

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

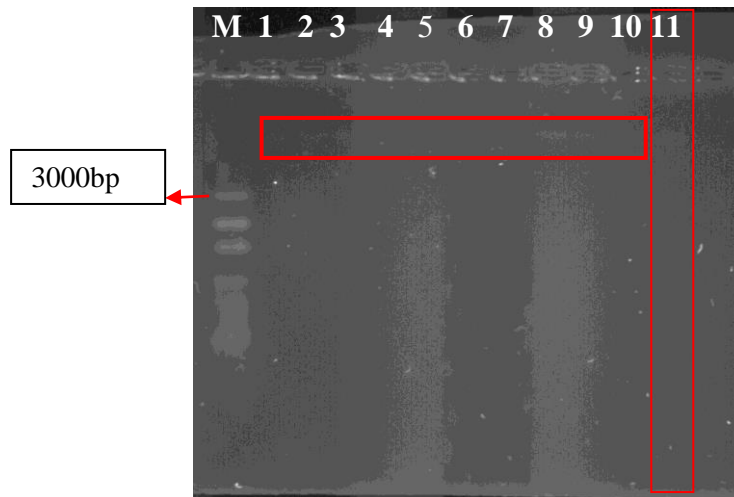
1. Karakteristik objek penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah sampel plasma darah. Sampel plasma yang digunakan berasal dari sampel plasma yang telah positif HBsAg yang sebelumnya telah dilakukan pemeriksaan menggunakan *rapid test* dimana sampel ini didapat dari Laboratorium RSUD Wangaya. Sampel plasma yang diuji merupakan hasil *centrifugasi* dari sampel darah yang ditampung menggunakan tabung EDTA yang kemudian plasmanya disimpan dalam tabung eppendorf.

Pengambilan sampel dilakukan setelah adanya hasil positif dari pemeriksaan hepatitis B yang dilakukan di laboratorium. Sampel yang diperiksa memiliki karakteristik diantaranya, sampel berwarna kuning jernih dengan tekstur cair.

2. Hasil isolasi DNA dari sampel plasma HBsAg positif

Seluruh sampel plasma yang didapat kemudian dilakukan proses isolasi DNA. Hasil isolasi DNA kemudian di elektroforesis untuk mengetahui keberhasilan hasil isolasi DNA. Hasil elektroforesis sampel isolasi DNA dari plasma HBV dengan berat molekul melebihi marker berkisar antara 12.000-13.000bp dapat dilihat pada gambar 5.

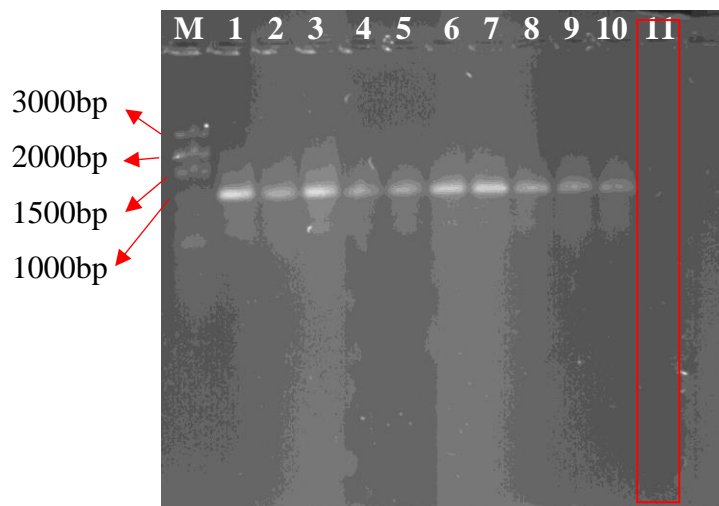


Gambar 5. Hasil isolasi sampel plasma HBV positif yang dibaca pada UV Solo
 Keterangan : M (marker), sumuran 1-10 (sampel 1-10), sumuran 11 (kontrol negatif)

Dari 10 sampel plasma HBV yang terkumpul diketahui bahwa seluruhnya (100%) terdapat DNA virus hepatitis B. Hasil isolasi sampel plasma HBV yang memiliki DNA virus hepatitis B tersebut kemudian dilanjutkan pada uji PCR.

3. Hasil uji PCR pada isolasi DNA menggunakan primer 1190r dan 251f

Masing-masing hasil isolasi DNA yang terkumpul kemudian diuji *polymerase chain reaction* menggunakan primer 1190r dan primer 251f. Dimana hasil dari uji PCR tersebut ditandai dengan adanya pita DNA yang berpendar. Hasil uji *polymerase chain reaction* dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil PCR dari isolasi DNA virus HBV yang dibaca pada UV Solo
Keterangan : M (marker), sumuran 1-10 (sampel 1-10), sumuran 11
(kontrol negatif)

Dari 10 isolasi DNA yang digunakan setelah dilakukan proses PCR dengan menggunakan primer 1190r dan primer 251f kemudian dielektroforesis selama 45 menit, setelah dielektroforesis hasil dibaca pada UV Solo dan didapatkan hasil pita DNA yang berpendar antara pada marker ke-4 dan ke-5 dengan berat molekul yang berkisar antara 800-1000bp. Data hasil pemeriksaan laboratorium selengkapnya terdapat pada lampiran 7.

Dalam penelitian ini digunakan kontrol untuk memantau proses kerja selama penelitian berlangsung. Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah kontrol negatifnya yaitu sampel plasma yang negatif HBsAg. Adapun hasil PCR menunjukkan tidak adanya pita DNA yang berpendar yang ditunjukkan pada sumuran ke-12.

B. Pembahasan

1. Isolasi dan Identifikasi virus HBV pada sampel darah HBsAg positif

Virus Hepatitis B merupakan virus DNA yang termasuk dalam famili *hepadnaviridae*, beramplop (envelope), berukuran 42 nm, dengan sebagian DNA virion adalah utas ganda (*partially double stranded*). Pemeriksaan secara molekuler dapat membantu mengidentifikasi keberadaan virus HBV ini dalam tubuh seseorang yang terinfeksi. Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik molekuler yang dapat memperbanyak sekuen DNA spesifik secara in vitro.

Sebelumnya, sampel plasma dari pasien diisolasi terlebih dahulu untuk dilanjutkan ke proses selanjutnya. Pemilihan plasma yang baik sangat penting dalam menunjang keberhasilan hasil isolasi DNA. Sebagai inokulum yang akan diisolasi karena 90% protein plasma disintesa dan dilepaskan oleh hati, dimana merupakan organ yang akan diinfeksi oleh HBV. Pada tahap isolasi DNA proses inkubasi sangat memberikan pengaruh yang besar dimana hal ini dilakukan agar DNA yang terdapat dalam sampel aktif dan tersaring dengan baik setelah penambahan reagen. Proses isolasi ini menggunakan *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* dalam proses isolasi juga terdapat penambahan enzim proteinase K dimana enzim ini dapat digunakan untuk menghancurkan protein sehingga DNA dapat diisolasi secara utuh. Pada penelitian ini menggunakan kontrol negative yang sebelumnya sudah mendapatkan perlakuan yang sama dengan sampel. Kemudian dilakukannya elektroforesis awal untuk mengetahui DNA total yang terdapat dalam plasma tersebut.

Membran DNeasy dari QIAGEN menggabungkan sifat ikatan membran berbasis silika-gel dengan teknologi putaran mikro. DNA akan diserap ke membran DNeasy karena adanya garam chaotropic dengan konsentrasi tinggi, yang akan menghilangkan air dari molekul. Dalam prosedur ekstraksi DNeasy, kondisi buffer dirancang untuk memungkinkan adsorpsi DNA yang spesifik pada membran silika-gel dan menawarkan penghilangan optimal karbohidrat, polifenol, dan metabolit lainnya (Latif and Osman, 2017).

Metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada sumber dan ukuran sampel. Prinsip di balik pemisahan DNA yang ada dalam sel adalah dengan membuat DNA bebas dari komponen seluler lainnya. Kehadiran protein,

lipid, polisakarida dan beberapa senyawa organik atau anorganik lainnya dalam isolasi DNA dapat mengganggu metode analisis DNA, terutama pada reaksi rantai polimerase (PCR). Isolasi DNA diperlukan untuk analisis genetik, yang digunakan untuk tujuan ilmiah, medis atau forensik (Srividya et al, 2011).

Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan pada UV Transiluminator atau gel doc. Ukuran fragmen DNA bisa diketahui dengan membandingkan band atau pita dari sampel dengan band dari DNA yang telah diketahui ukurannya, yang disebut marker. Marker yang digunakan dalam elektroforesis yaitu marker 100 bp (base pairs) dengan range fragmen 100-3000 bp. Hasil elektroforesis molekul DNA didapatkan band yang berpendar tanpa elektroforegram atau smear yang berarti DNA yang terisolasi sudah tidak terikat dengan kontaminan senyawa lain seperti protein, polisakarida dan senyawa fenolik. Pada hasil isolasi band yang didapatkan tidak berpendar terang, hal ini dapat terjadi karena sampel yang digunakan adalah plasma dimana plasma memiliki jumlah DNA yang sangat kecil sehingga pita yang dihasilkan saat pembacaan pada UV Transluminator tipis. Setelah hasil isolasi dibandingkan dengan marker, band yang muncul memiliki genom DNA berukuran lebih dari 10.000 bp yakni berkisar antara 12.000-13.000bp.

Menurut penelitian Srividya et al. (2011), DNA yang diisolasi dari bakteri dan darah ditemukan 100% murni bebas dari kontaminasi. Dalam biologi molekuler, isolasi DNA murni diperlukan untuk memperbanyak DNA pada proses PCR. Proses isolasi dapat dipengaruhi oleh beberapa hal salah satunya adalah waktu. Waktu yang diperlukan untuk ekstraksi dan pemurnian tergantung pada kemurnian DNA dan kesesuaiannya untuk berbagai prosedur seperti pembelahan enzim, ligasi dan kloning.

Menurut Chook et al. (2015), hepatitis B virus memiliki full genom sebesar 3215 bp, yang mana hasil tersebut berbeda dengan hasil yang didapat. Hal ini kemungkinan terjadi karena molekul DNA yang diisolasi terintergrasi dengan DNA hati manusia pada sampel plasma yang diduga positif hepatitis B.

2. Fragmen DNA virus Hepatitis B melalui teknik PCR menggunakan primer 251f dan primer 1190r

PCR berguna untuk mengamplifikasi (memperbanyak) suatu segmen DNA pada sampel yang telah diisolasi. Dengan PCR ini, molekul DNA maupun RNA yang berupa fragmen-fragmen dapat diidentifikasi dan diketahui ukuran berat molekulnya (bp). Pada tahap proses PCR menggunakan PCR Mix dimana PCR Mix ini berisi dua enzim yang dioptimalkan dengan hati-hati. Campuran enzim ini memiliki aktivitas eksonuklease 5' → 3' dan juga aktivitas proofreading 3' → 5'. Selain itu, campuran ini juga memungkinkan amplifikasi fragmen yang lebih panjang. Selain PCR Mix terdapat juga penambahan primer kemudian ditambahkan ddH₂O, ddH₂O adalah pelarut PCR mix, ditamhkannya ddH₂O agar DNA tidak berada dalam kondisi kering yang dapat mengganggu proses sintesis DNA oleh *enzim Taq Polimerase*. Dan yang terakhir ditambahkan dengan DNA template yang merupakan hasil dari isolasi DNA sampel.

Selain penggunaan PCR Mix terdapat penggunaan primer dimana oligonukleotida primer (desain primer) memegang peranan penting untuk spesifisitas maksimal dan efisiensi PCR (Gaffar, 2007). Penempelan primer berada pada tahap *annealing*, dimana primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada template. Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu primer yang mempunyai sekuen yang identik

dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat dan primer yang kedua yaitu yang identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Masing-masing dari dua primer PCR melengkapi untaian tunggal yang berbeda dari target untaian ganda (Hewajuli dan Dharmayanti, 2014). Perancangan primer dapat dilakukan berdasarkan urutan DNA yang telah diketahui ataupun dari urutan protein yang dituju. Data urutan DNA atau protein bisa didapatkan dari *database GenBank*. Apabila urutan DNA maupun urutan protein yang dituju belum diketahui maka perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui mempunyai hubungan kekerabatan yang terdekat (Handoyo dan Rudiretna, 2006). 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. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya (Yusuf, 2016).

Kunci utama PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target. Metode PCR dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah yang sangat sedikit. PCR adalah reaksi polimerase berantai, yaitu reaksi yang melibatkan enzim polimerase yang dilakukan secara berulang-ulang. Yang diulang-ulang adalah proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal, hibridisasi primer untuk mengawali replikasi DNA dilanjutkan dengan proses penambahan basa pada cetakan DNA oleh enzim polimerase (Hasibuan, 2015).

Keberhasilan PCR tergantung pada angka faktor seperti DNA templat, primer, dNTPs dan konsentrasi ion magnesium dalam reaksi campuran serta pilihan enzim polimerase dan suhu *annealing*. Penentuan suhu pada tahap *annealing* menjadi demikian kritis, dalam artian harus tepat. Jika suhu terlalu tinggi penempelan primer menjadi sangat lemah, sehingga bisa mengakibatkan produk yang dihasilkan sangat sedikit. Sebaliknya jika suhu terlalu rendah, bisa mengakibatkan terjadinya penempelan yang tidak spesifik, sehingga menghasilkan fragmen yang tidak diinginkan.

Untuk mengetahui ukuran dari DNA tersebut dilakukanlah proses elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan molekul selular berdasarkan atas ukurannya, dengan menggunakan medan listrik yang dialirkan pada suatu medium yang mengandung sampel yang akan dipisahkan. Teknik ini dapat digunakan dengan memanfaatkan muatan listrik yang ada pada makromolekul, misalnya DNA yang bermuatan negatif.

Karena DNA bermuatan negatif, ketika suatu sampel diisikan ke dalam suatu gel agarosa berpori yang terendam oleh buffer yaitu Tris-asetate (TAE), dan diberi suatu aliran listrik dengan muatan positif pada salah satu ujung gel dan muatan negatif pada ujung lainnya, fragmen-fragmen DNA berbentuk linear dan sirkuler dengan ukuran yang berbeda akan bergerak sepanjang gel dengan kecepatan yang berbeda-beda sehingga menempuh jarak yang berbeda-beda pada gel pada satu periode waktu tertentu. Agarosa digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memurnikan fragmen-fragmen DNA (Vivikananda, 2014). Gel agarose mempunyai kemampuan pemisahan dengan range yang cukup luas yaitu mulai 70 pb (pasangan basa) sampai 800.000pb. Selain itu penggunaan gel

agarose juga mempunyai keuntungan, dimana lokasi dari DNA dalam gel dapat diamati secara insitu dengan menggunakan staining gel sebagai pewarna. Staining gel ini memiliki sifat lebih tidak karsinogenik maka dari itu lebih aman untuk digunakan. Staining gel akan menginterkalasi (menyisip ke dalam) DNA. Penggunaan staining gel dimaksudkan untuk membantu visualisasi karena staining gel akan memancarkan sinar ultraviolet. Jika gel disinari dengan ultraviolet dari bawah maka akan tampak pendaran berupa pita-pita gel. Pita-pita tersebut adalah molekul-molekul DNA yang bergerak sepanjang gel setelah dielektroforesis (Yuwono, 2005).

Dalam proses elektroforesis, kecepatan pergerakan ini tergantung pada ukuran molekul DNA, kerapatan media gel yang dilalui DNA, serta arus listrik yang diberikan untuk bermigrasi molekul DNA (Novitasari et al., 2014). Selain itu pergerakan molekul dalam medan listrik juga dipengaruhi oleh bentuk, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. Fragmen yang lebih panjang dan lebih besar akan melintasi pori dengan lebih lambat, sedangkan fragmen yang lebih kecil dan lebih pendek akan bergerak lebih cepat dan menempuh jarak yang lebih jauh mendekati ujung gel yang bermuatan positif (Cappucino and Sherman, 2009).

Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan pada UV Transluminator atau *gel doc*. Prinsip kerja dari alat ini adalah sinar UV yang dipancarkan akan memancarkan Staining gel yang menempel pada DNA. Sehingga visualisasi DNA bisa terlihat lewat pancaran yang berwarna orange keputihan tersebut. Jika proses pemisahan DNA berhasil akan ditandai dengan adanya pita yang berpendar pada masing-masing sumur. Pita-pita yang berjarak sama dari sumur gel pada akhir elektroforesis mengandung molekul-molekul yang bergerak di dalam gel selama

elektroforesis dengan kecepatan yang sama, yang biasanya berarti bahwa molekul-molekul tersebut berukuran sama (Gaffar, 2007). Ukuran fragmen DNA bisa diketahui dengan membandingkan band atau pita dari sampel dengan band dari DNA yang telah diketahui ukurannya, yang disebut marker atau penanda. Hasil elektroforesis molekul DNA didapatkan band yang berpendar terang. Setelah dibandingkan dengan marker, band yang muncul berada di antara marker ke-4 dan ke-5 yakni antara 800-1000bp. Menurut primer yang digunakan, salinan DNA produk akan memiliki berat molekul sebesar 940 bp. Maka hasil tersebut dapat dikatakan positif terdapat virus HBV karena band yang muncul memiliki genom DNA berukuran 800-1000 bp, hasil tersebut berbanding lurus dengan hasil HbsAg pasien yang positif. 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.

Pada visualisasi gel agarose menghasilkan fragmen DNA yang tebal dan sedikit smear. Hal tersebut karena konsentrasi DNA yang dihasilkan cukup tinggi, namun masih terdapat sedikit kontaminan. Konsentrasi DNA yang tinggi menyebabkan kualitas DNA kurang baik, sehingga kontaminan akan bertambah. DNA dengan konsentrasi lebih rendah akan meminimalisir kontaminan dan lebih mudah bagi primer spesifik untuk menempel pada situs penempelan DNA target (Ratna, Bintara dan Mustikaningtyas, 2015).

Selain menggunakan primer 251F dan 1190R juga dapat menggunakan primer lain yang spesifik terhadap virus hepatitis B, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Abbas, Rasool, and Afroze (2005) ditemukan hasil positif dengan adanya pita DNA pada posisi 587 bp sesuai dengan primer B2833S 5'-3' GGG TCA

CCA TAT TCT TGG dan primer B170AS 5`-3' GT C CTA GGA ATC CTG ATG, dimana didapat suhu annealing yang optimal pada primer ini sebesar 55°C.

Menurut Kaneko, Kobayashi and Miller (2010) teknik PCR dapat diterapkan pada studi identifikasi DNA HBV dalam plasma yang dapat menunjukkan bahwa genom virus hadir dalam serum pada awal perjalanan infeksi akut yang dapat bertahan sepanjang perjalanan penyakit dalam waktu yang singkat. PCR merupakan pengujian yang berpotensi dalam teknik diagnostik yang akan memberikan informasi penting mengenai perjalanan infeksi HBV.

Tes PCR menyediakan metode sensitif untuk deteksi partikel HBV dari sampel serum. Salah satu kelemahan utama PCR adalah over kepekaan. Sensitivitas yang berlebihan ini menghasilkan false positif. Masalah false positive dapat dihilangkan dengan memilih kontrol dan perawatan yang tepat selama penanganan (Abbas, Rasool and Afroze, 2005).