

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERSETUJUAN UJIAN SIDANG PROPOSAL SKRIPSI	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	x
BAB 1.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Dan Manfaat Penelitian.....	3
BAB II.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Landasan Teori.....	4
A. Kanker Serviks	4
B. Gen Bcl-2	5
C. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	9
2.2 HIPOTESIS	12
BAB III METODE.....	13
3.1 Rencana Penelitian	13
3.1.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.1.2 Sampel penelitian	13
3.2 Peralatan dan Bahan	13

3.2.1 Peralatan.....	13
3.2.2 Bahan Habis Pakai.....	13
3.3 Teknik pengumpulan data	14
3.3.1 Desain Primer gen Bcl-2.....	16
3.3.2 Analisa <i>in silico</i>	16
3.3.3 Eksraksi DNA Saliva	16
3.3.4 Rekrutmen Pasien.....	16
3.3.5 Inkubasi dan Isolasi sampel pasien	16
3.3.6 Optimasi in-house PCR Primer Bcl-2.....	16
3.3.7 Elektroforesis dan Visualisasi Hasil	16
BAB IV HASIL	17
BAB V PEMBAHASAN	18
BAB VI KESIMPULAN.....	19
DAFTAR PUSTAKA.....	20

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Kandidat Primer BCL-2.....	19
Tabel 4.2	Hasil BLAST (<i>Basic Search Alignment Search Tool</i>) kandidat primer.....	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Perbandingan kanker pada wanita Indonesia dari berbagai usia.....4

Gambar 2 Urutan Kanker serviks pada wanita Asia dari berbagai usia.....5

Gambar 3 Tahapan pada PCR.....7

Gambar 4 Proses amplifikasi DNA.....7

Gambar 6 Mekanisme apoptosis.....9

Gambar 7 Anggota Famili Bcl-2.....10

Gambar 8 Teknik Pengumpulan Data.....13

Gambar 9 Amplikon primer.....21

Gambar 10 Hasil Optimasi Primer A.....22

Gambar 11 Konsentrasi kemurnian DNA.....23

Gambar 12 Hasil Optimasi Primer B dan C gen BCL-2.....24

Gambar 13 Hasil PCR Primer B dan C gen BCL-2 kombinasi konsentrasi.....25

Gambar 14 Hasil PCR Primer B dan C gen BCL-2 validasi sampel pasien.....25

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gen *Bcl-2* merupakan gen yang bertugas untuk melakukan regulasi apoptosis. Apoptosis adalah suatu mekanisme kematian sel yang sudah terprogram. Mekanisme apoptosis memiliki peranan penting dalam proses biologis. Beberapa hal dapat menyebabkan apoptosis pada sel, seperti senyawa toksik. Mekanisme terjadinya apoptosis dapat dipengaruhi oleh sel itu sendiri ataupun jaringan disekitarnya yang memberikan sinyal untuk terjadinya apoptosis sel. Sinyal yang menginduksi sel untuk apoptosis dapat berasal dari intraseluler berupa hormon atau dari sinyal ekstraseluler seperti sinar radiasi yang dapat menyebabkan kerusakan sel karena radikal bebas. Regulasi apoptosis sel yang tidak sempurna dapat menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkontrol serta timbulnya beberapa penyakit seperti penyakit autoimun dan neurodegeneratif. Sudah banyak studi untuk kejadian penyakit seperti penyakit autoimun, limfoma, kanker dan neurodegeneratif menggunakan gen *Bcl-2*.

Kanker leher rahim atau kanker serviks adalah salah satu penyakit kanker karena infeksi oleh *Human PapillomaVirus (HPV)*. Tipe *Human PapillomaVirus* penyebab sebagian besar kejadian kanker serviks adalah HPV tipe 16 dan tipe 18. Kanker serviks merupakan kanker yang paling sering terjadi pada wanita di seluruh dunia. Kejadian kanker serviks di Indonesia terus meningkat dan mayoritas penyintas kanker baru terdeteksi pada stadium lanjut. Masih belum banyak diketahui gejala dan ciri-cirinya, sehingga terlambat diberikan pengobatan yang menyebabkan tingkat kematian pasien penyintas kanker serviks sangat tinggi. Hal tersebut dapat dicegah dan terdeteksi lebih awal jika wanita mendapatkan vaksin HPV dan melakukan deteksi dini.

Analisa histologi untuk diagnosis menggunakan sampel biopsi selama ini belum memadai karena tingkat tingginya frekuensi penyakit yang berulang sehingga perlu dikembangkan pengetahuan biologi molekuler yang berkembang untuk mendiagnosis penyakit yang disebabkan perkembangan sel kanker untuk memudahkan biomarker deteksi dini dan indikator klinis terhadap target terapi yang

tepat untuk dilakukan pada gen atau protein tertentu yang berperan dalam kejadian penyakit. Saat ini untuk mendeteksi penyakit menggunakan gen *Bcl-2* masih banyak dilakukan dengan menggunakan teknik imunohistokimia. Metode ini merupakan teknik imunologi untuk mendeteksi antigen penyakit dengan menggunakan antibodi khusus atau spesifik. Kekurangan dari teknik ini adalah memerlukan kontrol internal dan eksternal, hasil positif palsu yang dimana antibodi tidak spesifik *staining*, dan hasil negatif palsu yaitu hilangnya antigen yang akan dideteksi. Sehingga penggunaan teknik PCR dipilih untuk deteksi keabnormalan yang terjadi pada gen *Bcl-2* menjadi alternatif karena PCR memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, spesifik target dan produk PCR dapat digunakan untuk analisa lanjutan tanpa membutuhkan sampel yang banyak.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi DNA dengan target gen tertentu. PCR adalah suatu proses enzimatik yang dilakukan secara *in vitro* untuk mengamplifikasi atau memperbanyak DNA dan setiap jumlah nukleotida yang diamplifikasi menjadi dua kali lipat dengan pengulangan 25-30 siklus. PCR merupakan teknik yang sering digunakan dalam laboratorium biologi molekuler untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi virus, untuk mendiagnosis suatu penyakit, identifikasi dibidang forensik, aplikasi pada Biodiversitas, dan deteksi mutasi gen pada sel ataupun jaringan dengan mengukur ekspresi gen secara kuantitatif. Siklus pada proses PCR meliputi proses awal denaturasi yaitu pemisahan untai ganda DNA, *annealing* yaitu pengenalan primer pada DNA target yang akan diamplifikasi dan elongasi atau pemanjangan untai DNA target. Komponen yang terdapat pada PCR yaitu DNA cetakan, primer oligonukleotida, DNA polimerase, dan beberapa komponen pendukung lainnya seperti buffer untuk PCR. Hasil dari produk PCR dapat diidentifikasi menggunakan elektroforesis gel untuk mengetahui ukuran DNA. Teknik PCR banyak digunakan untuk mendeteksi penyakit yang disebabkan oleh virus yang menyerang manusia maupun hewan dalam penelitian biologi molekuler.

Mendeteksi penyakit dengan menggunakan gen *Bcl-2*, validasi sampel biopsi jaringan serviks dari pasien yang mengalami keabnormalan serviks, dengan teknik PCR menggunakan tiga jenis primer yang spesifik mengenali gen *Bcl-2* agar dapat memudahkan diagnosa penyakit dengan teknik PCR yang sensitif dan spesifik.

Optimasi PCR perlu dilakukan untuk mendapatkan produk PCR yang memiliki kualitas yang baik sehingga dapat digunakan untuk analisa selanjutnya. Proses optimasi dapat dilakukan dengan cara memvariasikan penggunaan kondisi pada proses PCR karena optimasi kondisi berkaitan dengan faktor-faktor seperti jenis DNA polimerase, suhu penempelan primer (*annealing*), konsentrasi primer dan reagen PCR yang digunakan. Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan PCR. Salah satu berhasil atau tidaknya reaksi PCR adalah ada tidaknya primer oligonukleotida yang menempel pada templat atau DNA target sehingga teramplifikasi. Penelitian optimasi reaksi *in-house* PCR ini dilakukan untuk mendapatkan parameter yang tepat dalam mendapatkan kualitas produk PCR yang baik dan mendapatkan kondisi optimal.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah pada penelitian ini adalah:

- 1) Berapakah suhu *annealing* optimal primer *Bcl-2* yang digunakan dalam reaksi PCR?
- 2) Berapakah konsentrasi primer *Bcl-2* yang optimal digunakan dalam reaksi PCR?
- 3) Apakah kombinasi primer yang dipilih dalam reaksi PCR spesifik terhadap penggandaan gen *Bcl-2* ?

1.3 Tujuan Dan Manfaat Penelitian

a. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- 1) Mendapatkan reaksi PCR yang optimal untuk penggandaan gen *Bcl-2*.
- 2) Mendapatkan konsentrasi primer yang optimal pada reaksi PCR untuk penggandaan gen *Bcl-2*.
- 3) Mendapatkan kombinasi primer yang optimal untuk reaksi PCR terhadap penggandaan gen *Bcl-2*.

b. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah menghasilkan reaksi PCR yang sensitif, spesifik, dan produk PCR dapat digunakan untuk analisa lanjutan penyakit yang ditandai dengan keabnormalan pada gen *Bcl-2*.

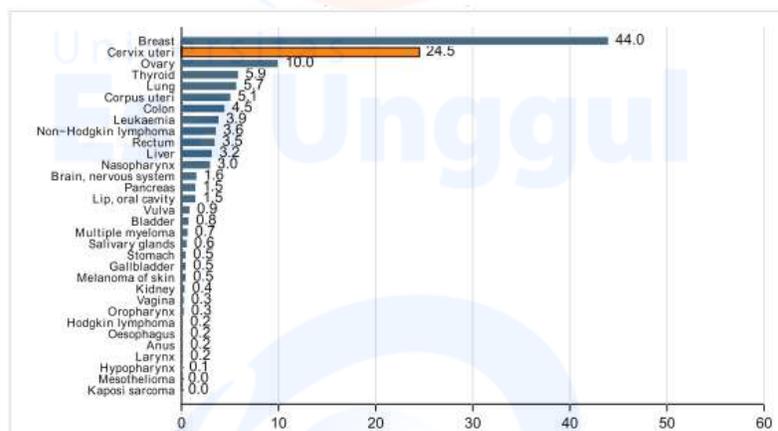
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

A. Pengertian Kanker dan Kanker Serviks

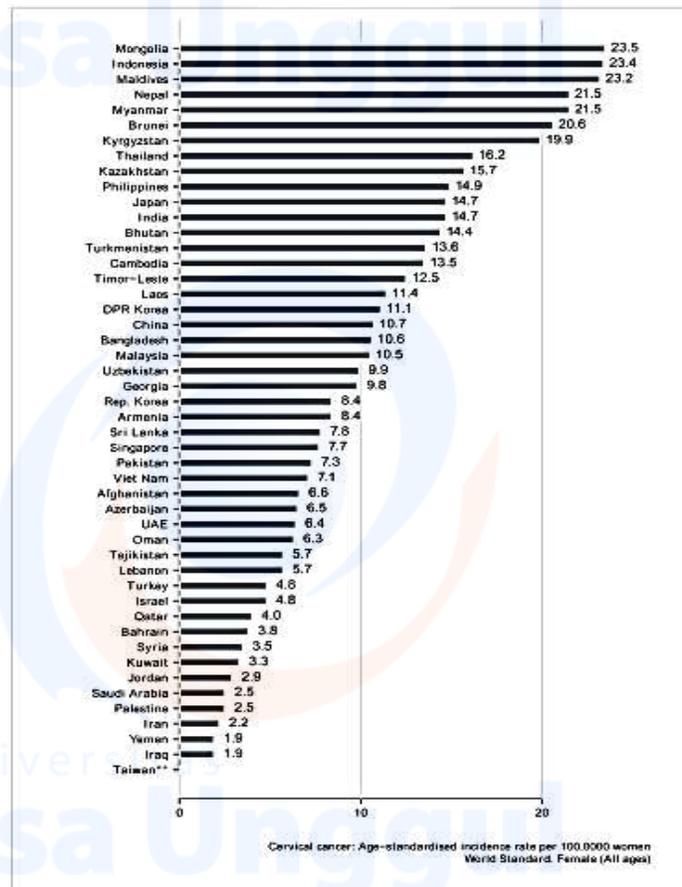
Kanker merupakan salah satu masalah utama dalam bidang kedokteran dan termasuk penyakit keganasan yang menjadi salah satu penyebab tertinggi kematian. Sel kanker merupakan sel normal yang mengalami perubahan genetik atau mengalami mutasi yang menyebabkan pertumbuhan sel tidak terkontrol sehingga mengalami keabnormalan. Kanker leher rahim atau kanker serviks adalah penyakit kanker karena infeksi oleh *Human Papilloma Virus (HPV)* yang menempati posisi ketiga kasus kanker pada wanita dengan usia 33-55 tahun yang mematikan didunia dengan sekitar 569.847 kasus baru dengan jumlah kematian 311.365. Serviks merupakan salah satu bagian tubuh pada wanita, organ yang menghubungkan antara rahim dengan vagina yang. Serviks memiliki dua bagian yaitu mulut rahim dan leher rahim. Infeksi HPV biasanya ditemukan pada saluran anogenital pria dan wanita dengan atau tanpa gejala. HPV juga dapat menyebabkan penyakit lain seperti papillomatosis dan kutil kelamin. (Center, 2019b; Nurwijaya, 2013)



Gambar 1 : Perbandingan kanker pada wanita Indonesia dari berbagai usia
(Center, 2019a)

Kasus kejadian kanker serviks di Indonesia terus meningkat karena mayoritas penyintas kanker serviks terdeteksi pada stadium lanjut. Faktor yang menyebabkan

penyintas kanker serviks terlambat mendapatkan penanganan karena kurangnya pengetahuan dan kesadaran untuk melakukan deteksi dini. Faktor lain yang menyebabkan kanker serviks adalah berhubungan seksual usia dini, aktivitas seksual tinggi dan sering berganti pasangan, penggunaan kontrasepsi, jumlah kelahiran, dan merokok.(Sulistiowati & Sirait, 2014)



Gambar 2: Urutan Kanker serviks pada wanita Asia dari berbagai usia
(Center, 2019b)

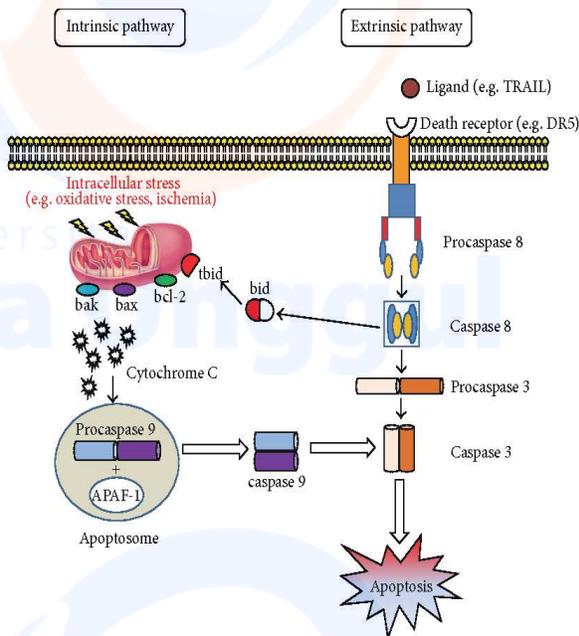
B. Gen *Bcl-2*

Gen *Bcl-2* merupakan gen yang bertugas untuk regulasi apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram suatu proses yang normal. Mekanisme kematian sel mempunyai fungsi sebagai perbaikan jaringan dan pelepasan sel rusak yang dapat membahayakan tubuh. Apoptosis diperlukan oleh sel untuk menjaga homeostatis tubuh karena serangan berbagai penyakit dan mencegah proliferasi sel yang tidak terkontrol. (Plat, Bucur, & Khosravi-Far, 2012)

Penelitian mengenai apoptosis berkembang pesat sejak awal tahun 1990. Studi mengenai apoptosis dimulai pada *Cenorhabditis elegans* atau cacing yang memiliki 1000 sel selama perkembangannya dan ada 131 sel yang mati. Peran apoptosis sangat penting untuk kondisi biologis, karena proses apoptosis yang tidak sempurna menyebabkan timbulnya penyakit yang bervariasi seperti penyakit autoimun karena sel T dan sel B autoreaktif, stroke iskemik karena aliran darah dari otak terbatas sehingga menyebabkan kematian sel saraf karena peningkatan apoptosis, dan kanker karena sel tumor kehilangan kemampuan untuk melakukan apoptosis.

Apoptosis terjadi secara langsung ketika sel yang rusak sudah tidak dapat diperbaiki lagi atau terinfeksi virus. Jika kemampuan sel untuk melakukan apoptosis rusak atau inisiasi apoptosis terhambat dapat menyebabkan sel membelah terus menerus sehingga berkembang menjadi kanker. Mekanisme apoptosis terbagi menjadi empat tahap yaitu (1) sinyal kematian sel atau penginduksi apoptosis, (2) tahap integrasi (transduksi signal, induksi gen apoptosis), (3) tahap pelaksanaan apoptosis dan (4) Tahap fagositosis. (Correla, Lee, & Wei Meng, 2017)

Mekanisme apoptosis tidak memerlukan proses transkripsi atau translasi. Sinyal penginduksi mesin molekular (*Molecular Machine*) dibutuhkan untuk kematian sel dianggap mengalami dormansi dan memerlukan aktivasi cepat yang menginduksi apoptosis yang berasal dari sinyal intraseluler dan ekstraseluler. Sinyal ekstraseluler berupa radiasi ionisasi, kerusakan karena disebabkan radikal bebas, dan gangguan siklus sel. Sedangkan sinyal intraseluler berupa hormon-hormon, seperti hormon tiroksin dan dapat dipicu karena kurangnya *growth factor* untuk sel bertahan hidup. (Amir, 2014; Correla et al., 2017)



Gambar 5: Mekanisme apoptosis

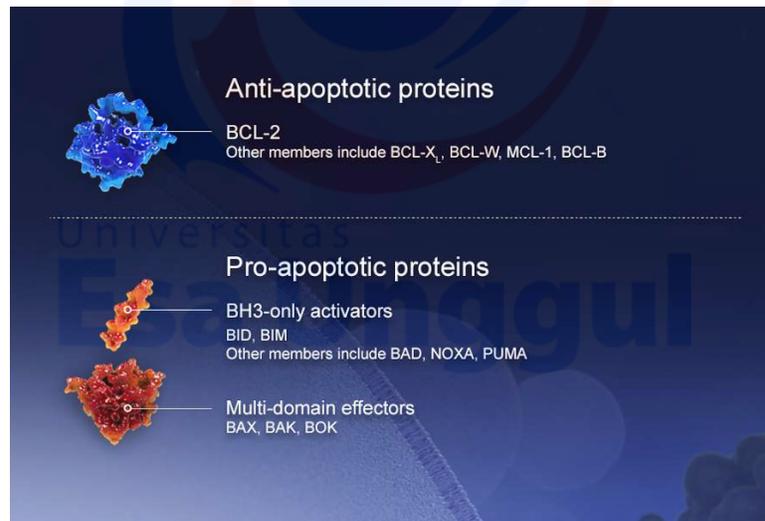
Jalur ekstrinsik (ekstraseluler) diinisiasi stimulasi dari reseptor kematian (*death receptor*) sedangkan jalur intrinsik diinisiasi karena pelepasan faktor sinyal dari mitokondria dalam sel adanya pelepasan molekul sinyal yang disebut ligan sel lain yang bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis. Ligan akan berikatan dengan *death receptor* yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. *Death receptor* yang terletak di permukaan sel adalah famili reseptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*), meliputi TNF-R1, CD 95 (Fas), dan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligan (TRAIL)-R1 dan R2. Jalur intrinsik disebabkan oleh senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang menyebabkan gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembran mitokondria.

Protein capcase-8 memotong anggota famili Bcl-2 yaitu Bid. Kemudian Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul pro-apoptotik seperti sitokrom C, Samc/Diablo, *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), dan omi/Htr2 dengan adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom C, APAF1 dan caspase 9 yang disebut apoptosom. (Loreto et al., 2014) (Plat et al., 2012)

Regulator apoptosis merupakan anggota dari *famili Bcl-2*. Terdapat sekitar 18 anggota *famili Bcl-2* yang sudah teridentifikasi dan dibagi ke dalam 3 grup yang berdasarkan strukturnya. Anggota grup pertama adalah *Bcl-2* dan *Bcl-xL* yang berfungsi sebagai anti-apoptosis, anggota grup kedua adalah *Bax* dan *Bak* (*Bcl-2 associated killer*) dan anggota grup ketiga yaitu *Bid* (*a novel BH3 domain-only death agonist*) dan *Bad* (*the Bcl-2 associated death molecule*) yang merupakan molekul pro-apoptosis. (Czabotar, Lessene, Strasser, & Adams, 2014; García-Sáez, 2012)

Keseimbangan proliferasi dan apoptosis berkontribusi sebagai perkembangan dan metastasis pada tumor. Gen supresor tumor dan onkogen dilaporkan beberapa penelitian berperan dalam jalur apoptosis yaitu gen *p53* dan *Bcl-2*. Beberapa studi penelitian untuk mengetahui hubungan antara terjadinya akumulasi protein-protein dan prognosis dalam kejadian kanker masih banyak yang bertentangan sehingga diperlukan banyak studi untuk gen *Bcl-2* yang berperan dalam kejadian penyakit.

Beberapa hasil data penelitian yang sudah dipublikasi saat ini menunjukkan bahwa amplifikasi onkogen menjadi salah satu penyebab perubahan genetik pada kejadian penyakit kanker. Penelitian pada kejadian kanker payudara dengan pemeriksaan amplifikasi gen *c-Myc* menunjukkan hasil dalam perkembangan tumor. Onkogen dari gen *c-Myc* adalah protein pengikat DNA yang berperan penting dalam regulasi pertumbuhan dan perkembangan sel. Onkoprotein *c-Myc* menyebabkan transformasi sel overekspresi sehingga terjadi akumulasi, Peningkatan level protein *c-Myc* dari metastasis pada kelenjar getah bening untuk kanker payudara. Konsentrasi tinggi *Bcl-2* dapat melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh protein *c-Myc*. Ekspresi *c-Myc* pada frekuensi rendah pada tumor sekitar kurang dari 50% dan hanya dua kasus tumor yang ditemukan pada frekuensi tinggi ekspresi *c-Myc* sekitar kurang dari 450% (Häyry et al., 2015; Yu et al., 2013)



Gambar 6: Anggota Famili Bcl-2

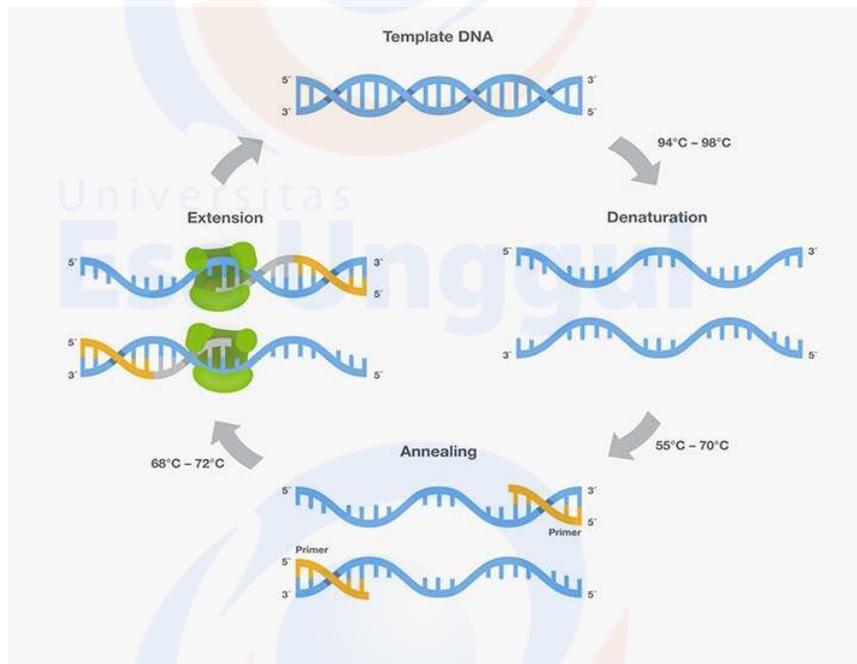
C. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) atau reaksi polimerase berantai adalah suatu proses enzimatik yang dilakukan secara *in vitro* teknik yang digunakan dalam laboratorium biologi molekuler untuk identifikasi penyakit genetik, infeksi virus, untuk mendiagnosis suatu penyakit, *Genetic Profiling in Forensic, Legal and Biodiversity Applications*, dan deteksi mutasi gen di sel ataupun jaringan dengan mengukur ekspresi gen secara kuantitatif. Teknik ini ditemukan oleh Kary Mullis pada tahun 1983. Reaksi PCR memerlukan beberapa komponen seperti cetakan DNA, primer spesifik, enzim DNA polimerase, buffer standar PCR dan konsentrasi ion Mg^{2+} , dan *gene cycler*. (Fatchiyah, Rahayu, Arumingtyas, & Widyarti, 2011)

Proses PCR adalah sebuah siklus yang berulang meliputi tahapan denaturasi, annealing dan elongasi oleh enzim DNA polymerase. *Taq DNA polymerase* diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus (Taq)* dikembangkan pada tahun 1998. Enzim ini tahan pada suhu $100^{\circ}C$ dan aktivasi maksimal pada suhu $70-72^{\circ}C$. Pasangan primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk hybrid pada ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target sehingga teramplifikasi spesifik target yang diinginkan. PCR mengamplifikasi DNA dengan bantuan suhu, enzim *Taq Polymerase* dan satu pasang primer untuk memperbanyak DNA target. (Bustin et al., 2017; Fatchiyah et al., 2011)

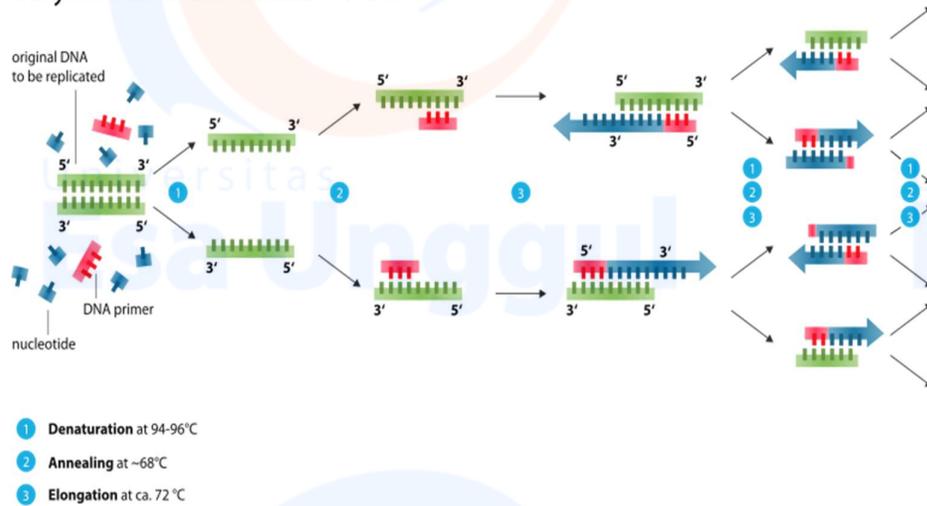
Tahapan PCR yang pertama yaitu denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik pada tahap ini untai ganda DNA menjadi terurai dua cetakkan DNA tunggal. Tahap kedua yaitu *Annealing* yaitu proses penempelan primer cetakkan DNA dengan rentang suhu antara $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$ selama 30 detik karena suhu *annealing* ditentukan oleh susunan primer. Untuk mendapatkan suhu optimal *annealing* dapat dilakukan dengan cara menghitung *melting temperature* (T_m) dari ikatan primer dan cetakkan DNA dan suhu *annealing* (T_A) 5°C lebih kecil dari T_m primer sebenarnya, primer disusun dari urutan nukleotida yang diperoleh dari GeneBank dan disintesis berdasarkan susunan nukleotida yang sudah ditentukan dengan ketentuan penyusunan primer dari oligonukleotida sepanjang 15-32 bp pada ujung-5' pita DNA cetakkan dan komplementnya. (Pjevac et al., 2017)

Tahap terakhir adalah elongasi dengan suhu 72°C pada langkah ini terjadi proses polimerasi untuk pembentukan untai DNA baru. Setiap jumlah nukleotida yang diamplifikasi menjadi dua kali lipat dengan pengulangan 25-30 siklus. Peningkatan jumlah siklus PCR melebihi 35 siklus tidak akan memberikan hasil yang positif. (Biosoft, 2014; Fatchiyah et al., 2011)



Gambar 3: Tahapan pada PCR (ThermoFisher, 2018)

Polymerase chain reaction - PCR



Gambar 4: Proses amplifikasi DNA

Cetakan DNA target amplifikasi sekitar 1000 pasang basa (bp) atau sekitar 1 kB. Hasil efisien dari amplifikasi antara 100-400 bp apabila hasil melebihi 1 kB prosesnya kurang efisien karena produk yang dihasilkan lebih panjang dan rentan terhadap inhibitor yang mempengaruhi kerja enzim polimerase. Amplifikasi lebih efisien jika suhu *annealing* berkisar tidak kurang dari 37°C karena untuk mencegah terjadinya *mispriming* hasil amplifikasi produk yang mempunyai sensitifitas tinggi pada saat suhu sekitar 55°C. Teknik PCR memiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari teknik PCR adalah dapat digunakan sebagai alat diagnosis berbasis molekuler seperti untuk mendeteksi virus, bakteri, dan protozoa dan dapat juga digunakan sebagai alternatif *gold standard* atau analisis parasit yang hidup tidak ditemukan didalam tubuh. (Sarbini et al., 2011)

Beberapa kekurangan dari teknik PCR adalah proses PCR yang memerlukan preparasi sampel cukup rumit dan reagen yang digunakan mahal, hasil PCR tidak dapat dilihat secara langsung sehingga tidak dapat membedakan parasit yang berada didalam dalam keadaan hidup atau mati karena memerlukan identifikasi lanjutan dengan elektroforesis gel.

2.2 HIPOTESIS

Ho: Penyesuaian suhu *annealing*, konsentrasi primer, kombinasi primer yang tepat akan menghasilkan PCR gen *Bcl-2* yang optimal.

H₁: Penyesuaian suhu *annealing*, konsentrasi primer, kombinasi primer yang tepat tidak akan menghasilkan reaksi PCR gen *Bcl-2* yang optimal.