

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Indeks Massa Tubuh (IMT)

Indeks Massa Tubuh (IMT) merupakan cara sederhana untuk menilai apakah seseorang mengalami kelebihan berat badan atau obesitas, dengan membandingkan berat badan terhadap tinggi badan pada orang dewasa (P2PTM Kemenkes RI, 2019). Rumus yang digunakan untuk menghitung IMT adalah membagi berat badan dalam kilogram dengan tinggi badan dalam meter yang dikuadratkan (kg/m^2).

$$\text{IMT} = \frac{\text{Berat badan (kg)}}{\text{Tinggi badan (m}^2\text{)}}$$

Untuk menghitung IMT hanya diperlukan dua data utama yaitu tinggi dan berat badan. Metode ini memiliki keunggulan karena biayanya rendah atau bahkan gratis, proses pengukurannya juga mudah, serta hasilnya dapat dibandingkan dengan standar rentang IMT yang sudah ditetapkan dalam tabel kriteria Asia Pasifik :

Tabel 1
Indeks Massa Tubuh

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	$\geq 30,0$

(Sumber : Lasabuda, Wowor dan Mewo, 2015)

Orang yang kelebihan berat badan memiliki IMT yang lebih tinggi dalam rentang sedang hingga berat yang meningkatkan risiko masalah kardiovaskular

seperti hipertensi, dislipidemia, diabetes mellitus dan masalah kesehatan lainnya di masa mendatang. Morbiditas dan kematian di masa mendatang dapat diprediksi oleh IMT yang lebih tinggi atau lebih rendah, karena IMT dapat mengukur kelebihan berat badan daripada kelebihan lemak tubuh dan sering digunakan sebagai parameter kegemukan tubuh atau obesitas (Makmun dan Pratama, 2021).

B. Obesitas

Obesitas atau kelebihan berat badan merupakan masalah kesehatan yang terjadi ketika jumlah lemak dalam tubuh melebihi batas normal yang dibutuhkan. Penumpukan lemak yang berlebih ini dapat menyebabkan peningkatan berat badan dan membahayakan kondisi kesehatan seseorang (Dewi, 2015).

Obesitas bisa dipengaruhi oleh berbagai faktor, baik dari dalam tubuh seperti faktor genetik, maupun faktor luar. Penyebab yang paling umum antara lain konsumsi berlebihan zat gizi makro (karbohidrat, lemak, dan protein), kebiasaan mengonsumsi makanan cepat saji dibandingkan makanan sehat, pola makan yang tidak teratur, kurang berolahraga, serta adanya riwayat obesitas dalam keluarga. Penyebab utama obesitas adalah ketidakseimbangan antara energi yang masuk (makanan) dan energi yang dikeluarkan (aktivitas), yang diperparah dengan mudahnya akses terhadap makanan tinggi kalori (Mu' dan Hanum, 2023).

Obesitas berdampak besar terhadap risiko munculnya berbagai penyakit kronis, seperti diabetes mellitus tipe 2, kanker, penyakit jantung, stroke, tekanan darah tinggi, serta gangguan pada tulang dan sendi. Orang yang mengalami obesitas cenderung memiliki risiko lebih tinggi untuk menderita penyakit-penyakit tersebut, yang berujung pada angka kesakitan dan kematian yang juga lebih tinggi. Dengan kata lain, obesitas bisa memengaruhi kesehatan baik secara langsung maupun tidak

langsung. Di negara maju, jumlah kasus gangguan kesehatan akibat obesitas bahkan melebihi kasus yang disebabkan oleh konsumsi alkohol dan rokok. Beberapa ahli menyebut obesitas sebagai epidemi bahkan pandemi, karena jumlah penderitanya yang terus meningkat secara global (Saraswati dkk., 2021).

Selama 25 tahun terakhir, kasus obesitas semakin umum terjadi di negara maju dan berkembang. Data tentang kelebihan berat badan dan obesitas telah tersedia di Indonesia sejak Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) kedua, yang dilakukan antara tahun 2007 dan 2013 sebagai bagian dari Riset Kesehatan Dasar. Sebuah artikel yang diterbitkan pada bulan Juni 2016 di *The Lancet* menyatakan bahwa 1,225 miliar orang di seluruh dunia sudah mengalami kelebihan berat badan atau obesitas pada tahun 1980. Pada tahun 2011, terdapat 400 juta orang obesitas dan 1,6 miliar orang dewasa yang kelebihan berat badan. Kemudian pada tahun 2013, 700 juta orang mengalami obesitas dan 2,3 miliar orang mengalami kelebihan berat badan (Triwinarto, Utami dan Hermina, 2016).

Data Riset Kesehatan Dasar tahun 2013, peningkatan prevalensi obesitas dilihat dari jenis kelamin (Kurdanti dkk., 2015). Prevalensi obesitas pada wanita jauh lebih tinggi daripada pria, dengan nilai 39,7 % pada wanita dan 19,7 % pada pria. Pada tahun 2018, angka obesitas pada orang dewasa di Indonesia meningkat menjadi 21,8%. Persentase obesitas di Indonesia pada tahun 2023 paling banyak di usia 40-50 tahun, prevalensi pada perempuan sebesar 41,7 % dan laki-laki 19,3 % (Kebijakan Pembangunan, Kementerian dan RI, 2023). Sedangkan di provinsi Bali tahun 2018 persentase obesitas sebesar 23,9 %, prevalensi pada perempuan sebesar 25,4 % dan laki-laki 22,4 %. Kota Denpasar memiliki persentase obesitas tertinggi

dengan angka 29,17 % pada perempuan dan 26,59 % pada laki-laki (Riskesdas Bali, 2018).

Obesitas dipengaruhi oleh beberapa faktor utama seperti meningkatnya asupan makanan, kondisi metabolisme tubuh, penggunaan energi dan faktor genetik. Perkembangan kota, globalisasi, serta gaya hidup modern menjadi penyebab utama meningkatnya kasus obesitas. Terdapat dua jenis obesitas, yang pertama adalah obesitas sentral atau disebut juga obesitas perut (*android*) yang ditandai dengan nilai Indeks Massa Tubuh (IMT) tinggi, lemak tubuh berlebih, serta ukuran lingkaran pinggang lebih dari 94 cm pada pria dan lebih dari 80 cm pada wanita. Obesitas jenis ini merupakan salah satu penyebab utama diabetes mellitus tipe 2. Jenis kedua adalah obesitas ginekoid atau obesitas perifer yang ditandai dengan lingkaran perut yang masih normal, tetapi IMT dan kadar lemak tubuh tinggi. Lemak pada obesitas ini cenderung menumpuk di bagian bawah tubuh seperti paha dan pinggul, serta lebih banyak disimpan di bawah kulit. Jenis obesitas ini umumnya dialami wanita dan cenderung lebih tidak berisiko secara metabolik (Saraswati dkk., 2021).

World Health Organization (WHO) telah menetapkan angka *cut off* untuk kategori obesitas pada orang Asia dewasa yaitu ≥ 25 .

Tabel 2
Klasifikasi Obesitas Orang Dewasa
Berdasarkan IMT Menurut WHO

Klasifikasi Obesitas	IMT (kg/m ²)
Obesitas I	25,0 – 29,9
Obesitas II	$\geq 30,0$

(Sumber : Sulistyowati, 2015)

C. Genetik

Gen merupakan satuan dasar pewarisan sifat pada makhluk hidup, yang tersimpan di lokasi tertentu dalam kromosom. Gen menyimpan informasi dalam bentuk kode yang terdapat pada materi genetik berupa DNA, RNA, atau pada beberapa jenis virus. Aktivitas gen dapat dipengaruhi oleh faktor internal seperti kondisi tubuh maupun faktor eksternal seperti perilaku atau lingkungan. Gen tersusun atas bagian yang disebut ekson (yang mengkode informasi genetik) dan intron (yang tidak mengkode), keduanya membentuk struktur lengkap dari suatu gen (Suhaeny, 2021).

Adenine, Tyamine, Cytosine dan *Guanine* (ATCG) adalah empat huruf kimia yang menyusun DNA yang mengandung informasi genetik manusia. Huruf-huruf ini dikenal sebagai gen. Gen melakukan hal ini dengan mengatur reaksi kimia yang membangun jalur metabolisme (Arimbi dkk., 2022).

Gen memiliki peran penting dalam proses replikasi (penggandaan diri) dan sintesis protein. DNA dalam gen mampu menyalin dirinya sendiri, mendukung pembentukan sel-sel baru, serta mewariskan informasi genetik ke generasi berikutnya. Fungsi utama lainnya dari gen adalah mengarahkan pembentukan protein, dengan menentukan urutan asam amino yang menyusun protein tersebut. Dengan demikian, gen memberikan instruksi spesifik mengenai jenis protein yang perlu dibentuk oleh tubuh (Arimbi dkk., 2022).

Gen dominan yang dilambangkan dengan huruf kapital, selalu hadir sebagai sifat yang dapat diamati. Hanya jika dikombinasikan dengan gen resesif lain, gen resesif (ditunjukkan dengan huruf kecil) dapat bermanifestasi sebagai sifat yang dapat diamati. Jadi, fenotipe A akan bermanifestasi sebagai genotipe AA atau Aa.

Sementara itu, jika genotipnya hanya aa, gen a akan bermanifestasi sebagai fenotipe a. Organisme homozigot adalah organisme yang memiliki dua gen identik pada satu lokus (AA atau aa), sedangkan organisme heterozigot memiliki pasangan gen alternatif (Aa). Alel adalah gen alternatif (A atau a) (Suhaeny, 2021)

1. Asam Deoksiribonukleat (DNA)

Gen yang berada di dalam inti sel tersusun dari DNA dan asam nukleat. DNA menyimpan informasi biologis yang penting bagi semua makhluk hidup, serta beberapa jenis virus. Selain ditemukan di inti sel, DNA juga terdapat di organel sel seperti mitokondria dan kloroplas. Penemuan struktur DNA didasarkan pada foto difraksi sinar-X yang dibuat oleh Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins, yang kemudian dimanfaatkan oleh James Watson dan Francis Crick untuk merancang model struktur DNA pada tahun 1953. Mereka mengembangkan bentuk heliks ganda DNA berdasarkan analisis data fisik dan kimia. Struktur DNA ini terdiri dari dua rantai polinukleotida yang saling melilit membentuk untai ganda (Wahyuni, 2018).

Penumpukan basa nukleotida yang berdekatan pada satu untai DNA menentukan strukturnya, sedangkan ikatan hidrogen antara basa yang berpasangan mengatur struktur untai ganda. Polinukleotida adalah satu untai DNA. Komponen satu nukleotida adalah basa nitrogen, gula pentosa, dan fosfat. Orientasi kedua untai DNA bersifat antiparalel, artinya keduanya berlawanan: satu untai adalah 5'→ 3', dan yang lainnya adalah 3'→ 5'. Basa guanin (G) dengan sitosin (C) serta adenin (A) dengan timin (T) membentuk ikatan hidrogen yang menyatukan kedua rantai tersebut (Wahyuni, 2018).

DNA menyimpan cetak biru sifat-sifat manusia yang bisa diwariskan ke generasi berikutnya. Karena itu, DNA yang diturunkan dari orang tua ke anak memiliki susunan yang identik. Nama "asam deoksiribonukleat" (DNA) terbentuk dari beberapa kata, yaitu "deoksiribosa" yang merupakan jenis gula pentosa, "nukleat" dari kata "nukleus" yang berarti inti sel, dan "asam" sebagai penanda sifat kimianya. DNA adalah zat kimia utama yang bertanggung jawab dalam membawa dan menyampaikan informasi genetik dari satu generasi ke generasi berikutnya, baik di tingkat sel maupun organisme secara keseluruhan. Molekul ini merupakan bagian penting dari gen, yang berperan dalam mewariskan sifat-sifat dari orang tua kepada anaknya (Effendi, 2020).

2. Asam Ribonukleat (RNA)

Asam ribonukleat (RNA) adalah molekul polinukleotida yang lebih kecil dibandingkan DNA dan hanya terdiri dari satu untai (heliks tunggal). RNA tersusun atas basa nitrogen yaitu purin (adenin dan guanin) serta pirimidin (sitosin dan urasil) dan menggunakan gula pentosa jenis ribosa (Asypini, 2019). RNA dapat ditemukan baik di dalam inti sel maupun di sitoplasma. Ada tiga jenis utama RNA, yaitu RNA ribosom (rRNA), RNA *transfer* (tRNA), dan RNA *messenger* atau kurir (mRNA). Walaupun RNA berstruktur untai tunggal, sebagian segmen nukleotidanya bisa membentuk pasangan basa dengan bagian lain dari molekul yang sama, sehingga membentuk struktur seperti pasangan basa konvensional. Karena kemampuan ini, RNA dapat melipat menjadi bentuk tiga dimensi tertentu yang ditentukan oleh urutan nukleotidanya dan juga oleh interaksi pasangan basa yang tidak biasa (non-konvensional (Hidayat dkk., 2021). Enzim RNase yang hampir universal dengan cepat memecah molekul RNA yang stabil secara termodinamika (Khansa, 2021).

3. Perbedaan DNA dan RNA

Lima hal yang membedakan DNA dan RNA yaitu (Effendi, 2020):

- a. DNA memiliki tingkat susunan yang tetap, sedangkan RNA memiliki tingkat susunan yang tidak tetap
- b. RNA ditemukan dalam sitoplasma, mitokondria, kloroplas, dan kromosom. DNA ditemukan dalam kromosom nukleus, kloroplas, dan mitokondria.
- c. DNA berbentuk heliks ganda, sedangkan RNA hanya satu untai, pendek, dan tidak terpilin
- d. DNA memiliki kandungan gula yaitu deoksi ribosa, dalam RNA ribosa. Basa primidin DNA adalah timin dan RNA urasil.

D. Obesitas dan Genetik

Gen *ob* dikenal sebagai gen pertama yang dikaitkan dengan obesitas. Gen ini ditemukan pada tikus gemuk berwarna kuning dan merupakan kelainan genetik pertama yang berhasil diidentifikasi dan dikloning. Pada dua jenis tikus yang sering digunakan dalam penelitian, yaitu tikus obesitas dan tikus diabetes, ditemukan gangguan pada produksi leptin (*ob/ob*) serta gangguan pada reseptor leptin (*db/db*), yang berperan dalam regulasi berat badan (Rejeki, Albab dan Prasetya, 2021).

Mutasi gen kandidat yang terkait dengan homeostasis energi terus menjadi fokus penelitian tentang obesitas. Sejumlah mutasi gen, termasuk yang melibatkan leptin, reseptor leptin, *pro-opiomelanocortin (POMC)*, dan *reseptor melanocortin 4 (MC4R)* diyakini sebagai penyebab obesitas monofaktorial (Arieska dan Meutia, 2023).

1. Gen *Melanocortin 4 Receptor (MC4R)*

Gen *MC4R* merupakan salah satu gen penting yang berhubungan dengan pertumbuhan (Prihdanini dan Maharani, 2019). Gen ini berfungsi untuk menurunkan asupan makanan dan mengaktifkan enzim adenilat siklase. Selain itu, *MC4R* juga berperan dalam pengaturan aktivitas insulin dan komposisi tubuh (Hazimi dkk., 2022). Gen *MC4R* termasuk dalam kelompok protein transmembran yang disebut *G-protein-coupled receptors* (GPCRs) dan diekspresikan di area otak yaitu hipotalamus, yang berperan dalam pengaturan berat badan dan obesitas (Rohmawan, 2022).

Gen *Melanocortin 4 Receptor (MC4R)* memiliki 800 pasangan basa, yang mengkode sekitar 332 asam amino dan ditemukan pada kromosom 18q21.3 (Arieska dan Meutia, 2023). Gen ini ditemukan di berbagai bagian sistem saraf seperti batang otak, sumsum tulang belakang, saraf simpatis preganglionik dan di nukleus paraventrikular hipotalamus. Fungsi utamanya adalah untuk membantu mengatur keseimbangan antara jumlah energi yang digunakan dan jumlah makanan yang dikonsumsi oleh tubuh (Heyder dkk., 2019).

Gen *MC4R* dapat diaktifkan oleh proses transduksi sinyal dari dalam maupun luar sel. Gen ini berinteraksi dengan protein G di dalam sel. *MC4R* termasuk dalam kelompok reseptor yang disebut *G-protein-coupled receptors* (GPCRs), yaitu reseptor protein yang memiliki tujuh bagian transmembran yang melewati membran sel. Ketujuh bagian ini dikenal sebagai TM1 hingga TM7. Ujung N (N-terminus) berada di bagian luar sel, sedangkan ujung C (C-terminus) terletak di bagian dalam sel (Arieska dan Meutia, 2023).

Empat jenis melanokortin endogen yang ditemukan di *MC4R* adalah β -*MSH*, α -*MSH*, *ACTH*, dan γ *MSH*. Kategori-kategori ini dipisahkan menurut tingkat afinitas yang dimilikinya. *Pro-opiomelanokortin (POMC)* diterjemahkan menjadi empat komponen endogen (Heyder dkk., 2019). Penggunaan produk *POMC* untuk mengaktifkan *MC4R* akan meningkatkan rasa lapar. Selain itu, inaktivasi *MC4R* akan mengurangi rasa lapar. Agonis *α -melanocyte-stimulating hormon (α -MSH)* atau β -*MSH* bertanggung jawab atas dampak anoreksigenik dari aktivasi *MC4R*, sedangkan antagonis *agouti-related peptide (AgRP)* yang terdiri dari 132 asam amino, bertanggung jawab atas efek oreksigenik dari inaktivasi *MC4R*, mutasi dapat mengakibatkan gangguan kesalahan dalam proses jalur transduksi (Arieska dan Meutia, 2023).

Penelitian kohort menunjukkan bahwa gen *MC4R* memiliki lebih dari 150 jenis mutasi. Di antaranya, terdapat 122 mutasi *missense* (salah arti), dua mutasi berupa penghapusan (delesi), tujuh mutasi *nonsense* (berhenti mendadak) dan sisanya merupakan mutasi *frameshift* (pergeseran rangka baca). Mutasi-mutasi ini dapat meningkatkan risiko seseorang mengalami obesitas. Selain itu, reseptor protein G yang bekerja bersama *MC4R* juga dapat bermutasi, sehingga menyebabkan gangguan dalam proses pengikatan dengan gen *MC4R*. Sebagian besar mutasi *MC4R* bersifat heterozigot dan sering dikaitkan dengan gejala seperti peningkatan kepadatan tulang, nafsu makan berlebih (*hiperfagia*), pertumbuhan tubuh yang cepat, Indeks Massa Tubuh (IMT) yang tinggi dan kadar insulin yang tinggi dalam darah (*hiperinsulinemia*) (Hauser dkk., 2017).

Melanocortin 4 Receptor (MC4R) memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan energi dalam tubuh atau yang dikenal sebagai homeostasis energi.

Kemajuan teknologi saat ini membuat proses identifikasi gen menjadi lebih mudah dan cepat. Salah satu hormon utama yang bekerja melalui pengaruh gen *MC4R* adalah leptin, yang berperan dalam perkembangan obesitas. Selain itu, *MC4R* juga terlibat dalam pengaturan sistem reproduksi, pengendalian aktivitas hormon insulin, serta menjaga fungsi sistem kardiovaskular (Arieska dan Meutia, 2023).

2. Polimorfisme

Polimorfisme merupakan variasi genetik yang dapat memengaruhi aktivitas dan efektivitas enzim dalam menjalankan fungsinya. Dengan kata lain, polimorfisme adalah kondisi di mana suatu spesies memiliki dua atau lebih tampilan fisik (fenotipe) yang berbeda. Agar bisa dikategorikan sebagai polimorfisme, variasi tersebut harus muncul secara bersamaan dalam satu populasi yang menjalani perkawinan acak (panmiktik) dan hidup di lingkungan yang sama (Arimbi dkk., 2022). Polimorfisme bisa berasal dari perubahan pada satu basa DNA (dikenal sebagai polimorfisme nukleotida tunggal atau SNP), atau dari variasi urutan DNA yang berulang, seperti minisatelit dan mikrosatelit (polimorfisme berdasarkan panjang). SNP berperan sebagai faktor yang meningkatkan kecenderungan terhadap suatu penyakit, tetapi bukan penyebab utama penyakit tersebut (Mahama dan Surydanari, 2023).

Pada manusia polimorfisme cukup sering ditemukan, terjadi sekitar setiap 1 dari 1000 nukleotida, dan sebagian besar tidak menimbulkan dampak kesehatan yang serius. Polimorfisme bisa menjelaskan variasi seperti jenis golongan darah atau warna rambut, namun perubahan genetik semacam ini biasanya tidak berbahaya (Mahama dan Surydanari, 2023). Namun, polimorfisme bisa menjadi penting jika di masa mendatang ada zat tertentu yang memengaruhi gen terkait golongan darah

atau rambut dan memicu perubahan atau mutasi genetik. Jika hal ini terjadi, tubuh memiliki kemampuan untuk memperbaikinya melalui pembentukan bentuk polimorfisme yang baru. Oleh karena itu, ketika suatu polimorfisme terdeteksi dalam pemeriksaan genetik, tidak selalu berarti bahwa orang tersebut memiliki atau akan mengalami penyakit tertentu (Suprapti, 2019).

E. Metode Pemeriksaan Polimorfisme

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mensintesis dan menggandakan DNA secara buatan di luar tubuh makhluk hidup (*in vitro*). Metode ini pertama kali ditemukan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Melalui teknik PCR, segmen DNA dapat diperbanyak hingga jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Proses ini bekerja dengan menggandakan untai ganda DNA target melalui serangkaian siklus berulang. Untuk memastikan proses PCR berjalan optimal, diperlukan tahap optimasi terlebih dahulu agar kondisi dan komposisi yang digunakan sesuai dengan kebutuhan sampel penelitian (Setyawati dan Zubaidah, 2021) .

Beberapa komponen utama yang dibutuhkan dalam reaksi PCR meliputi: DNA *template* sebagai cetakan, primer atau oligonukleotida pendek yang sesuai dengan urutan DNA target, deoksinukleotida trifosfat (dNTPs), larutan penyangga (*buffer* PCR), magnesium klorida ($MgCl_2$), serta enzim DNA *polymerase*. Tahapan dalam PCR dimulai dari pre-denaturasi, denaturasi, pelekatan primer (*annealing*), ekstensi atau perpanjangan, dan pasca-ekstensi. Selama tahap denaturasi hingga ekstensi, proses penggandaan DNA terjadi dan diulang dalam beberapa siklus. Faktor-faktor penting yang memengaruhi keberhasilan PCR antara lain adalah kualitas dan

jumlah DNA, suhu *annealing*, kadar $MgCl_2$, aktivitas enzim *polymerase*, konsentrasi primer, jumlah siklus, serta kondisi *buffer* yang digunakan (Setyawati dan Zubaidah, 2021) .

Setelah produk PCR diperoleh, langkah selanjutnya adalah menjalankan proses elektroforesis. Tujuannya adalah untuk melihat hasil amplifikasi DNA dengan cara membandingkan ketebalan dan ukuran pita secara visual. Pita tunggal yang tampak jelas dan sesuai ukuran target dianggap sebagai hasil yang ideal. Untuk mendapatkan hasil terbaik, PCR dilakukan menggunakan kombinasi konsentrasi primer dan suhu yang memberikan kualitas pita paling baik pada sampel (Khairul Anissa dkk., 2024).

PCR sangat bermanfaat karena memiliki keunggulan dalam hal ketelitian, efisiensi, dan keakuratan. Metode ini sangat spesifik karena mampu memperbanyak fragmen DNA melalui siklus yang berulang. Tingkat presisi yang tinggi berasal dari kemampuan enzim DNA *polymerase* dalam meminimalkan kesalahan saat proses amplifikasi berlangsung. Namun demikian, salah satu kendala utama dari penggunaan PCR adalah biaya operasionalnya yang tergolong cukup tinggi (Nugroho dkk., 2021) .

Metode PCR terdiri dari beberapa jenis diantaranya (Mahama dan Surydanari, 2023) :

a. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Teknik ini memanfaatkan perbedaan urutan DNA antar individu untuk membedakan satu organisme dengan yang lain. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) merujuk pada variasi dalam urutan DNA di lokasi tertentu yang dapat dikenali menggunakan enzim pemotong (enzim restriksi). Ketika enzim

ini digunakan untuk memotong DNA, akan dihasilkan fragmen-fragmen dengan panjang yang berbeda. Perbedaan panjang fragmen inilah yang digunakan sebagai penanda genetik, misalnya untuk melacak pewarisan gen dalam satu keluarga (National Human Genome Research Institute, 2024).

Enzim restriksi memotong DNA pada titik tertentu dan menghasilkan potongan-potongan DNA dengan ukuran yang telah ditentukan. Fragmen-fragmen ini kemudian dapat dipisahkan menggunakan teknik elektroforesis, di mana potongan yang lebih kecil akan bergerak lebih jauh dibandingkan dengan yang lebih besar. Untuk melihat fragmen DNA yang spesifik, digunakan probe berupa untai tunggal DNA yang telah diberi label radioaktif dan memiliki urutan komplementer terhadap target DNA. Probe ini akan menempel pada fragmen yang memiliki urutan basa yang cocok, sehingga membantu dalam mengidentifikasi fragmen DNA tertentu. Perbedaan urutan DNA ini, yang dikenal sebagai polimorfisme, dapat diwariskan oleh anggota komunitas tertentu (Emoto dkk., 2017).

RFLP sering kali dikaitkan dengan keberadaan penyakit genetik tertentu dan dapat memberikan informasi penting mengenai risiko seseorang terhadap penyakit tersebut. Polimorfisme ini dapat dijadikan sebagai indikator keberadaan gen penyakit, meskipun tidak secara langsung menunjukkan mutasi penyebabnya. Namun, tes ini tidak dapat dilakukan begitu saja karena hasilnya dapat bervariasi antar individu. Pada beberapa orang, RFLP mungkin terkait dengan gen yang bermutasi, sedangkan pada orang lain bisa saja terkait dengan alel yang normal. Oleh karena itu, selain pasien, anggota keluarga juga sebaiknya menjalani pemeriksaan untuk mengetahui kemungkinan pewarisan gen yang sama (Kasai dkk., 2015).

Probe yang paling efektif dalam metode ini adalah yang dapat melekat pada bagian DNA yang unik atau hanya muncul satu kali di seluruh genom. Biasanya, bagian DNA tersebut tidak memiliki fungsi penting, sehingga mutasi di wilayah ini tidak membahayakan organisme dan justru bisa menguntungkan karena fleksibel untuk perubahan. Ketika enzim restriksi memotong DNA, probe akan berikatan (hibridisasi) dengan fragmen DNA yang memiliki panjang berbeda tergantung pada variasi potongan yang diwarisi tiap individu. Akibatnya, dalam suatu populasi akan muncul berbagai versi gen (alel) atau bentuk polimorfisme. Sebagian orang mungkin bersifat heterozigot, dengan dua pita berbeda mewakili masing-masing alel, sementara yang lain bisa saja homozigot, hanya menunjukkan satu pita (Samarajeewa dkk., 2015).

b. *Reverse Transcriptase* (RT-PCR)

Melalui teknik ini, urutan RNA dari suatu sel atau jaringan dapat diperoleh, diperbanyak, atau dianalisis. Enzim *reverse transcriptase* berperan dalam mengubah RNA menjadi cDNA, sehingga membantu dalam proses pemetaan gen dan analisis pola ekspresi gen tersebut.

c. *Quantitative PCR* (qPCR)

Quantitative PCR (qPCR) merupakan pengembangan dari PCR konvensional yang tidak hanya memperbanyak DNA, tetapi juga memungkinkan pengukuran jumlah produk PCR secara langsung saat reaksi berlangsung (*real-time*). Selain komponen standar PCR, qPCR menggunakan molekul fluoresen yang akan bersinar saat DNA diperbanyak, mempermudah pengamatan. Kelebihan qPCR adalah dapat mendeteksi hasil secara *real-time* tanpa perlu proses elektroforesis tambahan. Analisis *post-PCR* seperti *melting curve* juga memungkinkan identifikasi variasi

genetik di lokasi tertentu. Metode ini lebih praktis dan cepat karena tidak memerlukan banyak tahapan setelah PCR selesai, serta mengurangi risiko kontaminasi. qPCR sering digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi gen atau menghitung salinan gen dengan membandingkan jumlah DNA target yang diperoleh dengan jumlah DNA/cDNA standar yang sudah diketahui (Arimbi dkk., 2022).

d. *Droplet digital PCR (ddPCR)*

Droplet Digital PCR (ddPCR) merupakan teknologi baru yang memungkinkan penghitungan biomarker molekuler dalam jumlah yang sangat kecil secara akurat. Teknologi ini bekerja dengan membagi campuran reaksi PCR menjadi sekitar 20.000 tetes kecil (nano-droplet) (Arimbi dkk., 2022). Setiap tetes dianalisis secara terpisah dan sinyal fluoresensinya dapat dihitung secara otomatis. Prosedur PCR dilakukan setelah pembagian sampel ke dalam partisi kecil (*microwell*), mirip dengan proses PCR biasa namun lebih *sensitive* (Putra dkk., 2020).

e. *Single-strand Conformation polymorphism (SSCP)*

Single Strand Conformation Polymorphism adalah metode lanjutan setelah PCR yang digunakan untuk mendeteksi mutasi di berbagai titik yang tersebar di wilayah ekson (Arimbi dkk., 2022). Teknik ini mampu mengidentifikasi perubahan hanya pada satu nukleotida sekalipun. Setelah PCR selesai, produk DNA dipanaskan dan diberi larutan denaturasi, lalu dijalankan dalam gel poliakrilamid (Putra dkk., 2020). Jika ada mutasi, bentuk (konformasi) untai DNA akan berubah dan menyebabkan perbedaan dalam kecepatan migrasi saat elektroforesis, sehingga dapat dibedakan antara DNA normal (*wild type*) dan yang bermutasi (Arimbi dkk., 2022).

f. *Allele-specific PCR (AS-PCR) dan Allelespecific Hybridization (ASH)*

AS-PCR dan ASH juga dikenal sebagai dengan nama analisis dotblot, umum digunakan untuk mendeteksi mutasi titik atau polimorfisme genetik. AS-PCR, atau juga dikenal sebagai ARMS (*Amplified Refractory Mutation System*) menggunakan dua reaksi PCR, satu dengan primer yang cocok dengan sekuens normal dan satu lagi dengan primer yang spesifik terhadap sekuens mutan. Deteksi hasil dapat dilakukan dengan elektroforesis atau melalui real-time PCR. Meskipun metode ini tergolong sederhana dan praktis untuk mendeteksi SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ada kelemahan dalam penerapannya. Pada kondisi yang tidak optimal, primer yang dirancang spesifik terhadap alel tertentu bisa gagal membedakan antara alel yang berbeda (Arimbi dkk., 2022) .

2. *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

(PCR-RFLP)

Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) merupakan teknik yang menggabungkan dua metode utama dalam analisis DNA, yaitu PCR untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu dan RFLP untuk mengamati variasi panjang fragmen hasil pemotongan oleh enzim. Ada tiga tahap utama dalam metode ini, yaitu amplifikasi DNA pada gen target, pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi endonuklease, dan visualisasi fragmen DNA dengan elektroforesis yang memperlihatkan perbedaan panjang fragmen tersebut. (Septiasari, 2023)

Penemuan enzim yang mampu memotong molekul DNA pada lokasi spesifik dengan jumlah terbatas membuka peluang besar dalam pengembangan teknologi DNA rekombinan. Enzim ini, yang pertama kali ditemukan di bakteri pada akhir

tahun 1960-an, dikenal dengan sebutan enzim restriksi. Fungsi utama enzim ini dalam bakteri adalah mengenali dan memotong DNA asing yang tidak dikenal, termasuk DNA dari faga, sebagai bentuk pertahanan terhadap invasi virus atau DNA dari bakteri lain. Enzim ini mengidentifikasi urutan DNA pendek yang bersifat palindromik yaitu urutan yang terbaca sama dari kedua arah dan memotong DNA tepat di lokasi tersebut. Pemotongan ini menghasilkan dua tipe ujung fragmen DNA, yaitu ujung tumpul (*blunt end*) dan ujung lengket atau tajam (*sticky end*) (Kusumawaty dkk., 2018).

Dalam penelitian PCR-RFLP, enzim restriksi yang sering digunakan adalah tipe II, yang memiliki kemampuan mengenali urutan basa tertentu pada DNA dan memotongnya secara spesifik. Enzim ini bekerja optimal ketika kondisi suhu, pH, dan konsentrasi garam sesuai dengan karakteristiknya. Dengan adanya banyak situs pengenalan enzim dalam molekul DNA, hasil pemotongan akan menghasilkan fragmen dengan ukuran dan jumlah yang bervariasi. Saat ini, telah dikenal sekitar 250 jenis enzim restriksi yang berbeda (Rita S, Widyastuti dan Nurwahyunani, 2021).

Dalam penelitian ini, digunakan enzim restriksi *EcoRI*, yang merupakan enzim pertama kali diisolasi dari bakteri *Escherichia coli strain RY*. *EcoRI* mengenali situs spesifik yaitu urutan G*AATTC, dan memotong DNA dengan menghasilkan ujung lengket (*sticky end*). Pemotongan oleh enzim ini bersifat palindromik, artinya urutan yang dikenali pada kedua untai DNA selalu sama jika dibaca dari arah 5' ke 3' (Kusumawaty dkk., 2018).

3. Sequencing DNA

Pengurutan DNA bertujuan untuk menentukan susunan basa nitrogen dalam sampel DNA, yaitu adenin, guanin, sitosin, dan timin. Teknik ini, yang juga dikenal sebagai *sequencing* DNA, menjadi salah satu kemajuan penting dalam bidang sains seperti genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomik. Contoh aplikasi teknologi ini yang sangat ambisius adalah pengurutan genom manusia (Saputri, 2018).

Metode Sanger (*Sanger Dideoxy Sequencing*) adalah metode pertama yang digunakan untuk mengurutkan DNA. Teknik ini menggunakan primer khusus untuk reaksi pengurutan dan memanfaatkan DNA cetakan sebagai bahan awal. Selama tiga dekade, teknologi Sanger dan variannya menjadi teknik pengurutan DNA yang paling banyak dipakai (Tasma, 2015).

Hasil pengurutan dengan metode Sanger biasanya menghasilkan urutan sepanjang 1000 hingga 1200 pasangan basa, dengan maksimum mencapai 2000 pasangan basa. Prosesnya melibatkan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi, pengkloningan fragmen DNA ke dalam vektor khusus, dan pengurutan setiap fragmen secara terpisah. Dengan menyusun dan menyelaraskan fragmen-fragmen DNA yang tumpang tindih, pemetaan genom manusia dapat diselesaikan secara lengkap (Tasma, 2015).

4. Next Generation Sequencing (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) atau sekuensing generasi berikutnya dikenal sebagai teknologi sekuensing paralel dalam skala besar. Mesin NGS menghasilkan urutan DNA yang jauh lebih pendek dibandingkan dengan metode Sanger, yaitu sekitar 50 sampai 500 pasangan basa. Karena panjang sekuensnya yang pendek,

setiap fragmen DNA diurutkan berkali-kali untuk mencapai cakupan genom yang memadai. NGS bekerja dengan memotong DNA genom menjadi fragmen pendek secara acak, lalu menambahkan adaptor khusus agar fragmen-fragmen tersebut dapat diurutkan dan disusun kembali (Tasma, 2015).

5. Hibridisasi Fluoresensi In Situ (FISH)

Teknik sitogenetika yang disebut hibridisasi fluoresensi in situ (FISH) digunakan untuk mendeteksi dan menentukan posisi urutan DNA tertentu pada kromosom. Dalam metode ini, probe yang diberi label fluoresensi hanya akan menempel pada segmen kromosom yang memiliki kesamaan urutan yang tinggi. Lokasi probe tersebut dapat dilihat dengan mikroskop fluoresensi. FISH tidak hanya berguna untuk mendeteksi mRNA spesifik dalam jaringan, tetapi juga sering dipakai untuk identifikasi DNA dalam konseling genetik, terapi, dan penentuan spesies. Teknik ini juga dapat membantu memetakan pola ekspresi gen secara temporal dan spasial di jaringan dan sel (Hidayaturrahmi dan Tirthaningsih, 2015).

6. DNA *Microarray*

Teknologi DNA *microarray* menggunakan susunan DNA atau probe oligonukleotida dengan kepadatan tinggi untuk mendapatkan data genetik. Oligonukleotida adalah segmen rantai DNA yang biasanya terdiri dari kurang dari 50 basa. Susunan probe ini ditempatkan pada chip berbahan semikonduktor, di mana tiap probe mengandung sejumlah sekuens DNA tertentu dalam jumlah sangat kecil, yakni di tingkat pikomol (10^{-12} mol) (Ihsani, Arifin dan Fatoni, 2020).

Microarray dapat memuat ratusan ribu sampel sekaligus dalam satu koleksi. Untuk membandingkan ekspresi gen antara sel sehat dan sakit, *microarray* menggunakan data sekuens yang diperoleh dari proyek genom dan inisiatif

sekuensing lainnya. Terdapat dua jenis *microarray* yang berbeda berdasarkan jumlah gen yang dianalisis dalam satu *chip* (Alonso, Larraga dan Alcolea, 2018) :

- a. *One channel microarray* adalah jenis *microarray* yang berisi satu set urutan gen dari sampel yang dianalisis melalui hibridisasi. Jenis ini menggunakan basis komputasi dan membutuhkan dua chip untuk melakukan perbandingan antar sampel.
- b. *Two channel microarray* adalah *microarray* yang memiliki dua urutan gen sampel yang berbeda untuk pemrosesan hibridisasi kompetitif. Jenis ini berwarna hijau, yang merupakan warna neon yang berbeda.