

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit metabolik kronis yang ditandai dengan gangguan dalam pengaturan kadar glukosa darah akibat produksi insulin yang tidak mencukupi atau karena respon tubuh yang tidak efektif terhadap insulin. Akibatnya, terjadi kondisi hiperglikemia atau peningkatan kadar gula darah (Mustofa, Purwono, dan Ludiana, 2022). Gejala umum yang dialami penderita diabetes melitus meliputi peningkatan nafsu makan (polifagia), frekuensi buang air kecil yang lebih sering (poliuria), rasa haus berlebihan (polidipsia), mudah lelah, tubuh terasa lemas, pusing (gangguan sensorik), mati rasa atau kesemutan (gangguan sistem kardiovaskular), serta perubahan kadar glukosa dalam darah (Anggraini, Widiani, dan Budiono, 2023). Diabetes melitus (DM) terbagi menjadi tiga jenis, yaitu DM tipe 1 yang disebabkan oleh kegagalan pankreas dalam memproduksi insulin, DM tipe 2 akibat rendahnya kadar insulin dalam tubuh, dan DM gestasional yang terjadi karena peningkatan kadar gula darah selama kehamilan. Banyak orang sering mengabaikan gejala diabetes melitus, sehingga penyakit ini sering baru terdeteksi setelah muncul komplikasi. Karena sifatnya yang sulit terdeteksi di awal, diabetes melitus dikenal sebagai '*Silent Killer*' (Ramadhani dan Khotami, 2023).

Diabetes melitus tipe 2 merupakan jenis yang paling umum diderita dibandingkan tipe lainnya, dengan sekitar 90% dari seluruh kasus diabetes melitus termasuk dalam kategori ini. Peningkatan prevalensi dari tahun ke tahun menjadikan diabetes sebagai masalah kesehatan masyarakat yang perlu mendapat

perhatian dan penanganan serius (Ramadhani dan Khotami, 2023). Tingginya prevalensi diabetes melitus tipe 2 disebabkan oleh interaksi antara faktor genetik dan lingkungan. Faktor lingkungan yang berkontribusi terhadap peningkatan risiko DM tipe 2 meliputi perubahan gaya hidup, seperti pola makan tidak seimbang yang dapat menyebabkan obesitas. Selain itu, kurangnya aktivitas fisik juga menjadi faktor risiko, sedangkan olahraga teratur dapat memperbaiki fungsi pembuluh darah, meningkatkan sensitivitas insulin, dan memperbaiki toleransi glukosa. Risiko juga meningkat seiring bertambahnya usia, khususnya pada kelompok umur 45–60 tahun, karena toleransi tubuh terhadap glukosa cenderung menurun seiring penuaan. Aktivitas mitokondria dalam sel otot juga menurun, mengakibatkan penumpukan lemak dan memperparah resistensi insulin (Imelda, 2019).

Berdasarkan jenis kelamin, prevalensi DM tipe 2 lebih tinggi pada wanita dibandingkan pria. Faktor genetik juga memengaruhi perkembangan diabetes. Jika salah satu orang tua menderita DM, risiko keturunannya terkena penyakit ini sebesar 15%, sedangkan jika kedua orang tua memiliki DM, risikonya meningkat menjadi 75%. Meskipun DM tipe 1 sering dikaitkan dengan kelainan pankreas yang menghambat produksi insulin, riwayat keluarga lebih sering dihubungkan dengan DM tipe 2 dari pada tipe 1 (Imelda, 2019).

Kepatuhan terhadap terapi pengobatan pada pasien DM sangat penting untuk keberhasilan pengobatan. Kepatuhan pasien dalam mengonsumsi obat antidiabetes oral merupakan salah satu faktor penting yang paling mempengaruhi keberhasilan monitoring glukosa darah pada penderita diabetes Melitus tipe 2. Pasien yang patuh pada pengobatan dan perawatan dapat memperbaiki kontrol gula darah dan mencegah kemungkinan komplikasi akibat penyakit tersebut. Oleh karena itu,

pendekatan terhadap pasien yang mengedukasi dan meningkatkan kesadaran akan pentingnya kepatuhan pada pengobatan adalah kunci dalam pengelolaan Diabetes Melitus dan penyakit tidak menular lainnya (Nursanti, Wibiksana, dan Astrianti, 2023).

B. Obesitas

Tingginya prevalensi diabetes melitus tipe II dikarenakan oleh beberapa penyebab seperti usia, jenis kelamin, genetik, pola makan, obesitas dan aktivitas fisik (Imelda, 2019). Pola makan tidak terkontrol akan menyebabkan obesitas yang dimana merupakan faktor yang paling berisiko terhadap kejadian diabetes melitus tipe II. Individu yang memiliki Indeks Massa Tubuh (IMT) $\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ tergolong gemuk dan obesitas. Diabetes Melitus tidak hanya terjadi pada usia dewasa, namun juga terjadi pada usia remaja (Qifti, Malini, dan Yetti, 2020).

Masa remaja merupakan fase dari anak-anak menuju dewasa. Terdapat 3 fase pada masa remaja yaitu, remaja awal (*early adolescence*) dari usia 12 tahun sampai 14 tahun, remaja madya (*middle adolescence*) dari usia 15 tahun sampai 18 tahun dan remaja akhir (*late adolescence*) dari usia 19 tahun sampai 21 tahun (Rusuli, 2022). Remaja menjadi kelompok usia yang rentan mengalami peningkatan berat badan, karena pada fase ini remaja membutuhkan energi lebih banyak untuk menunjang percepatan pertumbuhan dan perkembangan tubuhnya. Berat badan berlebih dan obesitas pada remaja dapat disebabkan oleh gaya hidup yang kurang sehat seperti asupan zat gizi makro berlebih, frekuensi konsumsi *fast food* sering, dan aktivitas fisik yang kurang (Qifti, Malini, dan Yetti, 2020).

Selama masa remaja, tubuh mengalami percepatan pertumbuhan dan perkembangan, yang secara alami meningkatkan kebutuhan akan nutrisi. Kondisi ini membuat remaja rentan terhadap masalah malnutrisi. Malnutrisi sendiri dapat berupa kekurangan atau kelebihan asupan gizi, ketidakseimbangan zat gizi penting, ataupun gangguan dalam proses pemanfaatan gizi oleh tubuh. Jenis-jenis malnutrisi mencakup gizi kurang (*wasting, stunting, dan underweight*), gizi lebih (*overweight dan obesitas*), serta kekurangan vitamin dan mineral. Masalah malnutrisi pada remaja dapat berdampak negatif terhadap capaian akademik karena memengaruhi perkembangan mental, menurunkan motivasi belajar, dan menghambat fungsi kognitif. Selain itu, kondisi kelebihan berat badan dan obesitas juga dapat mengganggu prestasi belajar melalui aspek sosial, seperti munculnya diskriminasi dan stigma (Noviyanti dkk., 2023).

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% (Kebijakan Pembangunan, Kementerian dan RI, 2023). Provinsi Bali termasuk dalam 18 provinsi di Indonesia yang mencatatkan prevalensi obesitas melebihi rata-rata nasional. Wilayah administrasi Provinsi Bali terdiri dari delapan kabupaten dan satu kota madya. Di antara wilayah tersebut, Kota Denpasar memiliki tingkat obesitas tertinggi, yaitu sebesar 15,2%, sedangkan angka terendah tercatat di Kabupaten Tabanan dengan persentase 12,6%. (Risksdas, 2018). Salah satu daerah perkotaan di Bali yang banyak memiliki penduduk adalah Kota Denpasar (Laksmi, Vidika, dan Widayanti, 2023).

Kawasan perkotaan cenderung memiliki risiko lebih tinggi terhadap kejadian obesitas. Lingkungan tempat tinggal turut berkontribusi terhadap kecenderungan kelebihan berat badan, di mana individu yang tinggal di kota, khususnya di negara-negara berkembang dan berpenghasilan rendah, lebih sering mengalami obesitas dibandingkan dengan mereka yang tinggal di wilayah pedesaan (Laksmita, Vidika, dan Widayanti, 2023). Remaja yang mengalami kelebihan berat badan, yang dapat berkembang menjadi obesitas, lebih sering ditemukan di lingkungan perkotaan. Hal ini disebabkan oleh kebiasaan mengonsumsi makanan cepat saji, rendahnya aktivitas fisik akibat seringnya penggunaan perangkat elektronik, serta kemudahan akses transportasi yang mengurangi kebutuhan untuk bergerak aktif (Noviyanti dkk., 2023).

Diagnosis obesitas biasanya ditegakkan melalui proses anamnesis (wawancara medis), pengukuran antropometri, serta identifikasi dini penyakit penyerta (komorbid) yang didukung oleh hasil pemeriksaan penunjang. Untuk menilai tingkat keparahan obesitas, dilakukan pengukuran berat dan tinggi badan guna menghitung Indeks Massa Tubuh (IMT) menggunakan rumus standar, yaitu :

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

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

Tabel 1
Klasifikasi Obesitas

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

(sumber : Sulistyowati, 2015)

C. Gen MTNR1B

Diabetes melitus (DM) tipe 2 adalah penyakit poligenik, multifaktorial dengan heterogenitas genetik yang tinggi. Penyebab diabetes melitus tipe 2 memiliki faktor resiko seperti usia, jenis kelamin, genetik, pola makan, obesitas dan aktivitas fisik (Imelda, 2019). Resistensi insulin dan disfungsi sel beta pankreas merupakan karakteristik utama DM tipe 2. Beberapa gen yang terkait dengan diabetes melitus tipe 2 diantaranya adalah gen *KCNJ11*, Gen *VDR*, dan gen *MTNR1B*. Peningkatan prevalensi dari tahun ke tahun menjadikan diabetes yang merupakan tantangan kesehatan masyarakat yang membutuhkan perhatian mendalam serta langkah penanggulangan yang tepat. (Ramadhani dan Khotami, 2023).

Gen *KCNJ11* merupakan bagian dari komponen saluran ion kalium yang sensitif terhadap ATP (saluran KATP) dan memiliki peran krusial dalam proses pelepasan insulin. Variasi genetik atau polimorfisme pada gen ini dapat menyebabkan perubahan dalam aktivitas pankreas, mengganggu keseimbangan glukosa tubuh, menurunkan produksi insulin, serta meningkatkan risiko terjadinya diabetes melitus tipe 2 (Prabandari, Anggraeni and Sadewa, 2019). Gen *KCNJ11* berhubungan erat dengan kejadian DM tipe 2 dan berperan dalam meningkatkan risiko penyakit ini. Berkurangnya sekresi insulin mengakibatkan jumlah glukosa yang diserap oleh

jaringan tubuh menjadi menurun, sementara hati justru meningkatkan produksi glukosa, yang pada akhirnya memicu terjadinya hiperglikemia. Jika kondisi ini berlangsung terus-menerus, sel-sel pankreas lama-kelamaan kehilangan kemampuannya untuk memproduksi insulin secara optimal, hingga akhirnya memicu timbulnya diabetes melitus tipe 2 (Yunita dkk., 2023).

Perkembangan penyakit diabetes melitus tipe 2 terjadi akibat kombinasi antara faktor genetik dan lingkungan. Adanya mutasi genetik pada sel beta pankreas yang diturunkan dari orang tua penderita diabetes tipe 2 dapat menyebabkan gangguan fungsi sel tersebut dalam memproduksi insulin. Kondisi ini turut memengaruhi efektivitas kerja insulin dalam menjaga kestabilan kadar glukosa darah. Salah satu gen yang turut berperan dalam mekanisme pelepasan insulin adalah gen *Vitamin D Receptor* (VDR), yang termasuk dalam kelompok reseptor inti. Reseptor ini berfungsi sebagai protein pengatur transkripsi yang diaktifkan oleh molekul ligan. *VDR* memiliki kemampuan spesifik untuk mengikat hormon 1,25-dihidroksivitamin D3 dan mengendalikan ekspresi gen tertentu pada sel target. Konsentrasi kalsitriol dan kalsifediol berkorelasi secara signifikan terkait dengan resistensi insulin, sehingga gen ini berhubungan dengan peningkatan risiko diabetes melitus tipe 2 (Angria dan Susanti, 2024).

Salah satu gen yang berperan penting dalam regulasi sekresi insulin dan resistensi insulin adalah Gen *Melatonin Receptor 1B* (*MTNR1B*). Melatonin adalah hormon neuroendokrin yang disekresikan oleh kelenjar pineal, yang memainkan peran regulasi dalam ritme sirkadian biologis, pematangan seksual dan respons imun reproduksi, tumor, penuaan, dan sebagainya. Oleh karena itu, melatonin memiliki berbagai efek fisiologis dan farmakologis. melatonin tidak hanya

mengatur tidur, tetapi juga sekresi insulin. Tidur yang kurang berkualitas atau kurang singkat dapat menyebabkan penurunan toleransi glukosa, sehingga meningkatkan risiko DM tipe 2. Tingkat sekresi melatonin justru berlawanan dengan aturan sekresi insulin, yang menunjukkan bahwa melatonin mungkin memiliki efek penghambatan pada pelepasan insulin. Ketidakseimbangan glikometabolisme yang stabil dan peningkatan kadar glukosa puasa merupakan tanda terjadinya DM tipe 2 karena keduanya dapat terus memengaruhi fungsi sel β pankreas dan mengurangi sekresi insulin. Melatonin adalah sejenis hormon indol yang umum ditemukan dalam organisme hidup. Hormon ini terutama disekresikan oleh kelenjar pineal dalam tubuh manusia, dan mengatur banyak fungsi fisiologis penting seperti ritme sirkadian, tidur, endokrin, kekebalan tubuh, dan anti-penuaan. Panjang total dari gen ini adalah 13159 bp. *MTNR1B* gen tersebut terutama diekspresikan di retina, otak, dan pulau pankreas. (Li, Wang and Zhang, 2022).

Gen *MTNR1B* terletak pada kromosom 11q21-22 dan memiliki dua ekson yang dipisahkan oleh intron. Gen *MTNR1B* merupakan salah satu gen yang berperan penting dalam regulasi sekresi insulin dan resistensi insulin, yang dimana variasi genetik pada *MTNR1B* dapat mempengaruhi fungsi sel beta pankreas dan berkontribusi pada gangguan metabolisme glukosa, yang merupakan faktor kunci dalam perkembangan DM tipe 2. Melantonin adalah hormon sirkadian yang penting dan telah banyak diteliti kontribusinya yang kompleks terhadap kualitas tidur, regulasi sirkadian, dan homeostasis glukosa. *MTNR1B* adalah mediator penting dalam pensinyalan melatonin yang menghubungkan ritme sirkadian dengan DM tipe 2, dan varian umum dari *MTNR1B* tampaknya lebih lanjut mengubah pelepasan melatonin pada malam hari, menghambat pelepasannya dari sel- β ; perubahan ini

menyebabkan ritme yang tertunda dan peningkatan kadar glukosa pada malam hari serta dini hari (Zhu *et al.*, 2023). Melatonin merupakan salah satu hormon yang berperan dalam metabolisme karbohidrat dan mengatur glukosa plasma. Hormon melatonin bekerja sesuai organ targetnya dengan cara mengikat reseptor melatonin yaitu *MT1* yang dikode oleh *MTNR1A* dan *MT2* yang dikode oleh *MTNR1B* gen. Ekspresi gen *MTNR1B* memiliki efek langsung pada pengaturan kadar glukosa puasa. Oleh karena itu, ketika polimorfisme terjadi pada gen ini, ia secara langsung memengaruhi kadar glukosa puasa (Tursinawati dkk., 2021).

D. Desain Primer

Langkah awal dalam melakukan amplifikasi dan analisis segmen DNA adalah dengan melakukan desain primer. Desain primer dilakukan guna mendapatkan produk primer yang spesifik yang digunakan untuk amplifikasi DNA menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) sangat bergantung pada tingkat spesifisitas primer yang digunakan. Primer harus mampu menempel secara tepat pada daerah target DNA yang akan diperbanyak. Primer juga menentukan batas awal dan akhir fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Proses PCR sendiri terdiri dari tiga tahapan utama.. Tahapan pertama dari proses PCR adalah pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA (*denaturasi*), selanjutnya terjadi penempelan primer pada fragmen DNA target (*annealing*) dan tahap akhir yaitu pemanjangan sekuen DNA (*extension*). Perancangan primer yang memenuhi standar kualitas untuk amplifikasi biasanya dilakukan secara *in silico*, yaitu dengan menggunakan perangkat lunak komputer untuk merancang atau mendesain primer secara digital (Safitri dan Achyar, 2023).

Primer merupakan salah satu komponen krusial dalam proses PCR. Primer adalah oligonukleotida yang berfungsi penting dalam amplifikasi DNA. Untuk mendapatkan primer yang tepat, biasanya dilakukan perancangan menggunakan perangkat lunak bioinformatika yang secara otomatis memilih primer spesifik untuk sekuens target. Namun, hasil otomatis ini tidak selalu sempurna, sehingga sering kali diperlukan penyesuaian manual agar primer yang dipilih benar-benar sesuai kebutuhan. Primer yang baik ditandai dengan kemampuan spesifisitas yang tinggi. Primer yang tidak spesifik bisa memicu amplifikasi di lokasi genom yang tidak diinginkan atau gagal mengamplifikasi target yang dituju. Proses desain primer secara *in silico* dilakukan untuk menghasilkan primer yang memenuhi standar amplifikasi. Keakuratan primer berperan penting dalam keberhasilan metode PCR. Primer yang spesifik akan berikatan dengan DNA target dan memulai proses perpanjangan membentuk untai DNA baru (Pranata dan Ahda, 2022).

Syarat-syarat perancangan desain primer yang efektif memiliki panjang basa 18-25 bp (tidak lebih dari 30 bp), primer harus cukup pendek agar mudah terikat selama tahap *annealing*, tetapi tidak terlalu pendek karena primer yang pendek dapat menyebabkan pengikatan yang tidak spesifik dan dengan demikian menghasilkan produk PCR yang tidak akurat. Nilai titik leleh (T_m) yang optimal untuk primer sebaiknya berkisar antara 50° hingga 60° , dan dalam jarak 5° satu sama lain. Primer yang spesifik memiliki selisih T_m sekitar 5°C antara primer *forward* dan primer *reverse*. Maksud dari hal ini adalah untuk mempermudah penentuan suhu *annealing*. Pasangan primer harus memiliki suhu leleh yang sama karena *annealing* selama PCR terjadi pada kedua untai secara bersamaan.

Kesalahan hibridisasi dapat terjadi jika suhu leleh masing-masing primer terlalu tinggi atau rendah relatif terhadap suhu *annealing* untuk reaksi (Benchling, 2022).

Primer untuk PCR dan sequencing harus mempunyai kandungan GC antara 40 - 60%, dengan ujung 3' primer diakhiri dengan C atau G untuk meningkatkan pengikatan oleh DNA polimerase. Pada 5 basa terakhir di ujung 3', harus ada setidaknya 2 basa G atau C, ini dikenal sebagai GC Clamp. GC bp memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan dengan bp AT (3 ikatan hidrogen vs 2), dan membantu stabilitas primer, serta meningkatkan spesifisitas pengikatan primer. Jika menggunakan situs pemotongan enzim restriksi pada primer, tambahkan 3 hingga 5 basa ke ujung 5' dari situs pemotongan. Ini dikenal sebagai urutan pemimpin dan memungkinkan pemotongan enzim yang lebih efisien, serta dapat dengan mudah menemukan situs pemotongan enzim restriksi melalui benchling menggunakan kriteria seperti nama enzim atau jumlah lokasi pemotongan. Stabilitas ujung primer adalah nilai ΔG maksimum dari lima basa dari ujung 3' primer, atau nilai ΔG maksimum tempat primer harus berikatan. Untuk mencapai amplifikasi DNA yang optimal hindari rangkaian empat atau lebih basa tunggal (misalnya, ACCCCC), atau empat atau lebih pengulangan dinukleotida (misalnya, ATATATATAT) karena akan menyebabkan kesalahan priming (Benchling, 2022).

Kespesifikan primer merupakan kunci keberhasilan amplifikasi dengan PCR. Sebagai langkah awal dalam penelitian ini, telah dilakukan uji pendahuluan terhadap desain primer PCR guna memastikan spesifisitas, efisiensi, serta keberhasilannya dalam mengamplifikasi target DNA nantinya, dengan hasil yang didapatkan yaitu F 5'- CAC TGC CAT CGC CAT TAAC C -3', R 5'- GGC CTT TCC TCA TTC TGT CCT T-3'. Keberhasilan proses amplifikasi dalam PCR sangat

dipengaruhi oleh spesifisitas primer yang digunakan. Primer yang dirancang secara spesifik akan berikatan tepat pada urutan DNA target, sehingga memungkinkan proses pemanjangan menjadi rantai DNA baru berjalan secara optimal (Pranata dan Ahda, 2022).

E. Metode Analisis Polimorfisme Gen

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah reaksi biokimia yang sederhana, namun memiliki pengaruh dalam perkembangan teknologi biologi molekular. PCR merupakan reaksi amplifikasi atau perbanyak DNA secara *in vitro* dengan menggunakan cara replikasi DNA melalui bantuan enzim DNA polimerase serta perubahan sifat fisik DNA terhadap suhu. Karena sensitivitasnya yang tinggi, PCR dapat melipatgandakan satu molekul DNA dalam satu siklus suhu. Metode ini mempercepat berbagai proses dalam biologi molekular. PCR sangat tepat untuk mendeteksi patogen, karena PCR sangat cepat dan sensitif (Maksum dkk., 2019).

Dengan kemampuan mengenali sekuens DNA secara spesifik, PCR dapat mereplikasi DNA secara cepat dan akurat, menghasilkan banyak salinan dari jumlah DNA yang sedikit. Proses replikasi DNA pada PCR memiliki tingkat akurasi yang tinggi, sehingga sering dimanfaatkan dalam berbagai bidang seperti analisis genetik, diagnosis klinis, rekayasa genetika, dan investigasi forensik. PCR bekerja dengan cara yang hampir sama seperti replikasi DNA alami di dalam tubuh. Replikasi DNA adalah proses yang digunakan semua sel hidup untuk menyalin materi genetik sebelum membelah. Salah satu tahap dalam siklus PCR adalah *denaturasi*, di mana suhu 95°C digunakan untuk memisahkan DNA beruntai ganda menjadi untai tunggal dengan memutus ikatan hidrogen. Proses *denaturasi*

berlangsung sekitar 2-5 menit dengan suhu 95⁰C, kemudian suhu diturunkan menjadi 55⁰C (masuk ke proses *annealing*), Tahapan kedua dalam siklus PCR adalah *annealing*, Pada proses *annealing*, primer menempel pada lokasi spesifik di DNA template untai tunggal melalui ikatan hidrogen. Suhu yang diterapkan diatur berdasarkan suhu *temperature melting* (Tm) primer yang digunakan (Maksum dkk., 2019).

Menentukan suhu *annealing* yang tepat sangat krusial, karena efisiensi dan spesifisitas reaksi bergantung pada suhu tersebut. Umumnya, suhu *annealing* yang lebih rendah (37⁰C) meningkatkan efisiensi, tetapi suhu yang rendah mungkin membuat primer tidak menempel dengan sempurna atau menempel ditempat yang salah (*mispriming*). Peningkatan suhu dapat meningkatkan spesifisitas reaksi amplifikasi, namun dapat mengurangi efisiensinya. Tahapan ketiga dalam proses PCR adalah *extension*, suhu yang digunakan pada *extension* adalah 72⁰C. Pada tahap ini, DNA polimerase akan menyusun rantai DNA baru berdasarkan informasi dari DNA cetakan. Setelah polimerasi selesai, rantai DNA yang baru akan membentuk ikatan hidrogen dengan DNA cetakan. Setelah diulang sebanyak 20-35 siklus, proses ini akan menghasilkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru, dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan DNA cetakan yang digunakan pada awalnya (Hidayat, 2020). Selain itu yang menjadi persyaratan utama dalam PCR meliputi DNA template, Primer, dNTP, Taq DNA polymerase, Bufer PCR, dan MgCl₂ (Maksum dkk., 2019).

Untuk memperoleh hasil PCR yang tepat dan konsisten, salah satu langkah kunci yang perlu dilakukan adalah ekstraksi DNA, dimana hasil ekstraksi DNA ini nantinya akan digunakan sebagai DNA template. Proses ekstraksi DNA bertujuan

untuk memisahkan DNA dari komponen sel lain, termasuk lemak, karbohidrat, dan protein. Ekstraksi DNA terdiri dari empat proses yakni *lysis, binding, washing, elute* (Fihiruddin, Ilmi, dan Khusuma, 2022).

Hasil amplifikasi PCR, atau yang dikenal sebagai *amplicon*, dapat diamati dan dianalisis melalui teknik elektroforesis gel agarosa. Metode ini memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran serta muatan listriknya. Dalam proses elektroforesis, molekul bermuatan dialirkan melalui medan listrik sehingga memungkinkan pemisahan berdasarkan berat molekulnya menggunakan gel agarosa, kemudian dilanjutkan dengan proses pewarnaan menggunakan zat pewarna khusus *etidium bromide* (Hidayat, 2020). Prinsip dasar teknik elektroforesis adalah pergerakan partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik pada kondisi yang stabil. Dengan muatan negatif pada setiap nukleotida dalam DNA, panjang molekul DNA dapat diidentifikasi dengan tepat melalui metode elektroforesis yang bekerja memisahkan molekul berdasarkan beratnya. Panjang molekul DNA yang sedang dianalisis dapat diketahui dengan membandingkannya dengan standar berat molekul DNA yang telah ditentukan (Puspitaningrum, Adhiyanto, dan Solihin, 2018).

Variasi genetik yang dikenal sebagai polimorfisme genetik dapat mempengaruhi perbedaan dalam aktivitas dan kapasitas enzim dalam menjalankan fungsinya. Hal ini dapat di lihat pertamakali dari aspek metabolisme tubuh. Enzim berperan dalam menjalankan proses metabolisme. Enzim merupakan protein yang dihasilkan melalui ekspresi genetik (sintesis protein). Setiap individu menghasilkan kapasitas enzim yang berbeda-beda. Istilah polimorfisme merujuk pada adanya dua atau lebih fenotip yang berbeda dalam populasi spesies tertentu, atau kemunculan

berbagai bentuk dalam satu populasi. Suatu bentuk dapat disebut sebagai polimorfisme jika muncul secara bersamaan dalam habitat yang sama dan termasuk dalam populasi *panmiktik* (perkawinan acak). Secara umum, polimorfisme berfungsi mempertahankan variasi bentuk dalam populasi yang tinggal di lingkungan berbeda, seperti variasi golongan darah pada manusia. Polimorfisme merupakan hasil dari proses evolusi yang bersifat dapat diwariskan, dan keberadaannya dapat berubah seiring waktu melalui seleksi alam. Dalam beberapa kasus, satu gen bisa menghasilkan berbagai bentuk tampilan, namun bentuk yang muncul sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan tempat individu tersebut hidup (Arimbi, 2022).

Polimorfisme dideteksi dengan memotong sekuens DNA target pada situs restriksi (*restriction sites*), yaitu lokasi spesifik pada sekuens nukleotida, menggunakan enzim restriksi atau endonuklease restriksi. Situs restriksi biasanya sepanjang 4-8 nukleotida dan bersifat palindromik. Enzim restriksi dalam analisis RFLP memotong DNA di situs tertentu. Mutasi titik (*point mutation*) dapat mengubah situs restriksi ini, menghasilkan perbedaan ukuran produk PCR yang dapat dideteksi menggunakan elektroforesis (gel atau kapiler) (Mahama and Suryandari, 2023).

Berbagai metode yang dapat digunakan untuk melakukan analisis polimorfisme gen yaitu (Mahama dan Suryandari, 2023) :

1. Jenis-jenis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

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

RT-PCR merupakan bentuk modifikasi dari teknik PCR konvensional yang digunakan untuk memperbanyak mRNA. Setelah mRNA diisolasi, tahap selanjutnya adalah mengubahnya menjadi DNA komplementer (cDNA) dengan bantuan enzim reverse transcriptase, juga dikenal sebagai RNA-dependent DNA polymerase. Proses ini disebut transkripsi balik (*reverse transcription*). cDNA yang dihasilkan kemudian dapat dijadikan template dalam reaksi PCR selanjutnya. Untuk sintesis cDNA, primer yang digunakan bisa berupa primer acak (*random hexamer*), oligo-dT, atau primer yang spesifik terhadap urutan tertentu. Proses transkripsi balik dan amplifikasi PCR dapat dilakukan dalam satu tabung sebagai prosedur satu tahap, atau dipisahkan menjadi dua reaksi terpisah. (Mahama dan Suryandari, 2023).

b) *Real-Time* PCR

Real-Time PCR mengadopsi prinsip dasar dari PCR konvensional, namun dilengkapi dengan kemampuan untuk mendeteksi dan mengukur produk amplifikasi secara langsung selama proses reaksi berlangsung. Berbeda dari PCR biasa, metode ini tidak hanya membutuhkan semua komponen standar PCR, tetapi juga melibatkan tambahan sistem deteksi yang memungkinkan pemantauan hasil secara *Real-Time*, digunakan molekul berlabel fluoresen untuk memvisualisasikan hasil amplifikasi DNA (amplikon) secara langsung selama proses berlangsung (Mahama dan Suryandari, 2023)

Real-time PCR memiliki sejumlah keunggulan, di antaranya kemampuan untuk mendeteksi hasil amplifikasi secara langsung tanpa perlu proses elektroforesis gel tambahan. Teknik ini juga memungkinkan analisis kurva leleh (*melting curve*) pasca-PCR guna mengidentifikasi variasi sekuens pada lokasi genetik tertentu. Selain itu, metode ini lebih efisien dibandingkan dengan teknik PCR konvensional karena tidak memerlukan penanganan lanjutan setelah amplifikasi, sehingga waktu pengerjaan lebih singkat dan risiko kontaminasi silang dari produk PCR sebelumnya dapat diminimalkan (Mahama dan Suryandari, 2023).

Quantitative PCR (qPCR) adalah bentuk lain dari real-time PCR yang digunakan untuk mengukur tingkat ekspresi gen atau jumlah salinan gen (*gene copy number*). Kuantifikasi dilakukan dengan membandingkan hasil amplifikasi sekuens target dengan produk PCR dari DNA atau cDNA yang jumlahnya telah diketahui sebelumnya sebagai pembanding (Mahama dan Suryandari, 2023).

c) *Droplet digital PCR* (ddPCR)

Droplet Digital PCR (ddPCR) merupakan teknologi inovatif yang memungkinkan pengukuran biomarker molekuler dengan tingkat akurasi tinggi, bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah. Metode ini membagi reaksi PCR menjadi sekitar 20.000 droplet mikro, di mana sinyal fluoresen dari tiap droplet dapat dianalisis secara individu dan dihitung secara kuantitatif. Proses ini dimulai dengan membagi sampel menjadi sejumlah partisi kecil (*microwell*), kemudian dilanjutkan dengan reaksi PCR seperti biasa (Mahama dan Suryandari, 2023).

d) PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

PCR-RFLP adalah metode analisis untuk mendeteksi polimorfisme dengan memotong fragmen DNA target pada lokasi spesifik yang disebut situs restriksi dengan menggunakan enzim restriksi atau endonuklease restriksi. Situs restriksi ini biasanya terdiri dari 4 sampai 8 nukleotida dan memiliki pola palindromik. Teknik RFLP memanfaatkan kemampuan enzim restriksi untuk memotong DNA pada situs tertentu tersebut, apabila terjadi perubahan urutan basa, seperti mutasi titik, hal ini dapat mengubah keberadaan situs restriksi sehingga ukuran fragmen PCR yang dihasilkan juga berubah, dan perbedaan ini dapat dianalisis melalui elektroforesis gel atau kapiler (Mahama dan Suryandari, 2023).

Metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme dalam mempelajari garis keturunan dan mendeteksi adanya mutasi. Metode RFLP adalah teknik analisis yang menggunakan enzim restriksi untuk memotong DNA pada urutan nukleotida tertentu di lokasi yang spesifik, sehingga menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran yang bervariasi (Septiasari, Junitha and Wirasiti, 2017). Hasil pemotongan tersebut dapat dilihat dari potongan pita DNA pada elektroforesis, yang dimana jika individu memiliki dua alel yang identik, maka genotipe tersebut dikatakan homozigot, sedangkan jika alelnya berbeda, genotipe tersebut disebut heterozigot (Angria dan Susanti, 2024). Metode ini diterapkan apabila terdapat area pemotongan oleh enzim restriksi. Pada alel homozigot atau mutan yang memiliki situs pemotongan, produk PCR akan terpotong oleh enzim restriksi tertentu (atau sebaliknya).

Sementara itu, pada alel heterozigot, produk PCR yang dihasilkan merupakan kombinasi antara fragmen yang terpotong dan yang tidak terpotong. (Puspitaningrum, Adhiyanto, dan Solihin, 2018).

Dalam teknik molekuler (bioteknologi), salah satu tool yang sangat penting adalah enzim restriksi endonuklease. Enzim restriksi memiliki peran mengkatalisis reaksi pemotongan DNA. Enzim restriksi endonuklease mampu memotong DNA secara tepat dan memiliki keberulangan tinggi, tanpa merusak struktur DNA secara keseluruhan. Kemampuan enzim restriksi memotong DNA secara tepat dikarenakan kemampuannya mengenali daerah spesifik pada DNA yang sesuai dengan daerah pengenalan enzim. Daerah ini dikenal dengan daerah restriksi (*restriction site*). Terdapat tiga tipe enzim restriksi, yaitu tipe I, II, dan III. Enzim restriksi tipe I mengenali sekuen DNA pada daerah tertentu, namun baru akan memotongnya setelah enzim ini terlebih dahulu “berjalan” dan melacak sekuen DNA sepanjang 1000-5000 basa dari daerah pengenalan enzim. Contoh enzim restriksi tipe I adalah *EcoK*. Enzim restriksi endonuklease tipe II mengenali sekuen target spesifik pada DNA dan mampu memutus DNA utas ganda dalam waktu bersamaan (jadi hanya diperlukan satu molekul enzim saja) (Suprayogi dkk., 2021).

Beberapa contoh dari enzim restriksi tipe II adalah *EcoRI* dan *AluI*. Enzim restriksi *nuclease* tipe III merupakan enzim pertengahan antara tipe I dan II. Enzim restriksi tipe III ini mampu memotong kedua utas DNA secara bersamaan, namun baru memotongnya setelah “berjalan” dengan jarak tertentu dari daerah pengenalan enzim. Contoh enzim restriksi tipe III

adalah *HgaI*. Dari ketiga tipe enzim restriksi di atas, enzim yang umum digunakan adalah enzim restriksi endonuklease tipe II karena sistem kerjanya yang lebih efektif dan efisien. Pada penelitian ini menggunakan enzim restriksi tipe II yaitu *EcoRI* dan *AluI*, yaitu enzim restriksi yang berasal dari *Escherichia coli* dan *Arthrobacter luteus*. Setiap enzim restriksi berbeda dari enzim restriksi lainnya dalam hal situs pengenalannya, enzim restriksi *EcoRI* yang akan mengenali dan memotong urutan basa GAATTC, enzim restriksi *AluI* yang akan mengenali dan memotong urutan basa AGCT (Suprayogi dkk., 2021).

Kemurnian DNA yang akan dipotong juga merupakan faktor yang cukup penting dalam teknik pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Semakin murni DNA plasmid yang digunakan akan semakin baik. Karena kerja enzim tidak akan terganggu oleh pengotor yang mungkin masih ada pada DNA yang hendak dipotong. Minimalisasi keberadaan pengotor dengan melakukan teknik isolasi DNA secara baik dan sesuai prosedur. Lama waktu pemotongan (inkubasi) juga berpengaruh terhadap hasil pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Semakin lama waktu pemotongan belum tentu semakin baik karena bisa jadi enzim akan memotong daerah yang bukan situs pengenalannya. Sementara waktu yang singkat juga belum tentu optimum karena memungkinkan DNA target belum terpotong sempurna oleh enzim restriksi. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi waktu inkubasi. Waktu terpendek inkubasi adalah 20 menit sementara waktu terlama sekitar semalam (*overnight*) (Suprayogi dkk., 2021).

e) *Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)*

Analisis SSCP adalah metode setelah PCR yang digunakan untuk membedakan mutasi yang tersebar di berbagai lokasi sepanjang ekson (yang terdistribusi secara acak di sepanjang ekson) (Somak, 2022). Teknik ini mampu mendeteksi perubahan tunggal pada nukleotida dalam produk DNA. Setelah amplifikasi PCR, produk tersebut didenaturasi dengan pemanasan dan penambahan *buffer* denaturasi. Selanjutnya, sampel dijalankan pada gel poliakrilamida menggunakan elektroforesis. Mutasi yang terjadi akan mengubah bentuk lipatan DNA, sehingga memengaruhi kecepatan migrasi selama elektroforesis, sehingga perbedaan antara sekuens normal (*wild-type*) dan mutan dapat terlihat pada gel (Mahama dan Suryandari, 2023).

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

AS-PCR dan ASH, yang juga dikenal sebagai analisis dot blot, umumnya digunakan untuk mendeteksi mutasi titik dan polimorfisme. AS-PCR, atau yang sering disebut *Amplified Refractory Mutation System (ARMS)*, menggunakan teknik PCR untuk mengidentifikasi *single nucleotide polymorphisms (SNP)*. Proses amplifikasi DNA target dilakukan dalam dua reaksi terpisah, yaitu satu reaksi menggunakan primer yang melengkapi sekuens normal (*wild-type*), dan reaksi lainnya menggunakan primer forward yang spesifik untuk sekuens mutan serta primer reverse untuk sekuens normal. Hasil amplifikasi dapat dideteksi melalui elektroforesis gel atau real-time PCR (Mahama dan Suryandari, 2023).

AS-PCR dikenal sebagai metode paling sederhana untuk mendeteksi SNP, namun penggunaannya memiliki keterbatasan. Dalam kondisi yang

kurang optimal, primer spesifik terhadap alel dapat memperkuat baik alel yang sesuai maupun tidak sesuai, sehingga menyebabkan distorsi dalam proporsi genotipe heterozigot. Sementara itu, pada teknik ASH, hasil PCR ditampilkan langsung pada membran nilon. Setelah proses denaturasi, membran tersebut diinkubasi dengan probe oligonukleotida berlabel yang bersifat komplemen terhadap sekuens mutasi (Mahama dan Suryandari, 2023).

2. DNA Sequencing

DNA sequencing adalah teknik untuk mengidentifikasi urutan basa nukleotida (A, T, C, G) dalam molekul DNA. Beberapa metode yang umum digunakan dalam DNA sequencing meliputi metode Sanger, metode Maxam & Gilbert, serta *pyrosequencing*. (Mahama dan Suryandari, 2023).

Sanger sequencing, atau metode penghentian rantai (*chain termination*), adalah teknik yang paling banyak digunakan di laboratorium molekuler untuk menentukan urutan nukleotida secara tepat pada fragmen DNA hasil amplifikasi PCR. Metode ini melibatkan penggunaan dideoksiribosa, suatu bentuk gula ribosa yang kehilangan gugus hidroksil pada posisi karbon 2' dan 3'. Dalam prosesnya, *dideoxynucleoside triphosphate* (ddNTPs) dimasukkan ke dalam rantai DNA yang sedang tumbuh, yang menyebabkan penghentian elongasi pada nukleotida tertentu. Akibatnya, terbentuk campuran fragmen DNA dengan panjang bervariasi, masing-masing berakhir pada satu dari empat nukleotida yang berjarak tertentu dari awal sekuens (Mahama dan Suryandari, 2023).

Metode Maxam-Gilbert, yang juga dikenal sebagai metode kimia, melibatkan dua tahap proses katalitik yang menggunakan piperidin dan dua

bahan kimia khusus untuk menghancurkan basa purin dan pirimidin. Purin bereaksi dengan dimetil sulfat, sementara pirimidin bereaksi dengan hidrazin, yang menyebabkan putusanya ikatan glikosidik antara gula ribosa dan basa, sekaligus mengganti basa tersebut. Piperidin bertindak sebagai katalis untuk membuka ikatan fosfodiester di tempat basa tersebut diganti. Dimetil sulfat dan piperidin secara khusus memisahkan nukleotida guanin, sedangkan dimetil sulfat dan piperidin dalam asam format memisahkan guanin dan adenin. Sebaliknya, kombinasi hidrazin dan piperidin memisahkan nukleotida timin dan sitosin, sementara hidrazin dan piperidin dalam larutan 1,5 M NaCl hanya memisahkan sitosin (Mahama dan Suryandari, 2023).

Reaksi selektif ini dipakai dalam DNA sequencing untuk menghasilkan substrat DNA untai tunggal yang diberi label radioaktif pada ujung 5'. Substrat berlabel tersebut kemudian digunakan dalam empat reaksi pemisahan yang berbeda, masing-masing menghasilkan kumpulan produk berlabel sesuai dengan nukleotida tertentu. Fragmen hasil dari keempat reaksi ini kemudian disusun berdampingan pada gel elektroforesis untuk dipisahkan berdasarkan ukuran molekulnya. Untuk mengamati fragmen-fragmen tersebut, gel diberi paparan sinar-X pada film autoradiografi, yang menghasilkan pola pita gel hitam yang mewakili fragmen DNA berlabel radioaktif, dan dari situ dapat ditentukan urutan sekuens DNA. Kelebihan metode ini meliputi kemampuan membaca DNA murni secara langsung, kemampuan untuk menyekuens DNA dengan homopolimerik secara efisien setara dengan sekuens DNA yang heterogen, serta aplikasinya dalam analisis interaksi protein-DNA (*footprinting*) dan studi struktur serta modifikasi epigenetik DNA. Namun, kekurangan

metode Maxam-Gilbert adalah penggunaan bahan kimia dan bahan radioaktif yang berbahaya dalam jumlah besar, prosedurnya yang rumit dan memakan waktu, keterbatasan dalam menganalisis lebih dari 500 pasangan basa, serta kesulitan dalam pembuatan kit sekuensing berbasis metode ini (Mahama dan Suryandari, 2023).

Pyrosequencing adalah teknik DNA sequencing yang bekerja berdasarkan prinsip “*sequencing by synthesis*”. Berbeda dengan metode Sanger yang mengandalkan terminasi rantai menggunakan dideoksinukleotida, pyrosequencing mendeteksi pelepasan pirofosfat saat nukleotida ditambahkan ke rantai DNA. Metode ini melibatkan enzim ATP sulfurylase dan luciferase, di mana pelepasan pirofosfat selama penggabungan nukleotida trifosfat memicu reaksi berantai yang menghasilkan cahaya biokimia (biochemiluminescent). Selanjutnya, enzim apyrase menguraikan nukleotida dan ATP yang tidak terikat, sehingga siklus dapat dilanjutkan dengan penambahan nukleotida berikutnya (Mahama dan Suryandari, 2023).

Sekuensing dilakukan dengan memasukkan dNTP satu per satu secara berurutan ke dalam *flow cell*. Kehadiran atau ketiadaan ledakan cahaya di setiap *picotiter well* menandakan apakah nukleotida tersebut berhasil bergabung, sehingga mengidentifikasi basa pelengkap pada template DNA di dalam *well* tersebut. Kelebihan metode ini meliputi kecepatan proses dan kemampuan membaca hingga 500 pasangan basa, tanpa perlu memperpanjang rantai DNA di luar proses biokimia alami yang dilakukan oleh DNA polimerase. Namun, keterbatasannya adalah panjang pembacaan sekuens DNA yang relatif pendek,

yakni sekitar 300–500 nukleotida, yang lebih singkat dibandingkan dengan metode Sanger (Mahama dan Suryandari, 2023).

3. *Next Generation Sequencing* (NGS)

Next Generation Sequencing (NGS) adalah teknologi generasi terbaru dalam metode sekuensing non-Sanger. Teknologi ini memungkinkan deteksi secara high-throughput terhadap berbagai perubahan genetik secara simultan pada genom normal maupun genom kanker. NGS mampu melakukan sekuensing paralel hingga miliaran fragmen asam nukleat pendek sekaligus. Dibandingkan dengan metode sekuensing konvensional seperti Sanger, NGS menawarkan kemampuan untuk melakukan sekuensing pada wilayah genom yang lebih luas dengan biaya yang lebih rendah dan sensitivitas yang lebih tinggi. Selain itu, NGS dapat diterapkan pada berbagai tingkat kompleksitas, termasuk *whole genome sequencing*, *whole exome sequencing*, *whole transcriptome sequencing* (mRNA sequencing), dan *targeted sequencing* menggunakan panel multigen (Mahama dan Suryandari, 2023).

NGS melibatkan beberapa tahap utama dalam proses sekuensing, meliputi fragmentasi DNA, persiapan pustaka, sekuensing paralel masif, analisis bioinformatika, serta anotasi dan interpretasi varian atau mutasi. Tahap awal dimulai dengan pembuatan *library template* DNA, di mana fragmen DNA dibuat dari DNA genomik yang dipotong secara acak dengan ukuran antara 10 hingga 100 pasangan basa, atau menggunakan fragmen *paired-end* dengan distribusi jarak terkontrol. Fragmen DNA untai ganda tersebut kemudian dilekatkan adaptor pada kedua ujungnya dan didenaturasi untuk menghasilkan *library* untai tunggal. *Library* ini diimobilisasi pada permukaan padat, baik

berupa permukaan datar maupun butiran pendukung (*beads*), lalu diamplifikasi secara klonal menggunakan teknik seperti *bridge* PCR, PCR emulsi, atau *in situ* *colonies*. Kluster DNA atau butiran yang telah diamplifikasi membentuk *array* *kluster* pada *slide*, yang selanjutnya menjalani siklus reaksi enzimatik dengan polimerase atau ligase. Proses sekuensing ini kemudian dipantau menggunakan sistem deteksi mikroskopik, dengan gambar yang direkam oleh kamera CCD untuk dianalisis lebih lanjut (Mahama dan Suryandari, 2023).

Dalam aplikasi klinis, *Next Generation Sequencing* (NGS) sangat bermanfaat terutama pada penyakit kanker, di mana dapat mengidentifikasi mutasi ganda sekaligus. Jika menggunakan metode molekuler tradisional, pemeriksaan harus dilakukan berulang kali dan membutuhkan jumlah sampel jaringan yang lebih banyak. Dengan NGS, seluruh mutasi tersebut dapat dideteksi dalam satu kali pemeriksaan saja. Saat ini, NGS banyak dipakai dalam uji klinis skala besar yang dikenal sebagai "*basket studies*" untuk *precision oncology*. Dalam studi basket ini, uji genomik digunakan untuk menyesuaikan terapi yang ditargetkan berdasarkan profil molekuler pasien, tanpa memperhatikan jenis histologi tumor. Pada bidang farmakogenomik, NGS memudahkan penerapan panel multigen klinis serta pendekatan *genome-wide* yang lebih kompleks, yang menggantikan penggunaan farmakogenetik berbasis gen tunggal (Mahama dan Suryandari, 2023).

Tiga aplikasi utama dari *Next Generation Sequencing* (NGS) dalam mikrobiologi klinis meliputi *whole-genome sequencing* (WGS), *targeted NGS* (tNGS), dan metagenomik NGS. WGS sering digunakan di laboratorium kesehatan masyarakat untuk mempercepat identifikasi serta pelacakan wabah

penyakit infeksi, sekaligus mendeteksi resistensi obat dan melakukan pengawasan epidemiologis. Sementara itu, metagenomik NGS menjadi alat deteksi patogen universal yang menjanjikan, memungkinkan diagnosis penyakit infeksi secara langsung dari sampel klinis tanpa perlu isolasi patogen terlebih dahulu (Mahama dan Suryandari, 2023).

4. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*

FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) umumnya digunakan untuk mendeteksi rearrangement gen, area delesi, amplifikasi kromosom, serta berbagai kelainan numerik kromosom. Teknik ini memanfaatkan fragmen DNA yang dilabeli dengan nukleotida berfluorofor sebagai probe untuk mencari keberadaan sekuens komplementer di dalam sel atau jaringan yang sudah difiksasi, menggunakan mikroskop fluoresen. Kelebihan utama FISH adalah sensitivitas dan spesifisitasnya yang tinggi dalam mengenali target DNA atau RNA, kemampuannya diaplikasikan langsung pada kromosom metafase maupun nuklei interfase, serta kemampuan visualisasi sinyal hibridisasi pada tingkat sel tunggal. Dalam prosedur FISH, DNA dalam sel ditempatkan pada slide, lalu probe berlabel fluoresen didenaturasi melalui inkubasi suhu tinggi dan diizinkan untuk berikatan (hibridisasi) dengan DNA target. Setelah hibridisasi, dilakukan beberapa tahap pencucian untuk menghilangkan probe berlebih. Kemudian, nuklei diberikan *counterstain* dan sinyal dari probe divisualisasikan menggunakan mikroskop fluoresen. Tahapan utama dalam *in situ hybridization* mencakup persiapan sitologis, pelabelan probe, dan hibridisasi *in situ* yang meliputi metode non-radioaktif, *genomic in situ hybridization (GISH)*, serta FISH itu sendiri (Mahama dan Suryandari, 2023).

FISH sangat berguna dalam mendeteksi serta memantau terapi yang ditargetkan pada kelainan genetik, misalnya untuk mengidentifikasi translokasi BCR/ABL1 pada leukemia mieloid kronis atau peningkatan ekspresi HER2 pada kanker payudara. FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi keberadaan bakteri seperti *Streptococcus pneumoniae* langsung dari sampel kultur darah. Dalam konteks diagnosis klinis, FISH menawarkan tingkat akurasi dan kejelasan yang lebih tinggi dibandingkan metode molekuler lainnya, seperti aCGH, SNP, dan teknik serupa (Mahama dan Suryandari, 2023).

5. *Comparative Genomic Hybridization* (CGH)

CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) digunakan untuk mendeteksi penambahan atau kehilangan segmen kromosom tertentu dengan cara memindai seluruh genom dalam satu tahap prosedur. Keunggulan CGH adalah kemampuannya untuk mengeksplorasi seluruh genom tanpa perlu informasi sebelumnya mengenai kelainan kromosom yang dicari. Proses ini melibatkan hibridisasi simultan antara DNA genomik sampel yang diberi label dengan DNA referensi normal pada kromosom metafase manusia (CGH standar), atau menggunakan perpustakaan *bacterial artificial chromosome* (BAC) dalam teknik array CGH (aCGH) (Mahama dan Suryandari, 2023).

Penggunaan array CGH (aCGH) dalam penelitian sangat penting dalam penemuan gen pada genetika manusia serta memperdalam pemahaman tentang perubahan genom yang terjadi pada kanker. Metode ini juga mendukung penelitian lanjutan mengenai konsep dasar seperti konformasi kromosom, metilasi DNA, asetilasi histon, gene silencing, pengaturan waktu replikasi, dan

berbagai mekanisme fundamental lain yang terkait dengan struktur dan fungsi DNA. Selain itu, aCGH terbukti efektif dalam mengidentifikasi pola DNA *copy number* atau “*signatures*” yang khas untuk berbagai tipe kanker (Mahama dan Suryandari, 2023).

6. DNA *Microarrays*

DNA microarray merupakan teknologi yang memungkinkan pengukuran ekspresi banyak gen sekaligus dalam satu reaksi. Dalam aplikasi klinis, microarray digunakan untuk mendeteksi kelainan pada wilayah kromosom tertentu. Analisis microarray terdiri dari dua langkah utama: pembuatan probe dan pembuatan cDNA target. Teknik ini memanfaatkan *multiplex spotted microarray technology*, yang menampilkan ribuan probe oligonukleotida terkait gen manusia pada permukaan padat (*gene chip*) atau pada butiran mikroskopis (*microscopic beads*). Selama proses analisis, RNA yang diisolasi dari sampel diubah menjadi cDNA, kemudian dilabeli dan dihibridisasi pada chip atau beads tersebut. Setelah hibridisasi, microarray dicuci untuk menghilangkan ikatan non-spesifik dan kemudian dipindai untuk mengukur intensitas fluoresensi setiap titik. Kuatnya sinyal fluoresensi sebanding dengan jumlah cDNA spesifik yang ada dalam sampel. Selain itu, DNA microarray juga dapat digunakan untuk analisis genom lengkap, seperti deteksi SNP dan perubahan jumlah salinan kromosom (Mahama dan Suryandari, 2023).

DNA microarrays menawarkan keuntungan signifikan dengan menyediakan platform yang memungkinkan pemeriksaan simultan terhadap banyak sampel genetik. Teknologi ini sangat membantu dalam identifikasi berbagai SNP dan mutasi, klasifikasi tipe tumor, serta penemuan gen target yang berperan sebagai

supresor tumor, biomarker kanker, dan gen yang terkait dengan resistensi terhadap kemoterapi. Selain itu, DNA microarrays juga berperan penting dalam pengembangan obat baru. Contohnya, microarray dapat digunakan untuk membandingkan pola ekspresi gen antara pasien kanker dan individu sehat guna mengidentifikasi gen-gen yang berhubungan dengan penyakit kanker tersebut (Mahama dan Suryandari, 2023).

Dalam pengobatan antibiotik, meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi penyebab kegagalan terapi pada berbagai penyakit infeksi. Analisis dengan DNA microarray sangat membantu karena genom bakteri relatif stabil dan diagnosis dapat dilakukan hanya dengan menggunakan sedikit DNA, berbeda dengan metode kultur yang memerlukan jumlah bakteri yang banyak. Untuk deteksi dini lesi oral kanker, profil ekspresi gen (*genomic fingerprints*) dapat membantu klinisi membedakan antara leukoplakia ringan dan lesi pra-kanker atau kanker stadium awal. Teknik *chromosomal microarray analysis* (CMA) digunakan dalam penelitian kohort besar di Brazil untuk mempelajari dasar genetik berbagai gangguan neurodevelopmental dan kelainan kongenital. Sebelumnya, di Amerika Serikat dan Eropa, CMA telah direkomendasikan sejak 2010 sebagai tes lini pertama (*first-tier*) untuk pasien dengan gangguan neurodevelopmental dan kelainan kongenital (Mahama dan Suryandari, 2023).