

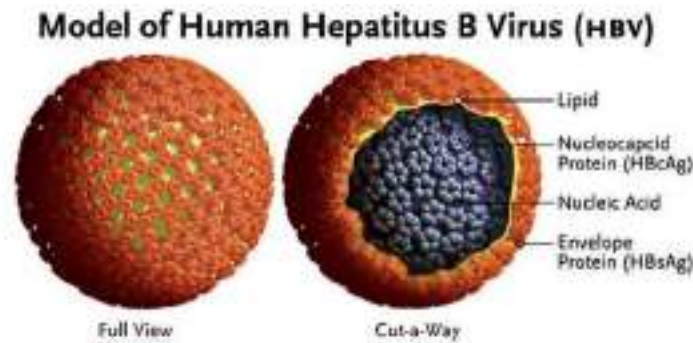
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Teori

1. Virus Hepatitis B (HBV)

Virus hepatitis B (HBV) merupakan virus yang menginfeksi hati mulai dari infeksi akut maupun kronis, bila berlanjut dapat menjadi sirosis hati maupun kanker hati (WHO, 2024). Virus hepatitis B (HBV) merupakan spesies dari genus *Orthohepadnavirus* dan anggota dari keluarga *Hepadnaviridae* berdiameter 40-42 nm. Masa inkubasi virus ini sekitar 15-180 hari, dengan rata-rata masa inkubasi 60-90 hari (Maharani & Noviar, 2018).



Sumber: Maharani & Noviar, 2018

Gambar 2.1 Struktur Virus Hepatitis B (HBV)

Virus hepatitis B (HBV) merupakan jenis virus DNA berbentuk bulat dan berlapis untai ganda dengan 3200 nukleotida (Maharani & Noviar, 2018). *Envelope protein* (HBsAg) adalah protein yang berada di selubung terluar dari virus hepatitis B, sedangkan *nukleokapsid* atau *core* (HBcAg) adalah protein yang berada di selubung dalam dari virus. Dalam *nukleokapsid* terdapat *nucleic acid* yang berisi HBV DNA dan enzim DNA *polymerase* berfungsi untuk mereplikasi atau menggandakan virus (Suharjo & Cahyono, 2010).

Penyakit yang ditimbulkan oleh virus ini adalah penyakit hepatitis B akut dan kronis, sirosis hati, maupun kanker hati. Penularan HBV melalui kontak langsung pada cairan organik yang terinfeksi seperti darah. Salah satu jalur utama penularannya adalah melalui hubungan seksual, dari ibu ke bayi selama kelahiran atau setelah kelahiran, dan melalui transfusi darah (Candotti &

Laperche, 2018). Selain itu, virus hepatitis B juga terdapat di sebagian besar cairan tubuh, termasuk air liur dan air mani sehingga dapat menular melalui kontak langsung melalui suntikan (Sievert dkk., 2010). Virus ini menimbulkan beberapa gejala pada penyakit hepatitis B berupa ikterus, mual dan muntah, kehilangan nafsu makan, nyeri pada tubuh, dan kelelahan (Maharani & Noviar, 2018).

2. Epidemiologi Hepatitis B

Saat ini, infeksi virus hepatitis B tetap menjadi masalah kesehatan bagi masyarakat. Infeksi HBV menjadi penyebab utama pada hepatitis kronis, sirosis, maupun kanker hati di dunia. Pola penyebaran HBV di negara Asia khususnya Indonesia adalah dari ibu ke anak selama proses kehamilan, persalinan, maupun setelah kelahiran. Studi menunjukkan bahwa 70% kanker hati di negara-negara Asia, termasuk Indonesia disebabkan oleh virus Hepatitis B (Suharjo & Cahyono, 2010).

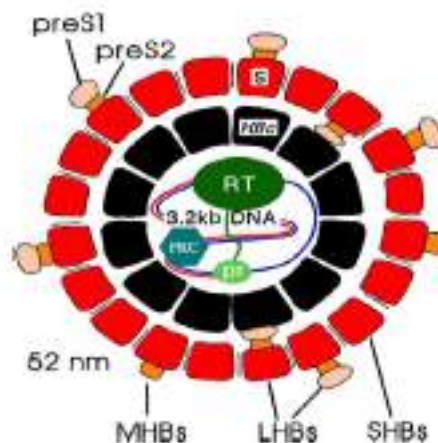
Menurut WHO, pada tahun 2022 diperkirakan sebanyak 254 juta orang terinfeksi hepatitis B kronis, dimana setiap tahun terdapat kasus infeksi baru sebanyak 1,2 juta jiwa. Kemudian, di tahun yang sama hepatitis B juga menjadi penyebab kasus kematian sebanyak 1,1 juta jiwa akibat sirosis dan karsinoma hepatoseluler (WHO, 2024). Secara global, pada tahun 2022-2023 terjadi peningkatan prevalensi infeksi virus Hepatitis B (HBV). Pada tahun 2022 sebanyak 62,4 juta jiwa terdiagnosis Hepatitis B dengan angka kematian mencapai 1,1 juta jiwa. Sedangkan pada tahun 2023 terjadi peningkatan kasus sebesar 63,3 juta jiwa terdiagnosis hepatitis B, dengan jumlah angka kematian mencapai 1,1 juta jiwa akibat penyakit sirosis dan karsinoma hepatoseluler (CDA Foundation, 2023).

Prevalensi infeksi virus hepatitis B (HBV) di Indonesia juga mengalami kenaikan di tahun 2022-2023. Pada tahun 2022, diperkirakan sebanyak 555.593 jiwa terinfeksi virus hepatitis B (HBV) dengan angka kematian mencapai 61.628 jiwa. Sedangkan di tahun 2023, diperkirakan sebanyak 574.296 jiwa terinfeksi virus hepatitis B (HBV) dengan jumlah angka kematiannya sebesar 63.164 (CDA Foundation, 2023). Berdasarkan Data Riset Kesehatan Dasar (2018), prevalensi kasus hepatitis B di Indonesia telah mencapai 1.017.290 jiwa

(Riskesdas Nasional, 2018). Sementara di Provinsi Lampung prevalensi kasus hepatitis B telah tercatat mencapai 31.462 jiwa, dimana wilayah Kota Bandar Lampung kasus terinfeksi virus hepatitis B mencapai 3.878 jiwa (Riskesdas Provinsi, 2018).

3. HBV DNA

Virus hepatitis B (HBV) merupakan molekul DNA berbentuk sirkuler dan berlapis untai ganda dengan 3200 nukleotida (Maharani & Noviar, 2018). Struktur genom dari virus hepatitis B (HBV) sangat kompleks, dimana selubung terluarnya mengandung lipid dan ketiga polipeptida gen S, yaitu *large* HBs (LHBs), *medium* HBs (MHBs), dan *small* HBs (SHBs) atau dikenal juga sebagai pre-S1, pre-S2, dan HBsAg (*Hepatitis B Surface Antigen*). Sedangkan bagian selubung dalamnya terdapat lapisan *nukleokapsid* atau *core* yang berisi HBcAg (*Hepatitis B Core Antigen*), DNA virus hepatitis B (HBV DNA), dan enzim DNA *polymerase* (Jalaluddin, 2018).



Sumber: Jalaluddin, 2018
Gambar 2.2 Struktur Genomic HBV

HBV DNA merupakan pengukuran langsung terhadap *viral load*, yang menunjukkan aktivitas replikasi virus. DNA dapat dideteksi pada tahap awal infeksi (1 bulan setelah infeksi HBV) dan meningkat hingga mencapai puncak sekitar 3 bulan setelah terpapar HBV. Pengujian HBV DNA dijadikan sebagai acuan untuk memulai terapi antivirus dan memantau pengobatan yang sesuai untuk pasien hepatitis B (Song & Kim, 2016).

Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) adalah molekul yang membentuk kromosom terdiri dari deoksiribosa, gula pentosa, dan basa-basa nukleotida (Fatchiyah dkk., 2011). *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) memiliki informasi genetik dari semua makhluk hidup yang terletak di dalam inti sel dan tersusun dengan rapi membentuk kromosom. Oleh karena itu, untuk mendapatkan DNA perlu dilakukannya prosedur khusus di laboratorium tertentu dengan menggunakan teknik pemurnian DNA (Puspitaningrum dkk., 2018).

Tahapan pertama dari analisis DNA adalah ekstraksi/isolasi DNA. Dalam hal ini, prosedur laboratorium sangat diperlukan untuk memecah/merusak dinding sel dan membran inti. DNA dipisahkan dari bagian-bagian lainnya seperti lipid, protein, dan RNA. Selama proses ekstraksi/isolasi DNA tersebut, DNA harus diperhatikan atau dijaga untuk mendapatkan hasil rantai DNA yang panjang (Fatchiyah dkk., 2011).

Prinsip kerja tahapan ekstraksi/isolasi dan purifikasi DNA terdiri dari proses pemecahan membran sel (lisis sel) menggunakan bantuan enzim, proses penghilangan protein menggunakan pelarut organik, proses penghilangan RNA yang dilakukan secara enzimatis menggunakan RNase, proses presipitasi DNA, pengukuran kemurnian dan kuantitas DNA (Puspitaningrum dkk., 2018).

4. Metode Pemeriksaan HBV DNA

Uji diagnostik HBV adalah uji pendeteksian penanda (marker) virus hepatitis B yang dapat dilakukan menggunakan berbagai macam pemeriksaan seperti pemeriksaan serologis, biokimia, dan molekuler (Abbas dkk., 2022). Beberapa metode untuk mendeteksi virus hepatitis B diantaranya, metode *Immunokromatografi Assay* dengan Rapid Test, metode *Enzyme Immuno Assay* (EIA) atau *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), metode *Chemiluminescence Immuno Assay* (CLIA), metode *Nucleic Acid Amplification Testing* (NAT) dan metode *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (*Real-Time PCR*) (Supadmi & Purnamaningsih, 2019). Pendekatan molekuler menjadi *gold standard* di laboratorium dalam mendeteksi adanya HBV DNA pada serum ataupun plasma menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Joniarti, 2022).

1) Pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengamplifikasi urutan DNA secara invitro menggunakan enzim *Taq Polymerase* yang melibatkan beberapa siklus berulang (menggandakan template DNA/complementary DNA (cDNA) sampai jutaan kopi urutan DNA) (Nurhayati & Darmawati, 2017). Metode PCR dalam amplifikasi DNA memiliki kemampuan untuk menaikkan jumlah urutan DNA dari jumlah awal menjadi ribuan hingga jutaan kopi. Jumlah DNA target akan meningkat dua kali lipat pada setiap siklus PCR (Fatchiyah dkk., 2011).

a. Prinsip Dasar PCR

Proses siklus yang berulang terdiri dari tahapan denaturasi, annealing, dan elongasi/ekstensi menggunakan enzim DNA *Polymerase*. Proses PCR dimulai dengan cetakan DNA yang sedikit dan jumlah DNA akan menjadi jutaan kali lipat setelah mengalami beberapa siklus amplifikasi (Nurhayati & Darmawati, 2017).

b. Komponen PCR

1. *Taq Polymerase* adalah enzim DNA *Polymerase* yang berfungsi membentuk untai DNA komplementer (cDNA) pada template DNA yang stabil dengan berbagai suhu.
2. $MgCl_2$ membantu menyediakan ion yang dibutuhkan oleh reaksi enzimatik.
3. *dNTP's* (*Deoxynucleotide Triphosphates*) merupakan bahan penyedia nukleotida dalam membentuk untai DNA baru yaitu *Adenin*, *Cytosine*, *Guanine*, *Thymine*.
4. *Buffer* berfungsi menjaga pH agar tetap ideal untuk kerja enzim.
5. *Primers* merupakan oligonukleotida pendek yang spesifik terhadap DNA target. Terdapat 2 jenis primer, yaitu:
 - a) *Forward primer* merupakan oligonukleotida yang identik dengan sekuen DNA pada ujung 5'fosfat pada rantai DNA cetakan (menempel pada DNA *anti-sense*).
 - b) *Reverse primer* merupakan oligonukleotida yang identik dengan sekuen DNA pada ujung 3'OH pada rantai DNA yang lain (menempel pada DNA *sense*).

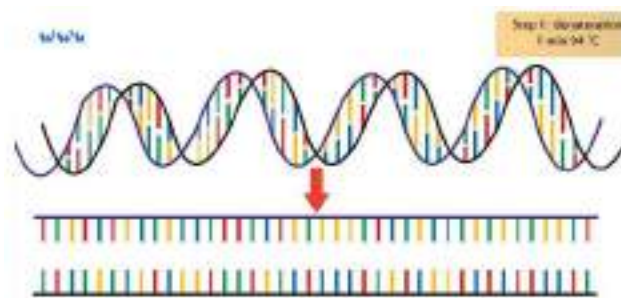
6. *Template* DNA mencakup DNA/cDNA yang akan diamplifikasi (Agustiningsih dkk., 2020).

c. Proses PCR

Pada proses PCR untuk mendapatkan DNA ampikon, maka perlu dilakukannya proses amplifikasi DNA dengan siklus yang berulang 30-40 siklus. Dalam proses amplifikasi DNA tersebut, terdapat 3 tahapan utama yang meliputi:

1. Denaturasi

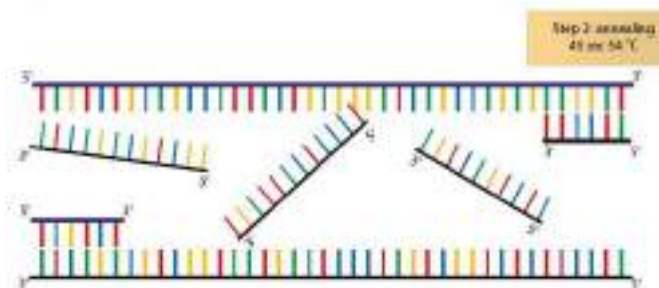
Proses pemisahan *double strand* DNA menjadi *single strand* DNA melalui pemanasan dengan temperatur suhu kisaran 92-95°C dalam waktu 1-2 menit. Namun, temperatur suhu yang paling standar digunakan adalah 94°C. Gambar berikut menunjukkan proses denaturasi.



Sumber: Nurhayati & Darmawati, 2017
Gambar 2.3 Proses Denaturasi

2. Annealing

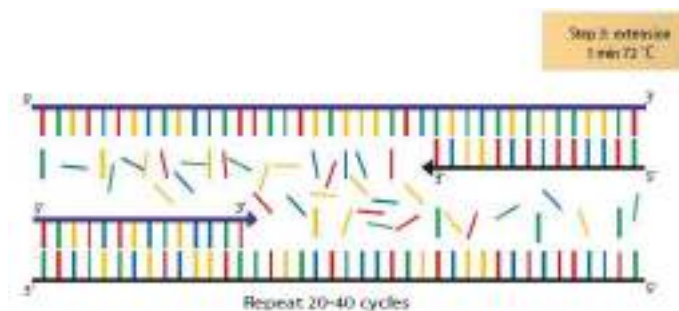
Proses melekatnya primer *Forward* dan *Reverse* pada *single strand* DNA target menggunakan suhu 50-60°C. Waktu 30-45 detik adalah waktu yang sering digunakan pada proses annealing. Gambar berikut menunjukkan proses annealing.



Sumber: Nurhayati & Darmawati, 2017
Gambar 2.4 Proses Annealing

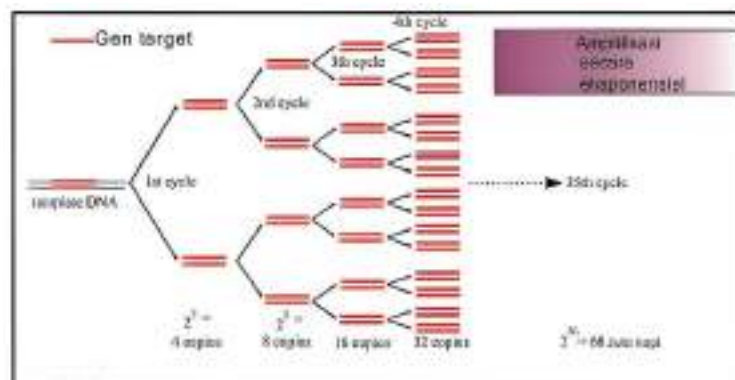
3. Ekstensi/Elongasi

Proses pemanjangan untai DNA baru, yang dilakukan oleh enzim *Taq Polymerase* menggunakan dNTP's yaitu *Adenin, Cytosine, Guanine, dan Thymine*. Tahap ini dimulai dari posisi primer yang telah menempel pada urutan basa nukleotida DNA target dan akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' dari *single strand* DNA. Pada tahap ini biasanya menggunakan suhu 72°C selama 1–2 menit. Gambar berikut menunjukkan proses ekstensi/elongasi.



Sumber: Nurhayati & Darmawati, 2017
Gambar 2.5 Proses Ekstensi/Elongasi

Dalam satu siklus PCR, jumlah urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi 2 kali jumlah awal sehingga jumlah DNA target akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Metode ini menghasilkan jutaan kopi DNA (amplikon) dalam waktu yang singkat dan sangat sensitif (Agustiningsih dkk., 2020). Biasanya, siklus yang terlalu panjang dapat menyebabkan konsentrasi produk tidak spesifik selain itu siklus yang terlalu sedikit juga dapat menyebabkan berkurangnya kuantitas produk yang diharapkan (Novel dkk., 2010).



Sumber: Agustiningsih dkk., 2020
Gambar 2.6 Proses Amplifikasi PCR

2) Pemeriksaan *Real-Time* PCR

Teknik *Real-Time* PCR didasarkan pada deteksi sinyal berfluoresensi dihasilkan secara proporsional selama amplifikasi DNA. Teknik ini dapat menentukan titik waktu atau siklus PCR dimana pertama kali asam nukleat terdeteksi pada proses amplifikasi DNA (nilai Ct). Fase eksponensial reaksi PCR menentukan ambang siklus (Ct), yang dihitung dengan membandingkan jumlah salinan target (Bustin, 2005). Akibatnya, semakin besar jumlah DNA target dalam salinan awal, semakin cepat peningkatan signifikan dalam sinyal fluoresensi akan muncul, sehingga menghasilkan Ct yang lebih rendah (Cheng *et al.*, 2007). Metode *Real-Time* PCR ini sangat berguna untuk pendeteksian *viral load* dan pengujian secara *real time*. Hal ini sangat berguna dalam menunjukkan tingkat infeksi aktif, interaksi host-virus, dan keberhasilan dari pengobatan antivirus (Bustin, 2005).

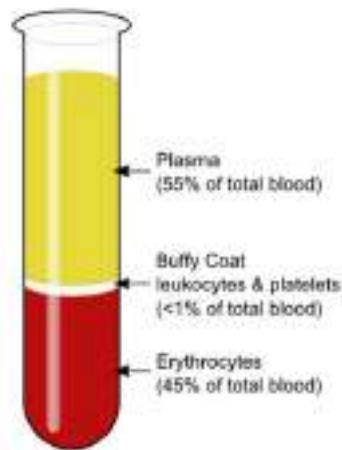
Real-Time PCR telah dikembangkan untuk mengatasi berbagai masalah yang ada pada uji PCR konvensional. Metode ini sangat sensitif untuk memvalidasi, mendeteksi, dan mengukur HBV DNA dalam kasus klinis tertentu, dimana pelabelan fluoresensi dari probe oligonukleotida diikat secara spesifik pada amplifikasi PCR. Kelebihan metode ini adalah waktu pengerjaan dapat dilakukan dalam satu waktu, memiliki sensitifitas yang lebih tinggi, dan lebih mudah untuk menindaklanjuti pasien dan melihat reaksi terhadap pengobatan yang diberikan (Chopra *et al.*, 2005).

Metode *Real-Time* PCR dimulai dengan proses isolasi untuk mendapatkan DNA/RNA murni. DNA/RNA tersebut dijadikan sebagai cetakan untuk menghasilkan cDNA untai pertama. Selama DNA diukur pada fase eksponensial amplifikasi PCR, produk yang terakumulasi akan dideteksi menggunakan probe DNA fluoresens dan kemudian data dianalisis (Fraga *et al.*, 2014).

5. Plasma

Plasma merupakan komponen terbanyak di dalam darah sebesar 55%. Plasma terdiri dari cairan matriks ekstraseluler berwarna kekuningan yang mengandung berbagai zat, termasuk air (92%) dan sekitar 8% terdiri dari glukosa, lemak, protein, vitamin, hormon, enzim, antibodi, karbondioksida, serta

mineral lainnya. Warna kuning dalam plasma berasal dari bilirubin saat proses perombakan eritrosit yang sudah tua, bersamaan dengan hadirnya karotenoid, hemoglobin, dan protein iron transferrin. Umumnya, plasma berisi protein albumin, globulin, dan fibrinogen (Rosita dkk., 2019).



Sumber: Kiswari, 2014

Gambar 2.7 Komponen Plasma

Plasma berfungsi mengangkut dan mengedarkan sari-sari makanan ke seluruh tubuh, serta mengangkut zat sisa metabolisme dari sel atau jaringan tubuh ke organ pengeluaran (Maharani & Noviar, 2018).

a. Pembuatan Plasma

Untuk memperoleh plasma perlu dilakukan pemisahan cairan ekstraseluler dari komponen lainnya menggunakan prinsip sentrifugasi berdasarkan berat molekulnya yang membuat plasma berada di bagian teratas. Plasma diperoleh tanpa menghilangkan fibrinogen yang merupakan zat pembekuan darah, kemudian plasma dipisahkan dari cairan ekstraselulernya. Dalam prosedur pemisahan plasma, zat antikoagulan seperti *Etylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) biasanya digunakan untuk mencegah terjadinya penggumpalan darah (Rosita dkk., 2019).

b. Pengaruh Lama Penyimpanan Plasma terhadap Kuantitas HBV DNA

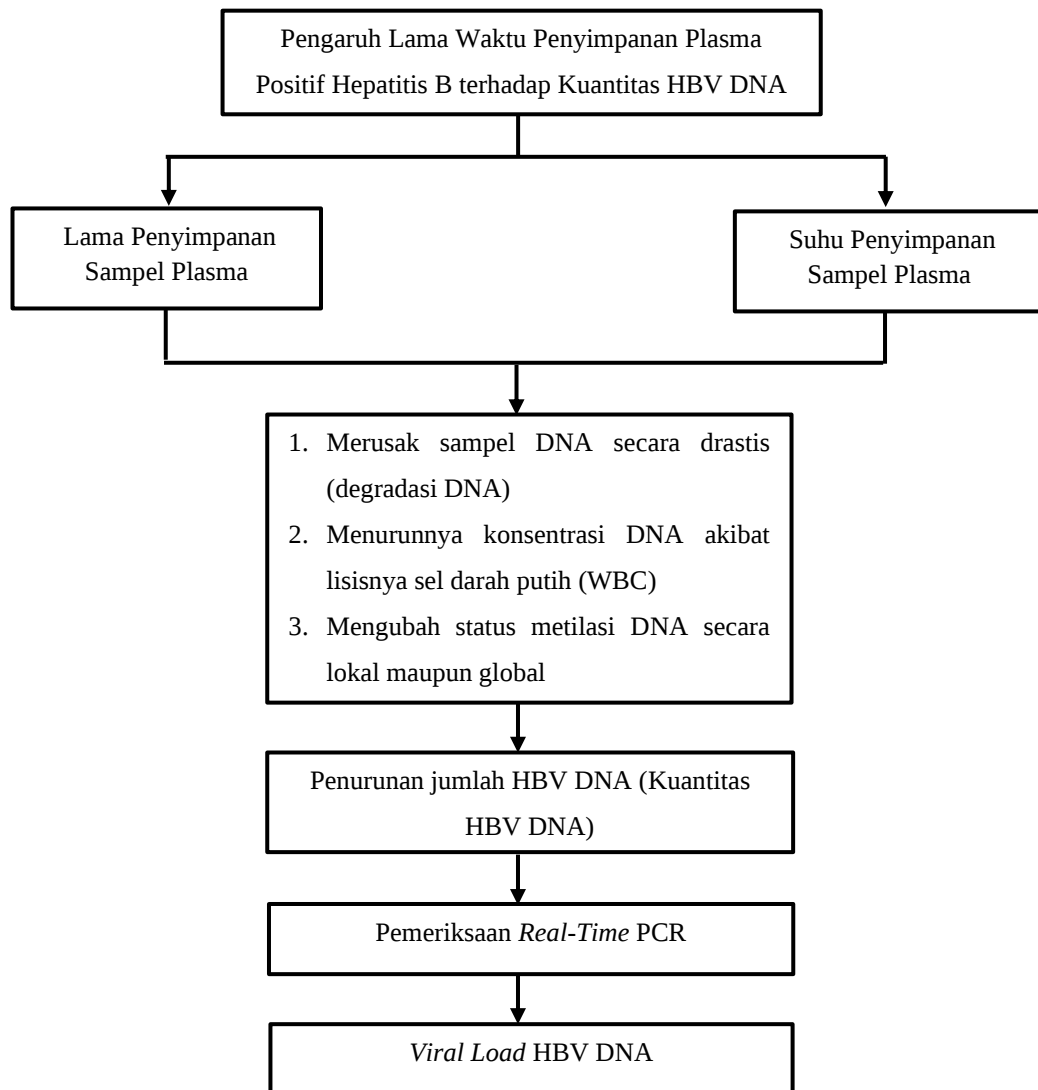
Salah satu faktor yang mempengaruhi kuantitas HBV DNA adalah waktu penyimpanan dan suhu penyimpanan. Ketika terjadi penundaan pemeriksaan pada sampel maka sampel tersebut harus disimpan terlebih dahulu dengan waktu dan suhu yang tepat agar tidak merusak dan tidak mengubah komponen yang

ada di dalamnya. Lamanya waktu penyimpanan menjadi salah satu faktor yang dapat merusak sel darah dan menurunkan kemurnian DNA. Penurunan kadar dan kemurnian DNA tersebut disebabkan oleh penyimpanan yang terlalu lama yang mengakibatkan terjadinya degradasi baik secara alami maupun oleh mikroorganisme (Lio dkk., 2021). Sehingga waktu dan suhu penyimpanan menjadi hal yang sangat penting untuk diperhatikan ketika terjadi penundaan terhadap pemeriksaan sampel.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Huang *et al.*, (2017) terkait pengaruh lama penyimpanan sampel pada hari ke-0, 3, 7, 9, 11, 13, 15 dengan suhu penyimpanan 24°C terhadap kuantitas DNA menunjukkan bahwa terjadi penurunan signifikan dalam konsentrasi DNA dengan waktu penyimpanan lebih dari 3 hari. Selain itu, DNA juga dapat resisten apabila disimpan dalam darah utuh selama 15 hari yang mengakibatkan jumlah DNA menurun drastis akibat lisisnya sel darah putih. Faktor durasi penyimpanan yang lebih dari tiga hari juga dapat mengubah status metilasi DNA secara signifikan, baik secara lokal maupun global. Durasi penyimpanan yang lama menyebabkan konsentrasi DNA menurun (Huang *et al.*, 2017).

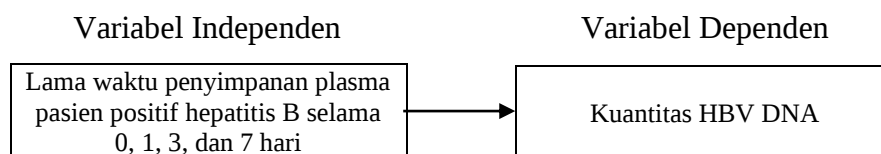
Sementara itu, penelitian yang dilakukan Handayani (2024) terkait dengan pengaruh waktu penyimpanan sampel *whole blood* darah donor terhadap kuantitas HBV DNA dengan metode *Real-Time* PCR menyatakan bahwa sampel *whole blood* darah donor yang disimpan pada hari ke-1, 3 dan 7 dengan suhu 2-8°C mengalami penurunan terhadap kuantitas HBV DNA. Dimana kuantitas HBV DNA pada sampel *whole blood* darah donor yang disimpan pada hari ke-1 memiliki kadar sebesar 551.823 IU/mL lebih tinggi dibandingkan dengan penyimpanan hari ke-3 yaitu 213.367 IU/mL dan hari ke-7 yaitu 131.680 IU/mL. Presentase penurunan kuantitas HBV DNA pada hari ke-1 sebesar 0%, pada hari ke-3 penurunan sebesar 61%, dan pada hari ke-7 penurunan sebesar 76% (Handayani, 2024).

B. Kerangka Teori



Gambar 2.8 Kerangka Teori

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.9 Kerangka Konsep

D. Hipotesis

H_0 : Tidak ada pengaruh lama waktu penyimpanan plasma pada pasien hepatitis B terhadap kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR.

H_a : Ada pengaruh lama waktu penyimpanan plasma pada pasien hepatitis B terhadap kuantitas HBV DNA menggunakan metode *Real-Time* PCR.