

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia. Indonesia menjadi negara dengan jumlah pasien kanker dengan kematian terbanyak di Asia Tenggara. Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pembelahan sebuah sel yang tidak terkendali. Penyebab dari tidak terkendalinya pembelahan suatu sel adalah terdapat mutasi genetik. Pada beberapa penelitian (Auerkari, 2015; Suroto et al., 2021) menunjukkan adanya peningkatan ekspresi protein BCL2, salah satu protein yang berperan dalam proses apoptosis. Overekspresi protein ini dapat menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkendali membuat keseimbangan di dalam tubuh terganggu, hal ini yang menjadi awal mula terbentuknya neoplasma, tumor, dan kanker. Gen ini memiliki peran yang sangat penting di dalam proses apoptosis yaitu melepaskan molekul pro apoptotik ke dalam sitosol diikuti pelepasan sitokrom C, lalu dilanjutkan oleh proses yang dapat menstimulasi kematian sel. Gen BCL-2 bekerja di dalam membran dari mitokondria yang memiliki peran penting dalam proses apoptosis. Protein famili Bcl-2 adalah suatu protein yang berperan dalam mengatur proses apoptosis sebagai komponen penting jalur intrinsik (mitokondria). Anggota dari protein famili Bcl-2 dapat memicu terjadinya apoptosis melalui sintesis gen pro-apoptosis dan menghambat apoptosis melalui sintesis gen anti apoptosis. Disregulasi ekspresi Bcl-2 dapat menyebabkan terjadinya perpanjangan kelangsungan hidup sel dengan mencegah apoptosis dan terlibat dalam pembentukan berbagai neoplasma. (Hatok & Racay, 2016)

Apoptosis adalah kematian sel dengan mekanisme genetik yaitu kerusakan atau fragmentasi DNA. Proses ini terjadi selama perkembangan embrio, untuk menjaga homeostasis jaringan. Apoptosis merupakan program kematian sel melalui proses aktif yang mampu mencegah kelangsungan hidup berbagai sel yang memiliki potensi tinggi memiliki pembelahan yang tidak terkontrol melalui kerusakan DNA. Apoptosis merupakan mekanisme yang penting untuk mencegah pembelahan sel kanker dan berfungsi sebagai salah satu kontrol checkpoint dalam suatu siklus sel. Apoptosis dikendalikan oleh protein pro-apoptotik maupun anti apoptotik. Sel-sel yang mati pada proses apoptosis dikenali oleh sel imun dan diperantarai oleh beberapa gen yang mengkode protein untuk kelompok enzim protease sistein yang berperan penting dalam mengatur dan mengeksekusi kematian sel secara apoptosis, kelompok enzim ini disebut caspase. Peristiwa apoptosis terjadi setelah adanya gangguan pada membran barier mitokondria dengan pelepasan sitokrom c melalui jalur caspase-3 pada sel normal. Aktivasi caspase-3 dipengaruhi oleh protein keluarga Bcl-2. Protein ini terdiri dari pro-apoptosis seperti Bax dan Bak dan anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-XL. Overekspresi Bcl-2 anti-apoptosis mencegah aktivasi caspase-3 pada tahap pelepasan sitokrom c, sehingga apoptosis tidak terjadi. Hal ini lah yang berhubungan erat dengan berbagai macam kanker, seperti kanker payudara, rahim, serviks, paru-paru, laring, kolorektal, pankreas, dll.

Penelitian mengenai laju ekspresi BCL2 di tingkat molekuler merupakan salah satu topik penelitian yang penting untuk mengetahui patogenesis kanker dan juga dapat berpotensi sebagai kandidat terapi dan prognosis. Metode yang digunakan untuk mengetahui laju transkripsi BCL-2 adalah dengan Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). (Eimani

et al., 2014) Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Nufroha et al., 2023), memperlihatkan adanya suhu optimum reaksi RT-PCR untuk BCL2 dengan saliva. Penelitian ini berfokus pada optimasi reaksi RT-PCR BCL2. Metode *Real-Time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)* merupakan metode selektif untuk deteksi sensitif dengan penghitungan yang tepat pada sekuens DNA target dalam waktu yang singkat. Selain itu, penelitian lain tentang amplifikasi gen BCL-2 menggunakan *Real Time PCR* juga sudah dilakukan oleh (Karaliotas et al., 2015; Saaed et al., 2017). Pada penelitian Karaliotas et al, 2015 memperlihatkan adanya ekspresi mRNA BAX dan BCL2 pada tulang rawan manusia dengan OA dan normal. Hasilnya ditemukan peningkatan ekspresi BAX dan penurunan rasio BCL2/BAX pada OA, sedangkan pada penelitian Saaed et al, 2017 memperlihatkan bahwa ekspresi gen BCL 2 pada pasien CLL lebih tinggi daripada pada subjek yang sehat. *Real-Time PCR* menggunakan pewarna DNA berbasis fluoresensi (intercalating dye, SYBR Green dan probe) fluoresens, dimana peningkatan sinyal fluoresens menunjukkan terjadinya amplifikasi gen target selama proses PCR. (Artika et al., 2022)

Dalam metode RT-PCR untuk mengetahui laju transkripsi BCL2 diperlukan proses optimasi. Hal ini penting agar mendapatkan komposisi dan kondisi PCR yang tepat, sehingga dapat menghasilkan hasil yang optimal. Dalam proses optimasi perlu dilakukan pengecekan efisiensi reaksi *Real-Time PCR*, efisiensi ini harus dilakukan sebelum metode *Real-Time PCR* tersebut dapat digunakan dalam riset maupun pada pasien, seperti yang telah dilakukan oleh (Bustin & Huggett, 2017). Dalam penelitian tersebut dilakukan optimasi real time pcr pada efisiensi reaksi. Efisiensi RT-PCR untuk mengamplifikasikan gen BCL-2 ini penting dilakukan untuk mendapatkan hasil kondisi yang efisien serta menghasilkan kondisi yang sama apabila dilakukan secara berkala.

Riset ini dilakukan sebagai lanjutan optimasi metode *Real-Time PCR* terhadap gen BCL2, yaitu melakukan validasi terhadap metode tersebut dengan cara melakukan serial dilution pada sampel yang akan digunakan lalu dilakukan analisis kurva standar dengan kondisi reaksi yang sudah dioptimasi sebelumnya oleh (Nufroha et al., 2023) dengan menggunakan sampel saliva manusia.

1.2 Rumusan Masalah

Metode RT-PCR merupakan metoda yang sangat efektif dalam amplifikasi gen BCL-2, sebuah gen yang berperan penting dalam regulasi kematian sel dan sering kali terlibat dalam banyak kondisi penyakit, termasuk kanker. Efisiensi yang tinggi dari metode ini memungkinkan deteksi yang sensitif dan akurat terhadap ekspresi gen BCL-2 bahkan dalam sampel klinis yang terbatas. Oleh karena itu, optimasi metode RT-PCR diperlukan untuk mendapatkan hasil kondisi yang efisien serta menghasilkan kondisi yang sama jika dilakukan secara berkala.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi *Real-Time* PCR yang memiliki efisiensi yang baik untuk mengamplifikasikan gen BCL-2
2. Memvalidasi metode *Real-Time* PCR yang sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk menghasilkan kondisi RT_PCR yang optimal dan efisien untuk mengamplifikasikan gen BCL-2 yang bersifat akurat dan sensitif yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutn

