

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan teknologi genetika di Indonesia mengalami kemajuan yang pesat. Salah satu contohnya adalah kemajuan dalam praktik klinis, di mana informasi farmakogenetik untuk mendeteksi dosis obat yang dibutuhkan secara individual. Kemajuan teknologi ini didukung oleh perkembangan teknik kloning DNA, metode sequencing DNA, serta *Polymerase chain reaction* (PCR), dan teknik biologi molekular lainnya yang mampu membantu pengembangan deteksi farmakogenetik. Farmakogenetik menjelaskan variabilitas respon obat akibat variasi genetik, baik pada tingkat individu maupun populasi. Tujuan utama farmakogenetik adalah untuk mengindividualisasi terapi pengobatan berdasarkan susunan genetik yang spesifik pada seseorang (Darmadipura, 2013).

Pada aplikasi farmakogenetik, terdapat beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap metabolisme obat dan telah diketahui lebih dari 90% semua obat mampu dimetabolisme oleh enzim CYP450 dan penyandi ekspresi dari enzim-enzim metabolisme obat yang termasuk CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP1A2, CYP1A1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2J2, CYP2C9, dan CYP2E1 (Radji, 2005) (Prakash et al., 2015). Subfamili CYP2 merupakan subfamili terbesar dari enzim CYP yang penting untuk metabolisme obat manusia dalam jumlah besar (Prakash et al., 2015). Meskipun CYP2D6 hanya memiliki rentang 25% dalam metabolisme obat tetapi dapat memetabolisme jumlah obat yang cukup banyak (Pondman, 2015) (Prakash et al., 2015). Polimorfisme CYP2D6 paling baik dipelajari dan satu salah satu pengembangan farmakogenetik yang paling menarik. Pengujian CYP2D6 memiliki dampak terbesar dari polimorfisme genetik di antara semua obat utama yang dimetabolisme CYP, Karena spektrum varian genetiknya yang luas (dari alel nol hingga amplifikasi gen beberapa kali lipat) dan sedikit dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan nongenetik (Zanger, 2014).

Polimorfisme genetik pertama yang diketahui dalam keluarga CYP ditemukan dalam enzim CYP2D6. Polimorfisme ini ditemukan 30 tahun yang lalu ketika sekelompok kecil pasien yang diberikan obat antihipertensi debrisoquine mengalami penurunan tekanan darah yang parah. Dapat diketahui bahwa enzim CYP2D6 bertanggung jawab atas metabolisme 25% obat termasuk antidepresan, beta-blocker, opioid, dan agen antiaritmia. Dalam beberapa individu pada setiap populasi memiliki varian alelik CYP2D6 yang berbeda dan variannya menentukan status metabolisme mereka. Terdapat empat macam metabolisme hasil polimorfisme pada CYP2D6, yaitu *Extensive Metabolizer* (EM), *Intermediate Metabolizer* (IM), *Poor Metabolizer* (PM) dan *Ultra-rapid Metabolizer* (UM). Hal ini memiliki kisaran dalam polimorfisme yang menyebabkan perbedaan hingga 10 kali lipat dalam dosis obat yang dibutuhkan untuk mencapai konsentrasi plasma yang identik pada individu. Sehingga polimorfisme ini dapat menyebabkan variasi respon obat termasuk mutasi pada daerah pengkodean gen yang dapat

menyebabkan penurunan atau hilangnya fungsi protein yang bertanggung jawab atas fungsi obat. Beragam respon terhadap obat yang dialami pasien berpotensi menyebabkan kerusakan parah atau bahkan kematian. Akibatnya, sangat penting untuk memahami dan mengembangkan teknik pengurutan genetik yang efektif dan murah. Dampak yang signifikan pada polimorfisme genetik yaitu dalam pengobatan umum salah satunya dalam deteksi farmakogenetik (Gummadi & Guddati, 2021; Zhou, 2009).

Dalam pengembangan deteksi farmakogenetik gen albumin sebagai *Housekeeping* gen juga telah dilaporkan dapat menentukan jumlah *copy* gen CYP2D6 (Duc L Nguyen, 2009) (Elke Schaeffeler, 2003). Gen albumin merupakan protein plasma yang paling banyak melimpah dalam plasma sekitar 55% dari protein darah (35-50 g/L) di dalam serum manusia. Albumin adalah protein globular kecil sekitar 5nm memiliki berat molekul sebesar 66,5 kDa. Albumin memiliki fungsi biologis termasuk dalam pemeliharaan koloid, tekanan osmotik, pengikatan zat endogen dan eksogen, serta efek antitrombotik (Parodi et al., 2019). Dalam deteksi molekuler gen albumin menjadi salah satu gen yang sering digunakan sebagai gen kalibrator dalam teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*). Gen kalibrator itu adalah sampel referensi tunggal atau sampel yang digunakan sebagai standar dengan konsentrasi analit yang diketahui dan digunakan untuk memverifikasi pengujian berfungsi dengan baik (Joni Kusnadi, 2022). Gen albumin juga merupakan salah satu bagian dari *Housekeeping* gen (Hua YUE, 2010) (Eli Eisenberg, 2013). *Housekeeping* gen merupakan gen yang diekspresikan secara stabil di semua sel organisme terlepas dari jenis jaringan, tahap perkembangan, keadaan siklus sel, atau sinyal eksternal, atau sebagai penanda keadaan biologis organisme yang sehat (Chintan J. Joshi, 2022).

Perkembangan teknologi DNA rekombinan yang juga dikenal sebagai kloning gen atau kloning molekuler, telah menjadi landasan penting dalam pengembangan bioteknologi molekuler. Metode yang paling umum digunakan dalam duplikasi fragmen DNA spesifik adalah metode PCR (Suryaningtyas, 2017). Secara umum, metode kloning terbagi menjadi dua kelas utama, yaitu tergantung pada ligase dan tanpa ligase. Metode kloning yang dipilih yaitu metode kloning tanpa ligasi salah satunya TA kloning. Metode TA kloning dianggap sebagai metode yang paling sederhana dan efisien untuk mengkloning produk PCR, mengatasi beberapa masalah metode lain dan berlaku untuk fragmen DNA dengan urutan yang tidak diketahui (Yao et al., 2016). Dalam metode kloning TA itu sendiri merupakan singkatan dari “timin” dan adenin” metode yang paling umum digunakan untuk mencapai efisiensi kloning yang tinggi (Ramos et al., 2017). Proses ini melibatkan penambahan nukleotida tambahan pada ujung 3' dari fragmen DNA menggunakan enzim terminal transferase, sehingga menghasilkan ujung tumpul di satu sisi dan ujung T yang menonjol di sisi lainnya. Ujung T ini akan berikatan dengan basa A yang terdapat pada vektor kloning yang telah dimodifikasi.

Dengan demikian, fragmen DNA dapat dimasukkan ke dalam vektor kloning dan direplikasi dalam sel bakteri untuk menghasilkan banyak salinan dari fragmen DNA tersebut (Green & Sambrook, 2021) (Yao et al., 2016).

Metode TA kloning ini banyak digunakan dalam bioteknologi dan penelitian genetika untuk mengkloning dan memanipulasi fragmen DNA (Green & Sambrook, 2021) (Yao et al., 2016). Ekstraksi DNA merupakan suatu langkah awal pengisolasian molekul DNA. Molekul DNA ini harus diekstraksi dari tempat asalnya. Pada seluruh jaringan dan cairan tubuh terdapat DNA. Oleh karena itu, DNA dapat diisolasi dari semua bahan biologis yang mengandung sel berinti, seperti darah, semen, akar, rambut, tulang dan lain-lain. Namun demikian, bahan yang paling sering digunakan untuk tujuan isolasi DNA adalah darah karena bahan tersebut relatif mudah diperoleh (Jo Edy Siswanto, 2016). Hal ini juga didukung dimana gen albumin memiliki presentase 55% dari protein darah (35-50 g/L) di dalam serum manusia (Parodi et al., 2019).

Dalam metode kloning sebagian besar membutuhkan vektor untuk membantu sebagai perantara yang akan membawa DNA masuk ke dalam sel inang dan terjadinya replikasi dan ekspresi fragmen DNA. Terdapat berbagai macam vektor yang telah digunakan saat ini seperti vektor non-komersial dan vektor komersial. Pemilihan vektor yang dianggap komersial seperti pGEM-T Easy Sistem vektor (Promega) merupakan vektor yang memiliki ukuran kecil yaitu 3015bp. Pada ukuran tersebut yang relatif kecil sehingga vektor mampu membawa DNA target cukup banyak dan memudahkan preparasi DNA sisipan dalam jumlah yang besar. Vektor pGEM-T Easy memiliki ukuran kecil tetapi dengan ini akan memudahkan masuknya ke dalam sel inang dan lebih mudah dimurnikan. Karena pGEM-T Easy cenderung tidak mudah rapuh dibandingkan dengan vektor yang memiliki ukuran besar (Seprianto, 2017; Yao et al., 2016).

Dalam penelitian Pondman et al. (2015), mengembangkan metode qPCR yang akurat dan dapat diandalkan untuk mendeteksi polimorfisme CYP2D6 pada alel *1/*4xN dengan menggunakan primer spesifik yang memperoleh sinyal fluoresen yang berbeda pada urutan target dan non-target. Metode ini berpotensi digunakan dalam pengembangan deteksi farmakogenomik dan peningkatan terapi obat yang disesuaikan dengan genetik (Pondman, 2015). Sementara itu, dalam Penelitian Elke, et al. (2003) mengembangkan metode Real-time PCR dalam pengembangan metode baru untuk menentukan dosis gen CYP2D6 per genom. Data amplifikasi CYP2D6 kuantitatif dinormalisasi menjadi albumin sebagai gen referensi internal yang diamplifikasi secara bersamaan dalam uji bipleks tabung tunggal (Elke Schaeffeler, 2003).

Berdasarkan uraian diatas akan dilakukan kloning gen albumin dengan menggunakan teknik TA kloning pada vektor pGEM-T Easy, yang dapat digunakan sebagai bagian dari pengembangan teknologi deteksi untuk aplikasi farmakogenetik. Sehingga dengan DNA rekombinan akan membantu proses optimasi setting PCR terutama pada kondisi terbatas sampel.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, masalah pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana efektivitas sampel darah pasien sebagai sumber DNA dalam mempengaruhi keberhasilan tahap kloning melalui PCR ke dalam plasmid vektor pGEM-T Easy?
2. Bagaimana konfirmasi yang dapat digunakan untuk memverifikasi keberhasilan kloning gen albumin dalam kerangka sistem TA kloning?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan yang diuraikan diatas, maka dapat ditetapkan tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Untuk melihat efektivitas sampel darah pasien sebagai sumber DNA dalam mempengaruhi keberhasilan tahap kloning melalui PCR ke dalam plasmid vektor pGEM-T Easy.
2. Untuk mengkonfirmasi keberhasilan kloning albumin pada sistem TA kloning.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat untuk Peneliti

Melalui penelitian ini, peneliti mendapatkan ilmu dan skill untuk melakukan TA kloning gen albumin sebagai bagian untuk pengembangan teknologi deteksi untuk aplikasi farmakogenetik.

1.4.2 Manfaat untuk Universitas

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru dan ilmu pengetahuan serta menambah *networking* dalam penelitian bersama BRIN,

1.4.3 Manfaat untuk Umum

Melalui penelitian ini dapat memberikan informasi baru terkait partial gen albumin efektif dapat digunakan sebagai dasar untuk deteksi terapi farmakogenetik melalui deteksi kloning gen.

1.5 Hipotesis

1. Kloning Partial Gen albumin akan menghasilkan fragmen DNA yang memiliki potensi pengembangan dalam teknologi deteksi farmakogenetik.
2. Keberhasilan kloning albumin dalam sistem TA kloning akan dikonfirmasi melalui berhasilnya pengamplifikasian fragmen DNA target dengan pendekatan teknik PCR yang menggunakan primer spesifik.