

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Gen BCL-2 merupakan gen spesifik yang berperan penting dalam mengatur proses apoptosis sel yang tempat aktivitasnya berada di membran mitokondria. Mitokondria memiliki peran dalam proses apoptosis sel yaitu melepaskan molekul proapoptotik kedalam sitosol serta dapat melepaskan sitokrom C, setelah itu dilanjut oleh proses yang dapat menstimulasi kematian sel (Utomo et al., 2018). Gen BCL-2 ini merupakan bagian dari protein famili Bcl-2 yang berfungsi sebagai penyebab kematian sel dengan mengontrol secara permeabilitas membran mitokondria dan melepaskan faktor apoptosis dari ruang antar membran ke dalam sitoplasma.

Apoptosis merupakan istilah dalam kematian sel terprogram yang membutuhkan keberadaan gen tanpa memenuhi beberapa atau seluruhnya kriteria morfologi apoptosis. Faktor apoptosis yang dilepaskan berupa bagian dari sitokrom C (protein heme yang bertindak sebagai suatu pembawa elektron dalam fosforilasi oksidasi mitokondria) dan Smac Diablo untuk mengaktifkan caspase, serta *Apoptotic Inhibiting Factor* (AIF) dan endonuklease G yang berperan untuk menginduksi *caspase independent apoptotic* dalam nukleus. Famili Bcl-2 memiliki anggota anti apoptosis yang dapat menghambat pelepasan faktor apoptosis dan juga anggota proapoptosis yang dapat merangsang pelepasan faktor apoptosis dalam kematian sel (Amir, 2014).

Proses apoptosis memainkan peran yang sangat penting dalam perkembangan dan pemeliharaan homeostasis (cara tubuh mempertahankan kondisi stabil agar berfungsi dengan normal) jaringan pada organisme multisel. Pada manusia dewasa diperkirakan sekitar 60 miliar sel diproduksi dan dihilangkan secara paralel setiap hari, sel yang baru akan diproduksi dengan pembelahan sel dan yang lama akan dihilangkan dengan cara apoptosis. Apoptosis ini dapat terjadi karena dipicu oleh berbagai sinyal yang dimunculkan dari dua jalur utama yaitu, jalur ekstrinsik (reseptor kematian) dan jalur intrinsik (mitokondria) (Macías et al., 2013).

Ketidaknormalan dalam regulasi kematian sel (apoptosis) dapat berakibat fatal yang bisa menyebabkan sejumlah penyakit yang berbahaya seperti, kanker, penyakit Autoimun, AIDS, dan juga penyakit Neurodegeneratif. Kanker merupakan penyakit yang melibatkan pertumbuhan sel yang tidak normal sebagai akibat dari disfungsi dalam regulasi siklus sel. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen BCL-2 yang tinggi berkaitan erat dengan keparahan tumor pada manusia, seperti adanya peningkatan ekspresi BCL-2 pada kanker melanoma, payudara, prostat, kolorektal hingga *Acute Myeloid Leukemia* (AML), akan memberikan respon klinis dan prognosis yang buruk serta menyebabkan resistensi terhadap kemoterapi dan radiasi.

Gen BCL-2 ini ternyata merupakan gen yang menonjol serta terdapat diseluruh tubuh dengan efek antagonis bagi kelangsungan hidup sel yaitu menghambat apoptosis. Salah satu tempat berlangsungnya gen BCL-2 terdapat didalam mulut, seperti pada gigi dan kelenjar ludah. Kelenjar ludah merupakan salah satu kelenjar eksokrin yang berperan penting dalam homeostasis gigi dengan cara menghasilkan saliva (air liur). Saliva merupakan sampel cairan biologis yang memiliki banyak fungsi dalam rongga mulut diantaranya sebagai pelumas, pencerna, perasa, penyangga pH, aktivitas antimikroorganisme, serta imunologi (Saghiri et al., 2017).

Saliva dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif sampel dalam penelitian karena memiliki beberapa keunggulan, seperti metode pengambilan yang non invasif (tidak mempengaruhi keutuhan jaringan tubuh lainnya) dan tanpa rasa sakit, ketersediaannya banyak, serta biaya pengumpulannya yang rendah sehingga pasien merasa nyaman jika sampel diambil dalam waktu yang berulang. Selain digunakan sebagai sampel penelitian, ternyata saliva juga dapat digunakan untuk mendiagnosis berbagai penyakit, salah satunya seperti kanker mulut (Woźniak et al., 2019)

Dalam penelitian ini metode yang digunakan yaitu *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang mana ini adalah suatu metode selektif untuk deteksi sensitif dengan penghitungan yang tepat dari sekuens DNA target dalam waktu yang singkat. *Real-Time PCR* (RT-PCR) merupakan metode yang banyak digunakan untuk deteksi dan kuantifikasi RNA yang mana banyak digunakan dalam penelitian biomedis dan saat ini merupakan metode referensi untuk diagnostik molekuler, pengujian air, makanan dan pakan, forensik dan sebagian besar pengujian asam nukleat lainnya (Bar et al., 2012).

*Real Time PCR* (RT-PCR) dapat digunakan untuk pengukuran tingkat ekspresi gen yang dikenal juga dengan *quantitative PCR* (qPCR). qPCR merupakan metode yang diandalkan untuk mengukur ekspresi gen karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan PCR Konvensional seperti deteksi yang akurat dan sensitivitas yang tinggi, hasil analisa langsung didapatkan sehingga mengurangi kontaminasi pada sampel serta diperoleh hasil yang berupa kuantitatif (kurva/grafik).

Penelitian ini difokuskan untuk optimasi kondisi parameter *Real-Time PCR* agar mendapatkan kondisi yang optimal dari sampel saliva dalam mengamplifikasi Gen BCL-2. Optimasi untuk amplifikasi gen BCL-2 dengan RT-PCR ini sangat penting dilakukan untuk mendapatkan hasil kondisi yang optimal serta menghasilkan kondisi yang sama apabila dilakukan secara berkala. Harapannya, hasil penelitian ini dapat dikembangkan menjadi salah satu uji prognosis penyakit kanker.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa Suhu *Annealing* yang optimal untuk Amplifikasi Gen BCL-2 dengan metode qRT-PCR ?
2. Manakah Pasangan Primer yang optimal untuk Amplifikasi Gen BCL-2 dengan metode qRT-PCR ?
3. Berapakah Konsentrasi Primer yang optimal untuk mengamplifikasi Gen BCL-2 dengan metode qRT-PCR ?

## 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 1.3.1 Tujuan

1. Mendapatkan Suhu *Annealing* yang optimal untuk Amplifikasi Gen BCL-2
2. Mengetahui Pasangan Primer yang optimal dalam mengamplifikasi Gen BCL-2
3. Mendapatkan Konsentrasi Primer yang optimal untuk Amplifikasi Gen BCL-2

### 1.3.2 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi parameter operational yang optimal dalam reaksi RT-PCR yang bersifat akurat dan sensitif yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya sebagai deteksi dini atau prognosis (prediksi) perjalanan penyakit kanker.