

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Obesitas

Menurut organisasi kesehatan dunia (WHO), obesitas adalah penumpukan lemak yang abnormal atau berlebihan yang menimbulkan risiko bagi kesehatan. Pengukuran menggunakan dengan Indeks Massa Tubuh (IMT). Selain itu terdapat metode lain dengan menggunakan rasio lingkaran pinggang dan tinggi badan, jika digunakan bersama IMT akan didapat hasil yang lebih akurat (Direktorat P2PTM & Ditjen P2P, 2024).

Obesitas kini menjadi permasalahan global yang memengaruhi sekitar 2 miliar orang di seluruh dunia dan berisiko terhadap kesehatan masyarakat, termasuk di Indonesia. Diprediksi bahwa pada tahun 2030, sekitar satu dari lima wanita dan satu dari tujuh pria akan mengalami obesitas, dengan total lebih dari 1 miliar orang secara global. Secara keseluruhan, angka kejadian obesitas lebih tinggi pada wanita dibandingkan pria, dengan mayoritas kejadian obesitas berasal dari negara berkembang.

Berat badan berlebih atau obesitas menjadi salah satu faktor risiko utama dalam perkembangan berbagai penyakit tidak menular, seperti diabetes mellitus, penyakit jantung, kanker, hipertensi, serta gangguan metabolik maupun non-metabolik lainnya. Selain itu, obesitas juga berperan dalam meningkatnya angka kematian akibat penyakit kardiovaskular, yang menyumbang sekitar 5,87% dari total kematian, serta penyakit diabetes dan gangguan ginjal yang berkontribusi sekitar 1,84% dari total kematian. Saat ini, obesitas diklasifikasikan sebagai kondisi medis yang membutuhkan penanganan menyeluruh. Selain memperbesar risiko terhadap

berbagai penyakit tidak menular, obesitas juga berdampak secara ekonomi, terutama karena tingginya biaya perawatan penyakit penyerta atau komorbiditas yang menyertainya.

B. Klasifikasi Berat Badan

Obesitas dapat diidentifikasi dengan menghitung Indeks Massa Tubuh (IMT), yang digunakan untuk mengevaluasi status gizi seseorang, baik terkait kelebihan maupun kekurangan berat badan. Indeks Massa Tubuh (IMT) diperoleh dengan membagi berat badan dengan tinggi badan dalam satuan meter kuadrat (kg/m^2).

Seseorang dikategorikan mengalami obesitas jika memiliki $\text{IMT} \geq 25 \text{ kg/m}^2$. Secara spesifik, wanita dianggap mengalami obesitas jika kadar lemak tubuhnya melebihi 27% dari total berat badan, sementara pada pria, batasannya adalah lebih dari 25% dari total berat badan (Astuti, 2021).

Klasifikasi obesitas yang paling umum digunakan untuk orang dewasa adalah berdasarkan kategori IMT (Indeks Massa Tubuh). Berikut klasifikasi obesitas menurut Asia Pasifik (Mulyasari dkk., 2023) :

Tabel 1
Klasifikasi IMT Menurut Asia Pasifik

Klasifikasi	IMT (kg/m^2)
<i>Underweight</i>	< 18,5
Normal	18,5 – 22,9
<i>Overweight</i>	> 23,0 – 24,9
Obesitas I	25,0 – 29,9
Obesitas II	$\geq 30,0$

1. Faktor penyebab obesitas

a. Faktor genetik

Faktor keturunan memiliki pengaruh dalam perkembangan obesitas. Penelitian menunjukkan bahwa anak-anak yang memiliki orang tua dengan berat badan normal memiliki risiko obesitas sebesar 10%. Jika salah satu orang tua mengalami obesitas, risiko meningkat menjadi 40–50%, dan jika kedua orang tua obesitas, peluangnya bisa mencapai 70–80% (Ayu dkk., 2023). Berdasarkan penelitian Nugraha (2010) dalam (P2PTM Kemenkes, 2024) menyebutkan bahwa faktor genetik berkontribusi sekitar 30% terhadap obesitas, meskipun mekanisme keturunan dalam memicu obesitas masih belum sepenuhnya dipahami.

b. Faktor lingkungan

1) Pola makan

Kebiasaan makan mencakup jumlah, jenis, jadwal, serta cara pengolahan makanan yang dikonsumsi sehari-hari. Konsumsi makanan dengan kepadatan energi tinggi, seperti yang kaya lemak dan gula tetapi rendah serat, dapat mengakibatkan ketidakseimbangan energi dalam tubuh. Jadwal makan yang tidak teratur, tidak sarapan, serta kebiasaan ngemil juga dikaitkan dengan peningkatan risiko obesitas. Selain itu, cara memasak yang menggunakan banyak minyak, santan kental, dan gula juga dapat meningkatkan asupan energi yang berlebihan.

2) Pola aktivitas fisik

Gaya hidup sedentari atau kurangnya aktivitas fisik menyebabkan pengeluaran energi yang rendah, sehingga meningkatkan risiko obesitas. Faktor-faktor yang mempengaruhi rendahnya aktivitas fisik meliputi kemudahan yang diberikan oleh berbagai fasilitas modern serta kemajuan teknologi yang membuat aktivitas sehari-

hari semakin minim melibatkan aktivitas fisik yang berat. Akibatnya, jumlah individu yang melakukan pekerjaan fisik berat semakin berkurang.

c. Faktor obat-obatan dan hormonal

1) Obat-obatan

Penggunaan obat steroid dalam jangka panjang, seperti yang digunakan dalam pengobatan asma, osteoarthritis, dan alergi, dapat merangsang peningkatan nafsu makan, yang pada akhirnya menyebabkan kenaikan berat badan. Selain itu, obat-obatan berbasis hormon yang digunakan untuk meningkatkan kesuburan atau sebagai kontrasepsi juga berpotensi memicu akumulasi lemak dalam tubuh, sehingga berkontribusi terhadap terjadinya obesitas.

2) Hormonal

Beberapa hormon yang berperan dalam regulasi berat badan antara lain leptin, ghrelin, tiroid, insulin, dan estrogen.

- a) Leptin, yang diproduksi oleh sel lemak, berfungsi sebagai sinyal untuk menghentikan makan. Namun, pada kondisi resistensi leptin, sinyal ini tidak berfungsi dengan baik, meskipun kadarnya tinggi, sehingga menyebabkan peningkatan asupan makanan.
- b) Ghrelin, sebaliknya, berperan dalam meningkatkan nafsu makan. Jika kadarnya tinggi, individu cenderung merasa lebih lapar dan makan lebih banyak.
- c) Estrogen berperan dalam metabolisme energi. Penurunan kadar estrogen, terutama pada wanita menopause, menyebabkan penurunan metabolisme basal tubuh, sehingga meningkatkan risiko kenaikan berat badan.
- d) Insulin, yang bersifat anabolik, berfungsi dalam pengolahan glukosa dalam tubuh. Konsumsi tinggi karbohidrat dan lemak dapat merangsang produksi

insulin, yang kemudian berkontribusi terhadap penyimpanan lemak, terutama di area *visceral*. Akumulasi lemak *visceral* ini dapat memicu peradangan kronis tingkat rendah (*chronic low-grade inflammation*), yang pada akhirnya berdampak pada resistensi insulin.

2. Faktor risiko obesitas

Adapun faktor yang dapat meningkatkan risiko seseorang mengalami obesitas berdasarkan Teori Klasik H. L. Blum, yaitu:

- a. Perilaku individu
- b. Lingkungan
- c. Pelayanan kesehatan
- d. Genetik (keturunan)

Keempat faktor ini saling berinteraksi dalam menentukan kondisi kesehatan seseorang. Pola makan dan aktivitas fisik sebagai bagian dari perilaku individu dapat dipengaruhi oleh lingkungan sosial, keluarga, serta norma yang berlaku dalam komunitas tempat seseorang tinggal (Saraswati dkk., 2021).

3. Gejala obesitas

Secara umum, obesitas ditandai dengan berbagai gangguan, termasuk masalah pernapasan akibat penumpukan lemak di bawah diafragma dan dalam dinding dada yang menekan paru-paru. Gangguan ini dapat menyebabkan sesak napas, bahkan saat melakukan aktivitas ringan. Selain itu, obesitas juga berhubungan dengan gangguan tidur, seperti *sleep apnea*, yang menyebabkan pernapasan terhenti sementara saat tidur dan meningkatkan rasa kantuk di siang hari (Sari, 2019).

Menurut P2PTM Kemenkes (2024), beberapa gejala atau tanda seseorang mengalami obesitas atau berisiko mengalami obesitas meliputi:

- a. Mendengkur saat tidur dan mengalami nyeri pinggul
- b. Timbunan lemak yang terlihat di area dada, leher, lengan, pinggul, paha, dan perut
- c. Stres atau masalah psikologis lainnya
- d. Riwayat keluarga dengan kelebihan berat badan atau obesitas
- e. Konsumsi obat-obatan seperti steroid atau terapi hormon tertentu
- f. Riwayat berat badan sebelumnya yang menunjukkan peningkatan IMT

C. Genetika

Genetika adalah cabang ilmu biologi yang mempelajari bagaimana sifat-sifat diwariskan dan apa yang menyebabkan perbedaan karakteristik antar makhluk hidup. Awalnya, genetika hanya berfokus pada mekanisme pewarisan sifat, tetapi kini telah berkembang menjadi bidang ilmu yang membahas materi genetik secara lebih luas. Secara umum, genetika mencakup beberapa aspek utama (Effendi, 2020):

1. Struktur materi genetik, mencakup berbagai komponen seperti gen, kromosom, DNA, RNA, plasmid, episom, serta elemen transposabel.
2. Reproduksi materi genetik, melibatkan proses seperti reproduksi sel, replikasi DNA, transkripsi balik (*reverse transcription*), mekanisme replikasi *rolling circle*, pewarisan sitoplasmik (*cytoplasmic inheritance*), serta pewarisan yang mengikuti hukum Mendel.
3. Fungsi materi genetik, meliputi peran materi genetik dalam transkripsi, modifikasi pasca-transkripsi, kode genetik, translasi, konsep *one gene one*

enzyme, interaksi antar-gen, regulasi ekspresi gen pada organisme prokariotik dan eukariotik, pengendalian genetik dalam respon imun, regulasi pembelahan sel, ekspresi jenis kelamin, serta perubahan dalam materi genetik.

4. Perubahan materi genetik, termasuk mutasi dan rekombinasi.
5. Genetika dalam populasi dan rekayasa genetik, mencakup studi tentang pewarisan sifat dalam populasi serta teknologi yang digunakan dalam manipulasi genetik

Menurut Rahmadina & Pd (2019), gen merupakan sekuens nukleotida dengan panjang tertentu yang mengode suatu protein yang menentukan sifat organisme. Semua makhluk hidup memiliki materi genetik yang tersusun dalam bentuk asam nukleat, yaitu makro molekul penting yang menyimpan informasi genetik.

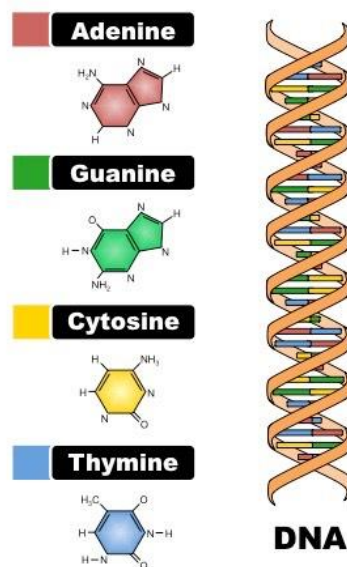
Terdapat dua jenis utama asam nukleat, yaitu asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA). Kedua jenis asam nukleat ini memiliki kesamaan dalam sifat kimia dan fisiknya karena tersusun dari unit mononukleotida yang dihubungkan oleh jenis ikatan yang serupa.

a. *Deoxyribonucleic acid* (DNA)

Asam deoksiribonukleat, atau yang lebih dikenal sebagai DNA, merupakan salah satu jenis asam nukleat yang termasuk dalam biomolekul utama penyusun berat kering suatu organisme. Dalam sel, DNA umumnya ditemukan di dalam inti sel (Rahmadina & Pd, 2019). Secara etimologis, istilah *deoxyribonucleic acid* (DNA) berasal dari beberapa kata, yaitu “deoxyribosa,” yang merujuk pada gula pentosa, “*nucleic*,” yang berasal dari kata “nucleus”, serta “*acid*,” yang berarti zat asam. Dalam pengertian terminologi, DNA merupakan senyawa kimia yang sangat penting karena berfungsi sebagai pembawa informasi genetik dalam sel atau

organisme secara keseluruhan, yang diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya (Effendi, 2020).

DNA tersusun dari dua untai yang berpilin membentuk struktur heliks ganda. Kedua untai ini dipertahankan oleh ikatan hidrogen yang terbentuk antara basa-basa nitrogen di masing-masing untai. Empat jenis basa nitrogen dalam DNA adalah adenin (A), sitosin (C, dari *cytosine*), guanin (G), dan timin (T). Adenin selalu berpasangan dengan timin melalui ikatan hidrogen, sementara guanin berpasangan dengan sitosin. Dalam proses replikasi DNA, untai baru disintesis berdasarkan urutan nukleotida dari untai DNA yang sedang digandakan.



Gambar 1 Struktur Pembentuk DNA

(Sumber : Utami & Raimarda, 2020)

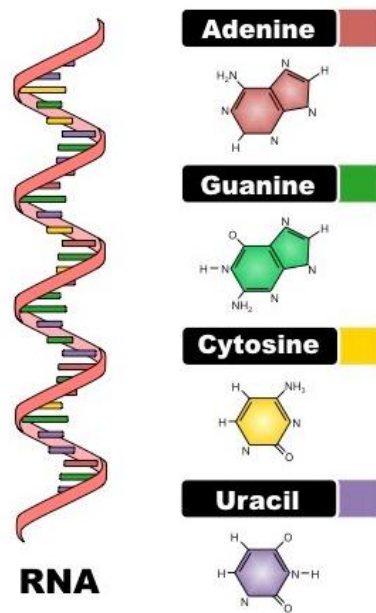
b. *Ribonucleic acid* (RNA)

RNA atau asam ribonukleat merupakan senyawa yang termasuk dalam kelompok asam nukleat dan ditemukan dalam sel makhluk hidup, termasuk hewan, tumbuhan, serta virus. RNA biasanya berada di dalam inti sel, sitoplasma, dan

ribosom. Secara umum, RNA berbentuk rantai tunggal (*single-stranded*) dan memiliki tiga jenis utama dengan jumlahnya yang dapat berubah tergantung pada aktivitas sintesis protein (Rahmadina & Pd, 2019).

RNA tersusun dari rantai polimer nukleotida, di mana setiap nukleotida terdiri dari satu gugus fosfat, satu gula ribosa, dan satu basa nitrogen (basa N). Struktur polimer ini terbentuk melalui ikatan antara gugus fosfat dari satu nukleotida dengan gugus gula ribosa dari nukleotida lainnya secara berselang-seling (Siswoyo, 2019).

Nukleotida dalam RNA dikenal sebagai ribonukleotida karena mengandung gula ribosa. Berbeda dengan DNA yang memiliki basa timin (T), RNA mengandung basa urasil (U) sebagai pasangan *adenine* (A), selain basa nitrogen lainnya, yaitu *guanine* (G) dan *cytosine* (C) (Hidayat dkk., 2021).



Gambar 2 Struktur Pembentuk RNA

(Sumber : Utami & Raimarda, 2020)

c. Perbedaan DNA dan RNA

Terdapat lima perbedaan utama antara DNA dan RNA, yaitu jenis gula yang terkandung, basa pirimidin, bentuk, jenis, dan lokasi ditemukannya. Komposisi DNA bersifat stabil dan tetap, sedangkan RNA memiliki struktur yang lebih bervariasi dan tidak tetap (Effendi, 2020).

Tabel 2
Perbedaan DNA dan RNA

Pembeda	DNA	RNA
Gula Penyusun	Deoksiribosa	Ribosa
Bentuk	<i>Double-stranded</i>	<i>Single stranded</i>
Basa	Guanin, Adenin, Timin, Sitosin	Guanin, Adenin, Urasil, Sitosin
Jenis	Hanya satu	3 jenis : mRNA, tRNA, dan rRNA
Lokasi	Inti	Inti Sitoplasma dan Ribosom

D. Gen *APOC3*

Gen ini mengkode komponen protein dari trigliserida kaya lipoprotein (TRL), termasuk lipoprotein densitas sangat rendah (VLDL), lipoprotein densitas tinggi (HDL), dan kilomikron (Burhannuddin dkk., 2022). Protein yang dikodekan berperan dalam metabolisme TRL ini melalui berbagai cara. Protein ini telah terbukti meningkatkan sekresi VLDL1, menghambat aktivitas enzim lipoprotein lipase, dan menunda katabolisme sisa-sisa TRL. Mutasi pada gen ini dikaitkan dengan rendahnya kadar trigliserida plasma dan berkurangnya risiko penyakit kardiovaskular iskemik, serta hiperalphalipoproteinemia, yang ditandai dengan

peningkatan kadar lipoprotein densitas tinggi (HDL) dan kolesterol HDL pada pasien manusia (Mayetti, 2017).

Apolipoprotein C3 (*APOC3*) telah dikaitkan sebagai gen kandidat penting yang terlibat dalam variasi kadar lipid plasma dan kelainan metabolik lainnya. Gen *APOC3* berada dalam gugus multigen *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* pada kromosom manusia 11q23. Gen *APOC3* berukuran 3367 bp yang terdiri dari 4 ekson yang mengkode glikoprotein 99 asam amino yang sebagian besar disintesis di hati dan dalam jumlah yang lebih sedikit di usus (Malalla dkk., 2019).

Apolipoprotein C3 (*APOC3*) memainkan peran penting dalam metabolisme TG. *APOC3* menurunkan pembersihan sisa-sisa lipoprotein kaya TG, melalui penghambatan lipolisis yang dimediasi lipoprotein lipase, memengaruhi penyerapan lipoprotein kaya TG oleh hati melalui *APOB* dan *APOE*, dan mendorong perakitan dan sekresi VLDL di hati (Nguyen dkk., 2016). *APOC3* mengkodekan protein yang relatif kecil yang berada di lokus yang sama dengan gen *APOA5* pada kromosom 11q23 (Au dkk., 2017). ApoC-III adalah protein yang menghambat aktivitas lipoprotein lipase (LPL), enzim yang bertanggung jawab untuk pemecahan trigliserida dalam darah (Borén, Packard & Taskinen, 2020).

E. Polimorfisme Genetik

Polimorfisme yaitu adanya varian genetik yang mengakibatkan perubahan aktivitas dan kemampuan enzim untuk menjalankan fungsinya. Dalam arti lain, poliformisme adalah ketika populasi suatu spesies memperlihatkan dua atau lebih fenotipe yang berbeda atau dengan kata lain adanya beberapa bentuk. Bentuk tersebut harus berada di lingkungan yang sama pada waktu yang sama dan menjadi

bagian dari populasi panmiktik (perkawinan acak) agar dapat disebut sebagai polimorfisme (Arimbi, 2022). Satu nukleotida atau nukleotida tunggal (polimorfisme nukleotida tunggal/SNP) atau berbagai rangkaian DNA yang berulang, termasuk minisatelit atau mikrosatelit (polimorfisme panjang), dapat menjadi sumber polimorfisme. SNP merupakan faktor predisposisi dan bukan penyebab langsung suatu penyakit.

Polimorfisme merujuk pada perubahan atau mutasi dalam gen yang tidak menyebabkan perubahan struktur protein, melainkan hanya menghasilkan variasi dalam fungsi protein. Meskipun polimorfisme tidak menunjukkan manifestasi klinis, keberadaannya dapat memengaruhi tingkat kerentanan individu terhadap suatu penyakit. Dampak dari polimorfisme adalah perbedaan tingkat kerentanan suatu populasi terhadap penyakit tertentu (Hermawan, 2022). Polimorfisme pada manusia merupakan kejadian umum, terjadi setiap 1 dalam 1000 nukleotida, dan umumnya tidak memiliki dampak klinis yang signifikan. Polimorfisme juga dapat mengakibatkan perbedaan golongan darah atau warna rambut, tetapi perubahan gen ini tidak berbahaya. Polimorfisme akan memiliki signifikansi jika, di masa mendatang terdapat zat tertentu yang berdampak pada golongan darah atau gen rambut yang dapat mengakibatkan mutasi pada suatu gen. Polimorfisme yang bermutasi dapat langsung diperbaiki oleh tubuh manusia dengan polimorfisme baru. Oleh karena itu, jika ditemukan polimorfisme saat pemeriksaan, jangan langsung mengaitkannya dengan penyakit tertentu atau kemungkinan berkembangnya kondisi tertentu.

Meskipun lebih dari 99% dari urutan DNA manusia sama, variasi sekuens DNA dapat memiliki dampak yang besar pada bagaimana manusia menanggapi penyakit;

faktor lingkungan seperti bakteri, virus, racun, dan bahan kimia, serta obat-obatan dan terapi lain. Oleh karena itu, SNPs penting untuk penelitian biomedis dan untuk mengembangkan produk farmasi atau menegakkan diagnosis medis. Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada gen yang tidak menimbulkan perubahan struktur protein, melainkan hanya mengakibatkan variasi pada fungsi protein. Polimorfisme tidak bermanifestasi klinis tetapi bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit (Oktariana dkk, 2023)

Polimorfisme gen Apolipoprotein C3 (*APOC3*) dikaitkan dengan penurunan lipoprotein densitas tinggi (HDL) dan non-HDL pada pasien dewasa, dan mempengaruhi kadar kolesterol total pada anak-anak. Polimorfisme gen *APOC3* akan dikaitkan dengan gangguan metabolisme dan lemak metabolisme dalam tubuh. Adanya gangguan metabolisme metabolik dikaitkan dengan tingginya kadar lipid dalam darah yang berhubungan dengan rendahnya kadar trigliserida plasma dan berkurangnya risiko penyakit kardiovaskular iskemik, serta hiperalphalipoproteinemia, yang ditandai dengan peningkatan kadar lipoprotein densitas tinggi (HDL) dan kolesterol HDL pada pasien manusia (NCBI, 2024). Polimorfisme gen *APOC3*, terutama 3238C/G, telah dikaitkan dengan peningkatan kadar trigliserida, risiko penyakit kardiovaskular, dan gangguan metabolik lainnya, termasuk dislipidemia pada pasien yang menjalani terapi antiretroviral (Singh dkk., 2024).

Terdapat 3 jenis genotipe yang dapat diidentifikasi dari polimorfisme gen, yaitu homozigot *wild type*, homozigot mutan, dan heterozigot. Genotipe *wild type* merupakan genotipe umum yang seringkali dijumpai pada gen tanpa polimorfisme (Borén, Packard & Taskinen, 2020). Disebut homozigot *wild type* jika terlihat 2

pita (TT), heterozigot (CT) jika terlihat 3 pita, dan homozigot mutan (CC) jika terlihat 1 pita pada visualisasi dengan menggunakan sinar *ultraviolet* (Oktariana dkk., 2023) .

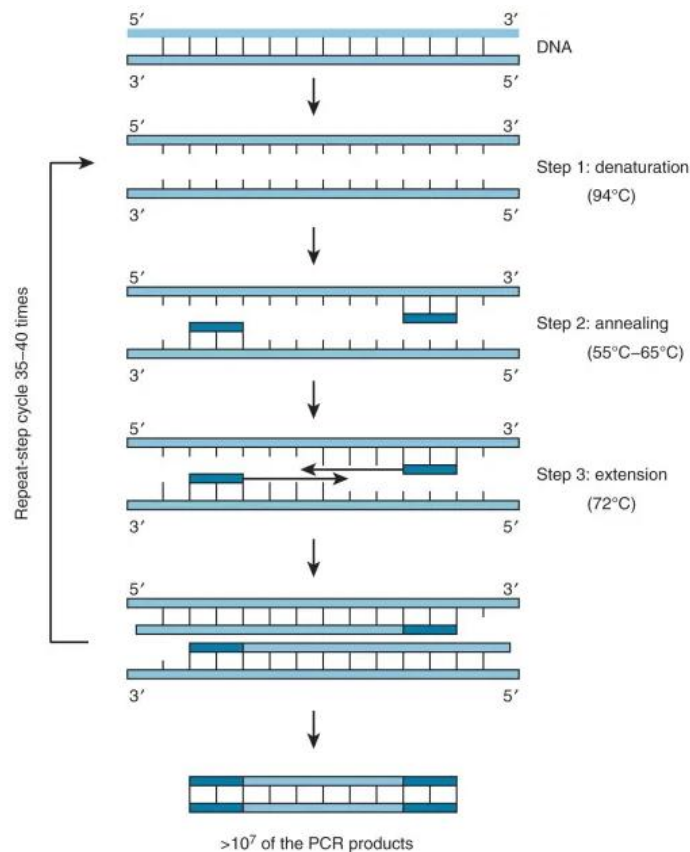
F. Metode Polimorfisme Gen

Polimorfisme gen dapat dilakukan dengan berbagai metode menurut Mahama & Suryandari (2023), yaitu sebagai berikut :

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Salah satu metode untuk mensintesis dan memperbanyak DNA secara in vitro adalah Polymerase Chain Reaction (PCR). Karry Mullis adalah orang pertama yang menemukan metode ini pada tahun 1985. Dalam beberapa jam, segmen DNA dapat diperbanyak jutaan kali menggunakan proses PCR. Target DNA untai ganda diduplikasi dalam setiap siklus proses PCR, yang terdiri dari beberapa fase (siklus) yang berulang. Untuk mendapatkan komposisi dan kondisi PCR yang tepat dan terbaik, optimasi sangat diperlukan sebelum proses PCR dilakukan pada sampel penelitian (Setyawati & Zubaidah, 2021).

Teknik amplifikasi DNA yang paling umum digunakan dalam penelitian molekuler. Metode ini bekerja dengan cara memperbanyak fragmen DNA secara eksponensial dalam arah dua sisi menggunakan sepasang primer oligonukleotida. Proses PCR membutuhkan beberapa komponen utama, yaitu DNA *template*, sepasang primer yang mengenali sekuens target, empat jenis deoksinukleotida trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polimerase, serta magnesium klorida (MgCl₂) yang dicampur dalam *reaction buffer* (Mahama & Suryandari, 2023).



Gambar 3 Tahapan PCR

(Sumber : Basicmedicalkey, 2019)

PCR terdiri dari tiga tahap utama yang berulang dalam setiap siklus: (1) Denaturasi, pemisahan DNA untai ganda menjadi dua untai tunggal dengan pemanasan hingga 95°C; (2) *Annealing*, pengenalan primer *forward* dan *reverse* pada DNA target dengan menurunkan suhu ke 55–65°C agar primer dapat menempel pada sekuens komplementernya; (3) Ekstensi, pemanjangan rantai DNA baru melalui penambahan basa nitrogen oleh DNA polimerase pada suhu 72°C. Tahapan-tahapan ini diulang 35-40 kali, di mana setiap siklus menghasilkan untai DNA baru yang dapat berfungsi sebagai *template* untuk sintesis berikutnya.

Adapun jenis-jenis PCR menurut Mahama & Suryandari (2023), yaitu sebagai berikut :

a. *Reverse Transcription PCR (RT-PCR)*

RT-PCR merupakan variasi dari teknik PCR standar yang bertujuan untuk mengamplifikasi mRNA. Dalam teknik ini, mRNA yang telah diisolasi dikonversi menjadi DNA komplementer (cDNA) dengan bantuan enzim *RNA-dependent*, *DNA polymerase* atau *reverse transcriptase*, dalam proses yang dikenal sebagai *reverse transcription*. cDNA yang dihasilkan dapat digunakan sebagai templat dalam amplifikasi PCR. Primer yang digunakan untuk sintesis cDNA dapat berupa primer non-spesifik, campuran oligonukleotida acak (*random hexamer*), primer oligo-dT, atau primer spesifik.

b. *Real-Time PCR*

Real-Time PCR mengadopsi prinsip PCR konvensional, namun dengan kemampuan untuk mendeteksi dan mengukur produk PCR secara langsung selama reaksi berlangsung. Selain komponen PCR standar, metode ini menggunakan molekul berlabel fluoresen untuk memvisualisasikan produk amplifikasi. Keunggulan *Real-Time PCR* antara lain memungkinkan deteksi langsung tanpa perlu elektroforesis gel tambahan, dapat menggunakan *melting curve analysis* pasca-PCR untuk mendeteksi variasi sekuens spesifik, lebih efisien, serta mengurangi risiko kontaminasi.

c. *Quantitative PCR (qPCR)*

PCR kuantitatif (qPCR) adalah salah satu varian dari *real-time PCR* yang digunakan untuk menganalisis tingkat ekspresi gen atau jumlah salinan gen (*gene copy numbers*). Kuantifikasi *template* awal yang digunakan dalam amplifikasi PCR

dilakukan dengan membandingkan produk PCR target dengan DNA atau cDNA referensi yang telah diketahui.

d. *Droplet digital PCR (ddPCR)*

ddPCR adalah teknologi canggih yang memungkinkan kuantifikasi biomarker molekuler pada level sangat rendah dengan tingkat akurasi tinggi. Teknik ini membagi sampel menjadi sekitar 20.000 *droplet* kecil, di mana setiap *droplet* dianalisis secara individual menggunakan fluoresensi. Proses ddPCR melibatkan pemisahan sampel awal menjadi banyak partisi (*microwell*), yang kemudian diproses melalui prosedur PCR standar, memungkinkan deteksi otomatis hasil PCR.

e. *PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)*

PCR-RFLP digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme dengan memotong sekuens DNA pada situs nukleotida spesifik, yang dikenal sebagai *restriction sites*, menggunakan enzim restriksi (*endonuklease*). *Restriction sites* biasanya terdiri dari 4-8 nukleotida dengan sifat palindromik. Jika terjadi mutasi, seperti mutasi titik (*point mutation*) yang mengubah situs restriksi, maka ukuran produk PCR yang dihasilkan juga akan berubah. Perbedaan ukuran ini dapat dianalisis menggunakan elektroforesis gel atau kapiler.

2. *DNA sequencing*

DNA sequencing adalah proses menentukan urutan basa nukleotida (A, T, C, G) dalam DNA. Metode yang umum digunakan antara lain *Sanger sequencing*, *Maxam & Gilbert sequencing*, dan *pyrosequencing*.

a. *Sanger sequencing* atau *chain termination method* merupakan teknik yang paling sering digunakan dalam laboratorium molekuler untuk menentukan

urutan nukleotida dalam fragmen DNA yang telah diamplifikasi melalui PCR. Metode ini menggunakan *dideoxynucleotide triphosphates* (ddNTPs), yang menghambat perpanjangan rantai DNA saat dimasukkan, menghasilkan fragmen DNA dengan panjang bervariasi yang mencerminkan posisi nukleotida tertentu dalam urutan DNA.

- b. *Maxam-Gilbert sequencing*, juga dikenal sebagai *Chemical method*, menggunakan reaksi kimia spesifik untuk memotong DNA berdasarkan tipe basa nukleotida. Fragmen DNA kemudian dianalisis melalui autoradiografi menggunakan sinar-X. Keunggulan metode ini adalah kemampuannya untuk menganalisis DNA murni secara langsung serta mengidentifikasi interaksi protein-DNA. Namun, metode ini memiliki kelemahan seperti penggunaan bahan kimia berbahaya, prosedur kompleks, serta keterbatasan dalam menganalisis lebih dari 500 pasangan basa.

3. *Next Generation Sequencing* (NGS)

Generasi baru teknologi *non-Sanger sequencing* yaitu *Next Generation Sequencing* (NGS). NGS adalah teknologi sekuensing modern yang memungkinkan analisis genom dalam skala besar dengan kecepatan dan efisiensi tinggi. Teknologi ini mampu mendeteksi perubahan genetik *secara high-throughput* dalam genom konstitusional maupun kanker. Dibandingkan dengan metode konvensional seperti *sanger sequencing*, NGS memiliki keunggulan dalam cakupan genom yang lebih luas, biaya lebih rendah, serta sensitivitas lebih tinggi. Teknologi ini mencakup beberapa pendekatan seperti *Whole Genome Sequencing* (WGS), *Whole Exome Sequencing* (WES), *Whole Transcriptome Sequencing* (mRNA sequencing), dan *Targeted Sequencing of Multigene Panels*.

4. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*

FISH adalah teknik yang memanfaatkan asam nukleat yang dimodifikasi secara kimia untuk mendeteksi keberadaan sekuens DNA atau RNA tertentu dalam sel atau jaringan. Teknologi ini banyak digunakan untuk menganalisis *gene rearrangements*, delesi atau amplifikasi kromosom, serta kelainan kromosom numerikal. Dengan menggunakan *fluorophore-coupled probes*, teknik ini memungkinkan visualisasi spesifik melalui mikroskop fluoresen. Keunggulan FISH adalah tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, serta kemampuannya untuk diaplikasikan langsung pada kromosom metafase maupun *nuklei interfase*.

5. *Comparative Genomic Hybridization (CGH)*

CGH digunakan untuk mengidentifikasi *gains* atau *losses* pada area kromosom tertentu dengan memindai keseluruhan genom dalam satu prosedur. Salah satu keunggulan CGH adalah kemampuannya dalam menganalisis seluruh genom tanpa perlu mengetahui terlebih dahulu penyimpangan kromosom yang dicari. Teknik ini melibatkan hibridisasi simultan antara DNA spesimen dengan DNA referensi normal yang telah diberi label fluoresen, kemudian dibandingkan untuk mengidentifikasi perubahan dalam jumlah salinan kromosom.

6. *DNA microarrays*

DNA microarrays digunakan untuk menganalisis ekspresi banyak gen dalam satu percobaan. Dalam aplikasi klinis, teknologi ini berperan dalam deteksi kelainan kromosom, analisis ekspresi gen, serta *whole-genome analysis* pada *Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)* dan *copy number variation (CNV)*. Teknik ini memanfaatkan *multiplex spotted microarray technology*, di mana ribuan oligonukleotida probes ditempatkan dalam *gene chip* atau *microscopic beads*. RNA

dari sampel kemudian dikonversi menjadi cDNA, diberi label fluoresen, dan dihibridisasi ke *chip* untuk dianalisis lebih lanjut menggunakan pemindaian fluoresens.