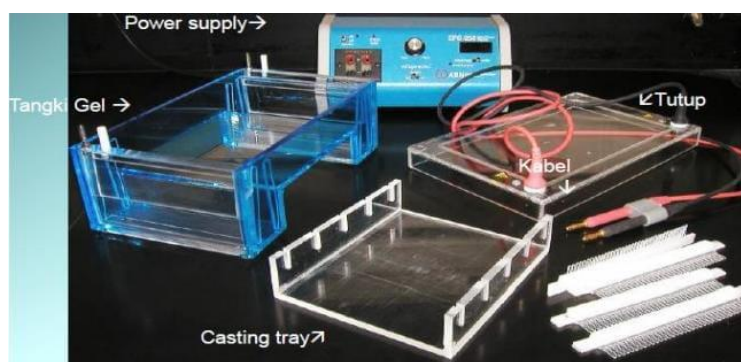
DNA memiliki muatan listrik negatif, oleh karena itu, ketika DNA ditempatkan pada medan listrik, molekul tersebut bergerak menuju kutub positif (anoda). Proses migrasi DNA ini tidak hanya dipengaruhi oleh medan listrik yang diberikan, tetapi juga oleh sifat fisik molekul DNA itu sendiri, seperti bentuk dan ukurannya. Molekul DNA yang ukurannya lebih kecil

bergerak lebih cepat dibandingkan molekul yang ukurannya lebih besar, karena hambatan yang dialami saat melewati medium gel lebih kecil. Medium gel yang digunakan dalam elektroforesis biasanya terbuat dari bahan seperti agarosa atau poliakrilamida. Gel ini memiliki struktur pori-pori kompleks yang memungkinkan pemisahan molekul DNA berdasarkan ukurannya, sehingga fragmen DNA yang berbeda dapat terpisah dengan jelas (Maksum dkk., 2019).

Analisis pemisahan molekul DNA dengan ukuran kurang dari 500 nukleotida biasanya menggunakan medium gel poliakrilamid, karena pori-pori gel poliakrilamid lebih kecil dibandingkan dengan molekul DNA yang akan melewatinya. Sementara itu, gel agarose memiliki pori-pori yang lebih besar, sehingga cocok digunakan untuk pemisahan molekul DNA yang ukurannya lebih besar (Puspitaningrum dkk., 2018).

5. Elektroforesis Gel Agarosa

Pemilihan medium untuk elektroforesis sangat memengaruhi keberhasilan prosedur. Elektroforesis pada umumnya menggunakan 2 medium yaitu gel agarosa dan gel poliakrilamid. Gel agarosa adalah medium standar guna mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA dan RNA. Gel ini memiliki keuntungan yaitu lebih mudah digunakan, lebih cepat memisahkan molekul dan tidak bersifat toksik. Kekurangannya adalah gel ini sangat sensitif dan juga rentan rusak yang berarti harus dikerjakan dengan hati-hati (Harahap, 2018).

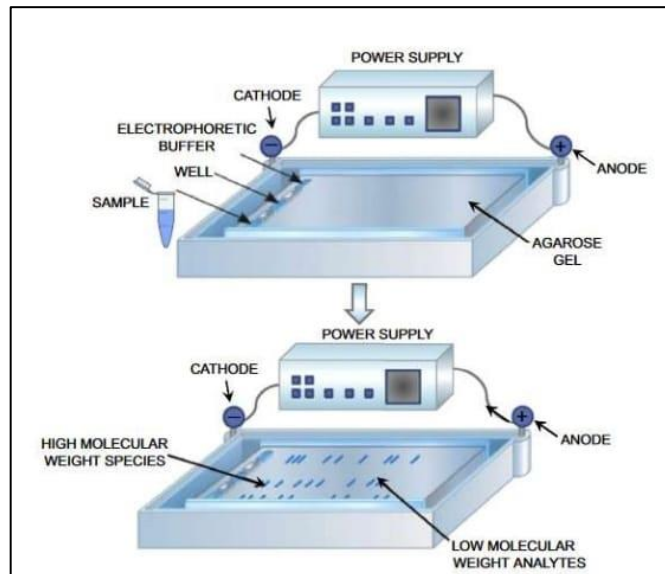


Sumber: Nurhayati, 2017

Gambar 2. 4 Peralatan Elektroforesis Gel Agarose.

Elektroforesis gel agarosa merupakan metode yang paling efektif digunakan untuk memisahkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran mulai

dari 100 – 25.000 bp (*basepair*). Pemisahan DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa dimulai saat DNA dimasukkan ke sumuran gel yang sudah dialiri arus terlebih dahulu. Molekul DNA mengandung gugus fosfat yang muatannya negatif, maka dari itu ketika diposisikan dalam medan listrik, fragmen DNA akan berpindah ke anoda yang muatannya positif (Lee *et al.*, 2012).



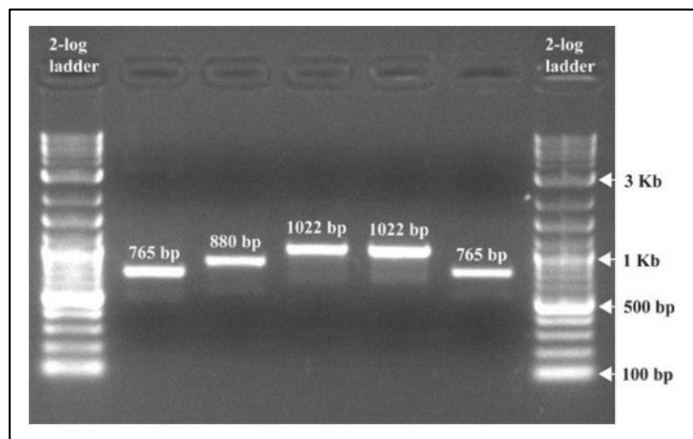
Sumber: Nikmatullah, 2023

Gambar 2. 5 Tahapan Elektroforesis Agarose.

Kecepatan perpindahan elektroforesis DNA melalui gel agarosa ditentukan oleh beberapa hal, yaitu:

- Ukuran molekul DNA : Semakin kecil ukuran molekul maka perpindahannya lebih cepat
- Konsentrasi gel agarosa : Semakin rendah konsentrasi gel yang digunakan, laju perpindahan semakin cepat dikarenakan berkurangnya gesekan molekul.
- Tegangan yang digunakan : Ketika tegangan ditingkatkan, molekul DNA berukuran besar akan bermigrasi dengan kecepatan lebih cepat daripada molekul kecil.
- Konformasi DNA : Merujuk pada bentuk tiga keadaan/bentuk molekul DNA (linear, supercoiled, atau sirkular) yang memengaruhi cara DNA bergerak melalui gel.

- e. Bufer yang digunakan untuk elektroforesis : Buffer dengan ion yang tinggi akan meningkatkan panas sehingga aliran listrik pun akan meningkat (Mursyidin, 2024).

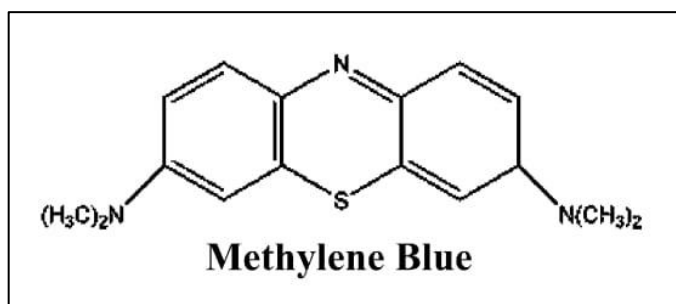


Sumber: Lee, 2012

Gambar 2. 6 Gel Pasca Elektroforesis.

6. Methylene Blue

Methylene Blue (*Methylthionine chloride*) merupakan senyawa kimia dengan struktur $C_{16}H_{18}N_3SCl$ (Rizki dkk., 2019). Methylene blue sering digunakan pada bidang kimia, biologi, ilmu pengobatan dan industri pewarnaan. Senyawa ini bersifat kationik dan larut dalam air (Riwayati dkk., 2019). Kelebihan penggunaan methylene blue jika dibandingkan dengan pewarna yang lain yaitu methylene blue memiliki harga yang relatif lebih murah dan juga terjangkau (Huda, 2018).



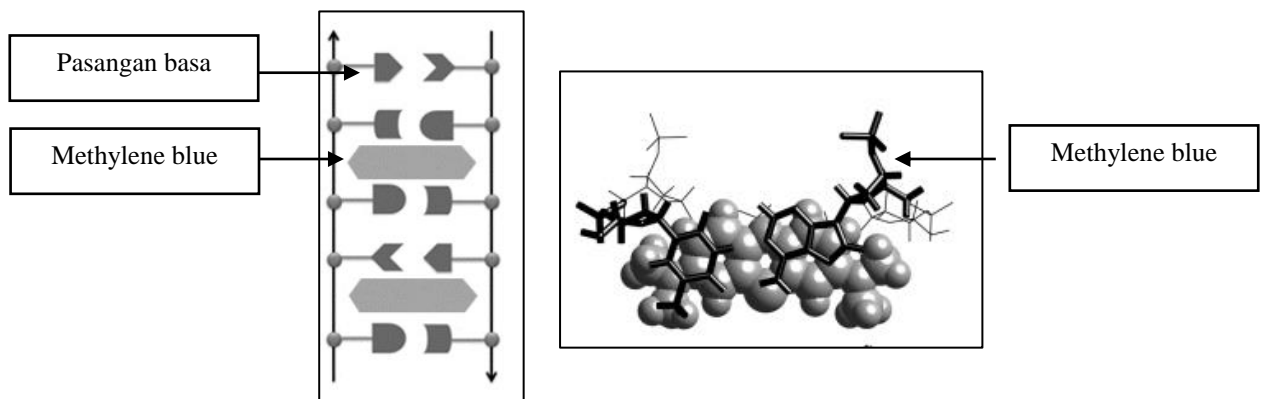
Sumber: Nafisi, 2006

Gambar 2. 7 Struktur Kimia Methylene Blue.

Metilen biru adalah agen fotosensitisasi yang sering digunakan dan juga merupakan alternatif dari etidium bromida (EtBr). Methylene Blue digunakan dalam berbagai aplikasi, seperti pewarnaan dalam histokimia, reagen biokimia, dan juga telah dikembangkan untuk mengobati berbagai penyakit seperti infeksi mikroba, malaria, kanker, serta keracunan sianida.

Methylene blue berikatan dengan DNA melalui dua cara utama, yaitu dengan cara semi-interkalasi dan elektrostatik. Sebagai interkalator, struktur methylene blue mirip dengan ethidium bromida (EtBr). Methylene blue dapat berinteraksi dengan DNA melalui beberapa mekanisme yang berbeda, yang bergantung atas urutan nukleotida, kekuatan larutan ion, serta perbandingan konsentrasi methylene blue dan DNA (Rohs, 2012).

Larutan methylene blue yang digunakan pada setiap perendaman adalah larutan methylene blue yang baru, sehingga jumlah partikel methylene blue juga tidak berkurang pada setiap perlakuan. Mekanisme pengikatan methylene blue dan DNA terjadi melalui ikatan interkalasi (Rohs, 2012).



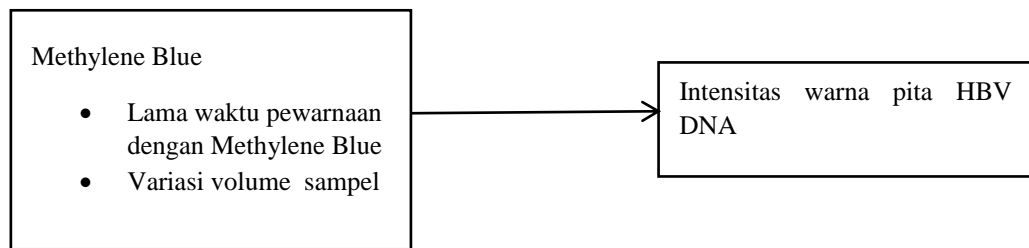
Sumber: (Mursyidin, 2024; Rohs, 2012)
Gambar 2. 8 Proses interkalasi Methylene Blue dan DNA

Ikatan interkalasi terjadi ketika struktur cincin aromatik methylene blue planar atau heteroaromatik disisipkan di antara pasangan basa DNA virus yang berdekatan tanpa mengganggu susunannya secara keseluruhan. Ketika interkalasi terjadi, jarak vertikal antara pasangan basa DNA virus menjadi lebih jauh, mengakibatkan perubahan tingkat rotasi (sudut puntiran) struktur DNA virus. (Merdekawati, 2021).

B. Kerangka Konsep

Variabel Independen

Variabel Dependen

**C. Hipotesis**

Ho : Pewarna Methylene Blue tidak sensitif sebagai alternatif pewarna DNA pada pasien positif Hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.

Ha : Pewarna Methylene Blue sensitif sebagai alternatif pewarna DNA pada pasien hepatitis B pada proses elektroforesis agarose.