

## Analisis Polimorfisme Gen dan Aplikasinya Dalam Klinik

CORRY N. MAHAMA<sup>1\*</sup>, DWI A. SURYANDARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

<sup>2</sup>Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

Diterima: 26 Oktober 2022 – Disetujui: 16 Januari 2023  
© 2023 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

### ABSTRACT

Gene polymorphism refers to a variation in DNA sequence that occurs in a population with a frequency of 1% or higher. Polymorphism may be a variation in single nucleotide (SNP) or a variation in some repetitive DNA sequences (length polymorphism). Several methods can be used to analyze polymorphism, included Polymerase Chain Reaction (PCR), DNA sequencing from the conventional method to more sophisticated method such as Next Generation Sequencing (NGS), fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and DNA microarrays. Recently, more studies have been carried out to find the relationship between polymorphism and disease severity or prognosis, response to various drugs, susceptibility to environmental factors such as toxins, susceptibility to infections and cancers.

**Key words:** DNA; gene polymorphism; PCR; clinic.

### PENDAHULUAN

Variabilitas genetik antara individu satu dengan lainnya lazim dijumpai (Chiarella *et al.*, 2020; Somak, 2022). Variasi genetik biasanya dibagi menjadi beberapa jenis antara lain polimorfisme (nukleotida tunggal), *small insertions and deletions*, dan varian struktural (Nusrath & Raiza, 2015). Berdasarkan jenis variasi genetik, yang paling sering ditemukan adalah polimorfisme gen (Chiarella *et al.*, 2020). Polimorfisme gen merupakan suatu perubahan dalam sekuens DNA pada populasi umum dengan frekuensi lebih dari 1% (Chiarella *et al.*, 2020; Somak, 2022). Polimorfisme ini bisa berupa perubahan pada satu nukleotida atau nukleotida tunggal (*single-nucleotide polymorphism*/SNP), atau

berupa variasi sejumlah sekuens DNA yang repetitif, misalnya minisatelit atau mikrosatelit (*length polymorphism*) (Somak, 2022). SNP tidak menyebabkan suatu penyakit secara langsung, akan tetapi lebih bersifat sebagai suatu faktor predisposisi (Nusrath & Raiza, 2015; Somak, 2022). Pada mutasi, terjadi perubahan yang permanen dari sekuens DNA suatu gen yang ditemukan kurang dari 1% populasi serta memiliki kemungkinan yang besar untuk menyebabkan penyakit. Mutasi bisa berupa *germline* dan somatik. Mutasi *germline* muncul di semua sel tubuh, sedangkan mutasi somatik hanya dijumpai pada sel tumor saja (Somak, 2022).

Berdasarkan area genomiknya, beberapa SNP yang terdapat pada posisi tertentu kemungkinan akan memberikan efek merugikan (*deleterious effects*) karena mengubah struktur molekul sehingga menyebabkan perubahan fungsional protein (Nusrath & Raiza, 2015), yaitu:

- 1) Koding Protein. SNP yang terdapat di area ekson dapat menyebabkan perubahan struktur dan fungsi protein dengan membuat kodon *start* atau *stop* baru (seperti *nonsense SNPs*)

---

\* Alamat korespondensi:

Program Doktor Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran  
Universitas Indonesia, Jakarta.  
Alamat rumah: Jl. Arie Lasut no. 26, Kelurahan Singkil 1,  
Kecamatan Singkil, Kota Manado – 95234.  
E-mail: corry.mahama@gmail.com.

atau substitusi asam amino *deleterious* (misalnya *missense* SNPs).

- 2) Regulasi *Splicing*. SNP pada lokasi *splice* dapat merubah regulasi *splicing*, menyebabkan terjadinya *exon skipping* atau retensi intron. SNP pada lokasi *splice* eksonik dapat mengganggu regulasi *splicing* alternatif dengan mengubah *exonic splicing enhancers* atau *silencers*.
- 3) Regulasi transkripsional. SNP pada area regulasi transkripsi (*transcription factor binding sites*, *CpG islands*, *microRNA*, dan lain-lain) dapat menyebabkan perubahan lokasi pengikatan dan mengganggu regulasi gen yang benar.
- 4) Modifikasi post-translasi. Perubahan lokasi modifikasi post-translasi bisa terjadi pada SNP di area koding protein, sehingga bisa mengganggu modifikasi post-translasi yang seharusnya.

Berbagai metode yang dapat digunakan untuk melakukan analisis polimorfisme gen yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *DNA sequencing* baik yang konvensional maupun dengan *Next Generation Sequencing* (NGS), *fluorescence in situ hybridization*, *comparative genomic hybridization*, serta *DNA microarray* (Somak, 2022). Akhir-akhir ini semakin banyak peneliti menganalisis polimorfisme gen yang dikaitkan dengan derajat penyakit, respons terhadap obat pada berbagai penyakit, kerentanan terhadap faktor-faktor lingkungan seperti toksin, dan suseptibilitas terhadap infeksi mikroorganisme tertentu dan kanker (Dieter *et al.*, 2022; Nusrath & Raiza, 2015).

## METODE ANALISIS POLIMORFISME GEN DAN APLIKASI KLINIS

### Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah suatu teknik amplifikasi yang paling sering digunakan dalam laboratorium molekular. Teknik ini didasarkan pada amplifikasi

eksponensial dan bidireksional dari sekuens DNA dengan menggunakan satu set primer oligonukleotida. Dalam setiap PCR *run*, memerlukan suatu *DNA template*, sepasang primer untuk mengenali sekuens target, empat deoksinukleotida trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polimerase, dan magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) yang dicampur dalam *reaction buffer*. Ada 3 tahapan dalam siklus PCR: (1) Denaturasi. Pemisahan DNA untai ganda (*double-stranded*) menjadi 2 untai tunggal (*single-stranded*), terjadi pada suhu tinggi 95 °C; (2) *Annealing*, merupakan reaksi pengenalan primer *forward* dan *reverse* pada DNA target. Reaksinya didinginkan pada suhu 55-65 °C sehingga primer bisa menempel pada sekuens komplementernya; (3) Ekstensi. Merupakan reaksi pemanjangan rantai DNA dengan penambahan basa nitrogen sehingga terbentuk untai DNA yang baru, dilakukan pada suhu 72°C. Tahapan-tahapan ini diulang 35-40 kali, dan pada tiap siklus, untai DNA yang baru disintesis berfungsi sebagai *template* untuk sintesis DNA selanjutnya (Putra *et al.*, 2020; Somak, 2022).

### Jenis-jenis PCR

#### 1) Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

RT-PCR adalah modifikasi dari teknik PCR standar untuk amplifikasi mRNA. Hasil isolasi mRNA diubah menjadi DNA komplementer (cDNA) dengan menggunakan enzim *RNA-dependent DNA polymerase* atau *reverse transcriptase* (Putra *et al.*, 2020; Somak, 2022). Proses ini dikenal sebagai *reverse transcription*. cDNA bisa digunakan oleh molekul DNA lain untuk amplifikasi PCR. Primer untuk sintesis cDNA dapat berupa non-sekuens spesifik, suatu campuran (*mixture*) heksamer yang random atau primer oligo-dT, atau sekuens spesifik. RT dan amplifikasi PCR dapat dilakukan sebagai prosedur dua tahapan dalam suatu tube tunggal atau sebagai dua reaksi yang terpisah (Somak, 2022).

#### 2) Real-Time PCR

*Real-Time* PCR menggunakan prinsip utama PCR konvensional namun mendeteksi dan mengkuantifikasi produk PCR secara *real time*

seiring progresivitas reaksi. Selain semua komponen PCR konvensional, pada *real-time* PCR juga menggunakan molekul yang berlabel fluoresen untuk visualisasi amplicon-amplicon PCR (Somak, 2022).

Beberapa kelebihan *real-time* PCR yaitu melakukan deteksi secara *real-time* dan tidak memerlukan elektroforesis gel lanjutan; bisa menggunakan *post-PCR melting curve analysis* untuk mendeteksi variasi sekuens pada lokus yang spesifik, serta lebih praktis dibandingkan teknik lainnya dan tidak membutuhkan pengerjaan sampel setelah amplifikasi PCR sehingga waktu prosedur lebih singkat dan risiko kontaminasi oleh produk PCR sebelumnya lebih minimal (Somak, 2022).

PCR kuantitatif (qPCR) merupakan variasi dari *real-time* PCR yang bisa digunakan untuk evaluasi kadar ekspresi gen atau *gene copy numbers*. Penilaian kuantitatif dari template awal yang digunakan untuk amplifikasi PCR diperoleh dengan membandingkan jumlah produk PCR sekuens target dengan produk PCR yang didapatkan dari amplifikasi jumlah DNA/cDNA yang diketahui (Somak, 2022).

### 3) Droplet digital PCR (ddPCR)

ddPCR adalah teknologi revolusioner yang memberikan kuantitasi akurat pada tingkatan biomarker molekular yang sangat rendah, karena partisi reaksi PCR mencapai 20.000 nano droplets, dimana fluoresensi dapat diukur secara terpisah dan terkuantisasi (Somak, 2022). Pada ddPCR hasil PCR dapat terdeteksi secara otomatis. Tekniknya bekerja dengan membagi sampel awal menjadi suatu partisi (microwell) dilanjutkan dengan prosedur PCR biasa (Putra *et al.*, 2020).

### 4) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analysis

Deteksi polimorfisme dengan cara memotong sekuens DNA target [pada sekuens nukleotida spesifik yang dikenal sebagai situs restriksi (*restriction sites*)], menggunakan enzim restriksi atau endonuklease restriksi. Situs restriksi biasanya sepanjang 4-8 nukleotida dan bersifat palindromik. Analisis RFLP menggunakan

kemampuan enzim restriksi untuk memotong DNA pada situs yang spesifik. Jika terdapat suatu variasi sekuens misalnya mutasi titik (*point mutation*), menyebabkan perubahan situs restriksi untuk enzim yang spesifik, ukuran produk PCR akan mengalami perubahan, yang bisa diperlihatkan oleh elektroforesis (gel atau kapiler) (Somak, 2022).

### 5) Single-strand Conformation polymorphism (SSCP)

Analisis SSCP adalah suatu teknik post-PCR untuk membedakan mutasi pada lebih dari satu lokasi (yang terdistribusi secara acak di sepanjang ekson) (Somak, 2022). SSCP dapat mendeteksi perbedaan nukleotida dari DNA produk dengan perbedaan 1 nukleotida (Putra *et al.*, 2020). Setelah amplifikasi PCR, produk PCR didenaturasi dengan panas dan diberikan *denaturing buffer*. Selanjutnya dilakukan elektroforesis gel poliakrilamid. Jika terdapat mutasi dalam sekuens yang diamplifikasi, akan merubah konformasi lipatan sekuens dan menyebabkan perubahan mobilitas elektroforetik. Hal ini bisa menyebabkan perbedaan migrasi antara sekuens *wild-type* dan mutan pada gel (Somak, 2022).

### 6) Allele-specific PCR (AS-PCR) and Allele-specific Hybridization (ASH)

AS-PCR dan ASH juga dikenal sebagai *dot-blot analysis*, biasanya digunakan untuk deteksi mutasi titik dan polimorfisme (Somak, 2022). AS-PCR yang lebih dikenal sebagai *Amplified Refractory Mutation System* (ARMS), pada dasarnya menggunakan PCR untuk mendeteksi SNP (Putra *et al.*, 2020). Amplifikasi DNA target dilakukan dalam 2 reaksi yaitu satu reaksi dengan primer komplementer untuk sekuens normal (*wild-type*), dan reaksi lainnya memiliki primer forward komplementer untuk sekuens mutan dan primer reverse komplementer untuk sekuens DNA normal. Deteksi amplifikasi oleh elektroforesis gel atau dengan *real-time* PCR (Somak, 2022). AS-PCR dianggap sebagai teknik mendeteksi SNP yang paling mudah dilakukan, namun memiliki kelemahan dalam aplikasi, dimana pada kondisi sub-optimal, allele-spesific primer cenderung

meningkatkan alel yang cocok dan tidak cocok dan bisa mengubah proporsi heterozigot (Imyanitov *et al.*, 2002; Putra *et al.*, 2020).

Pada ASH, produk PCR tertera secara langsung pada membran nilon. Setelah denaturasi, membran tersebut mengalami hibridisasi dengan probe oligonukleotida berlabel yang komplemen terhadap sekuens mutan (Somak, 2022).

### **Keuntungan dan keterbatasan PCR**

Berbagai kelebihan dan keterbatasan PCR diuraikan dalam tabel 1 (Putra *et al.*, 2020).

### **Aplikasi Klinis**

- Aplikasi medis
  - PCR sangat berperan dalam diagnosis berbasis-DNA dengan menghasilkan sekuens target yang dibutuhkan secara mudah dan cepat. Beberapa contoh aplikasinya antara lain untuk (Atawodi, *et al.*, 2011):
    - a) Penyakit monogenik. Penyakit monogenik diakibatkan oleh kelainan gen tunggal misalnya pada anemia sel sabit, beta thalasemia, serta beberapa kasus hemofilia.
    - b) Penyakit mutasi
    - c) DNA typing
    - d) Keperluan forensik
    - e) Penyakit infeksius manusia
    - f) Deteksi ras onkogenik
    - g) Produksi vaksin DNA
- Aplikasi penelitian (Atawodi *et al.*, 2011).
  - a) *Direct sequencing* DNA yang diamplifikasi secara *in vitro*
  - b) Deteksi mutasi gen
  - c) Deteksi ekspresi gen
  - d) Analisis evolusi
  - e) Analisis sekuens DNA pada gamet individu

### **DNA sequencing**

*DNA sequencing* adalah proses penentuan sekuens basa nukleotida (A,T,C,G) dalam suatu DNA. Beberapa jenis DNA sequencing antara lain metode Sanger, metode Maxam & Gilbert, serta

metode pyrosequencing (França *et al.*, 2002; Somak, 2022).

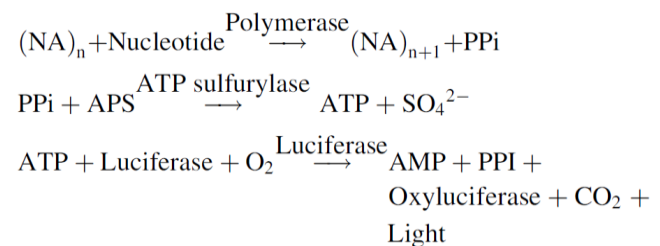
*Sanger sequencing* atau *chain termination method* merupakan teknik yang paling sering digunakan pada laboratorium molekular dalam mendeteksi komposisi nukleotida yang *spesifik (exact)* dari fragment DNA yang diamplifikasi dengan PCR. (Somak, 2022) Pada teknik sanger, digunakan metode yang melibatkan bentuk ketiga dari gula ribosa, yaitu *dideoxyribose* yang tidak memiliki gugus hidroksil pada karbon 2' dan 3' (Bisht & Panda, 2014). Teknik ini menggunakan *chain terminating dideoxynucleoside triphosphate* (ddNTPs), dimana saat dimasukkan dalam untai DNA yang sedang bertambah, akan mengakhiri elongasinya pada nukleotida tertentu, sehingga menghasilkan suatu campuran fragmen DNA dengan panjang yang bervariasi, yang masing-masing sesuai dengan satu dari empat nukleotida yang diletakkan pada jarak yang spesifik dari awal sekuens (Bisht & Panda, 2014; França *et al.*, 2002; Somak, 2022).

Pada metode Maxam-Gilbert atau *The Chemical method*, terdapat dua langkah proses katalitik yang melibatkan piperidine dan dua bahan kimia yang secara khusus menghancurkan purin dan pirimidin. Purin bereaksi dengan dimetil sulfat sedangkan pirimidin bereaksi dengan hidrazin sehingga bisa menghancurkan ikatan glikosida antara gula ribosa dan basa, dan mengganti basa yang ada. Piperidin mengkatalisasi celah ikatan fosfodiester dimana basa tersebut diganti. Dimetil sulfat dan piperidin sendiri secara khusus memisahkan nukleotida guanin tetapi dimetil sulfat dan piperidin dalam asam format memisahkan nukleotida guanin dan adenin. Demikian halnya dengan hidrazin dan piperidin memisahkan nukleotida timin dan sitosin, sementara hidrazin dan piperidin dalam 1.5 M NaCl hanya memisahkan nukleotida sitosin. Reaksi selektif ini digunakan untuk DNA sequencing untuk membuat substrat DNA untai tunggal yang memiliki label radioaktif pada ujung 5'. Substrat berlabel ini digunakan untuk empat reaksi pemisahan berbeda, yang masing-masing

membuat suatu populasi akhir produk pemisahan berlabel pada nukleotida yang dikenal (Bisht & Panda, 2014). Fragmen dari empat reaksi diatur berjejer pada elektroforesis gel untuk pemisahan berdasarkan ukuran molekul. Untuk memvisualisasikan fragmen-fragmen tersebut, gel dipaparkan sinar X film untuk autoradiografi, menghasilkan serangkaian pita gelap yang masing-masing sesuai dengan fragmen DNA dengan radiolabel, dan diperoleh sekuensnya (Aryal, 2022; Bisht & Panda, 2014). Kelebihan metode ini adalah DNA murni dapat langsung dibaca, DNA runs homopolimerik dapat disekuensikan (diurutkan) seefisien sekuens DNA heterogen, dapat digunakan untuk menganalisis interaksi protein DNA (misalnya footprinting), serta bisa digunakan untuk menganalisis struktur asam nukleat dan modifikasi epigenetik DNA. Sedangkan kekurangan metode Maxam-Gilbert adalah metode ini menggunakan bahan kimia dan material radioaktif berbahaya dengan cukup ekstensif, memiliki metode yang kompleks (rumit) dan lama, tidak bisa menganalisis lebih dari 500 pasang basa, serta sulit untuk membuat kit DNA berdasarkan sekuensing Maxam-Gilbert (Aryal, 2022).

*Pyrosequencing* adalah metode *DNA sequencing* berdasarkan prinsip "*sequencing by synthesis*". Perbedaan dengan Sanger sequencing yaitu metode ini bergantung pada deteksi pelepasan pirofosfat (PPi) saat penggabungan nukleotida, bukan dengan terminasi rantai dengan *dideoxynucleotides* (Bisht & Panda, 2014). *Pyrosequencing* menggunakan enzim ATP sulfurylase dan luciferase. Pelepasan PPi, selama penggabungan nukleotida trifosfat ke rantai DNA, memicu suatu kaskade reaksi biokimia melalui ATP sulfurylase dan luciferase, menghasilkan suatu ledakan cahaya *biochemiluminescent* yang dipancarkan. *Apyrase* mendegradasi nukleotida yang tidak berpasangan dan ATP, setelah itu ditambahkan nukleotida lain. Sekuensing dicapai dengan memasukkan masing-masing dNTPs secara berurutan ke dalam flow cell. Ada atau tidaknya ledakan cahaya pada masing-masing

picotiter well menunjukkan penggabungan dari nukleotida terkait sehingga menunjukkan identitas basa pelengkap pada template DNA di dalam well tersebut (Bisht & Panda, 2014; Somak, 2022). Kelebihan metode ini adalah kecepatan dan pembacaan hingga 500 pb, tidak perlu memperpanjang rantai DNA di luar proses biokimia normal oleh DNA polymerase. Adapun keterbatasan metode ini adalah panjang pembacaan sekuens DNA berkisar 300-500 nukleotida, lebih pendek daripada metode Sanger. Reaksi yang digunakan dalam *pyrosequencing* yaitu (Bisht & Panda, 2014):



#### *Aplikasi Klinis* (Bisht & Panda, 2014)

1. Bidang medis, DNA sequencing digunakan untuk mendeteksi berbagai gen yang berkaitan dengan penyakit hereditas atau didapat.
2. Bidang ilmu forensik, bisa digunakan untuk mengidentifikasi para kriminal dengan menemukan berbagai bukti dari TKP (sampel rambut, kuku, kulit, atau darah) serta bisa untuk uji paternitas dari anak.
3. Bidang agrikultur. Mapping dan sekuensing dari keseluruhan genom mikroorganisme sangat bermanfaat bagi para ahli agrikultur dalam hal panen dan tanaman pangan. Misalnya gen suatu bakteri khusus digunakan pada tanaman pangan untuk meningkatkan resistensinya terhadap serangga dan hama, sehingga bisa meningkatkan produktivitas dan nilai nutrisi tanaman tersebut.
4. Lain-lain:
  - a. Untuk prosedur dan metode manipulasi gen

- b. Menemukan *tandem repeats* atau *inverted repeat* untuk kemungkinan *hairpin formations*.
- c. Untuk menemukan sekuens polipeptida dari bank data atau untuk membandingkan sekuens DNA dari organisme lain untuk analisis filogenetik.
- d. Membuat peta evolusi molekuler
- e. Identifikasi ekson dan intron
- f. Menemukan variasi antar spesies atau dalam spesies.
- g. Aplikasi metagenomik

*library* untai tunggal dan diimobilisasi pada permukaan padat (baik pada permukaan datar atau *supporting beads*) dan diamplifikasi secara klonal oleh satu dari beberapa alat seperti bridge PCR, PCR emulsi, atau *in situ* *colonies*. Kluster DNA atau *beads* yang diamplifikasi membentuk suatu urutan (*array*) kluster DNA pada suatu slide, yang kemudian dilakukan manipulasi siklik dengan enzim seperti polimerase atau ligase. Setelah itu dimonitor oleh sistem deteksi mikroskopik, dan gambar yang direkam oleh kamera CCD (Bisht & Panda, 2014).

### Next Generation Sequencing (NGS)

Generasi baru teknologi non-Sanger *sequencing* yaitu *Next Generation Sequencing* (NGS) (Bisht & Panda, 2014). Dengan teknologi NGS, memudahkan deteksi *high-throughput* perubahan genetik multipel pada genom konstitusional maupun kanker. Dengan NGS bisa dilakukan sekuensing paralel hingga miliaran sekuens asam nukleat pendek. Beberapa keuntungan NGS dibandingkan dengan teknik sekuensing konvensional seperti *Sanger sequencing*, antara lain bisa melakukan sekuensing area genom yang lebih besar dengan harga lebih terjangkau dan sensitivitas lebih tinggi, serta bisa dilakukan pada tahapan kompleksitas yang berbeda meliputi *whole genome sequencing*, *whole exome sequencing*, *whole transcriptome sequencing* (*mRNA sequencing*), dan *targeted sequencing of multigene panels* (Somak, 2022).

NGS melibatkan beberapa langkah utama dalam sekuensing, seperti fragmentasi DNA, persiapan Library, sekuensing paralel yang masif, analisis bioinformatika, dan anotasi varian/mutasi serta interpretasi (Qin, 2019). Pertama-tama, dibuat DNA template library, kemudian fragmen DNA library dipersiapkan baik dari DNA genomik yang dipotong secara acak (berukuran 10 - 100 pb) atau secara alternatif fragmen *pair-end* dengan *controlled distance distribution*. Fragmen untai ganda diligasi dengan sekuens adaptor pada kedua ujung dan didenaturasi. Dibuat *template*

### Aplikasi Klinis

#### 1. Kanker

Pada kanker bisa ditemukan mutasi multipel, yang bila dikerjakan dengan pemeriksaan molekular tradisional, harus diulang pemeriksaan berkali-kali, serta memerlukan sampel jaringan lebih banyak. Dengan NGS, tujuan ini bisa tercapai dengan satu pemeriksaan. Misalnya mutasi NPM1 dan CEBPA dari RUNX1 pada leukemia mieloid akut (AML) berhubungan dengan subtype AML yang berbeda (Qin, 2019; Swerdlow *et al.*, 2017).

#### 2. Precision medicine

Pemeriksaan NGS saat ini banyak digunakan untuk berbagai uji klinis *large "basket"* untuk *precision oncology*. *Basket studies* menggunakan uji genomik untuk mengarahkan pasien ke *targeted therapy* yang sesuai dengan profil molekularnya masing-masing, tanpa memandang histologi tumor. Beberapa contoh basket studies yang dikenal dan masih berjalan seperti *Targeted Agent and Profiling Utilization Registry* (TAPUR), *MyPathway*, dan *Molecular Analysis of Therapy Choice* (NCI-MATCH) (Hainsworth *et al.*, 2018; Karlovich & Williams, 2019; Mangat *et al.*, 2018).

#### 3. Farmakogenomik

Baik *single-nucleotide variants* (SNVs) dan perubahan struktural seperti inversi, insersi, delesi atau *copy number variations* (CNVs) berpengaruh terhadap respons obat. Farmakoterapi personalisasi sangat menguntungkan karena indeks terapeutik obat sempit dan obat diberikan

pada dosis yang bisa ditoleransi maksimal, menjaga keseimbangan antara efek toksik obat dan efikasi yang rendah. NGS memfasilitasi implementasi klinis dari panel multigen diikuti oleh pendekatan *complex genome-wide* yang sebagian besar menggantikan studi farmakogenetik tunggal (Demkow, 2016).

#### 4. Mikrobiologi

Tiga aplikasi utama NGS dalam mikrobiologi klinis meliputi *whole-genome sequencing* (WGS), *targeted NGS* (tNGS), dan NGS metagenomik. WGS sering dipakai di laboratorium kesehatan masyarakat untuk membantu identifikasi cepat dan melacak wabah penyakit infeksius serta mendeteksi resistensi dan surveilans. NGS metagenomik telah menjadi alat deteksi patogen universal yang menjanjikan untuk diagnostik penyakit infeksi yang dilakukan langsung dari spesimen klinis (Mitchell & Simner, 2019).

#### Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH diawali dengan temuan bahwa asam nukleat bisa dimodifikasi secara kimiawi untuk menggabungkan hapten seperti biotin atau digoksigenin, yang nantinya bisa dideteksi dengan *reporter molecule* berlabel secara fluoresens seperti avidin atau anti-digoksigenin (Shakoori, 2017). FISH lazim digunakan untuk deteksi *gene rearrangements*, area delesi dan amplifikasi kromosom, dan berbagai kelainan kromosom numerikal (Somak, 2022). FISH menggunakan fragmen DNA yang bergabung dengan *fluorophore-coupled nucleotides* sebagai *probes* untuk memeriksa ada tidaknya sekuens komplementer dalam sel atau jaringan yang difiksasi (menggunakan mikroskop fluoresen). Keuntungan utama menggunakan teknologi FISH antara lain sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam mengenali sekuens DNA atau RNA target, aplikasi langsung baik terhadap kromosom metafase dan nuklei interfase, serta visualisasi sinyal hibridisasi pada tingkat sel-tunggal (Cui *et al.*, 2016; Somak, 2022). Selama prosedur FISH, DNA dalam sel diletakkan pada suatu slide, kemudian probes berlabel fluoresen yang diteliti,

didenaturasi dengan inkubasi pada suhu tinggi. Probe tersebut dibiarkan berhibridisasi dengan DNA target. Setelah itu dilakukan beberapa kali pencucian pasca hibridisasi untuk menghilangkan kelebihan probe. Setelah melakukan *counterstaining* nuklei, sinyal probe divisualisasi di bawah mikroskop fluoresen (Ratan *et al.*, 2017; Shakoori, 2017; Somak, 2022). Langkah-langkah pada *in situ hybridization* terdiri dari preparasi sitologis, pelabelan probe, dan hibridisasi *in situ* yang meliputi: hibridisasi *in situ* non-radioaktif, genomic *in situ hybridization* (GISH) dan FISH (Shakoori, 2017).

#### Aplikasi Klinis

FISH bisa bermanfaat untuk mendeteksi dan memonitor terapi spesifik yang berkaitan dengan abnormalitas gen, seperti deteksi translokasi BCR/ALB1 pada leukimia mieloid kronik, atau peningkatan HER2 pada kanker payudara (Ratan *et al.*, 2017). FISH bisa digunakan untuk mendeteksi bakteri seperti *Streptococcus pneumoniae* dari sampel kultur darah (Rahman *et al.*, 2017). Penggunaan FIS pada kasus-kasus onkologi lainnya cukup banyak ditemukan dalam literatur (Kuehl & Bergsagel, 2002; Vasilieva *et al.*, 2012; Weickhardt *et al.*, 2013; Wertheim, *et al.*, 2012). Penggunaan pada diagnosis klinis, FISH jauh lebih akurat dan lugas jika dibandingkan dengan teknik profiling molekular lain seperti aCGH, SNP dll (Ratan *et al.*, 2017).

#### Comparative Genomic Hybridization (CGH)

CGH digunakan untuk identifikasi bertambah atau hilangnya (*gains/losses*) area kromosomal spesifik dengan melakukan pemindaian keseluruhan genom dalam satu tahapan prosedur (Levy *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2013; Somak, 2022). Keuntungan menggunakan CGH yaitu bisa melakukan pencarian pada keseluruhan genom tanpa memerlukan informasi terkait penyimpangan kromosom yang dimaksud. Prosedur ini berupa hibridisasi *in situ* secara simultan dari DNA spesimen genomik total yang dilabel berbeda dan DNA referensi normal ke

sebaran kromosom metafase manusia yang normal (CGH standar) atau dengan *bacterial artificial chromosome/BAC library* (array CGH/aCGH) (Levy *et al.*, 1998; Somak, 2022).

### **Aplikasi Klinis**

Penggunaan aCGH dalam penelitian sangat berperan dalam penemuan gen pada genetika manusia, meningkatkan pemahaman mengenai perubahan genom pada kanker serta melanjutkan studi konsep dasar terkait konformasi kromosom, metilasi DNA, asetilasi histon, *gene silencing*, pengaturan waktu replikasi, serta banyak mekanisme dasar lainnya yang berhubungan dengan struktur dan fungsi DNA. aCGH juga terbukti bermanfaat untuk DNA *copy number "signatures"* atau profil untuk berbagai jenis kanker (Bejjani & Shaffer, 2006; Gilbert *et al.*, 2004).

Beberapa studi menunjukkan penggunaan aCGH untuk diagnostik, antara lain oleh de Vries dkk, yang meneliti 100 orang dengan retardasi mental yang tidak diketahui penyebabnya. Semua subyek memiliki kromosom GTG-banded yang normal. aCGH dengan suatu *tiling resolution genome-wide microarray* mengandung 32.447 BACs (*bacterial artificial chromosomes*) mengidentifikasi perubahan *de novo* yang relevan secara klinis pada 10% subyek penelitian (Bejjani & Shaffer, 2006; de Vries *et al.*, 2005).

### **DNA microarrays**

DNA *microarrays* dapat digunakan untuk menentukan ekspresi banyak gen (*multiple genes*) dalam suatu reaksi tunggal (Somak, 2022). Dalam konteks klinis, DNA microarray digunakan untuk mendeteksi kelainan pada area kromosomal (Levy & Burnside, 2019). dua langkah dalam analisis microarray yaitu: produksi probe dan produksi cDNA target. Teknik ini menggunakan *multiplex spotted microarray technology* dimana terdapat ribuan probes oligonukleotida yang berkaitan dengan gen manusia terlihat pada suatu permukaan yang padat (*gene chip*) atau pada suatu *microscopic beads*. Selama analisis, RNA yang diisolasi dari suatu sampel, diubah menjadi

cDNA, diberi label, dan dihibridisasi ke chip atau *beads* (Govindarajan, Duraiyan, Kaliyappan, & Palanisamy, 2012; Somak, 2022). Setelah hibridisasi, microarray dicuci untuk menghilangkan pengikatan non-spesifik dan dipindai untuk mengukur jumlah fluoresens dari masing-masing spot. Intensitas sinyal sebanding dengan banyaknya sekuens cDNA spesifik pada spesimen. DNA *microarrays* juga bisa digunakan untuk *whole-genome analysis* pada SNP dan perubahan *copy number* kromosom (Somak, 2022).

### **Aplikasi Klinis**

#### **a. Kanker**

DNA *microarrays* dapat memberikan keuntungan tersendiri karena menyediakan platform untuk pemeriksaan secara simultan sejumlah besar sampel genetik, sehingga bisa membantu identifikasi berbagai SNP dan mutasi; klasifikasi tumor; identifikasi gen target dari supresor tumor, biomarker kanker, serta gen yang berkaitan dengan kemoresistensi; dan penemuan obat baru. Misalnya, untuk membedakan berbagai pola kadar ekspresi gen antara kelompok pasien kanker dan orang normal untuk mengidentifikasi gen yang berkaitan dengan kanker tersebut. *Gene microarrays* telah digunakan untuk CGH, dimana genomik DNA dilabel secara fluoresen dan digunakan untuk menentukan adanya pengurangan (*loss*) atau amplifikasi gen (Govindarajan *et al.*, 2012). *Array-based CGH* (aCGH) telah digunakan untuk memetakan abnormalitas genetik pada berbagai jenis tumor (Cowell, *et al.*, 2010; Govindarajan *et al.*, 2012; Klijn *et al.*, 2008).

#### **b. Pengobatan antibiotic (Govindarajan *et al.*, 2012).**

Meningkatnya resistensi terhadap antibiotik menyebabkan kegagalan terapi pada banyak penyakit infeksi. Analisis DNA microarray dapat membantu karena genom bakteri biasanya bertahan cukup lama dan suatu diagnosis bisa ditegakkan hanya dengan sejumlah kecil DNA, dibandingkan sejumlah



besar bakteri yang dibutuhkan untuk pemeriksaan kultur.

c. Deteksi awal lesi oral prekanker (Govindarajan *et al.*, 2012).

Identifikasi profil ekspresi gen (*genomic fingerprints*) akan membantu para klinisi membedakan lesi putih pada mulut (leukoplakia) yang ringan dengan lesi prekanker atau kanker stadium dini.

d. Kelainan neurodevelopmental dan anomali kongenital (Krepischi *et al.*, 2022).

Teknik *chromosomal microarray analysis (CMA)* digunakan untuk meneliti dasar-dasar genetik dari berbagai kelainan neurodevelopmental dan abnormalitas kongenital pada suatu penelitian kohort terbesar di Brazil. Sebelumnya di AS dan Eropa, CMA sudah direkomendasikan sebagai pemeriksaan lapis pertama (*first-tier*) pada pasien-pasien dengan kelainan neurodevelopmental dan abnormalitas kongenital sejak 2010.

## KESIMPULAN

Variasi genetik lazim ditemukan antar individu, baik berupa polimorfisme, maupun berbagai varian struktural lainnya. Berdasarkan area genomiknya, beberapa jenis SNP pada posisi tertentu dapat memberikan efek merugikan karena mengubah struktur molekul sehingga terjadi perubahan fungsional protein antara lain seperti *protein coding*, *splicing regulation*, *transcriptional regulation* atau berupa *post-translational modification*.

Seiring kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, semakin berkembang teknik-teknik yang lebih canggih terkait analisis polimorfisme gen. Terdapat bermacam-macam metode PCR seperti RT-PCR, real-time PCR, ddPCR, PCR-RFLP, SSCP, serta AS-PCR dan ASH. Demikian juga dengan metode sekuensing baik yang konvensional seperti metode Sanger dan metode Maxam-Gilbert, hingga metode yang lebih baru seperti NGS. Metode hibridisasi seperti FISH dan

CGH serta DNA microarray juga banyak digunakan dalam berbagai analisis. Tentu, setiap metode mempunyai kelebihan dan kekurangannya masing-masing.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aryal, S. 2022. DNA sequencing: Maxam-Gilbert and Sanger Dideoxy method. Retrieved September 19, 2022. <https://microbenotes.com/dna-sequencing-maxam-gilbert-and-sanger-dideoxy-method/>.
- Atawodi, S., J. Atawodi, and A. Dzikwi. 2011. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. *Sahel Medical Journal*. 13(2): 54-63. <https://doi.org/10.4314/smj2.v13i2.64834>.
- Bejjani, B. A., and L.G. Shaffer. 2006. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*. 8(5): 528-533. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060029>.
- Bisht, S. S., and A.K. Panda. 2014. DNA sequencing: Methods and applications. In: I. Ravi, M. Baunthiyal, and J. Saxena (Eds.), *Advances in Biotechnology*. pp: 11-23. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1554-7>.
- Chiarella, P., P. Capone, and R. Sisto. 2020. The role of genetic polymorphisms in the occupational exposure. In: *The recent topics in genetic polymorphisms*. p.: 13. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86975>.
- Cowell, J.K., K.C. Lo, J. Luce, and L. Hawthorn. 2010. Interpreting aCGH-defined karyotypic changes in gliomas using copy number status, loss of heterozygosity and allelic ratios. *Experimental and Molecular Pathology*. 88(1): 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.09.014>.
- Cui, C., W. Shu, and P. Li. 2016. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 4: 1-11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00089>.
- de Vries, B.B.A., R. Pfundt, M. Leisink, D.A. Koolen, L.E.L.M. Vissers, I.M. Janssen, S. van Reijmersdal, W.M. Nillesen, E.H.L.P.G. Huys, N. de Leeuw, D. Smeets, E.A. Sistermans, T. Feuth, C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, A.G. van Kessel, E.F.P.M. Schoenmakers, H.G. Brunner, and J.A. Veltman. 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *American Journal of Human Genetics*. 77(4): 606-616. <https://doi.org/10.1086/491719>.
- Demkow, U. 2016. Next generation sequencing in pharmacogenomics. In: *Clinical applications for next-generation sequencing*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801739-5.00011-8>.
- Dieter, C., L. de A. Brondani, C.B. Leitão, F. Gerchman, N.E. Lemos, and D. Crispim. 2022. Genetic polymorphisms associated with susceptibility to COVID-19 disease and

- severity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 17(7): e0270627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270627>
- França, L.T. C., E. Carrilho, and T.B. Kist. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35(2): 169-200. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>.
- Gilbert, N., S. Boyle, H. Fiegler, K. Woodfine, N.P. Carter, and W.A. Bickmore. 2004. Chromatin architecture of the human genome: Gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*. 118(5): 555-566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.011>.
- Govindarajan, R., J. Duraiyan, K. Kaliyappan, and M. Palanisamy. 2012. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 4(2): S310-2. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100283>.
- Hainsworth, J.D., F. Meric-Bernstam, C. Swanton, H. Hurwitz, D.R. Spigel, C. Sweeney, H. Burris, R. Bose, B. Yoo, A. Stein, M. Beattie, and R. Kurzrock. 2018. Targeted therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: Results from mypathway, an open-label, phase IIA multiple basket study. *Journal of Clinical Oncology*. 36(6): 536-542. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.3780>
- Imyanitov, E.N., K.G. Buslov, E.N. Suspitsin, E.S. Kuligina, E.V. Belogubova, M.Y. Grigoriev, A.V. Togo, and K.P. Hanson. 2002. Improved reliability of allele-specific PCR. *BioTechniques*. 33(3): 484-490. <https://doi.org/10.2144/02333bm04>.
- Karlovič, C.A., and P.M. Williams. 2019. Clinical applications of next-generation sequencing in precision oncology. *Cancer Journal*. 25(4): 264-271. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000385>.
- Klijn, C., H. Holstege, J. de Ridder, X. Liu, M. Reinders, J. Jonkers, and L. Wessels. 2008. Identification of cancer genes using a statistical framework for multiexperiment analysis of nondiscretized array CGH data. *Nucleic Acids Research*. 36(2): e13-e13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1143>.
- Krepischi, A.C.V., D. Villela, S.S. da Costa, P.C. Mazzonetto, J. Schauben, M.P. Migliavacca, F. Milanezi, J.G. Santos, G. Guida, R. Guarischi-Sousa, G. Campana, F. Kok, D. Schlesinger, J.P. Kitajima, F. Campagnari, D.R. Bertola, A.M. Vianna-Morgante, P.L. Pearson, and C. Rosenberg. 2022. Chromosomal microarray analyses from 5778 patients with neurodevelopmental disorders and congenital anomalies in Brazil. *Scientific Reports*. 12(1): 15184. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19274-6>.
- Kuehl, W. M., and P.L. Bergsagel. 2002. Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*. 2(3): 175-187. <https://doi.org/10.1038/nrc746>.
- Levy, B., and R.D. Burnside. 2019. Are all chromosome microarrays the same? What clinicians need to know. *Prenatal Diagnosis*. 39(3): 157-164. <https://doi.org/10.1002/pd.5422>
- Levy, B., T.M. Dunn, S. Kaffe, N. Kardon, and K. Hirschhorn. 1998. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genetics in Medicine*. 1(1): 4-12. <https://doi.org/10.1097/00125817-199811000-00004>.
- Mangat, P.K., S. Halabi, S.S. Bruinooge, E. Garrett-Mayer, A. Alva, K.A. Janeway, P.J. Stella, E. Voest, K.J. Yost, J. Perlmutter, N. Pinto, E.S. Kim, and R.L. Schilsky. 2018. Rationale and design of the targeted agent and profiling utilization registry (TAPUR) study. *JCO Precision Oncology*. 2018(2): 1-14. <https://doi.org/10.1200/PO.18.00122>.
- Mitchell, S.L., and P.J. Simner. 2019. Next-generation sequencing in clinical microbiology: Are we there yet?. *Clinics in Laboratory Medicine*. 39(3): 405-418. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.05.003>.
- Nusrath, A., and P.T.B. Raiza. 2015. Review on single nucleotide polymorphism analysis methods. *International Journal of Engineering Research and Technology (IJERT)*. 3(30): 1-4. <https://doi.org/10.17577/IJERTCONV3IS30005>.
- Park, S.J., E.H. Jung, R.S. Ryu, H.W. Kang, H.D. Chung, and H.Y. Kang. 2013. The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns. *Molecular Cytogenetics*. 6(1): 1-5. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-6-21>.
- Putra, G., L. Angeline, C.J. Yonathan, N.I. Niedhatrata, M.H.R. Firdaus, and J.R. Yoewono. 2020. A review of the development of polymerase chain reaction technique and its uses in scientific field. *Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 2(1): 14-30. <https://doi.org/10.33019/jstk.v2i1.1619>.
- Qin, D. 2019. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*. 16(1): 4-10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>.
- Rahman, A. E., A. Iqbal, D.M.E. Hoque, M. Moinuddin, S. bin Zaman, Q.S.U. Rahman, T. Begum, A.I. Chowdhury, R. Haider, S. El Arifeen, N. Kisson, and C.P. Larson. 2017. Managing neonatal and early childhood syndromic sepsis in sub-district hospitals in resource poor settings: Improvement in quality of care through introduction of a package of interventions in rural Bangladesh. *PLoS ONE*. 12(1): 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170267>.
- Ratan, Z.A., S. bin Zaman, V. Mehta, M.F. Haidere, N.J. Runa, and N. Akter. 2017. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science. *Cureus*. 9(6): e1325. <https://doi.org/10.7759/cureus.1325>.
- Shakoori, A.R. 2017. Fluorescence in situ hybridization (FISH) and its applications. In: T. Bhat and A.A. Wani (Eds.), *Chromosome Structure and Aberrations*. pp.: 343-367. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3_16).
- Somak, R. 2022. *Molecular anatomic pathology. Principles,*

- techniques, and application to immunohistologic diagnosis. *In: D.J. Dabbs (Ed.). Diagnostic Immunohistochemistry.* <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5766-6.00006-6>.
- Swerdlow, S., E. Campo, N. Harris, E. Jaffe, S. Pileri, H. Stein, and J. Thiele. 2017. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.* (4th ed.). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Vasilieva, L. E., S.I. Papadimitriou, and S.P. Dourakis. 2012. Modern diagnostic approaches to cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International.* 11(4): 349-359. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(12\)60192-1](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(12)60192-1).
- Weickhardt, A.J., D.L. Aisner, W.A. Franklin, M. Varela-Garcia, R.C. Doebele, and D.R. Camidge. 2013. Diagnostic assays for identification of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small cell lung cancer. *Cancer.* 119(8): 1467-1477. <https://doi.org/10.1002/cncr.27913>.
- Wertheim, G.B.W., E. Hexner, and A. Bagg. 2012. Molecular-based classification of acute myeloid leukemia and its role in directing rational therapy: Personalized medicine for profoundly promiscuous proliferations. *Molecular Diagnosis and Therapy.* 16(6): 357-369. <https://doi.org/10.1007/s40291-012-0009-0>.