

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Virus Hepatitis B

1. Pengertian virus

Kata virus berasal dari Bahasa Latin *virion* yang berarti racun, yang digunakan pertama kali dalam Bahasa Inggris tahun 1392. Definisi “agen yang menyebabkan infeksi penyakit pertama kali digunakan tahun 1728, sebelum ditemukannya virus sendiri oleh Dmitry Iwanovsky tahun 1892 (Hasdianah dan Dewi, 2014).

Virus adalah parasit berukuran mikroskopik yang menginfeksi sel organisme biologis. Virus bersifat parasite obligat, hal tersebut disebabkan karena virus hanya dapat bereproduksi di dalam sel material hidup dengan menginvasi dan memanfaatkan sel makhluk hidup karena virus tidak memiliki perlengkapan seluler untuk bereproduksi sendiri. Biasanya virus mengandung sejumlah kecil asam nukleat (DNA atau RNA, tetapi tidak kombinasi keduanya) yang diselubungi semacam bahan pelindung yang terdiri atas protein, lipid, glikoprotein atau kombinasi ketiganya. Genom virus akan diekspresikan menjadi baik protein yang digunakan untuk memuat bahan genetik maupun protein yang dibutuhkan dalam daur hidupnya (Hasdianah dan Dewi, 2014).

Istilah virus biasanya merujuk pada partikel-partikel yang menginfeksi sel – sel eukariota (organisme multisel dan banyak jenis organisme tunggal), sementara istilah bakteriofage atau fage digunakan untuk jenis yang menyerang jenis-jenis sel prokariota (bakteri dan organisme lain yang tidak berinti sel). Virus sering diperdebatkan statusnya sebagai makhluk hidup karena ia tidak dapat menjalankan

fungsi biologisnya secara bebas jika tidak berada dalam sel inang. Karena karakteristik khasnya ini virus selalu terasosiasi dengan penyakit tertentu, baik pada manusia (misalnya virus influenza dan HIV), hewan (misalnya virus flu babi) atau tanaman (misalnya virus mosaik tembakau/TMV) (Hasdianah dan Dewi, 2014).

2. Hepatitis B

Hepatitis adalah suatu penyakit hati yang disebabkan oleh virus Hepatitis B, yang dapat menyebabkan peradangan hati akut atau kronis yang dapat berlanjut menjadi sirosis hati atau kanker hati. Hepatitis B akut jika perjalanan penyakit kurang dari 6 bulan sedangkan Hepatitis B kronis bila penyakit menetap, tidak menyembuh secara klinis atau laboratorium atau pada gambaran patologi anatomi selama 6 bulan (Bratanata, Gani, dan Karjadi, 2015).

Virus hepatitis B adalah anggota keluarga *Hepadnavidae*. Menurut Komite Internasional Taksonomi Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2009 dalam Noviana, 2012) keluarga *Hepadnaviridae* dibagi menjadi dua genus yaitu:

- a. Genus *Orthohepadnavirus*, yaitu virus hepatitis yang menyerang mamalia, seperti *hepatitis B virus* (yang menginfeksi ordo primata), *woodchuck hepatitis virus*, *ground squirrel hepatitis virus* dan *arctic squirrel hepatitis virus*
- b. Genus *Avihepadnavirus*, yaitu virus hepatitis yang menyerang bangsa unggas, seperti *duck hepatitis virus*, *heron hepatitis virus* dan *goose hepatitis virus*.

Hepadnavirus merupakan virus DNA dengan virion beramplop (envelope) berukuran 42 nm, dengan sebagian DNA virion adalah utas ganda (*partially double stranded*). Virus ini merupakan virus DNA hewan berukuran terkecil dan mempunyai ukuran genom sebesar kurang lebih 3200 pasang basa, terdiri dari

empat *open reading frame* (ORF) untuk gen P, C, S dan X yang masing-masing mengkode *DNA polimerase/reverse transcriptase*, protein inti (*core*), protein permukaan (*surface*) dan protein X. Untuk gen S dibagi menjadi regio pre-S1, pre-S2 dan S. Gen C terbagi menjadi regio pre-C dan C (Noviana, 2012)

Protein permukaan yang berada pada pembungkus virus (*envelope*) dikenal sebagai antigen permukaan (HbsAg) yang merupakan protein penting dalam pendiagnosaan klinis infeksi dan imunisasi virus ini. Selain HBsAg terdapat dua antigen penting lainnya yaitu antigen inti hepatitis B (HBsAg) yang membentuk nukleokapsid *virion*, dan antigen e (HBeAg) adalah antigen yang dikeluarkan ke dalam peredaran darah oleh sel-sel yang terinfeksi virus (Noviana, 2012).

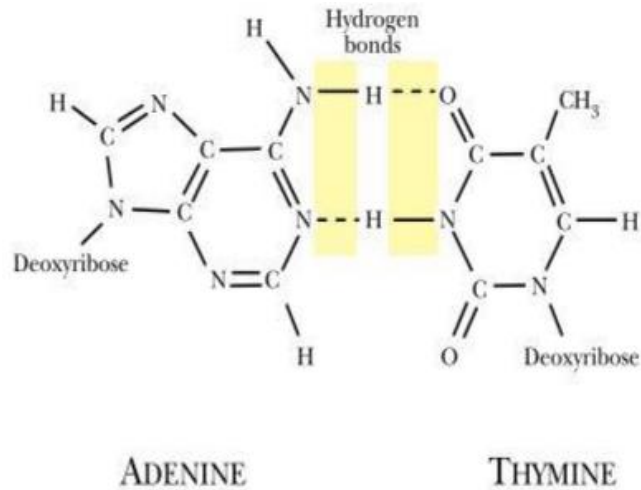
3. Pengertian DNA

DNA merupakan makromolekul berupa benang sangat panjang yang terbentuk dari sejumlah besar deoksiribonukleotida, yang masing-masing tersusun dari satu basa, satu gula dan satu gugus fosfat. Apabila kita ibaratkan suatu tubuh, maka DNA diibaratkan sebagai otak yang dapat mengatur segala proses di dalam tubuh. Di samping itu, DNA juga mempunyai peran penting dalam pewarisan sifat. DNA merupakan suatu senyawa kimia yang penting pada makhluk hidup. Tugas utamanya membawa materi genetik dari suatu generasi ke generasi berikutnya. DNA juga merupakan senyawa polinukleotida yang membawa sifat-sifat keturunan yang khas pada kromosom. DNA penting dalam hal hereditas. Paket semua informasi genetik dan dibagikan pada generasi berikutnya. Dasar untuk ini terletak pada kenyataan bahwa DNA membuat gen dan gen membuat kromosom (Nurhayati, 2017).

DNA pertama kali ditemukan oleh F. Miescher (1869) dari sel spermatozoa dan sel eritrosit burung, selanjutnya dinamakan sebagai nuklein. Penemuan lain dilakukan oleh Fischer (1880), yaitu tentang adanya zat pirimidin (yang berupa Sitosin dan Timin) dan dua purin (Adenin dan guanin). Setelah penemuan tersebut, dilengkapi pula dengan penemuan Levine (1910) tentang gula 5 karbon ribosa, gula deoksiribosa, dan asam fosfat dalam inti. Keberadaan DNA tersebut sebagian besar di dalam nukleus (inti sel). Tetapi ada juga yang terdapat pada mitokondria (Nurhayati, 2017).

a. Struktur DNA

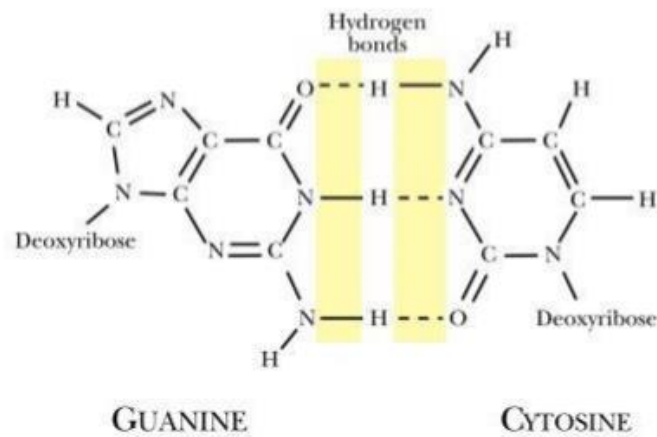
Mononukleotida penyusun DNA terdiri dari satu basa nitrogen (Adenin, Guanin, Citosin, Timin), satu gula 2-deoksi-D-Ribosa, dan satu gugus posphat, bila dirangkai menjadi polinukleotida (DNA). Strukturnya double heliks atau double strand, strand satu dengan strand kedua bersifat komplementer atau berpasangan. Selain itu, kedua strand tersebut juga dihubungkan oleh ikatan hidrogen. Apabila nukleotida pada strand pertama membawa basa Adenin, maka nukleotida tersebut akan berpasangan dengan nukleotida yang membawa basa Timin yang terdapat pada strand kedua. Kemudian antara kedua nukleotida tersebut akan terbentuk 2 ikatan hidrogen yang menghubungkan antara basa Adenin dengan Timin (Nurhayati, 2017).



Gambar 1. Pasangan basa Adenin dengan Tymin yang dihubungkan oleh dua ikatan hidrogen

Sumber : (Nurhayati, 2017)

Bila nukleotida strand pertama membawa basa Cytosin, maka nukleotida tersebut akan berpasangan dengan nukleotida yang membawa basa Guanin yang terdapat pada *strand* kedua. Kemudian antara kedua nukleotida tersebut akan terbentuk 3 ikatan hidrogen yang menghubungkan antara basa Cytosin dengan Guanin. Kedua strand bersifat saling komplementer dan keduanya dihubungkan oleh ikatan hidrogen ternyata bentuknya mirip seperti jalan kereta api, namun tidak lurus dimana *strand* satu dan *strand* yang satunya hanya bersanding saja, tetapi kedua *strand* pada DNA terpilin ke kiri (Nurhayati, 2017).



Gambar 2. Pasangan basa Guanin dengan Cytosin yang dihubungkan oleh tiga ikatan hidrogen
 Sumber : (Nurhayati, 2017)

b. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan tahapan pekerjaan awal yang harus dilakukan dalam berbagai pemeriksaan analisis DNA. Keberhasilan proses isolasi DNA seringkali sangat menentukan hasil pekerjaan selanjutnya. Proses ekstraksi untuk mendapatkan DNA berkualitas tinggi merupakan satu kaidah dasar yang harus dipenuhi dalam analisis molekuler. Berbagai analisis biologi molekuler memerlukan hasil isolasi DNA dengan tingkat kemurnian dan kualitas yang baik. DNA hasil isolasi harus terbebas dari berbagai kontaminan seperti protein dan RNA yang dapat mengganggu berlangsungnya proses PCR. Oleh karena itu, metode isolasi DNA yang tepat sangat diperlukan untuk mendapatkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Berbagai teknik ekstraksi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar sehingga saat ini muncul berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi DNA dalam bentuk kit yang prosesnya akan lebih mudah, cepat, dan sederhana (Murthy, 2017).

c. Prinsip isolasi DNA

Ekstraksi dan purifikasi DNA pada dasarnya merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Ekstraksi DNA pada organisme *eukaryot* dilakukan melalui proses penghancuran dinding sel (*lysis of cell wall*), penghilangan protein dan RNA (*cell digestion*), dan pengendapan DNA (*precipitation*) dan pemanenan. Saat ini isolasi DNA secara teknis menjadi lebih mudah dengan munculnya berbagai teknik ekstraksi dan purifikasi dalam bentuk kit. Isolasi DNA merupakan teknik ekstraksi dan atau purifikasi DNA dari suatu sel sebagai tahap awal suatu analisis genetik. Isolasi DNA diperlukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Terdapat 3 prinsip utama dalam isolasi DNA yakni 1). penghancuran (lisis), 2). ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta 3). pemurnian DNA (Murtiyaningsih, 2017).

B. Darah

1. Pengertian darah

Darah merupakan salah satu jaringan dalam tubuh yang berbentuk cair berwarna merah. Karena sifat darah yang berbeda dengan jaringan lain, mengakibatkan darah dapat bergerak dari satu tempat ke tempat lain sehingga dapat menyebar ke berbagai kompartemen tubuh. Penyebaran tersebut harus terkontrol dan harus tetap berada pada satu ruangan agar darah benar-benar dapat menjangkau seluruh jaringan di dalam tubuh melalui sistem yang disebut sistem kardiovaskuler, yang meliputi jantung dan pembuluh darah. Dengan system tersebut darah dapat diakomodasikan secara teratur dan diedarkan menuju organ dan jaringan yang tersebar diseluruh tubuh. Darah didistribusikan melalui pembuluh darah dari

jantung keseluruh tubuh dan akan kembali lagi menuju jantung. Sistem ini berfungsi untuk memenuhi kebutuhan sel atau jaringan akan nutrient dan oksigen, serta mentransport sisa metabolisme sel atau jaringan keluar dari tubuh (Nugraha, 2015)

2. Komponen darah

Darah dibentuk dari dua komponen yaitu komponen selular dan komponen non-selular. Komponen selular sering disebut juga korpuskuli, yang membentuk sekitar 45% yang terdiri dari tiga macam atau jenis sel yaitu eritrosit, leukosit, dan trombosit. Pada dasarnya trombosit bukan berupa sel melainkan bentuk keping-keping dari pecahan sitoplasma sel megakariosit (Nugraha, 2015)

Komponen non-seluler berupa cairan yang disebut plasma dan membentuk sekitar 55% bagian dari darah. Dalam plasma terkandung berbagai macam molekul makro dan mikro, baik yang bersifat larut air (hidrofilik) maupun tidak larut air (hidrofobik), berupa organik maupun anorganik, serta atom-atom maupun ionik. Plasma yang tidak mengandung faktor-faktor pembekuan darah disebut serum. Plasma darah terdiri dari air, protein, karbohidrat, lipid, asam amino, vitamin, mineral dan lain sebagainya. Komponen tersebut ikut mengalir dalam sirkulasi bersama darah, baik bebas atau diperantai molekul lain agar dapat terlarut di dalam plasma (Nugraha, 2015)

3. Jenis spesimen darah

a. Darah utuh (Whole Blood)

Darah utuh atau whole blood adalah spesimen darah yang memiliki komponen darah secara utuh dan kondisinya sama dengan di dalam aliran darah dalam tubuh. Spesimen darah utuh didapatkan dengan penambahan antikoagulan,

untuk menghambat pembekuan darah. Penambahan antikoagulan harus disesuaikan dengan jenis pemeriksaan. Spesimen darah utuh yang didiamkan terlalu lama akan mengalami pengendapan sel-sel darah sehingga akan terjadi pemisahan antara sel darah dan plasma, sehingga perlu dilakukan pencampuran kembali agar komponen darah homogen (Nugraha, 2015)

b. Plasma

Plasma darah adalah bagian cair darah yang tidak mengandung sel-sel darah tetapi masih mengandung faktor-faktor pembekuan darah. Plasma didapat dengan cara memisahkan sel-sel darah dari darah utuh dengan cara sentrifugasi (Nugraha, 2015)

c. Serum

Serum adalah bagian cair darah yang tidak mengandung sel-sel darah dan faktor-faktor pembekuan darah. Serum didapat dari spesimen darah yang tidak ditambahkan antikoagulan, sehingga darah akan membeku dalam waktu kurang lebih 15 menit. Darah yang membeku dilakukan sentrifugasi, sehingga terjadi pemisahan antara cairan dan sel-sel darah, cairan berwarna kuning hasil sentrifugasi disebut sebagai serum darah (Nugraha, 2015)

C. Teknik Pemeriksaan Virus Hepatitis B

1. Teknik dengan metode *Slide Rapid Test*

Untuk mengetahui adanya virus hepatitis B dalam tubuh pasien diperlukan pemeriksaan HBsAg. HBsAg merupakan salah satu jenis antigen yang terdapat pada bagian pembungkus dari virus hepatitis B yang dapat dideteksi pada cairan tubuh yang terinfeksi (Wijayanti, 2016).

HBsAg positif dapat ditemukan pada pengidap sehat (Healthy carrier), hepatitis B akut, hepatitis B kronik, sirosis hati maupun kanker hati primer. HBsAg dapat dijumpai selama perjalanan infeksi HBV. Pada infeksi akut dapat pula dijumpai pada saat munculnya gejala-gejala hepatitis, sedangkan pada infeksi HBV kronik dapat dijumpai pada fase *immune tolerance* dan *immune clearance*, yang merupakan fase replikatif HBV. Pada fase integritas yang merupakan fase nonreplikatif HVB, dalam sirkulasi hanya didapatkan partikel HBsAg berbentuk bulat (Winata, 2017).

Metode *slide rapid test* adalah metode chromatographic visual, cepat dan satu langkah *sandwich immunoassay* untuk mendeteksi HBsAg. Dalam metode ini, antibodi monoklonal terkonjugasi dengan emas koloid dan antibodi poliklonal yang diimobilisasi pada strip nitroselulosa. Sampel serum mengalir melalui pad penyerap dan bercampur dengan pereaksi sinyal. Jika sampel mengandung antigen, antibodi emas koloid berkonjugasi dan berikatan dengan antigen, membentuk kompleks. Sedangkan migrasi kompleks melalui jalur nitrocellulose, perangkap antibodi poliklonal amobil dan membentuk antibodi-antigen-antibodi koloid berwarna emas kompleks (Adeyemi, Omolade, Raheem-ademola, 2013)

2. Teknik dengan menggunakan PCR

Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik molekuler yang dapat memperbanyak sekuen DNA spesifik menjadi jutaan salinan secara *in vitro*. Teknik PCR menggandakan DNA dengan bantuan enzim Taq DNA polymerase yang tahan akan suhu tinggi dan sepasang primer oligonukleotida yang masing-masing komplementer dengan ujung 3' dari salah satu untai DNA sasaran (Passarge 2007: 60). Prinsip kerja PCR adalah reaksi enzimatik dari proses

polimerisasi DNA untuk memperbanyak bagian-bagian spesifik DNA yang diinisiasi dengan pelekatan primer. Primer tersebut akan mengikat daerah spesifik pada DNA yang akan diperbanyak dan menginisiasi replikasi DNA sehingga menghasilkan salinan DNA yang sama. Primer yang digunakan pada proses PCR adalah primer forward dan reverse

Komponen-komponen yang digunakan pada proses PCR antara lain adalah DNA template yang mengandung sekuens spesifik yang akan diperbanyak, dNTP (deoksinukleotida trifosfat) berperan sebagai sumber monomer nukleotida dalam polimerisasi DNA, PCR buffer berperan dalam mempertahankan kestabilan pH, primer forward dan reverse, kation divalen berperan sebagai kofaktor enzim DNA polimerase. Komponen lain yang digunakan di dalam PCR adalah Taq DNA polimerase yang berperan dalam menghasilkan produk DNA target, dan akuabides berperan sebagai pelarut (Paoletta 1998: 182). Siklus PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, annealing (pelekatan) dan polimerisasi (pemanjangan primer sehingga membentuk rantai DNA yang diinginkan

Tahap awal dalam reaksi PCR adalah denaturasi, yaitu proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal. Suhu proses denaturasi tergantung pada banyaknya basa guanin dan sitosin, serta panjang cetakan DNA. Semakin panjang cetakan DNA dan semakin banyak basa guanin dan sitosin yang dikandung, maka semakin tinggi suhu yang diperlukan, serta semakin lama waktu yang dibutuhkan. Suhu umum yang digunakan untuk denaturasi adalah sekitar 90-96°C (Annisa, 2012). Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya

proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase (Yusuf, 2016).

Tahap kedua dalam reaksi PCR adalah annealing yang merupakan proses pelekatan primer pada cetakan DNA. Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60% G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR (Yusuf, 2016). Suhu annealing biasanya berada antara 3°-5° C lebih rendah daripada melting temperature terendah primer. Suhu annealing yang digunakan adalah antara 50°-70° C (Annisa, 2012).

Tahap ketiga adalah polimerisasi, yaitu proses pemanjangan primer oligonukleotida dengan bantuan enzim Taq DNA polymerase. Suhu pada tahap polimerisasi harus disesuaikan dengan suhu optimum kerja enzim yang digunakan. Enzim Taq DNA polymerase umumnya menggunakan suhu polimerisasi antara 72°-78° C (Annisa, 2012). Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35–100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2016).

Reaksi-reaksi tersebut di atas diulangi lagi dari 25–30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru

yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi (Yusuf, 2016).

a. Jenis PCR

Menurut Yusuf (2016), teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa jenis diantaranya:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA.
2. *Inverse-PCR*, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuen internal yang diketahui. Template didigesti dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer yang memiliki titik ujung yang memiliki jarak yang jauh satu sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi "sekuen antara" dari beragam gen.
3. *Nested-PCR*, proses ini memungkinkan untuk mengurangi kontaminasi pada produk selama amplifikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan. Dua set primer digunakan untuk mendukung metode ini, set kedua mengamplifikasi target kedua selama proses pertama berlangsung. Sekuens DNA target dari satu set primer yang disebut primer inner disimpan di antara sekuens target set kedua dari primer yang disebut sebagai outer primer. Pada prakteknya, reaksi pertama dari PCR menggunakan outer primer, lalu reaksi PCR kedua dilakukan dengan inner primer

atau *nested* primer menggunakan hasil dari produk reaksi yang pertama sebagai target amplifikasi. *Nested* primer akan menyatu dengan produk PCR yang pertama dan menghasilkan produk yang lebih pendek daripada produk yang pertama.

4. *Quantitative-PCR*; digunakan untuk pengukuran berulang dari hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas, dimulai dari jumlah DNA atau RNA. Hasil dari metode ini juga menampilkan copy dari sampel

5. *Reverse Transcriptase (RT-PCR)*; metode ini digunakan untuk amplifikasi, isolasi atau identifikasi sekuen dari sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (mengubah RNA menjadi DNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.

6. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Metode ini dikembangkan oleh Welsh and McClelland (1990) dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer–primer dengan sequens acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom.

Primer yang digunakan adalah Primer 251f dengan sequence forward (3' ke 5') GAC TYG TGG TGG ACT TCT C yang akan menempel pada posisi asam nukleat 251 sampai 269 sedangkan primer 1190r dengan sequence reverse (5' ke 3') TCA GCA AAY ACT YGG CA dan akan menempel pada segmen asam nukleat ke 1190 sampai 1174, yang nantinya akan menghasilkan produk sebesar 940 bp. Digunakannya primer ini karena primer ini spesifik terhadap virus hepatitis B. Set primer ini bekerja dengan optimal, karena mereka bisa mencapai batas deteksi yang sangat rendah, 50 sampai 100 IU / ml. Bila diterapkan pada genotipe HBV tingkat

keberhasilan amplifikasi yang tinggi (96 sampai 98%) dan *sequencing* (89 sampai 99%) dicapai untuk primer set ini. Demikian pula, tingkat keberhasilannya adalah 100% untuk kedua amplifikasi (Chook et al., 2015).