

## BAB II STUDI PUSTAKA

### 2.1 Asam Valproat

Asam valproat merupakan obat antiepilepsi generasi pertama yang secara umum memiliki mekanisme kerja yang belum banyak diketahui, akan tetapi mekanisme terhadap *Gamma-Aminobutyric Acid* (GABA) di otak diketahui merupakan mekanisme paling relevan dalam memunculkan efek terapi meskipun obat ini tidak mempengaruhi GABA secara langsung. Asam valproat diketahui menghambat *dehidrogenase suksinat semialdehid*. Penghambatan ini menghasilkan peningkatan *semialdehid suksinat* yang bertindak sebagai inhibitor GABA transaminase yang pada akhirnya mengurangi metabolisme GABA dan meningkatkan transmisi GABAergik (Drugbank, 2019). Karenanya, asam valproat dapat meningkatkan jumlah neurotransmitter GABA dan menghambat *GABA-transaminase* (GABA-T), yaitu enzim yang mendegradasi GABA di otak untuk mencegah degradasi GABA, serta menurunkan pengembalian GABA (Husna *et al*, 2018).

Asam valproat merupakan asam lemak dengan molekul  $C_8H_{16}O_2$  yang memiliki nilai kliren obat sebesar 13-19 liter/jam/m<sup>2</sup>, waktu paruh eliminasi selama 13-19 jam, dan dimetabolisme, kemudian dieksresikan dalam bentuk metabolitnya bersama bentuk utuh dalam jumlah yang sedikit melalui urin. Informasi mengenai nilai bersihan obat dan  $T_{1/2}$  eliminasi berpengaruh pada adanya variasi kadar asam valproat dalam darah. Sebagai obat antiepilepsi dengan indeks terapi spektrum luas, obat ini sering diberikan pada pasien epilepsi dewasa maupun anak sebagai terapi pilihan (Catur *et al.*, 2018). Meskipun begitu, penggunaan asam valproat dengan dosis lazim perlu dilakukan monitoring karena adanya variasi faktor genetik individual pasien epilepsi yang menyebabkan kadar obat dalam plasma pasien bervariasi. Kadar asam valproat dalam tubuh dapat mencapai 50 –100 µg/ml (Zhu *et al.*, 2017). Dengan adanya penelitian di bidang farmakogenomik pada asam valproat, dapat diketahui bahwa terdapat kandidat gen yang mengalami polimorfisme sehingga mempengaruhi beberapa fase farmakokinetik obat tersebut. Salah satunya adalah polimorfisme pada gen

penyandi enzim pemetabolisme asam valproat yang bertanggung jawab terhadap perubahan kadar obat dalam plasma (Chadwick, 1985).

Proses metabolisme asam valproat pada manusia terjadi melalui 3 jalur utama, yaitu jalur glukoronidasi dalam hepar yang dikatalisis oleh enzim glukoronidase di dalam retikulum endoplasma hepar, jalur  $\beta$  oksidasi di dalam mitokondria hepar dan jalur hidrosilasi yang dikatalisis oleh *Cytochrome P450* (CYP450). Jalur glukoronidasi merupakan jalur utama pembentukan metabolit urin (konjugat glukoronat) oleh enzim glukoronidase dalam jumlah metabolit lebih dari 50% dari dosis asam valproat yang diberikan dibandingkan melalui jalur lain. Proses pembentukan kojugat glukoronat terjadi melalui proses konjugasi dengan cara pengikatan gugus karboksilat oleh asam D-glukoronat yang selanjutnya diubah menjadi beta-glukoronida yang bersifat lebih polar sehingga mudah dieksresikan melalui urin (Chatzistefanidis *et al.*, 2016; Krishnaswamy, 2005)

## 2.2 Enzim Glukoronidase

Enzim glukoronidase atau *uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases* (UGTs) merupakan enzim glikoprotein yang terikat membran retikulum endoplasma yang bekerja dengan mengkatalisis konjugasi senyawa lipofilik oleh asam glukoronat dalam proses glukoronidasi (reaksi fase II pada tahapan metabolisme obat). Enzim ini menyebabkan peningkatan solubilitas cairan tubuh dan mengeksresikan metabolit glukoronida dari tubuh melalui empedu atau urin (Chatzistefanidis *et al.*, 2012). Enzim glukoronidase yang mengeksresikan asam valproat dengan mengubahnya ke dalam bentuk konjugat glukoronat disandi oleh gen *UGT1A6* (Puranik *et al.*, 2013). Gen *UGT* yang diekspresikan pada DNA manusia adalah *UGT1A* seperti *UGT1A3*, *UGT1A5*, *UGT1A6*, *UGT1A7*, *UGT1A8*, *UGT1A9*, *UGT1A10*, dan *UGT1A11*. Gen *UGT1A6* diekspresikan di dalam liver, sedangkan jenis lain diekspresikan pada organ tubuh yang lain seperti di lambung maupun usus besar (Krishnaswamy, 2005). Gen *Uridine-5-diphosphate Glucuronosyltransferase Family 1 Member A6* (*UGT1A6*) merupakan gen yang mengkode enzim glukuronosiltransferase yang terdapat di organ hati yang mengkatalisis reaksi glukoronidasi (tahapan konjugasi

metabolisme obat) yang mengubah asam valproat menjadi senyawa polar yang dapat dieksresikan (Nagar *et al.*, 2004). Polimorfisme gen *UGT1A6* dapat terjadi pada varian alel T>G, A>G, dan A>C. (Zhu *et al.*, 2017).

### 2.3 Polimorfisme *UGT1A6 rs2070959*

Polimorfisme merupakan variasi urutan DNA yang terjadi pada suatu populasi. Variasi urutan DNA dapat terjadi pada perubahan basa nukleotida yang tidak menimbulkan perubahan struktur protein melainkan hanya mempengaruhi fungsi protein. Polimorfisme gen *UGT1A6* berdampak pada perubahan total konsentrasi obat dalam farmakogenomik asam valproat. Keterangan ini dibuktikan oleh hasil penelitian yang dilakukan terhadap 162 pasien epilepsi Ras China bahwa diantara beberapa gen penyandi enzim glukoronidase yang diteliti, *UGT1A6* merupakan gen yang berkaitan dengan perubahan konsentrasi asam valproat dalam darah (Hung *et al.*, 2011). Penelitian lain juga dilakukan terhadap 76 pasien epilepsi pada populasi Yunani berusia >16 tahun menunjukkan bahwa polimorfisme *UGT1A6* dapat meningkatkan kecepatan kliren obat (Chatzistefanidis *et al.*, 2016). Polimorfisme gen *UGT1A6* yang terjadi pada varian alel T>G, A>G, dan A>C menunjukkan konsentrasi obat yang lebih rendah di dalam plasma dan kebutuhan dosis asam valproat yang lebih tinggi (Zhu *et al.*, 2017). Pada populasi China, frekuensi kejadian polimorfisme gen *UGT1A6* paling tinggi terjadi pada varian alel A>G (56,4%) dibandingkan dengan varian alel lainnya (T>G 54,3% dan A>C 55,3%) (Guo *et al.*, 2012). Penelitian terhadap polimorfisme gen *UGT1A6* pada varian alel A>G juga telah dilakukan oleh Jalil *et al.*, (2015) diketahui bahwa tingginya frekuensi persebaran kejadian polimorfisme gen *UGT1A6* pada varian alel A>G pada populasi Malayia dan India memiliki peluang terhadap kejadian polimorfisme gen *UGT1A6* A>G di Indonesia, yaitu 15,40% dan 16,40%. Terjadinya polimorfisme gen *UGT1A6* pada varian alel A>G mempengaruhi kadar asam valproat dalam darah yang berpengaruh terhadap toksisitas atau efektivitas terapi. Pada penelitian tersebut juga dipaparkan bahwa perubahan dua varian alel pada gen *UGT1A6* yaitu A>G dan A>C dapat menyebabkan penurunan aktifitas enzim glukoronosiltransferase sebanyak 30-50% (Jalil *et al.*, 2015). Terjadinya penurunan aktifitas enzim akan mempengaruhi

kliren obat melalui kecepatan glukoronidasi yang mengakibatkan perbedaan kadar efektifitas dan terapi obat. Variasi alel terletak pada suatu sekuen spesifik dalam sekuen gen *UGT1A6* yang disebut *Reference Single Nukleotida Polymorphism* (rs). Variasi alel *A>G* terdapat pada *rs2070959* (NCBI, 2018). Perubahan basa yang terjadi pada varian SNP 2070959 khususnya *Adenin* (A) menjadi *Guanin* (G) mengakibatkan perubahan susunan kodon dari asam amino *Treonin* (Thr) menjadi *Alanin* (Ala). Perubahan asam amino ini berpotensi meningkatkan aktifitas enzim glukoronidase sehingga mempercepat proses metabolisme yang mengakibatkan lebih banyak metabolit yang dieksresikan yang selanjutnya mempengaruhi perubahan konsentrasi obat dalam darah. Selain itu, perubahan susunan kodon tersebut berpotensi menimbulkan tumbuhnya tumor (NCBI, 2018).

#### 2.4 Suku Jawa

Indonesia merupakan negara dengan populasi terpadat keempat di dunia setelah populasi China, India dan Amerika. Terdapat sekitar dua pertiga dari total jumlah penduduknya menghuni pulau Jawa, Bali, dan Madura. Suku Jawa menempati prosentase terbesar dibanding suku lainnya yaitu 45% dari populasi, suku Sunda 14%, suku Melayu 7,5%, dan 33,5% berasal dari suku lainnya. Kemiripan genetik masing-masing populasi di daerah tertentu dapat ditelusuri melalui kajian genetik. Kemiripan genetik ini ditelusuri menggunakan kode genetik berupa beberapa penanda genetik seperti DNA mitokondria dan kromosom Y (Tumonggor *et al.*, 2013). Dalam publikasi yang berjudul "*Genome-Wide Insights into The Genetic History of Human Populations*", Pugach (2015) membagi beberapa kelompok nenek moyang dengan penutur bahasa yang berbeda-beda dengan istilah seperti Austronesia, Negrito, Melanesian, Austroasiatik, Austronesian dan suku Asia lain. Negara Indonesia yang merupakan penutur bahasa Austronesia terbesar di dunia, khususnya Suku Jawa memiliki kemiripan genetik dengan nenek moyang penutur bahasa Austronesia dari wilayah Asia bagian barat seperti India dan Asia bagian timur seperti China yang diduga dikarenakan jalur yang dilalui nenek moyang ketika masuk ke Indonesia (Pugach, 2015). Jalur imigrasi yang dilalui nenek moyang untuk masuk ke wilayah Indonesia pertama kali dilalui adalah Eropa – Arab – India – Asia

Tenggara dan menyebar ke Palembang dan Jawa. Jalur imigrasi yang kedua adalah Teluk Persia – China – Indonesia. Sekitar 1500 Sebelum Masehi (SM), bangsa *Proto* Nusantara (Nenek moyang bangsa Austronesia yang pertama memasuki Indonesia) masuk ke Nusantara melalui jalur barat melewati semenanjung melayu kemudian Sumatera dan jalur timur melewati kepulauan Filipia kemudian Sulawesi. Suku yang termasuk Bangsa *Proto* Nusantara yang masih ada di Indonesia hingga saat ini diantaranya adalah suku Dayak, suku Toraja dan Nias. Kemudian, sekitar tahun 500 sebelum masehi, terdapat bangsa yang disebut *Deutro* Nusantara (Bangsa Melayu Muda) memasuki wilayah Indonesia melalui jalur yang sama seperti bangsa sebelumnya, dengan membawa kebudayaan yang lebih maju dan sudah membawa percampuran budaya dengan India, Timur Tengah dan Eropa. Suku keturunan bangsa *Deutro* Nusantara ini diantaranya yaitu suku Jawa, suku Sunda, suku Minang dan Bugis (Gumelar, 2016). Informasi tentang polimorfisme genetik dari populasi orang asli Indonesia masih sangat jarang, sehingga pemetaan kejadian polimorfisme genetik ini dilakukan pada suku-suku besar di Indonesia khususnya suku Jawa sebagai suku mayoritas di Indonesia dengan epilepsi (Yuliwulandari *et al.*, 2009).

Suku Jawa sendiri memiliki istilah untuk menyebutkan sistem kekerabatannya sendiri mulai dari generasi sebelumnya yaitu generasi orangtua, generasi kakek dan nenek, generasi buyut (orangtua kakek nenek), generasi canggah (orangtua buyut), dan generasi areng (orangtua canggah) (Sari, 2017). Dalam penelitian ini, subjek yang ditetapkan sebagai kriteria inklusi pada penelitian ini hanyalah sampai generasi buyut bersuku Jawa. Dalam pewarisan sifat, dikenal istilah *Breeding* atau keturunan yang dihasilkan dari suatu perkawinan yang dibagi ke dalam 2 kelompok, yaitu *inbreeding* dan *outbreeding*. Istilah *Inbreeding* ditujukan untuk suatu organisme (*inbrida*) dimana organisme tersebut berasal dari tetua asal yang sama. *Inbreeding* akan banyak melahirkan keturunan dengan sifat homozigositas genotip yang tinggi sehingga variasi dalam populasi akan berkurang. Sedangkan keturunan *outbreeding* menghasilkan sifat heterozigositas yang mengakibatkan tingginya variasi dalam populasi. *Outbreeding* berlaku pada lebih dari 3 generasi dalam suatu populasi (Suryo, 2003). Oleh karena itu, sedikitnya dibutuhkan 3 generasi yang sama (Suku Jawa)

dalam hubungan kekerabatan untuk menggambarkan frekuensi pewarisan genetik khususnya gen *UGT1A6 rs2070959*.

Pemilihan sample secara sengaja pada populasi suku Jawa didasarkan pada pertimbangan sebagai berikut: (1) Hingga saat ini, riset farmakogenetika mengenai gen penyandi enzim pemetabolisme asam valproat yang melibatkan populasi Suku Jawa Indonesia masih sangat terbatas. Penelitian yang mengkaji varian genetik *UGT1A6 rs2070959* yang pada populasi Indonesia khususnya suku Jawa belum pernah dilakukan sebelumnya (Christensen *et al.*, 2005). (2) Pertimbangan kemudahan akses terhadap proses konfirmasi data subjek pemilik isolat DNA tersimpan yang akan digunakan sebagai sampel pada penelitian ini.

## **2.5 Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode analisis variasi genetik untuk memperbanyak (amplifikasi) DNA secara *invitro* dengan cara melipatgandakan fragmen menjadi 2<sup>n</sup> kali lipatnya secara enzimatik (Budiartha, 2015). Metode ini ditemukan oleh seorang ahli genetika bernama Kary Mullis saat melakukan sebuah reaksi di dalam mesin yang dapat mengubah berbagai suhu dengan cepat (*Thermocycler*). PCR efektif digunakan untuk menyalin molekul DNA berukuran panjang antara 100-3000 pasang basa (Brookes, 2006). Menurut Yusuf, A. K. (2010), terdapat beberapa komponen yang dibutuhkan dalam proses PCR, yaitu:

1. DNA *template*, yaitu merupakan untaian DNA yang digunakan sebagai cetakan untuk memperbanyak DNA baru yang sama. Konsentrasi DNA *template* tidak boleh terlalu tinggi karena dapat menyebabkan primer salah menempel pada sekuen dan jika rendah menyebabkan primer tidak dapat menemukan sekuen target (Yusuf, 2010).
2. Primer, merupakan satu pasang primer yang umumnya terdiri dari 18-28 basa nukleotida yang berfungsi untuk mengenali sekuen yang akan disalin. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi menyebabkan primer menempel pada tempat yang salah dan jika terlalu rendah mengakibatkan hasil amplifikasi yang sedikit (Yusuf, 2010).

3. Molekul *Deoksiribonukleotida triphosphates* (dNTP), merupakan komponen nukleotida yang terdiri dari deoksi (ATP, CTP, GTP, TTP) dan digunakan untuk merangkai untai DNA baru pada proses *elongasi* (Yusuf, 2010).
4. Enzim DNA *Polymerase*, merupakan enzim yang stabil pada suhu tinggi yang berfungsi untuk mengkatalisis sintesis DNA pada proses pemanjangan DNA. Enzim ini diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim DNA *Polymerase* akan bekerja bila terdapat  $Mg^{2+}$ , yaitu ion logam yang berfungsi sebagai kofaktor DNA *Polymerase* (Yusuf, 2010).
5. Senyawa Buffer yang berfungsi untuk menstabilkan kerja DNA *Polymerase* dengan menjaga keseimbangan pH ketika proses PCR berlangsung (Yusuf, 2010).

Prinsip dasar metode PCR adalah memperbanyak fragmen DNA menggunakan enzim polimerase pada temperatur tinggi yang dilakukan secara berulang. Metode PCR ini terdiri dari tiga tahapan yang umumnya diulang sebanyak 30-50 siklus, yaitu: (a) Pemanasan untai ganda DNA *template* sehingga menjadi untai yang terpisah (*Denaturasi*). Tahap ini berlangsung dalam campuran yang berisi sepasang primer, campuran dNTP, dan enzim DNA polimerase pada suhu 95°C. Proses ini umumnya berlangsung selama 30 detik. Proses pre-denaturasi dibutuhkan waktu 3-5 menit untuk memastikan bahwa DNA *template* benar-benar terpisah sebelum siklus denaturasi dimulai, (b) Penempelan (*anneal*) sepasang primer pada urutan DNA tertentu yang berlangsung akibat penurunan suhu denaturasi menjadi suhu tertentu (50-60°C) yang diketahui dari nilai *Melting Temperature* (TM) primer yang bergantung pada panjang primer. Semakin panjang primer, semakin tinggi suhunya, (c) Apabila suhu dinaikkan lagi (72-76°C), proses *annealing* akan terhenti dan terjadi pemanjangan (*extension*) primer dengan bantuan DNA *Polymerase* dengan kecepatan penyusunan 35-100 nukleotida/detik. Umumnya proses *extension* diakhiri dengan proses *post elongasi* pada suhu 72°C untuk meyakinkan bahwa produk PCR (DNA hasil amplifikasi) terbentuk untai ganda. Proses ini umumnya berlangsung selama 5-10 menit (Budiarto, 2015).

*Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)* merupakan metode analisis variasi genetik yang didasarkan pada pemotongan urutan nukleotida tertentu oleh enzim restriksi pada amplicon (DNA hasil amplifikasi) sehingga dihasilkan fragmen dengan panjang bervariasi. Prinsip dari metode PCR-RFLP adalah adanya polimorfik pada sekuen pengenal yang spesifik pada masing-masing gen (Septiasari *et al.*, 2017). Kelebihan metode ini yaitu hasil cepat diperoleh, stabil, hasil amplifikasi dapat dihitung secara kuantitatif, serta tidak memerlukan pelatihan khusus penggunaan alat. Kekurangan metode PCR-RFLP adalah mudah terkontaminasi dalam pengerjaannya, target sekuensing DNA harus diketahui terlebih dahulu, tidak semua enzim restriksi tersedia secara komersial, dan biaya enzim yang besar (Puspitaningrum *et al.*, 2018).

Enzim restriksi merupakan enzim nuklease yang akan memotong sekuen spesifik DNA dengan panjang 4 hingga 7 pasang urutan basa nukleotida yang dikenali sebagai sekuen target atau sekuen pengenal. Pengamatan terhadap enzim restriksi pertamakali dilakukan oleh W. Arber pada tahun 1960. Enzim ini berkerja dengan cara mendegradasi molekul DNA dengan memecah ikatan fosfodiester penghubung satu nukleotida dengan nukleotida lain. Aktifitas enzim restriksi dapat dipengaruhi oleh kondisi suhu, waktu inkubasi, buffer yang tidak sesuai, dan konsentrasi garam yang terlalu tinggi. Secara umum, enzim restriksi dibagi menjadi 3 tipe, yaitu enzim restriksi tipe I, II, III yang digolongkan berdasarkan pada kemampuan mengenali dan memotong urutan basa nukleotida DNA. Enzim restriksi tipe I dan III dapat mengenali 1000-5000 urutan basa nukleotida dan melakukan pemotongan diluar urutan pengenal DNA. Enzim restriksi tipe II mengenali 4-7 urutan basa nukleotida dan melakukan pemotongan pada posisi tersebut di dalam urutan pengenal DNA. Pemotongan yang dihasilkan dapat berupa fragmen DNA berujung tumpul (*blunt end*) dan fragmen DNA berujung lancip (*sticky end*) (Yohannes, 2013). Pada penelitian ini, enzim restriksi yang bertugas memotong sekuen target pada gen penyandi enzim pemetabolisme asam valproat adalah enzim *NsiI* (Nagar *et al.*, 2004). Enzim *NsiI* dapat mengenali sekuen target dengan panjang 6 basa nukleotida yaitu ATGCAT sebagai tempat pemotongan dan memotong diantara basa Adenin (A) dan Timin (T) pada DNA hasil amplifikasi. Terdapat enzim restriksi yang memiliki situs pengenalan dan



pemotongan serupa dengan enzim *NsiI*, contohnya enzim *MphI103I*. Suatu enzim yang memiliki kemiripan dengan enzim lain dalam mengenali dan memotong sekuen DNA yang spesifik disebut *Isoschizomer*. Pemotongan tersebut akan menghasilkan produk basa sebesar 128 bp dan 87 bp. Berikut DNA *template* gen *UGT1A6 rs2070959* (215 bp) dan posisi SNP yang akan diteliti memiliki urutan sekuen berupa ATACAT (warna merah) dimana penanda huruf '**R**' menunjukkan polimorfisme yang terjadi pada basa A yang akan berubah menjadi G (ATGCAT):

```
CTTTAAGGAGAGCAAGTTTGATGCTCTTTTCACAGACCCAGCCTTACCC
TGTGGGGTGATCCTGGCTGAGTATTTGGGCCTACCATCTGTGTACCTCT
TCAGGGGTTTTCCGTGTTCCCTGGAGCATRCATTCAGCAGAAGCCCAG
ACCCTGTGTCCTACATTCCCAGGTGCTACACAAAGTTTTTCAGACCACAT
GACTTTTCCCAACGAGTGG
```

Prinsip teknik elektroforesis dalam pemisahan DNA yaitu berdasarkan migrasi partikel bermuatan di bawah pengaruh medan elektronik. Teknik ini dapat menentukan panjang fragmen DNA melalui perbedaan berat molekul. Fragmen DNA memiliki muatan negatif pada nukleotidanya sehingga fragmen dapat bermigrasi pada medium elektroforesis dibantu adanya tegangan listrik. Pergerakan partikel pada medium dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ukuran partikel, konsentrasi medium, serta kekuatan medan listrik. Fragmen DNA berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat. Konsentrasi medium agarose yang lebih besar menyebabkan laju migrasi DNA menjadi lebih lambat karena terbentuknya pori-pori medium yang kecil. Medan listrik dengan kekuatan besar berasal dari tegangan listrik yang besar akan mempercepat laju migrasi fragmen. Media gel agarosa umumnya digunakan sebagai tempat migrasi fragmen DNA. Gel agarose memiliki pori-pori lebih besar sehingga dapat mendeteksi molekul DNA besar dibandingkan gel poliakrilamid yang hanya dapat memisahkan molekul DNA dengan ukuran kurang dari 500 nukleotida saja. Gel agarose diberi pewarna khusus (*Florosafe*) agar DNA dapat teramati dibawah sinar UV. *Florosafe* merupakan pewarna DNA yang memiliki panjang gelombang tertentu yang dapat menangkap panjang gelombang pita DNA yang terpapar sinar UV dengan cara menyisip ke dalam DNA (Zein *et al.*, 2013; Puspitaningrum *et al.*, 2018).

## 2.6 Sekuensing DNA

Hasil analisis genetik menggunakan metode PCR-RFLP dapat dilanjutkan dengan melakukan konfirmasi hasil tersebut menggunakan teknik pengurutan sekuens DNA (urutan basa *Adenin*, *Guanin*, *Sitosin* dan *Timin*) pada molekul DNA untuk mendeteksi adanya variasi genetik. Proses sekuensing dilakukan dengan melihat urutan huruf-huruf DNA dari fragmen DNA tertentu (Brookes, 2006). Umumnya, teknik sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode sekuensing dideoksi Sanger yang diberi nama sesuai nama penemunya yaitu seorang ahli biokimia Cambridge, Fred Sanger (Brookes, 2006). Sekuensing genom dengan metode Sanger merupakan sekuensing generasi pertama dan menjadi teknik standar dalam mengidentifikasi sekuens DNA karena metode ini efisien, *simple*, dan membutuhkan biaya paling rendah diantara metode sekuensing lain. Hingga tahun 2014, sebanyak 3 generasi turunan sekuensing sudah dikembangkan dari metode ini (Kchouk *et al.*, 2017).

Metode sekuensing Sanger diciptakan dengan beberapa modifikasi atas dasar ditemukannya metode PCR. Persamaan metode ini dengan metode PCR terlihat dari beberapa komponen yang dibutuhkan saat proses sekuensing berlangsung seperti *DNA template*, enzim DNA polimerase, primer, dan sumber nukleotida dNTP. Sedangkan, beberapa modifikasi yang membedakan metode ini dengan metode PCR yaitu terdapat pada primer, penambahan ddNTP yang mengandung label fluoresensi (*dye*) yang akan memberi sifat fluoresen agar dapat divisualisasi saat diamati dibawah sinar UV, jenis media serta jumlah DNA yang dihasilkan. Metode PCR menggunakan sepasang primer (*foward* dan *reverse*) yang dapat membaca dua arah pembacaan ( $5' \rightarrow 3'$  dan  $3' \rightarrow 5'$ ), sedangkan metode sekuensing menggunakan sebuah primer saja yang hanya dapat membaca satu arah sekuens DNA ( $5' \rightarrow 3'$  atau sebaliknya). Selain itu, apabila dalam metode PCR memerlukan dNTPs (deoxy-Nucleotide Triphosphate) sebagai sumber nukleotida untuk menyusun sekuens DNA, maka pada metode sekuensing terdapat ddNTPs (dideoxy-Nucleotide Triphosphate) yang berperan untuk menghentikan perbanyakan nukleotida. Visualisasi hasil pada metode PCR dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel dengan medium agarose,

sedangkan visualisasi hasil pada metode sekuensing menggunakan elektroforesis dengan medium gel poliakrilamid untuk memisahkan fragmen DNA yang ukuran panjangnya hanya berbeda satu basa. PCR menghasilkan amplifikasi DNA yang dengan jumlah produk DNA yang berlipat ganda, sedangkan sekuensing tetap dengan hasil sesuai cetakan aslinya (Gužvić, 2013).

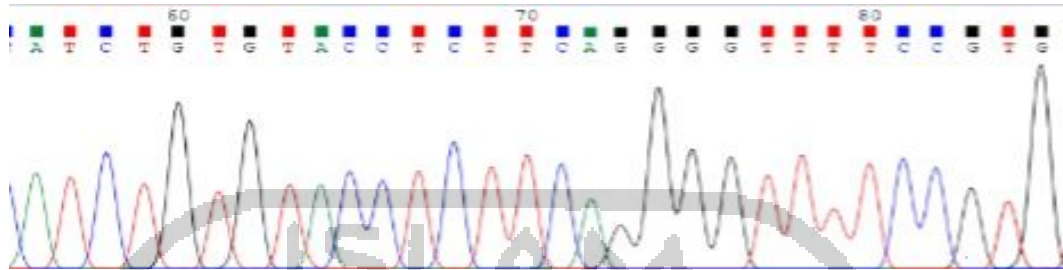
Metode sekuensing dideoksi Sanger dapat dilakukan melalui metode radioaktif dan metode *fluoresense*. Metode sekuensing radioaktif Sanger umumnya disebut dengan *dye primer sequencing*, sedangkan metode fluoresens Sanger disebut dengan *dye terminator*. Berikut perbedaan antara metode dideoksi Sanger radioaktif dan *fluoresense* tercantum pada tabel 2.1 (Toha, 2001).

**Tabel 2.1.** Perbedaan Sekuensing Radioaktif dan *Fluoresense* Sanger

Perbedaan	Radioaktif	Fluoresense
Prinsip	Pengurutan nukleotida ditentukan dengan membuat 4 reaksi terpisah menggunakan basa pemutus pada tiap reaksi dan deteksi oleh penanda radioaktif pada primer	Pengurutan nukleotida ditentukan dengan membuat 1 reaksi menggunakan basa pemutus dan dideteksi oleh penanda <i>fluoresense</i> pada ddNTP
Proses	Dilakukan secara manual	Dilakukan secara otomatis
Hasil pembacaan	Dideteksi dengan elektroforesis dengan bentuk pita vertikal pada 4 lajur	Dideteksi dalam bentuk puncak grafik (elektroforegram)
Kelebihan dan kekurangan	Sederhana, Memerlukan waktu penyiapan fragmen DNA, terbatas dalam menentukan urutan nukleotida	Waktu singkat, efisien, penyiapan lebih mudah, digunakan tabung tunggal, dapat menentukan urutan nukleotida lebih banyak, memerlukan keahlian khusus dalam mengoperasikan alat

Penemuan mesin sekuensing otomatis (*Automated Capillary Sequencer*) semakin memudahkan proses analisis sekuensing DNA. Dalam setiap mesin terdapat puluhan kapiler yang akan menentukan jumlah sampel DNA yang akan disekuensing. Prinsip dari *Automated Capillary Sequencer* adalah visualisasi urutan basa DNA melalui pelabelan ddNTPs (mengandung *fluoresense*) yang dipisahkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid secara otomatis dan dibaca dalam bentuk elektroforegram melalui komputer. Elektroforegram

merupakan hasil pembacaan sekuensing berupa peak-peak berwarna yang menunjukkan urutan sekuen basa nukleotida (Lewis, 2007).



Gambar 2.1. Elektroforegram

