

# FARMAKOGENETIK DAN INDIVIDUALISASI TERAPI HEPATITIS B KRONIS

Ilmu farmakologi merupakan mempelajari perkembangan teknologi genomik yang berkaitan dengan penemuan dan pengembangan obat-obat baru, termasuk pengoptimalan dosis obat dan pemilihan obat untuk tiap individu. Beberapa individu menunjukkan efek yang diinginkan, namun beberapa lainnya menunjukkan respon terapeutik yang minimal atau tidak berespon sama sekali.

Dengan tersusunnya buku ini, diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan kebermanfaatannya dalam dunia pengobatan serta bagi masyarakat yang membutuhkannya.



# FARMAKOGENETIK DAN INDIVIDUALISASI TERAPI HEPATITIS B KRONIS



Dr. dr. Rath Dewi Yudhani, M.Sc.  
Dr. Yulia Sari, S.Si., M.Si.  
dr. Dyonisa Nasirochmi Pakha, M.Sc.  
Dr. dr. Triyanta Yuli Pramana, Sp.PD-KGEH., FINASIM.  
dr. Didik Prasetyo, Sp.PD-KGEH., M.Kes., FINASIM.



**FARMAKOGENETIK  
DAN  
INDIVIDUALISASI TERAPI  
HEPATITIS B KRONIS**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

## UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

### **Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4**

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

### **Pembatasan Pelindungan Pasal 26**

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 113**

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

# FARMAKOGENETIK DAN INDIVIDUALISASI TERAPI HEPATITIS B KRONIS



**Dr. dr. Ratih Dewi Yudhani, M.Sc.**

**Dr. Yulia Sari, S.Si., M.Si.**

**dr. Dyonisa Nasirochmi Pakha, M.Sc.**

**Dr. dr. Triyanta Yuli Pramana, Sp.PD-KGEH., FINASIM.**

**dr. Didik Prasetyo, Sp.PD-KGEH., M.Kes., FINASIM.**

**NCM**  
CV. MITRA CENDEKIA MEDIA

Buku ini tidak diperjualbelikan.

**Farmakogenetik dan Individualisasi Terapi Hepatitis B Kronis**

**Dr. dr. Ratih Dewi Yudhani, M.Sc., Dr. Yulia Sari, S.Si., M.Si.,  
dr. Dyonisa Nasirochmi Pakha, M.Sc., dkk.**

Editor:

**dr. Betty Suryawati, M.Biomed Sci., Ph.D.**

Desainer:

**Siska Wulandari**

Sumber Gambar Cover:

**www.canva.com**

Penata Letak:

**Lailatul Marhamah**

Proofreader:

**Tim Mitra Cendekia Media**

Ukuran:

**viii, 156 hlm, 14,8x21 cm**

ISBN:

**978-623-176-287-0**

Cetakan Pertama:

**Oktober 2023**

Hak cipta dilindungi undang-undang  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**Anggota IKAPI: 022/SBA/20**

**PENERBIT MITRA CENDEKIA MEDIA**

Kapalo Koto No. 8, Selayo, Kec. Kubung, Kab. Solok  
Sumatra Barat – Indonesia 27361  
HP/WA: 0812-7574-0738  
Website: [www.mitracendekiamedia.com](http://www.mitracendekiamedia.com)  
E-mail: [mitracendekiamedia@gmail.com](mailto:mitracendekiamedia@gmail.com)

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# Daftar Isi

Prakata | vii

## **BAB I FARMAKOGENOMIK DAN FARMAKOGENETIK | 1**

- A. Definisi | 1
    - 1. Farmakogenomik | 1
    - 2. Farmakogenetik | 2
    - 3. Perbedaan Farmakogenomik dan Farmakogenetik | 4
  - B. Perkembangan Farmakogenomik dan Farmakogenetik | 5
  - C. Aplikasi Farmakogenomik dan Farmakogenetik | 12
- Referensi | 18

## **BAB II METODE ANALISIS GEN PADA FARMAKOGENOMIK DAN FARMAKOGENETIK | 27**

Referensi | 87

## **BAB III FARMAKOGENOMIK- FARMAKOGENETIK DAN PRINSIP INDIVIDUALISASI TERAPI | 95**

Referensi | 114

Buku ini tidak diperjualbelikan.



**BAB IV FARMAKOGENOMIK-  
FARMAKOGENETIK DAN PRINSIP  
INDIVIDUALISASI TERAPI PADA  
HEPATITIS B KRONIS | 115**

- A. Hepatitis B | 115
    - 1. Definisi dan Epidemiologi | 115
    - 2. Terapi Hepatitis B | 117
  - B. Farmakogenomik-Farmakogenetik dan prinsip Individualisasi terapi Hepatitis B | 126
- Referensi | 140

**Profil Penulis | 149**

**Profil Editor | 155**

Buku ini tidak diperjualbelikan.



# Prakata

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. karena berkat rahmat dan karunia-Nya, tim penyusun dapat menyelesaikan buku *Farmakogenetik dan Individualisasi Terapi Hepatitis B Kronis* dengan tepat waktu.

Buku ini akan membahas mengenai farmakogenomik dan farmakogenetik secara umum, metode analisis gen pada farmakogenomik dan farmakogenetik, dan prinsip individualisasi terapi farmakogenomik-farmakogenetik serta prinsip individualisasi terapi hepatitis B kronis. Dengan tersusunnya buku ini diharapkan dapat memberikan kebermanfaatan dalam dunia farmakogenomik-farmakogenetik, khususnya pada hepatitis.

Dalam kesempatan ini penyusun menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan buku ini yang tak dapat kami sebutkan satu persatu.

Semoga buku ini dapat bermanfaat ke depannya. Kritik dan saran akan diterima dengan senang hati oleh penulis untuk perbaikan di kemudian hari.

Surakarta, Oktober 2023

**Tim Penyusun**

Buku ini tidak diperjualbelikan.





# BAB I

## FARMAKOGENOMIK DAN FARMAKOGENETIK

### A. Definisi

#### 1. Farmakogenomik

Farmakogenomik merupakan cabang ilmu farmakologi yang mempelajari perkembangan teknologi genomik yang berkaitan dengan penemuan dan pengembangan obat-obat baru, termasuk pengoptimalan dosis obat dan pemilihan obat untuk tiap individu. Farmakogenomik berperan dalam memaksimalkan efikasi obat sekaligus meminimalisasi risiko timbulnya toksisitas (Pirmohamed, 2023). Ketika obat dipaparkan ke dalam tubuh manusia, maka akan menghasilkan reaksi yang berbeda pada masing-masing individu. Berdasarkan analisis terbaru, terdapat 3 sampai 24 orang yang menunjukkan kegagalan respons terapeutik saat menggunakan 10 obat terlaris di Amerika (Schork, 2015). Selain itu, *Adverse Drug Reactions* (ADR) ditemukan sebanyak 6,5% pada saat pasien masuk ke rumah sakit, dan meningkat > 15% pada pasien dengan multimorbiditas (Osanlou et al., 2022; Pirmohamed et al., 2004). Kegagalan respons terapeutik dapat berdampak pada peningkatan biaya perawatan. Hal ini mendasari berkembangnya farmakogenomik, dari perspektif satu

obat untuk semua (*One Drug Fits All*) atau satu dosis untuk semua (*One Dose Fits All*) menjadi *personalised medicine*, di mana pasien akan mendapatkan obat dengan dosis tertentu yang telah mempertimbangkan karakteristik masing-masing individu, termasuk faktor genetik (Pirmohamed, 2023).

Dalam perkembangan penelitian farmakogenomik, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) menjadi fokus perhatian saat ini, yang berpotensi dalam menentukan profil respons obat per individu (Pirmohamed, 2001). Genome-Wide Association Studies (GWAS) mengumpulkan data dari hasil klinis dan metode statistik yang komprehensif untuk menganalisis ribuan SNPs di seluruh populasi di dunia. Hubungan satu SNPs atau kombinasi varians tertentu terhadap respons obat dapat diidentifikasi melalui GWAS (Gupta, 2015; Wiita & Schrijver, 2011). Penerapan farmakogenomik terkait SNPs adalah melalui *profiling* SNPs secara individual yang berkorelasi dengan respons individual. Pendekatan ini dapat mengubah model "*one dose fits all*" menjadi *personalised medicine*, yang dapat memaksimalkan efikasi dan meminimalisasi toksisitas obat (Pirmohamed, 2001).

## 2. Farmakogenetik

Farmakogenetik didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari pengaruh gen terhadap metabolisme sebuah obat. Farmakogenetik dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi pasien yang secara genetik memiliki risiko untuk munculnya ADR maupun respons terapi yang inadekuat (Chang et al., 2015; Evans & McLeod, 2003; Gupta, 2015). Perbedaan risiko



dan respons obat pada tiap individu dapat dipengaruhi oleh farmakodinamik, termasuk reseptor dan *polimorfisme transporter*. Selain itu, Farmakokinetik obat juga dapat berbeda pada tiap individu yang dipengaruhi oleh profil genetik. Hal ini mendasari adanya variasi dari konsentrasi plasma ataupun ekskresi obat yang dapat menginduksi toksisitas atau mengurangi efikasi dari suatu obat (Gupta, 2015). Oleh karena itu, diperlukan pemahaman yang mendalam terkait peran farmakogenetik sebagai pedoman untuk optimalisasi terapi berdasarkan profil genetik individu yang akan memaksimalkan efikasi terapi sekaligus meminimalisasi risiko toksisitas yang mungkin timbul (Shi et al., 2001).

Dalam farmakogenetik, *fenotiping* metabolik berfungsi untuk menilai efek farmakologis, reaksi yang merugikan, dan kecepatan metabolisme. Namun, metode ini membutuhkan waktu yang lama, pengumpulan sampel yang berulang, sampel yang harus stabil, dan berbagai faktor eksternal lainnya. Untuk mengatasi hal tersebut, *genotiping* dapat digunakan sebagai metode dalam mengidentifikasi hubungan genetik dengan cara menganalisis variasi struktur DNA yang menentukan sifat-sifat fenotip tertentu pada individu. Dibandingkan dengan *fenotiping* metabolik, metode *genotiping* bersifat minimal invasif dan tidak dipengaruhi oleh interaksi obat dengan obat maupun obat dengan makanan, karena sampel diambil dari darah tepi (Gupta, 2015).



### 3. Perbedaan Farmakogenomik dan Farmakogenetik

Pada tahun 510 SM, Pythagoras melakukan pengamatan terkait konsumsi kacang fava. Pada sebagian individu, konsumsi kacang fava dapat berakibat fatal, yang pada akhirnya diketahui sebagai akibat adanya defisiensi enzim Glukosa 6 fosfat Dehidrogenase (G6PD) pada individu tersebut. Temuan Pythagoras ini menjadi awal fokus dari farmakogenetik. Semenjak itu, penelitian mengenai farmakogenetik terus berkembang, dan istilah farmakogenetik muncul pertama kali pada tahun 1957 oleh Friedrich Vogel, seorang farmakologis dari Jerman (Pirmohamed, 2011). Farmakogenetik didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari variabilitas respons obat karena keturunan. Selanjutnya, pada tahun 1990-an, muncul proyek *Human Genome* dan pengembangan ilmu genomik (Gupta, 2015). Pada tahun 1997, istilah farmakogenomik mulai dikenalkan oleh Marshall (Pirmohamed, 2011).

Istilah farmakogenomik dan farmakogenetik sering digunakan secara bergantian (Gupta, 2015; Pirmohamed, 2001, 2011). Farmakogenetik difokuskan pada hubungan gen dengan metabolisme obat, sedangkan farmakogenomik memfokuskan pada keseluruhan gen pada genom yang menentukan respons obat (Pirmohamed, 2001). Penekanan farmakogenomik lebih lanjut adalah ketika peneliti memiliki ilmu dan teknologi untuk mengevaluasi keseluruhan genom, serta kemampuan menganalisis multipel gen terhadap respons obat, dibandingkan hanya berfokus pada satu gen saja (Pirmohamed, 2011). Sumber lain mendefinisikan farmakogenetik

Buku ini tidak diperjualbelikan.



sebagai sebuah studi untuk menginvestigasi pengaruh variasi genetik terhadap respons dari produk farmaseutikal, sedangkan farmakogenomik bersifat lebih luas, sebagai sebuah aplikasi dari teknologi genomik untuk mengembangkan sebuah obat baru atau menganalisis lebih dalam obat yang sudah ada (Gupta, 2015).

Selain itu, farmakogenetik dan farmakogenomik memiliki pendekatan yang berbeda dalam pengaplikasiannya. Farmakogenetik dimulai dengan menemukan respons obat yang tidak terduga dan mengevaluasi penyebab genetiknya. Sedangkan, farmakogenomik akan mengeksplorasi variasi genetik terlebih dahulu dalam suatu populasi, di mana variasi ini kemungkinan berkontribusi terhadap respons tertentu dari suatu obat (Gupta, 2015). Meskipun terdapat perdebatan dalam kedua terminologi tersebut, keduanya memiliki tujuan yang sama, yaitu untuk meningkatkan keefektifitasan penggunaan obat, melalui pendekatan ketepatan obat terhadap respons pasien. Pendekatan ini diharapkan akan memaksimalkan efikasi obat sekaligus menekan toksisitasnya (Pirmohamed, 2011).

## **B. Perkembangan Farmakogenomik dan Farmakogenetik**

Gen memiliki pengaruh terhadap genotipe dan fenotipe seorang individu. Gen tersusun dari DNA dan menginstruksikan sel untuk memproduksi protein. Gen di dalam tubuh manusia memiliki variasi dari ratusan pasangan basa hingga dua juta pasangan (Oates & Lopez, 2018). Perbedaan genetik antar individu muncul saat

Buku ini tidak diperjualbelikan.



terjadi perubahan pada sekuens DNA, yang dikenal dengan sebutan alel. Alel dapat memiliki SNP, yang dapat muncul pada setiap 100-300 pasangan basa dan menyumbang sekitar 90% dari semua perbedaan dalam DNA manusia. Mutasi ini dapat mempengaruhi regulasi, ekspresi, maupun aktivitas dari protein, sehingga berdampak pada kehilangan atau munculnya suatu fungsi dari protein tersebut. Akibatnya, genotipe ini akan berdampak pada kemampuan individu dalam metabolisme obat-obat tertentu, yang dapat diklasifikasikan menjadi *poor*, *intermediate*, *extensive* and *ultra-rapid metabolizers* (Karki et al., 2015).

Banyak penelitian yang telah menunjukkan adanya variasi farmakokinetik dan efek obat pada tiap individu dengan profil genetik yang spesifik. Variasi genetik dapat mempengaruhi keberhasilan terapi, maupun memicu reaksi yang merugikan dan toksisitas (Abdullah-Koolmees et al., 2020). Hal ini mendorong terjadinya peningkatan penelitian dan pengembangan ilmu yang berkaitan dengan farmakogenomik. Penelitian di Amerika dan Inggris menemukan bahwa terdapat lebih dari 50% pasien memperoleh minimal satu obat yang memiliki interaksi obat dengan gen (Dunnenberger et al., 2015; Kimpton et al., 2019). Selain itu, dalam perkembangannya ditemukan bahwa seiring bertambahnya usia, lebih dari 90% pasien di atas 70 tahun akan diresepkan satu obat yang memiliki panduan farmakogenomik (Kimpton et al., 2019).

Farmakogenetik telah berperan dalam identifikasi peran genetik terhadap respons obat, salah satunya adalah peran enzim sitokrom P450 oksidase (CYP450 *oxidase*) dalam metabolisme obat (Oates & Lopez, 2018).



CYP2D6 merupakan salah satu polimorfisme pertama yang diteliti yang terkait dengan perannya dalam memetabolisme *debrisoquine* (Ingelman-Sundberg, 2005). Penelitian terkait CYP2D6 telah menunjukkan peran enzim ini dalam memetabolisme lebih dari 25% obat secara keseluruhan. Selain itu, ditemukan 80 varian dari CYP2D6 dengan mayoritas menunjukkan penurunan aktivitas enzim (Ingelman-Sundberg, 2005; Sim & Ingelman-Sundberg, 2010). Variasi ini telah dikatalogkan oleh *Human CYP Allele Nomenclature Committee* atau yang dikenal dengan *Pharmacogenetic Variation* (PharmVar) Consortium (<https://www.pharmvar.org/>).

Dua enzim CYP450 lainnya yang memiliki peran penting dalam metabolisme obat adalah CYP2C9 dan CYP2C19 (Sim & Ingelman-Sundberg, 2010). Selain enzim CYP450, terdapat peran gen atau alel lainnya, seperti HLA-B\*1502 pada *carbamazepine-induced Stevens Johnson Syndrome* di beberapa populasi Asia atau KRAS pada kanker kolon yang terkait dengan efikasi dari Cetuximab (Pirmohamed, 2011).

Saat ini belum ada keselarasan dalam pelabelan obat antara beberapa badan regulator obat. Hal ini dikarenakan perbedaan dalam tindakan, undang-undang hukum, dan praktik klinis. Label obat hanya bersifat informatif saja tanpa adanya petunjuk khusus dalam pengaturan dosis atau obat alternatif sehingga informasi ini pada umumnya akan diabaikan oleh klinisi (Pirmohamed, 2023).

Meskipun demikian, penelitian mengenai farmakogenetik terus berkembang. Genome-Wide Association Studies atau GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) merupakan salah satu

Buku ini tidak diperjualbelikan.



pendekatan untuk mengidentifikasi interaksi gen dan obat, termasuk farmakodinamik, mekanisme aksi, dan toksisitas dari interaksi tersebut (Buniello et al., 2019; Pirmohamed, 2023). Penelitian dengan tujuan identifikasi pengaruh genetik pada respons obat dilakukan dengan menganalisis protein yang bertanggung jawab pada metabolisme, transpor, dan target obat (McInnes et al., 2021).

Sebagai contoh, dosis pemeliharaan warfarin yang melibatkan 181 pasien untuk mendeteksi hubungan dosis dengan varian pada gen CYP2C9 dan VKORC1 (Cooper et al., 2008). Walaupun jumlah sampel dirasa cukup, namun kecilnya sampel memungkinkan terlewatnya beberapa keterlibatan farmakogenetik yang kompleks. Hal ini menjadi tantangan penelitian farmakogenetik dalam mengumpulkan sekelompok sampel dengan data fenotipe yang baik. Selain itu, penelitian interaksi respons obat di GWAS berjumlah kurang dari 10% (McInnes et al., 2021). Meskipun demikian, asosiasi yang ditemukan di GWAS merupakan langkah awal untuk memahami pengaruh genetik terhadap respons obat, yang menjadi dasar untuk studi selanjutnya (Lavertu et al., 2018). Selain GWAS, data-data farmakogenomik mayoritas berasal dari penelitian observasional dengan ukuran sampel dan kualitas yang bervariasi.

Dengan data yang tersedia, perlu pengembangan lebih lanjut yang menunjang implementasi klinis pada praktik dokter. Beberapa penelitian saat ini telah menunjukkan relevansi klinis pengaruh genotipe pasien terhadap manfaat dan risiko dari obat. Hal ini mendorong terbentuknya pedoman berbasis bukti (*evidence-based guideline*). *Guideline* ini dapat memberikan rekomendasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



farmakoterapi dari interaksi obat dan genetik, termasuk memprediksi fenotipe. Hal ini mendorong farmakogenetik untuk dapat diterapkan dalam praktik klinis sehari-hari (Abdullah-Koolmees et al., 2020).

Beberapa konsorsium yang telah mengeluarkan rekomendasi, antara lain The Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC), the Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety (CPNDS), and the French National Network (Réseau) of Pharmacogenetics (RNPGx). Keempat konsorsium tersebut memiliki keunikan dan kekuatan yang berbeda dalam pendekatan dan pedoman mereka. DPWG ([www.knmp.nl](http://www.knmp.nl)), per tanggal 1 Juli 2020, telah mengidentifikasi 60 pasangan gen-obat yang memiliki interaksi dan memerlukan pengaturan dosis atau *monitoring* reaksi yang obat merugikan. Selain itu, terdapat 18 pasangan gen-obat yang memiliki interaksi namun tidak memerlukan aksi, dan 29 pasangan gen-obat yang tidak memiliki interaksi (Abdullah-Koolmees et al., 2020; Group, 2020).

CPIC (<https://cpicpgx.org/guidelines/>) me-review hasil tes laboratorium genetik yang dapat diaplikasikan sebagai bahan pertimbangan dalam peresepan di praktik klinis (Caudle et al., 2014; CPIC, 2021). Beberapa *guideline* dari CPIC juga menggunakan GWAS untuk mengidentifikasi hubungan obat dan gen (Relling & Klein, 2011). Selanjutnya, CPNDS yang berfokus pada *severe adverse drug reactions* (SADR) dengan tujuan mengidentifikasi marker prediktor genomik dari SADR dan menyediakan informasi genetik klinis untuk pasien dan tenaga kesehatan (Ross et al., 2010).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Pedoman lainya adalah RNPGx yang memberikan rekomendasi tes farmakogenetik dalam praktik klinis sehari-hari. Pedoman ini merekomendasi tes varian genetik atau tes genotipe yang perlu dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan farmakoterapi (Picard et al., 2017). Beberapa *guideline* dipublikasikan dalam jurnal dan *website* PharmGKB ([www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)) (CPIC, 2021; Picard et al., 2017; Relling & Klein, 2011; Ross et al., 2010). Baik DPWG, CPNDS, dan RNPGx merekomendasikan pemeriksaan *genotyping* sebagai perawatan rutin pasien jika memiliki manfaat yang bermakna, antara lain menurunkan risiko reaksi yang merugikan dan risiko terapi yang tidak efektif (Abdullah-Koolmees et al., 2020).

Meskipun terdapat tes genetik yang sudah diimplementasi dalam klinis dan atau mengubah label obat, namun terdapat beberapa kendala dalam proses translasi farmakogenetik. Faktor-faktor yang berpengaruh antara lain jumlah sampel yang tidak adekuat, fenotiping klinis, desain studi dan strategi genotyping yang buruk, asesmen yang tidak adekuat terhadap faktor *co-existing* klinis dan lingkungan, kurangnya kolaborasi antar kelompok, dan pendanaan yang tidak adekuat (Pirmohamed, 2011). Faktor-faktor tersebut perlu ditangani secara komprehensif dan sistematis untuk meningkatkan proses translasi farmakogenetik ke praktik klinis.

Tantangan akan sampel yang kecil mendorong beberapa konsorsium, antara lain International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (IWPC), Metformin Genetics (Met-Gen) and the International Clopidogrel Pharmacogenomics Consortium (ICPC), untuk



meningkatkan jumlah sampel, berbagi data, dan melakukan kolaborasi meta-analisis (Pirmohamed, 2023). *Randomised controlled trials* (RCTs) dapat digunakan untuk mengkonfirmasi hubungan gen dan obat. Namun, pelaksanaan RCTs sebagai desain studi menemui beberapa tantangan, yaitu biaya, ketatnya kriteria inklusi dan eksklusi, masalah etik, kesulitan desain pada studi yang melibatkan polifarmasi dan multi-morbiditas, serta jumlah sampel yang besar (Huddart et al., 2019; Pirmohamed, 2023; Speich et al., 2018). Adanya varian yang langka juga menyebabkan kecilnya prevalensi suatu kelompok, yang dapat berdampak pada kualitas RCTs yang lemah atau *underpowered*. Hal ini dapat berakibat pada kurang bermanfaatnya RCTs untuk mengidentifikasi hubungan varian farmakogenetik dengan risiko *adverse drug reactions*. Selain itu, studi farmakogenetik dengan desain retrospektif belum dapat mengumpulkan bukti peran *marker* farmakogenetik dalam pengaturan dosis (Huddart et al., 2019).

*Cost-effectiveness* saat ini juga menjadi pertimbangan dalam pelaksanaan farmakogenomik secara klinis. Telah banyak studi yang menganalisis *cost-effectiveness*, di mana keefektivitasan biaya berdasarkan frekuensi dari variasi alel yang akan diperiksa. Beberapa variasi alel dapat memiliki persentase yang besar di populasi tertentu, dan persentase yang kecil di populasi lainnya. Sehingga, biaya akan menjadi lebih efektif pada populasi yang memiliki frekuensi alel cukup besar (Pirmohamed, 2023). Sebagai contoh, Allopurinol dengan alel HLA-B\*58:01 yang memiliki frekuensi 15-18% di populasi Asia, sehingga bersifat *cost-effective* untuk dilakukan *genotyping*, dibandingkan dengan populasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Eropa (1-2%) (Plumpton et al., 2017). Namun, hal ini dapat berakibat pada diskriminasi terhadap populasi minor yang akan melakukan tes serupa (Pirmohamed, 2023).

### C. Aplikasi Farmakogenomik dan Farmakogenetik

*Precision medicine* saat ini menjadi arah pengembangan dan penggunaan obat di klinis. Farmakogenomik memiliki potensi untuk mengubah praktik kedokteran saat ini, dengan mengganti skrining dan pengobatan yang bersifat luas menjadi pendekatan personal yang berfokus pada keadaan klinis dan dengan mempertimbangkan genetik pasien. Dengan demikian, dokter dapat memanfaatkan farmakogenomik dengan praktik kedokteran tradisional untuk memprediksi obat mana yang dapat bekerja, dosis yang tepat untuk mencapai respons terapeutik, dan obat mana yang perlu dihindari berdasarkan risikonya untuk menimbulkan reaksi obat yang merugikan (Gupta, 2015). Tantangan utama dalam hal ini adalah mengidentifikasi pasien, di mana tes genetik dapat berpengaruh pada perawatannya (Chang et al., 2015).

Tujuan utama dalam praktik farmakogenetik adalah mengidentifikasi pasien yang memiliki variasi genetik yang dapat ditindak lanjuti (*actionable genetic variations*) (Chang et al., 2015). Sehingga, tiga tujuan dari tes farmakogenetik adalah identifikasi pasien yang mungkin atau tidak mungkin memiliki respons terhadap obat tertentu (contoh: indikasi), identifikasi pasien yang kemungkinan cenderung memperoleh risiko bahaya dari suatu obat (contoh: kontraindikasi/bahaya), dan sebagai panduan pengaturan dosis (Chang et al., 2015).



## 1. Pemeriksaan Genomik untuk Mengidentifikasi Indikasi (*Indication-Based Testing*)

Beberapa obat memiliki efikasi yang dipengaruhi oleh variasi gen tertentu. Hal ini berarti, apabila variasi gen spesifik tersebut ditemukan pada pasien, maka obat dapat diberikan kepada pasien. Sebaliknya, apabila pasien tidak atau kurang memiliki gen spesifik tersebut, maka pemberian obat tersebut sebaiknya dihindari (Chang et al., 2015).

Sebagai contoh, terapi untuk fibrosis kistik, yaitu *ivacaftor*. Penelitian menunjukkan respons terapi dengan pemberian *ivacaftor* akan efektif pada pasien yang memiliki mutasi G551D-CFTR (4% dari keseluruhan pasien fibrosis kistik) (Ramsey et al., 2011), sebaliknya pada pasien dengan mutasi F508del-CFTR (85% pasien), respons terapi pada pemberian *ivacaftor* tersebut tidak tampak (Flume et al., 2012). Contoh berikutnya adalah ribavirin untuk hepatitis C. Penelitian dengan subjek pasien hepatitis C virus (HCV) genotipe 1 membuktikan adanya hubungan antara SNPs pada gen IL28B dengan respons terapi (Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009). Pasien yang memiliki genotipe CC pada rs12979860 lebih mudah mencapai *sustained viral response* (HCV tidak terdeteksi dalam darah selama 12 minggu setelah terapi selesai) dibandingkan pasien dengan genotipe CT dan TT, termasuk perbedaan pada respons kinetik virus (Thompson et al., 2010). Di sisi lain, pada pasien yang terinfeksi HCV genotipe 2 dan 3, SNPs IL28B hanya berpengaruh pada pasien yang tidak menunjukkan hasil HCV RNA negatif setelah empat minggu terapi (Mangia, 2011). Meskipun IL28B

Buku ini tidak diperjualbelikan.



memiliki peran dalam mengkode IFN tipe lambda yang memiliki efek antivirus, belum dapat dipastikan secara jelas bagaimana mekanisme dari variasi gen tersebut berdampak pada respons terapi (Afdhal et al., 2011). Saat ini *genotyping* IL28B telah digunakan di klinik hepatitis C, termasuk digunakan pada beberapa penelitian untuk menginvestigasi agen anti-hepatitis C yang baru (Pirmohamed, 2011). Oleh karena itu, untuk obat-obatan tertentu diperlukan tes farmakogenetik di awal pengobatan, yaitu sebelum memulai terapi, untuk memprediksi respons obat pada pasien.

## 2. Pemeriksaan Genomik untuk Mengidentifikasi Risiko (*Contra-Indication-Based Testing*)

Pemeriksaan farmakogenetik dapat dilakukan untuk mengidentifikasi pasien yang memiliki risiko lebih tinggi untuk munculnya reaksi merugikan yang serius (*serious adverse reaction*) pada pemberian suatu obat tertentu. Reaksi yang merugikan dapat bersifat reaksi imun atau hipersensitivitas, dengan angka kejadian sebesar 8% pada pasien dalam perawatan dengan diagnosis ADR yang terkait obat (Gomes & Demoly, 2005), salah satu contohnya adalah abacavir, terapi untuk HIV. Reaksi hipersensitivitas yang bersifat mengancam nyawa muncul pada 5-8% pasien yang memperoleh obat ini (Hetherington et al., 2001). Reaksi hipersensitivitas abacavir berhubungan dengan alel HLA-B\*5701 yang akan meningkatkan risiko reaksi hipersensitivitas sebesar 10 kali lipat dibandingkan pasien *noncarrier* alel tersebut (Hetherington et al., 2001; Mallal et al., 2002). Hal ini berdampak pada modifikasi label obat dan pengimplementasian dalam panduan klinis, yang berhasil menurunkan insidensi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



hipersensitivitas abacavir (Pirmohamed, 2010). Oleh karena itu, pemeriksaan genomik tertentu perlu dilakukan dalam rangka mengidentifikasi alel atau gen terkait sebelum memulai terapi, sehingga pemberian terapi tersebut dapat dihindari pada pasien yang memiliki alel atau gen terkait (Chang et al., 2015).

### 3. Pemeriksaan Genomik untuk Panduan Pengaturan Dosis (*Dosing-Based Testing*)

Panduan pengaturan dosis sangat diperlukan terutama untuk obat yang memiliki indeks terapi sempit, di mana perubahan dosis sekecil apa pun dapat meningkatkan respons obat yang besar. Banyak polimorfisme genetik yang digunakan sebagai panduan pengaturan dosis, terutama pada gen yang berperan dalam metabolisme obat (Chang et al., 2015). Sebagai contoh adalah warfarin yang memiliki dosis bervariasi antara 0.5 - 20 mg/hari. Warfarin termasuk tiga resep obat teratas penyebab *adverse drug reaction-related hospital admission* dalam beberapa studi epidemiologi (Pirmohamed, 2006; Pirmohamed, 2011). Saat ini pemberian warfarin pada pasien dimonitor dengan nilai *International Normalized Ratio* (INR). Mayoritas studi menunjukkan polimorfisme genetik CYP2C9 dan VKORC1 berpengaruh dalam variasi pengaturan dosis harian warfarin (Johnson & Cavallari, 2015; Pirmohamed, 2011). Genetik CYP2C9, terutama varian \*2 dan \*3, memiliki hubungan dengan penurunan aktivitas katalis dari enzim tersebut, yang berdampak sekitar 15% dari variabilitas dosis. Polimorfisme VKORC1 menyumbang 25% dari variabilitas dosis (Jonas & McLeod, 2009; Pirmohamed, 2011). Berdasarkan analisis secara keseluruhan antara faktor

Buku ini tidak diperjualbelikan.



usia, BMI, dan faktor genetik menunjukkan hasil bahwa faktor-faktor tersebut dapat menyumbang sekitar 50% dari variabilitas pengaturan dosis warfarin. Hal ini berdampak pada modifikasi label obat warfarin oleh FDA dan munculnya tablet dosis (Finkelman et al., 2011; Jonas & McLeod, 2009; Pirmohamed, 2011). Meskipun telah dilakukan perubahan melalui modifikasi label obat Warfarin, namun tes farmakogenomik belum direkomendasikan secara umum sebagai panduan pengaturan dosis Warfarin (Johnson & Cavallari, 2015).

Contoh obat lainnya adalah Azathioprine yang bersifat sitotoksik. Obat ini digunakan untuk terapi pada berbagai variasi kanker dan penyakit autoimun. Azathioprine akan diubah menjadi metabolit inaktif oleh Thiopurine S-methyltransferase, yang kemudian akan diekskresikan (Chang et al., 2015). Adanya variasi gen pada TPMT dan NUDT15 menyebabkan fenotipe terbagi menjadi normal *metabolizer*, *intermediate metabolizer*, *possible intermediate metabolizer*, *poor metabolizer*, dan *interdeterminate*. Contoh *poor metabolizer* pada TPMT adalah \*3A/\*3A, \*2/\*3A, \*3A/\*3C, \*3C/\*4, \*2/\*3C, \*3A/\*4, sedangkan pada NUDT15 adalah Diplotipe \*2/\*2, \*2/\*3, \*3/\*3. Defisiensi TPMT pada populasi Eropa dan Afrika mengakibatkan intoleransi Tiopurine, sedangkan risiko akibat NUDT15 adalah Myelosuppression (penekanan sumsum tulang belakang) terkait Tiopurine pada populasi Asia dan Hispanic. Berdasarkan studi tersebut, maka pasien yang memiliki genetik TPMT atau NUDT15 yang tergolong

Buku ini tidak diperjualbelikan.



kelompok *poor metabolizer*, perlu mendapatkan penurunan dosis Azathioprine (Relling et al., 2019).

Dapat disimpulkan bahwa pasien yang akan mendapatkan obat yang hanya memberikan respons terapi pada populasi tertentu, obat dengan risiko timbulnya reaksi merugikan yang serius, atau obat yang memiliki indeks terapi yang sempit, maka pasien tersebut termasuk kandidat untuk memperoleh tes farmakogenetik sebelum obat tersebut diberikan.

Infeksi Hepatitis B virus (HBV) saat ini masih menjadi masalah kesehatan di dunia dan mempunyai dampak yang bervariasi, antara lain hepatitis akut, *self-limiting recovery*, hepatitis kronis, sirosis, kanker hati, dan gagal hati. Munculnya variasi ini berhubungan dengan faktor virus, lingkungan, dan pejamu (*host*). Dalam hal pejamu, variasi genetik dapat berpengaruh terhadap klinis dari infeksi HBV. Polimorfisme genetik pejamu dapat berupa *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), insersi atau delesi, dan *copy number variation*. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa variasi genetik pejamu memiliki peran terhadap respons pasien, baik responsif maupun non-responsif, yang mendapatkan terapi IFN- $\alpha$  atau nucleos(t)ide analog (Zhang et al., 2019). Sehingga penggunaan farmakogenetik dapat dimanfaatkan untuk melihat respons pasien terhadap sebuah pengobatan.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Referensi

- Abdullah-Koolmees, H., van Keulen, A. M., Nijenhuis, M., & Deneer, V. H. M. (2020). Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPGx Guidelines. *Front Pharmacol*, 11, 595219. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595219>
- Afdhal, N. H., McHutchison, J. G., Zeuzem, S., Mangia, A., Pawlotsky, J. M., Murray, J. S., Shianna, K. V., Tanaka, Y., Thomas, D. L., Booth, D. R., & Goldstein, D. B. (2011). Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010. *Hepatology*, 53(1), 336-345. <https://doi.org/10.1002/hep.24052>
- Buniello, A., MacArthur, J. A. L., Cerezo, M., Harris, L. W., Hayhurst, J., Malangone, C., McMahon, A., Morales, J., Mountjoy, E., Sollis, E., Suveges, D., Vrousseau, O., Whetzel, P. L., Amode, R., Guillen, J. A., Riat, H. S., Trevanion, S. J., Hall, P., Junkins, H., . . . Parkinson, H. (2019). The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D1005-d1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>
- Caudle, K. E., Klein, T. E., Hoffman, J. M., Muller, D. J., Whirl-Carrillo, M., Gong, L., McDonagh, E. M., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., Schwab, M., Agundez, J. A., Freimuth, R. R., Huser, V., Lee, M. T., Iwuchukwu, O. F., Crews, K. R., Scott, S. A., Wadelius, M., Swen, J. J., . . . Johnson, S. G. (2014). Incorporation of pharmacogenomics into routine clinical practice: the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline development process. *Curr Drug Metab*, 15(2), 209-217. <https://doi.org/10.2174/1389200215666140130124910>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Chang, M. T., McCarthy, J. J., & Shin, J. (2015). Clinical application of pharmacogenetics: focusing on practical issues. *Pharmacogenomics*, 16(15), 1733-1741. <https://doi.org/10.2217/pgs.15.112>

Cooper, G. M., Johnson, J. A., Langaee, T. Y., Feng, H., Stanaway, I. B., Schwarz, U. I., Ritchie, M. D., Stein, C. M., Roden, D. M., Smith, J. D., Veenstra, D. L., Rettie, A. E., & Rieder, M. J. (2008). A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood*, 112(4), 1022-1027. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134247>

The Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium. (2021). Clinical pharmacogenetics implementation Consortium (CPIC). *Guidelines*. <https://cpicpgx.org/guidelines/>

Dunnenberger, H. M., Crews, K. R., Hoffman, J. M., Caudle, K. E., Broeckel, U., Howard, S. C., Hunkler, R. J., Klein, T. E., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2015). Preemptive clinical pharmacogenetics implementation: current programs in five US medical centers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55, 89-106. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124835>

Evans, W. E., & McLeod, H. L. (2003). Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 538-549. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020526>

Finkelstein, B. S., Gage, B. F., Johnson, J. A., Brensinger, C. M., & Kimmel, S. E. (2011). Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *J Am Coll Cardiol*, 57(5), 612-618. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.08.643>

Flume, P. A., Liou, T. G., Borowitz, D. S., Li, H., Yen, K., Ordoñez, C. L., & Geller, D. E. (2012). Ivacaftor in subjects with

Buku ini tidak diperjualbelikan.



cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest*, 142(3), 718-724. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2672>

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., Heinzen, E. L., Qiu, P., Bertelsen, A. H., Muir, A. J., Sulkowski, M., McHutchison, J. G., & Goldstein, D. B. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), 399-401. <https://doi.org/10.1038/nature08309>

Gomes, E. R., & Demoly, P. (2005). Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(4), 309-316. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000173785.81024.33>

The Dutch Pharmacogenetics Working Group. (2020). Pharmacogenomic recommendations, *farmacogenetica-update*. [www.knmp.nl/](http://www.knmp.nl/)

Gupta, P. D. (2015). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ayurgenomics for personalized medicine: a paradigm shift. *Indian J Pharm Sci*, 77(2), 135-141. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.156543>

Hetherington, S., McGuirk, S., Powell, G., Cutrell, A., Naderer, O., Spreen, B., Lafon, S., Pearce, G., & Steel, H. (2001). Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin Ther*, 23(10), 1603-1614. [https://doi.org/10.1016/s0149-2918\(01\)80132-6](https://doi.org/10.1016/s0149-2918(01)80132-6)

Huddart, R., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., & Klein, T. E. (2019). Are Randomized Controlled Trials Necessary to Establish the Value of Implementing Pharmacogenomics in the Clinic? *Clin Pharmacol Ther*, 106(2), 284-286. <https://doi.org/10.1002/cpt.1420>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*, 5(1), 6-13. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500285>
- Johnson, J. A., & Cavallari, L. H. (2015). Warfarin pharmacogenetics. *Trends Cardiovasc Med*, 25(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.09.001>
- Jonas, D. E., & McLeod, H. L. (2009). Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. *Trends Pharmacol Sci*, 30(7), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.001>
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, 8, 37. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Kimpton, J. E., Carey, I. M., Threapleton, C. J. D., Robinson, A., Harris, T., Cook, D. G., DeWilde, S., & Baker, E. H. (2019). Longitudinal exposure of English primary care patients to pharmacogenomic drugs: An analysis to inform design of pre-emptive pharmacogenomic testing. *Br J Clin Pharmacol*, 85(12), 2734-2746. <https://doi.org/10.1111/bcp.14100>
- Lavertu, A., McInnes, G., Daneshjou, R., Whirl-Carrillo, M., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2018). Pharmacogenomics and big genomic data: from lab to clinic and back again. *Hum Mol Genet*, 27(R1), R72-r78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy116>
- Mallal, S., Nolan, D., Witt, C., Masel, G., Martin, A. M., Moore, C., Sayer, D., Castley, A., Mamotte, C., Maxwell, D., James, I., & Christiansen, F. T. (2002). Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and



hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet*, 359(9308), 727-732. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)07873-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)07873-x)

Mangia, A. (2011). Individualizing treatment duration in hepatitis C virus genotype 2/3-infected patients [<https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02357.x>]. *Liver International*, 31(1), 36-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02357.x>

McInnes, G., Yee, S. W., Pershad, Y., & Altman, R. B. (2021). Genomewide Association Studies in Pharmacogenomics. *Clin Pharmacol Ther*, 110(3), 637-648. <https://doi.org/10.1002/cpt.2349>

Oates, J. T., & Lopez, D. (2018). Pharmacogenetics: An Important Part of Drug Development with A Focus on Its Application. *Int J Biomed Investig*, 1(2). <https://doi.org/10.31531/2581-4745.1000111>

Osanlou, R., Walker, L., Hughes, D. A., Burnside, G., & Pirmohamed, M. (2022). Adverse drug reactions, multimorbidity and polypharmacy: a prospective analysis of 1 month of medical admissions. *BMJ Open*, 12(7), e055551. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-055551>

Picard, N., Boyer, J. C., Etienne-Grimaldi, M. C., Barin-Le Guellec, C., Thomas, F., & Loriot, M. A. (2017). Pharmacogenetics-based personalized therapy: Levels of evidence and recommendations from the French Network of Pharmacogenetics (RNPGx). *Therapie*, 72(2), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2016.09.014>

Pirmohamed, M. (2001). Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol*, 52(4), 345-

Buku ini tidak diperjualbelikan.



347. <https://doi.org/10.1046/j.0306-5251.2001.01498.x>

Pirmohamed, M. (2006). Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Clin Pharmacol*, 62(5), 509-511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02806.x>

Pirmohamed, M. (2010). Pharmacogenetics of idiosyncratic adverse drug reactions. *Handb Exp Pharmacol* (196), 477-491. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00663-0_17)

Pirmohamed, M. (2011). Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug Discovery Today*, 16(19), 852-861. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.08.006>

Pirmohamed, M. (2023). Pharmacogenomics: current status and future perspectives. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00572-8>

Pirmohamed, M., James, S., Meakin, S., Green, C., Scott, A. K., Walley, T. J., Farrar, K., Park, B. K., & Breckenridge, A. M. (2004). Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ*, 329(7456), 15-19. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7456.15>

Plumpton, C. O., Alfrevic, A., Pirmohamed, M., & Hughes, D. A. (2017). Cost effectiveness analysis of HLA-B\*58:01 genotyping prior to initiation of allopurinol for gout. *Rheumatology* (Oxford), 56(10), 1729-1739. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex253>

Ramsey, B. W., Davies, J., McElvaney, N. G., Tullis, E., Bell, S. C., Dřevínek, P., Griese, M., McKone, E. F., Wainwright, C. E., Konstan, M. W., Moss, R., Ratjen, F., Sermet-Gaudelus, I., Rowe, S. M., Dong, Q., Rodriguez, S., Yen, K., Ordoñez, C.,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



& Elborn, J. S. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365(18), 1663-1672. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105185>

Relling, M. V., & Klein, T. E. (2011). CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther*, 89(3), 464-467. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.279>

Relling, M. V., Schwab, M., Whirl-Carrillo, M., Suarez-Kurtz, G., Pui, C. H., Stein, C. M., Moyer, A. M., Evans, W. E., Klein, T. E., Antillon-Klussmann, F. G., Caudle, K. E., Kato, M., Yeoh, A. E. J., Schmiegelow, K., & Yang, J. J. (2019). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update. *Clin Pharmacol Ther*, 105(5), 1095-1105. <https://doi.org/10.1002/cpt.1304>

Ross, C. J., Visscher, H., Sistonen, J., Brunham, L. R., Pussegoda, K., Loo, T. T., Rieder, M. J., Koren, G., Carleton, B. C., & Hayden, M. R. (2010). The Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety: a model for safety pharmacology. *Thyroid*, 20(7), 681-687. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.1642>

Schork, N. J. (2015). Personalized medicine: Time for one-person trials. *Nature*, 520(7549), 609-611. <https://doi.org/10.1038/520609a>

Shi, M. M., Bleavins, M. R., & de la Iglesia, F. A. (2001). Pharmacogenetic application in drug development and clinical trials. *Drug Metab Dispos*, 29(4 Pt 2), 591-595.

Sim, S. C., & Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website:

Buku ini tidak diperjualbelikan.



a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics*, 4(4), 278-281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-4-278>

Speich, B., von Niederhäusern, B., Schur, N., Hemkens, L. G., Fürst, T., Bhatnagar, N., Alturki, R., Agarwal, A., Kasenda, B., Pauli-Magnus, C., Schwenkglens, M., & Briel, M. (2018). Systematic review on costs and resource use of randomized clinical trials shows a lack of transparent and comprehensive data. *Journal of Clinical Epidemiology*, 96, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2017.12.018>

Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M. L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G. J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G. J., Booth, D. R., & George, J. (2009). IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41(10), 1100-1104. <https://doi.org/10.1038/ng.447>

Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., . . . Mizokami, M. (2009). Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41(10), 1105-1109. <https://doi.org/10.1038/ng.449>

Thompson, A. J., Muir, A. J., Sulkowski, M. S., Ge, D., Fellay, J., Shianna, K. V., Urban, T., Afdhal, N. H., Jacobson, I. M., Esteban, R., Poordad, F., Lawitz, E. J., McCone, J., Shiffman, M. L., Galler, G. W., Lee, W. M., Reindollar, R., King, J. W., Kwo, P. Y., . . . McHutchison, J. G. (2010). Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics

Buku ini tidak diperjualbelikan.



and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 139(1), 120-129.e118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.013>

Wiita, A. P., & Schrijver, I. (2011). Clinical application of high throughput molecular screening techniques for pharmacogenomics. *Pharmgenomics Pers Med*, 4, 109-121. <https://doi.org/10.2147/pgpm.S15302>

Zhang, Z., Wang, C., Liu, Z., Zou, G., Li, J., & Lu, M. (2019). Host Genetic Determinants of Hepatitis B Virus Infection. *Frontiers in genetics*, 10, 696. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00696>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## BAB II

# METODE ANALISIS GEN PADA FARMAKOGENOMIK DAN FARMAKOGENETIK

Saat ini, adanya variasi respons terhadap obat merupakan masalah tersendiri di praktik klinis. Variasi respons terapi ini mulai dari adanya kegagalan respons terhadap obat tersebut sampai pada timbulnya respons obat yang merugikan (*adverse drug response/ADR*). Variasi respons terapi di antara individu ini merupakan hal yang diwariskan dan terkait dengan adanya variasi genomik di antara satu individu dengan individu lainnya (Wang et al., 2012). Komposisi genomik merupakan faktor penting yang menentukan keseluruhan respons individu terhadap obat tertentu. Farmakogenomik merupakan irisan dari cabang ilmu farmakologi dan ilmu genomik. Secara sederhana, farmakogenomik merupakan studi tentang bagaimana variasi genom mempengaruhi respons individu terhadap obat (Weng et al., 2013). Variasi ini mungkin dapat disebabkan karena adanya perbedaan/varian pada target obat yang mempengaruhi efikasi terapi ataupun perbedaan enzim yang berperan di dalam proses transpor maupun metabolisme obat, yaitu enzim CYP450 yang mempengaruhi efikasi dan toksisitas terapi (Katara, 2014; Klein & Zanger, 2013).

Penelitian menunjukkan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) berperan penting dalam mempengaruhi

Buku ini tidak diperjualbelikan.

timbulnya variasi respons obat yang terkait dengan variasi genomik. Melalui proses *sequencing* dari keseluruhan genom yang meliputi 3 milyar pasangan basa, peneliti menemukan bahwa terkadang salah satu pasangan basa berbeda dari yang diharapkan. Dari 4 jenis basa yang menyusun DNA (*adenine*, *guanine*, *cytosine* dan *thymine*), pada umumnya adenine berikatan dengan *thymine* dan *guanine* dengan *cytosine*. Diperkirakan setiap 1000 atau lebih pasangan basa tersebut, peneliti menemukan adanya “*mispairing*” (pasangan basa yang tidak tepat), seperti *guanine* yang semestinya berpasangan dengan *cytosine*, terkadang ditemukan berpasangan dengan *thymine*. Secara teori, jika “*mispairing*” tersebut ditemukan pada setidaknya 1% di antara keseluruhan populasi, maka “*mispairing*” tersebut dinyatakan sebagai *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (Kirk et al., 2002).

*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) adalah bentuk polimorfisme yang paling sederhana di antara dua genom yang dipilih secara acak. Pada dasarnya, SNP merupakan substitusi satu nukleotida dengan nukleotida lainnya di lokasi tertentu pada genom dan menurut definisi ditemukan di lebih dari 1% populasi. Frekuensi SNP diperkirakan terjadi setiap 800 pasangan basa (*base pair*/bp) di seluruh genom yang memiliki lebih dari 9 juta SNP (Medrano & De Oliveira, 2014).

SNPs ditemukan secara luas distribusinya pada genome manusia, dan dapat terjadi baik di *coding* region maupun *noncoding* region. SNPs pada *coding* region diklasifikasikan menjadi 2, yaitu *synonymous* SNPs dan *nonsynonymous* SNPs. *Synonymous* SNPs merupakan SNPs di *coding* region yang tidak berpengaruh pada *sequence* protein. Di sisi lain, SNPs pada *coding* region yang mengakibatkan perubahan urutan asam amino pada protein dikenal sebagai *nonsynonymous* SNPs yang selanjutnya dibagi lagi menjadi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



*missense* dan *nonsense* SNPs (Hunt et al., 2009). Polimorfisme pada gen yang berperan dalam mengkode reseptor obat, *transporter* obat maupun jalur persinyalan di dalam sel, dapat berperan penting dalam menentukan respons klinis individu terhadap obat (Nebert et al., 2013).

Setiap individu membawa dua salinan dari setiap gen. Salinan gen tertentu pada suatu populasi, mungkin tidak selalu memiliki urutan nukleotida yang identik. Varian *single nucleotide* ini tersebar di seluruh genom semua spesies dan mendasari keanekaragaman manusia. SNP terjadi pada manusia setiap 300-2000 pasangan basa di sepanjang genom (Lindpaintner, 1999). Pada prinsipnya, SNP dapat terjadi pada nukleotida mana saja, dan pada bidang studi epidemiologi genetik, SNP yang relatif umum ditemukan, akan menjadi perhatian terbesar (Alwi, 2005).

Sebagian besar SNPs secara fungsional tidak berfungsi dan muncul di *noncoding* region atau non-regulasi genom. Namun, beberapa SNPs berperan dalam menyebabkan perubahan struktur atau ekspresi protein. SNPs yang berfungsi secara biologis ini dianggap esensial dan menentukan keragaman manusia baik dalam hal kesehatan maupun penyakit. Saat ini telah berkembang penelitian untuk mengidentifikasi SNPs yang umum dan relevan secara biologis, khususnya yang terkait dengan risiko penyakit. Ketika SNPs telah diidentifikasi dan dikarakterisasi maka profil genetik berbasis SNP ini, dapat dilihat sebagai *fingerpint*, yang berguna dalam menentukan risiko kerentanan seseorang terhadap berbagai penyakit dan respons terhadap obat-obatan (Alwi, 2005).

Identifikasi dan karakterisasi sejumlah besar SNPs diperlukan sebelum dapat digunakan secara ekstensif sebagai penanda genetik. Beberapa ratus ribu SNPs diperlukan sebagai

Buku ini tidak diperjualbelikan.



sumber data untuk mengonstruksi *biomarker* genetik yang dapat dioptimalkan dalam penelitian yang mengeksplorasi keterkaitan varian gen tersebut dengan fenotip tertentu, baik risiko perkembangan penyakit maupun respons terapi (Alwi, 2005). Sejak selesainya Human Genome Project pada tahun 2003 dan HapMap International Project pada tahun 2005, hingga saat ini, SNPs dianggap sebagai salah satu *marker* genetik yang paling penting karena distribusinya yang luas pada genom dan analisisnya yang relatif mudah (Medrano & De Oliveira, 2014).

Metode deteksi SNPs atau SNPs *genotyping* diklasifikasikan menjadi 2 golongan utama yaitu metode tradisional dan metode mutakhir (*high throughput methods*). Metode konvensional berbasis gel untuk deteksi SNPs menggunakan teknis molekuler standar seperti *amplification refractory mutation system* (ARMS), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) dan *single strand conformation polymorphism* (SSCP). Metode mutakhir (*high throughput methods*) untuk deteksi SNPs di antaranya *Direct DNA Sequencing*, *Variant Detector Arrays* (VDA) dan *DNA microarray technology* (Alwi, 2005; Koopae & Koshkojeh, 2014).

Metode deteksi SNPs secara lebih rinci dijelaskan sebagai berikut:

## A. Metode Deteksi SNPs secara Konvensional

### 1. *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS)

*Allele-Specific Polymerase Chain Reaction* (AS-PCR), yang juga dikenal dengan *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) atau *PCR Amplification of Specific Alleles* (PASA) merupakan metode berbasis PCR yang dapat diterapkan untuk mendeteksi SNPs



yang telah diketahui sebelumnya (Darawi et al., 2013). Selain itu, teknik ARMS juga dapat diaplikasikan untuk mengenali mutasi yang belum diketahui sebelumnya (Koopae & Koshkoiyeh, 2014). Konsep AS-PCR/ARMS ini dipelopori oleh Newton et al. pada tahun 1989, sekitar 6 tahun setelah PCR ditemukan (Darawi et al., 2013).

Pada pendekatan ARMS ini, diperlukan desain primer spesifik yang memungkinkan enzim DNA polimerase untuk mengamplifikasi DNA, jika *nucleotide* pada ujung -3' dari primer merupakan komplemen dari basa pada *sequence* varian maupun *wild-type*. Setelah melalui proses PCR dan elektroforesis, terbentuknya pola produk PCR yang spesifik akan memungkinkan diferensiasi dari SNPs. Beberapa pendekatan inovatif telah digunakan untuk mendeteksi adanya produk PCR spesifik. Beberapa metode tersebut didasarkan pada hibridisasi dengan *probe* berlabel spesifik maupun *analysis melting curve* yang keduanya memerlukan pewarnaan (*staining*) pada asam nukleat. AS-PCR/ telah digunakan secara luas di berbagai bidang studi seperti farmakogenetika, kelainan/penyakit berdasar genetik, mikrobiologi dan lain-lain (Darawi et al., 2013).

Metode ARMS-PCR tetra-primer merupakan metode *genotyping* SNP yang sederhana dan ekonomis dan hanya melibatkan PCR secara tunggal yang diikuti dengan gel elektroforesis gel. Metode ini didasarkan pada kombinasi antara prinsip PCR tetra-primer dan teknik ARMS. Namun demikian, kedua metode tersebut berasal dari pendekatan *mismatch* (ketidakcocokan) untuk menghasilkan reaksi alel spesifik. Pendekatan



alel spesifik ini bergantung pada penggunaan primer alel spesifik yang mengandung *mismatch* pada ujung 3' sehingga primer ini bersifat spesifik hanya untuk satu alel SNP dan refrakter terhadap alel lainnya. Akibatnya, enzim DNA polimerase hanya dapat memperpanjang primer ketika ujung 3' nya sangat cocok dengan *template* DNA dan baru akan memproduksi produk (amplikon PCR). Melalui metode ini, dapat dilakukan identifikasi genotip DNA target melalui analisis diproduksi atau tidaknya amplikon (Medrano & De Oliveira, 2014).

Perbedaan di antara teknik tetra-primer dan ARMS adalah lokasi mismatch (ketidakcocokan). Untuk tetra-primer, lokasi ketidakcocokan terletak di tengah-tengah primer alel spesifik dan menggunakan empat primer pada proses reaksi tersebut. Namun, pada metode ARMS, *mismatch* (ketidakcocokan) terletak di ujung 3' primer alel spesifik dan menggunakan lima primer. Perbedaan lainnya yaitu, metode *genotyping* tetra-primer dilakukan dalam satu reaksi dengan 2 suhu *annealing* (TA) yang berbeda, suhu *annealing* yang tinggi digunakan pada siklus pertama sedangkan suhu *annealing* yang lebih rendah diterapkan pada siklus yang tersisa (Ye et al., 2001). Di sisi lain, metode ARMS hanya menggunakan satu suhu *annealing*, namun proses *genotyping* dilakukan pada dua reaksi yang berbeda (Medrano & De Oliveira, 2014).

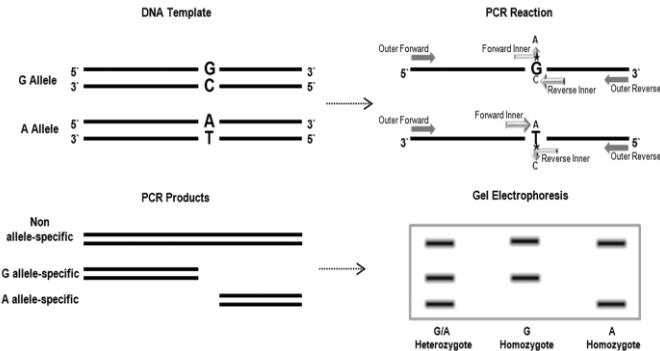
Proses ARMS-PCR tetra-primer dijalankan dalam tiga tahapan reaksi. Pada reaksi tahap pertama, fragmen yang dibentuk oleh *outer* primer akan digunakan sebagai *template* fragmen oleh inner primer dalam rangka menghasilkan fragmen alel spesifik. Oleh



karena itu, untuk mengoptimalkan pembentukan ampikon *outer* primer secara tepat, maka pada tahap 1 ini hanya menggunakan *outer* primer. Reaksi tahap 2 menggunakan *Restriction Fragment Length Polymorphism*-PCR (RFLP-PCR) untuk mendapatkan sampel kontrol. *Genotype* yang dinilai melalui teknik RFLP-PCR ini digunakan untuk memvalidasi *genotype* yang diperoleh dengan ARMS-PCR tetra-primer. Reaksi tahap ketiga adalah penambahan *inner* primer dan mengoptimasi protokol sampai *genotype* yang diperoleh dengan ARMS-PCR tetra-primer sama dengan yang diperoleh dengan PCR-RFLP di semua sampel kontrol. Strategi ini merupakan cara yang baik untuk memastikan keseluruhan fragmen terbentuk secara benar, mengingat lebih besarnya amplifikasi tidak spesifik yang mungkin terbentuk ketika keempat primer telah digunakan.

Untuk memperjelas prinsip ARMS-PCR tetra-primer maka ditunjukkan dengan ilustrasi pada Gambar 1 (Ye et al., 2001).





Gambar 1 Skema Ilustrasi ARMS-PCR tetra-primer untuk SNP *genotyping*. Substitusi C/T individu *heterozygote* ditampilkan sebagai contoh. Amplikon dua alel spesifik dibentuk menggunakan dua pasang primer. Satu pasang primer (*outer forward dan reverse inner*) menghasilkan amplicon yang merepresentasikan alel C, sedangkan pasangan primer lainnya (*forward inner dan outer reverse*) menghasilkan amplicon yang merepresentasikan alel T. Spesifisitas *inner primers* ditentukan oleh dua *mismatches*, salah satunya terletak di antara ujung 3' terminal basa *inner primers* dan *template*. *Mismatches* yang kedua berada di posisi -2 dari ujung 3' terminal (ditandai oleh asterik). Gambar bawah menunjukkan bahwa dengan memosisikan dua *outer primer* pada jarak yang berbeda dari nukleotida polimorfik, maka akan terbentuk kedua amplicon alel spesifik dengan panjang yang berbeda, sehingga dapat diidentifikasi dan dibedakan dengan gel elektroforesis (Ye et al., 2001).

Aplikasi metode ARMS dalam menentukan SNPs relatif lebih murah dibandingkan metode lain yang tersedia. Desain primer dan metode PCR dengan optimasi yang baik merupakan aspek krusial dalam menentukan keberhasilan analisis SNPs berdasarkan metode *genotyping* berbasis ARMS. Setelah optimasi protokol berhasil dicapai, maka eksekusi dari metode ARMS ini relatif sederhana yang mirip dengan PCR konvensional (Darawi et al., 2013). Seperti semua metode lainnya, metode ARMS-PCR tetra-primer juga

Buku ini tidak diperjualbelikan.



memiliki kelebihan maupun keterbatasan. Kelebihan metode ARMS-PCR tetra-primer telah dijelaskan sebelumnya, sedangkan keterbatasan metode tersebut di antaranya, tidak diindikasikan untuk SNPs di regio DNA yang kaya akan *cytosine* dan *guanine* dan tidak direkomendasikan untuk sampel DNA yang tidak dimurnikan (Medrano & De Oliveira, 2014).

Pada poin ini juga mendeskripsikan prinsip *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang merupakan salah satu komponen penting pada metode ARMS-PCR. Selain itu, karena genom manusia mengandung sekitar 3 miliar pasangan basa, metode identifikasi, isolasi, dan amplifikasi yang tepat dari suatu segmen tertentu yang juga disebut sebagai sekuen target merupakan hal yang sangat krusial. Dalam farmakogenomik, *sequence* target adalah segmen DNA genom (biasanya beberapa ratus pasang basa) yang mengandung daerah polimorfik yang akan dianalisis. Jenis polimorfisme yang sering dipelajari dalam farmakogenomik meliputi *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), polimorfisme insersi atau delesi (penyisipan atau penghapusan nukleotida tertentu dalam urutan target), atau tandem *repeat polymorphism* (daerah di mana sejumlah nukleotida tertentu, biasanya dua atau tiga, diulang beberapa kali). Amplifikasi sekuen target yang mengandung area polimorfik untuk dianalisis tersebut memerlukan prosedur PCR. PCR telah merevolusi biologi molekuler dan merupakan salah satu teknik yang paling umum digunakan dalam analisis farmakogenomik (Aquilante et al., 2006).

Teknik PCR konvensional merupakan suatu teknik perbanyakan (replikasi) DNA secara enzimatik



(Dorado et al., 2019; Green & Sambrook, 2018b). Teknik ini banyak diterapkan di bidang biokimia, kedokteran/medis dan biologi molekuler karena mempunyai beberapa kelebihan, di antaranya metode cukup praktis dan murah, memerlukan sampel yang sedikit, dan menghasilkan salinan DNA dalam jumlah besar dalam waktu singkat (Levin et al., 2018).

Teknik berbasis asam nukleat terutama digunakan untuk menilai dan mengeksplorasi variasi fenotipe di antara individu yang diteliti. Dalam proses ini, diawali dengan ekstraksi DNA genom, penentuan target lokus genetik dan *running* sampel menggunakan metode PCR (Hashim & Al-Shuhaib, 2019). Komponen dalam metode PCR secara teknis yaitu:

**a. DNA Template (cetakan)**

DNA *template* yaitu DNA untai ganda yang berisi urutan basa dari hasil isolasi DNA. DNA *template* atau DNA cetakan merupakan bahan yang akan diuji dan pada dunia kesehatan sering kali disebut sebagai sampel. DNA *template* yang digunakan umumnya merupakan DNA genom yang diperoleh melalui prosedur isolasi DNA. Tingkat kemurnian DNA pada proses PCR sangatlah penting. Kemurnian DNA dapat di uji melalui pengukuran *spectrophotometer* dengan membandingkan absorbansi A260/A280. DNA dikatakan murni apabila perbandingan absorbansinya menunjukkan angka 1,8-2,0 (Levin et al., 2018; Sophian & Yustina, 2023).

**b. DNA Polimerase**

DNA Polimerase merupakan enzim yang mengkatalisis penggabungan nukleotida ke dalam



untaian DNA atau juga dikenal sebagai enzim yang berperan dalam proses elongasi untaian DNA *template*. Enzim taq DNA Polimerase merupakan enzim yang di isolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* YT1 yang bersifat termofilik (hidup pada lingkungan panas). Enzim taq DNA Polimerase dapat mengenali region yang tidak diinginkan dan penggunaan taq DNA Polimerase yang terlalu sedikit membuat DNA menjadi teramplifikasi dalam jumlah yang sedikit (Cavalcanti et al., 2007; Marygold et al., 2020).

**c. Oligonukleotida Primer**

Primer merupakan DNA untaian tunggal atau oligonukleotida pendek yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA. Panjang primer berkisar antara 20-30 basa. Untuk merancang urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. Primer oligonukleotida disintesis menggunakan suatu alat yang disebut DNA *synthesizer*. Primer digunakan untuk pengenalan titik/daerah spesifik pada genom. Untuk mengenali daerah khusus, biasanya primer yang digunakan antara 18 sampai 30 bp. Primer dirancang dengan *system Forward* dan *Reverse*. *Primer Forward* melakukan amplifikasi pada *leading strand*, sedangkan *Primer Reverse* melakukan amplifikasi pada *lagging strand*. Kandungan *guanine* dan *cytosine* sebaiknya mendekati atau 50% dari total. Untuk menghindari salah target (mis primer) maka sebaiknya ujung 3' dihindarkan dari tiga basa

Buku ini tidak diperjualbelikan.



berturut-turut pada C dan G. Untuk membuat desain primer tersebut, saat ini sudah banyak program yang dapat digunakan (Budiarto, 2016; Levin et al., 2018; Maksum et al., 2019; Puspitaningrum et al., 2018).

Primer yang digunakan dalam PCR harus memiliki sekuen nukleotida yang komplementer terhadap daerah yang mengapit segmen DNA target pada *template*. Amplifikasi gen target membutuhkan dua primer yang berikatan secara spesifik pada daerah ujung 5' dan ujung 3' DNA target. Hal tersebut menandakan bahwa desain primer sangat menentukan spesifisitas reaksi PCR. Untuk reaksi PCR yang optimal, primer yang digunakan harus memiliki beberapa karakteristik sebagai berikut:

- 1) Kedua primer yang digunakan sebaiknya memiliki kandungan G-C yang sama sehingga memiliki *Temperature Melting* (TM) yang sama (Budiarto, 2016; Levin et al., 2018; Maksum et al., 2019; Moriarty et al., 2021; Puspitaningrum et al., 2018).
- 2) Kedua primer yang digunakan sebaiknya tidak mengandung sekuen yang komplementer antara kedua primer tersebut. Syarat ini untuk menghindari pembentukan dupleks antara kedua primer.
- 3) Primer yang digunakan sebaiknya tidak mengandung sekuen yang bersifat *inverted repeats*.
- 4) Konsentrasi primer yang digunakan harus sesuai dengan jumlah siklus PCR yang



dijalankan, konsentrasi yang terlalu tinggi menyebabkan efisiensi reaksi PCR yang rendah dan menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik. Primer oligonukleotida yang digunakan umumnya pada konsentrasi 1  $\mu\text{mol}$  dalam reaksi PCR (50 pmol per 50  $\mu\text{l}$  reaksi). Konsentrasi antara 0,1 dan 1  $\mu\text{mol}$  dapat digunakan. Konsentrasi yang lebih tinggi dapat meningkatkan *annealing* primer nonspesifik dan dengan demikian menjadi produk amplifikasi nonspesifik.

- 5) Primer PCR biasanya memiliki panjang 18-30 nukleotida dan sebaiknya memiliki kandungan *guanine + cytosine* (G+C)  $\sim 50\%$  karena akan menentukan suhu  $T_m$ , yaitu suhu di mana setengah molekul DNA akan beruntai ganda (Borah, 2011; Hong et al., 2022; Lando et al., 2015).
  - a) DNA terdiri dari *adenine*, *thymin*, *cytosine*, dan *guanine*. Tiga ikatan hidrogen antara G dan C dan dua ikatan hidrogen antara A dan T diperlukan untuk menggabungkan dua untai DNA. Karena lebih banyak ikatan hidrogen antara G dan C, maka amplifikasi DNA kaya GC menjadi lebih sulit. Untuk menghindari hal ini, dapat dilakukan dengan memilih DNA target dengan kandungan GC antara 50% sampai 55%. Kandungan GC yang lebih tinggi akan meningkatkan suhu leleh reaksi ( $T_m$ ) (Kuslich et al., 2019; Leber, 2020).



b) Tm primer dapat diperkirakan dengan persamaan aturan praktis:

$$2 \times (\text{jumlah As dan Ts}) + 4 \times (\text{jumlah Gs dan Cs})$$

A=adenine,

T=thymine,

G=guanine,

C=cytosine

Namun, perhitungan Tm oligonukleotida yang lebih akurat membutuhkan pertimbangan efek kekuatan ionik dan basa terdekad dalam untai DNA. Saat ini, telah tersedia perangkat lunak untuk melakukan perhitungan ini.

c) Nilai Tm untuk kedua primer dalam suatu reaksi harus serupa, dan suhu *annealing* yang digunakan biasanya  $\sim 5^{\circ}\text{C}$  di bawah Tm. Saat suhu *annealing* mendekati Tm, maka amplifikasi yang lebih spesifik tercapai, tetapi hasil keseluruhan dapat menurun. Terlepas dari perhitungan yang cermat, pengujian empiris suhu *annealing* sangat penting untuk pengujian PCR yang dioptimalkan dengan baik (Borah, 2011; Hong et al., 2022; Lando et al., 2015).

d) Komplementaritas pada ujung 3' pasangan primer harus dihindari karena hal ini mendorong pembentukan oligomer primer (dimer primer). Produk tersebut merupakan *template* untuk amplifikasi PCR dan bersaing dengan produk target yang diinginkan. Hal ini menyebabkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



penurunan hasil produk yang diinginkan dan adanya produk nonspesifik yang dapat mempersulit analisis (Borah, 2011; Hong et al., 2022; Lando et al., 2015).

**d. dNTP (*Deoxynucleoside Triphosphate*)**

Senyawa dNTP merupakan bahan baku penyusun DNA yang baru dan terdiri atas 4 macam sesuai dengan basa penyusun DNA, yaitu dATP, dCTP, dGTP dan dTTP. Poin penting lainnya dari PCR (*template*) DNA adalah kemurnian DNA. DNA yang tidak dimurnikan tidak dapat diamplifikasi. Kontaminan seperti fenol, kloroform dan garam lainnya menghambat reaksi PCR. Fenol adalah salah satu penghambat PCR yang umum. Untuk meminimalkan kontaminasi, sebaiknya DNA dilarutkan dalam *buffer* TE dan pH *buffer* TE harus mendekati 8.0. Integritas DNA dipertahankan pada pH ~8.0. Selain itu, DNA *template* juga perlu untuk dipastikan apakah terfragmentasi atau tidak. DNA yang terfragmentasi tidak dapat digunakan dalam PCR. Untuk pengecekan tersebut digunakan teknik elektroforesis gel agarosa. Jika konsentrasi DNA yang diekstraksi terlalu tinggi maka sebaiknya juga diencerkan dengan menggunakan *buffer* TE dan konsentrasi DNA untuk amplifikasi sebaiknya 30ng. Amplifikasi tidak mungkin dilakukan tanpa *template* DNA PCR (Stillman, 2013).

**e. *Buffer* dan Ion Logam**

Buffer yaitu bahan-bahan kimia untuk mengondisikan reaksi agar berjalan optimum dan menstabilkan DNA polimerase (Takei et al., 2018). Ion logam umumnya ion bivalen ( $Mg^{2+}$ ) dan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



monovalen (K<sup>+</sup>) yang berperan sebagai kofaktor DNA polimerase. Tanpa ion ini DNA polimerase tidak dapat bekerja (Scientific, 2023).

Metode PCR secara teknis dilakukan dengan menggunakan mesin *thermal cycler* yang dapat menaikkan dan menurunkan suhu dalam waktu cepat sesuai kebutuhan siklus PCR. Setiap siklus reaksi PCR terdiri atas tiga tahap (Dorado et al., 2019; Ehtisham et al., 2016; Green & Sambrook, 2018a; Shafeeq, 2021), sebagai berikut:

a. Denaturasi

Denaturasi yaitu tahap pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal melalui pemanasan pada temperatur 94-96 °C selama 30-60 detik. Selama proses denaturasi tersebut, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi akan menyebabkan putusannya ikatan hidrogen di antara basa-basa yang komplemen.

b. *Annealing* atau Penempelan

*Annealing* merupakan tahap penempelan basa oligonukleotida primer pada basa untai tunggal *template* DNA yang komplemen. Suhu penempelan ini berdasarkan *temperature melting* (T<sub>m</sub>) primer yang digunakan dan berkisar pada suhu 45-60°C.

c. *Ekstensi/elongasi*

Elongasi yaitu tahap pemanjangan primer menjadi suatu untai DNA baru oleh enzim DNA polimerase pada suhu 70-72°C. Pada tahap ini, enzim DNA



polimerase akan menempekan dNTP yang komplementer dengan basa pada *template* DNA.

Selain ketiga proses tersebut, biasanya PCR didahului dan diakhiri oleh tahapan berikut:

a. Pra-denaturasi

Tahap ini dilakukan selama 1-9 menit pada awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktivasi enzim DNA polimerase.

b. Elongasi Final

Tahap elongasi final dilakukan pada suhu optimum enzim (70-72oC) selama 5-15 menit untuk memastikan bahwa setiap untai tunggal yang tersisa sudah diperpanjang secara sempurna. Proses ini dilakukan setelah siklus PCR terakhir. *Post elongation* digunakan untuk menyempurnakan semua pemanjangan *copy template* DNA dan tujuan utamanya juga menyempurnakan reaksi, sedangkan *hold* digunakan untuk melindungi sampel ketika reaksi telah selesai.

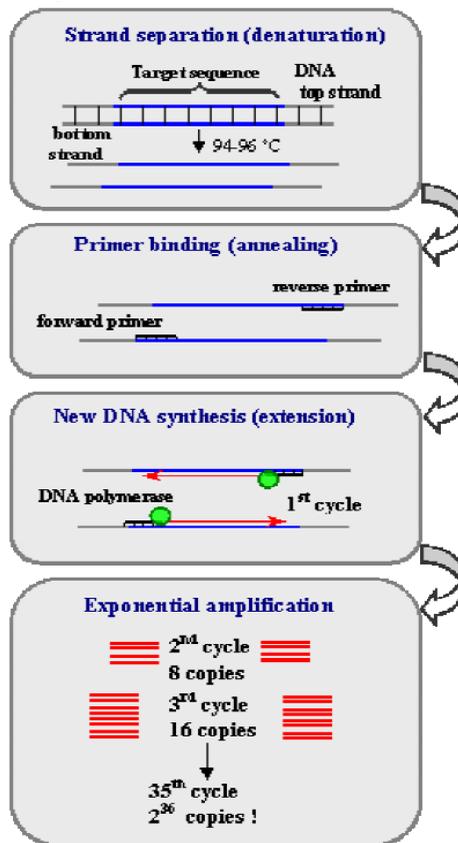
Siklus PCR dapat berlangsung 30-45 kali tergantung dari kebutuhan. Satu untaian DNA pada satu kali siklus akan digandakan menjadi dua. Dua untaian DNA akan menjadi empat. Empat untaian DNA akan digandakan menjadi delapan pada siklus ketiga dan begitu seterusnya. Namun demikian suatu bahan DNA tidak mungkin hanya satu dan dapat berjumlah ribuan hingga jutaan. Satu reaksi dimungkinkan dengan mempertimbangkan jumlah DNA *template* yang dimasukkan ke dalam reaksi. Semakin sedikit jumlah DNA, maka dibutuhkan siklus PCR yang lebih

Buku ini tidak diperjualbelikan.



banyak untuk mendapatkan *copy template* DNA yang mencukupi untuk analisis selanjutnya. Jumlah DNA 105, maka dibutuhkan 25 siklus. Apabila jumlah DNA 104, maka dibutuhkan 30 siklus. Begitu juga seterusnya 103 dan 102, maka dibutuhkan 35 dan 40 siklus. Semakin sedikit sampel yang digunakan, maka dapat dipastikan jumlah siklus yang digunakan semakin banyak.

Untuk memperjelas, tahapan proses PCR ditampilkan pada Gambar 2 berikut:



Gambar 2 Skema Siklus Reaksi PCR (ncbi.nlm.nih.gov)

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## 2. **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Teknik PCR-RFLP juga dikenal sebagai *cleaved amplified polymorphic sequence*. Dalam teknik ini, amplicon PCR dipaparkan dengan enzim restriksi tertentu yang akan memotong DNA pada posisi restriksi yang khas dan dikenal sebagai *recognition site*. Pemotongan DNA oleh enzim restriksi ini akan menghasilkan beberapa fragmen DNA dengan berbagai ukuran. Selanjutnya amplicon DNA yang telah terpotong tersebut akan dijalankan di dalam gel elektroforesis yang diberi aliran listrik. Adanya perbedaan ukuran fragmen DNA tersebut akan bergerak melintasi gel dengan jarak yang berbeda-beda, sehingga di akhir proses elektroforesis akan didapatkan beberapa band (pita) sesuai dengan ukuran fragmen DNA tersebut (Hashim & Al-Shuhaib, 2019).

PCR-RFLP merupakan metode tradisional untuk mendeteksi polimorfisme gen. Metode ini sederhana, cepat, dan efektif, serta telah banyak enzim restriksi yang tersedia secara komersial dengan harga yang terjangkau (Wang et al., 2017). Teknik RFLP digunakan untuk mendeteksi mutasi dan SNP yang telah diketahui sebelumnya. Pendekatan ini terdiri dari dua langkah utama. Pertama, DNA target yang mengandung SNP diamplifikasi menggunakan metode PCR standar. Kedua, produk PCR dicerna/dipotong menggunakan enzim restriksi. Perubahan nukleotida dapat terjadi pada semua genom eukariotik. Jika perubahan tersebut menghasilkan fenotip baru, atau menimbulkan perubahan pengenalan *restriction-site* oleh enzim endonuklease restriksi, maka sekuens DNA menjadi tidak dikenali (tidak terpotong) oleh enzim

Buku ini tidak diperjualbelikan.



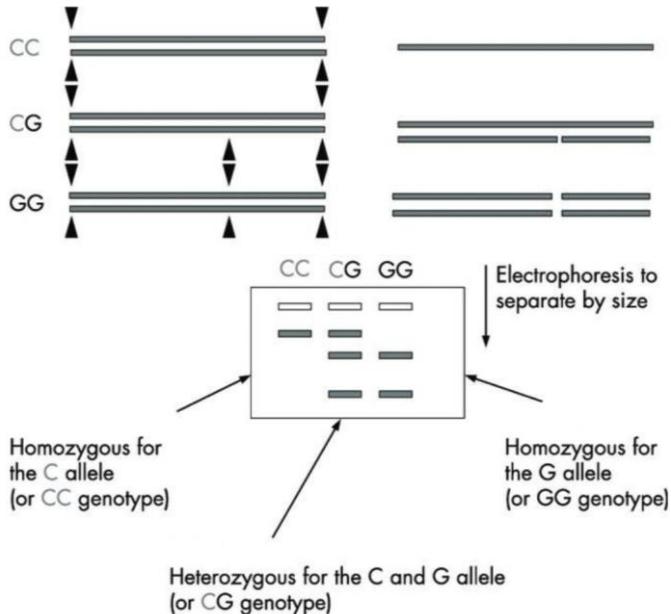
*endonuclease* restriksi yang spesifik tersebut (Koopae & Koshkoiyeh, 2014).

Metode RFLP-PCR terdiri dari 4 langkah, sebagai berikut (Tarach, 2021):

- a. Materi genetik diisolasi dan fragmen DNA yang diteliti dengan panjang (ukuran *base pair*) yang telah diketahui sebelumnya diamplifikasi menggunakan PCR dengan sepasang primer spesifik.
- b. Produk amplicon mengalami digesti/pemotongan oleh enzim restriksi yang mengenali *recognition site* spesifik, sekitar 4-8 *base pair* (pasangan basa)
- c. Pemisahan fragmen amplicon yang telah dipotong tersebut menggunakan gel elektroforesis
- d. Visualisasi dan identifikasi potongan fragmen DNA dengan *etidium bromide* atau perak

Teknik RFLP ini akan menampilkan tiga kemungkinan hasil yang ditunjukkan pada Gambar 3. Pertama, jika pada DNA target tersebut tidak terdapat *recognition site*, maka proses digesti dengan enzim restriksi yang relevan akan menghasilkan fragmen yang panjang. Kedua, jika terdapat *recognition site*, maka proses digesti dengan enzim restriksi yang relevan akan menghasilkan dua fragmen yang lebih pendek. Kemungkinan ketiga, jika *recognition site* hanya terdapat pada salah satu dari dua alel induk, maka proses digesti akan menghasilkan dua pola elektroforesis yang berbeda, yaitu terdapat satu fragmen panjang dan dua fragmen lainnya yang lebih pendek (Beuzen et al., 2000).





Gambar 3 RFLP dan Deteksi Allel (Tarach, 2021)

Enzim Restriksi memotong DNA pada *sequence* yang spesifik (ditandai dengan panah). Jika polimorfisme (perubahan *sequence* DNA) terjadi pada lokasi yang dikenali oleh enzim restriksi tertentu (*recognition site*) dan dekat dengan gen target, maka akan menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran berbeda yang sesuai dengan alelnya dan akan terpisah melalui elektroforesis yang akan tampak pada saat divisualisasikan.

Salah satu dari banyak contoh praktis penerapan RFLP-PCR dalam penelitian SNP *genotyping* adalah yang dilakukan oleh Alavian et al. (2018) untuk mendeteksi polimorfisme rs1127354 dan rs7270101 yang terkait dengan gen *Inosin Inosine*

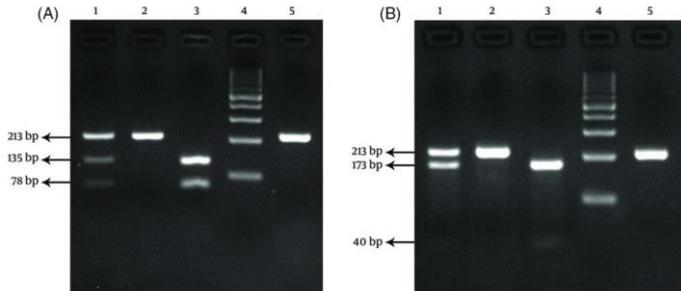
Buku ini tidak diperjualbelikan.



*Triphosphatepyrophosphatase* (ITPA). SNP rs1127354 dan rs7270101 dikaitkan dengan gangguan fungsional pada enzim ITPase, yang mengakibatkan proteksi timbulnya anemia pada pasien dengan infeksi virus hepatitis C kronis (HCV) yang menjalani regimen terapi yang bergantung pada ribavirin (RBV). Pada penelitian tersebut, 100 pasien di Iran dengan hepatitis C kronis diidentifikasi genotipenya untuk mengetahui polimorfisme rs1127354 dan rs7270101 dengan bantuan RFLP-PCR (Gambar 4) dan metode *sequencing* Sanger untuk memvalidasi hasilnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 100 sampel yang diuji dengan PCR-RFLP dan *sequencing*, ke semuanya memiliki hasil yang sama persis, dengan kesesuaian 100%. Hal ini menunjukkan kegunaan RFLP-PCR dalam mempelajari SNP dengan efisiensi dan keandalan yang sama tingginya dengan *sequencing* Sanger, namun dengan biaya yang lebih murah (Alavian et al., 2018).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 4 Hasil produk PCR-RFLP setelah didigesti oleh enzim XceI dan MboII. (A) Gel elektroforesis hasil produk PCR-RFLP setelah digesti oleh enzim XceI untuk SNP rs1127354. Lajur 1, 2 dan 3 masing-masing diidentifikasi sebagai genotipe CA, CC, dan AA. Lajur 4 menunjukkan *marker* ukuran gen. Lajur 5 adalah produk PCR yang tidak dipaparkan enzim digesti sebagai kontrol. (B) Gel elektroforesis hasil produk PCR-RFLP setelah didigesti oleh enzim MboII untuk SNP rs7270101. Lajur 1, 2, dan 3 masing-masing diidentifikasi sebagai genotipe AC, AA, dan CC. Lajur 4 menunjukkan *marker* ukuran gen. Lajur 5 adalah produk PCR yang tidak dipaparkan enzim digesti sebagai kontrol (Alavian et al., 2018).

Metode PCR-RFLP telah digunakan sejak tahun 1988 dan telah terbukti menjadi metode yang cepat dan sensitif untuk mendeteksi polimorfisme gen. Namun, metode ini memiliki beberapa keterbatasan di antaranya belum adanya enzim restriksi yang tepat yang dapat mengenali situs polimorfik tertentu dan beberapa enzim restriksi maupun *isoschizomer*-nya tergolong mahal untuk skrining sampel skala besar (Wang et al., 2017). Selain itu, keterbatasan dari metode RFLP adalah sebagian besar mutasi pada genom tidak menghasilkan penghapusan, atau pembentukan *recognition site* yang terkait dengan endonuklease restriksi, sehingga mutasi tersebut tidak mungkin dideteksi dengan analisis RFLP. Keterbatasan lainnya yaitu, dalam beberapa kasus, tahapan digesti

Buku ini tidak diperjualbelikan.



oleh enzim endonuklease restriksi membutuhkan waktu yang lama dan suhu tinggi (Koopae & Koshkoiyeh, 2014).

### 3. **Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)**

Teknik PCR-SSCP awalnya diaplikasikan oleh Orita et al. (1989) untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya *point mutation* pada amplicon PCR. Konsep utama dari PCR-SSCP berdasar pada pemisahan awal (*melting*) DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal melalui pemanasan. Pada kondisi terpisah, molekul untai tunggal DNA tersebut cenderung melipat membentuk struktur tiga dimensi sesuai dengan *sequence* (urutan) asam nukleat. Oleh karena itu, di dalam gel elektroforesis poliakrilamid, molekul DNA untai tunggal yang telah terpisah menempati ukuran yang sama, namun dengan struktur tiga dimensi yang berbeda dan memiliki mobilitas yang berbeda pula. Struktur konformasional tersebut dipengaruhi oleh mutasi pada posisi nukleotida tertentu dalam *sequence* primer yang dapat mengubah konformasi fisik dari pita untai tunggal yang terdenaturasi. Perubahan ini sering kali menyebabkan posisi pita untai tunggal yang mengalami mutasi sedikit miring, jika dibandingkan dengan pita untai tunggal normal dalam gel poliakrilamida yang netral (Gasser et al., 2006).

Untuk deteksi SSCP, fragmen DNA yang diduga mengandung SNP, diampifikasi dengan PCR, dilanjutkan dengan proses denaturasi dan *running* amplicon pada gel poliakrilamida yang tidak terdenaturasi. Selama proses *running* pada gel tersebut, fragmen untai tunggal mengadopsi struktur sekunder sesuai dengan urutan nukleotidanya.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Fragmen yang mengandung SNP diidentifikasi sebagai hasil dari pola migrasi yang menyimpang dan dikonfirmasi dengan proses *sequencing*. Meskipun SSCP adalah teknik yang banyak digunakan dan relatif sederhana, tingkat keberhasilannya untuk deteksi SNP bervariasi, biasanya berkisar antara 70%-95% (Alwi, 2005).

Optimalisasi PCR-SSCP dicapai dalam serangkaian percobaan (optimasi) yang dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan maupun resolusi hasil PCR-SSCP, seperti pengujian konsentrasi gel poliakrilamida (8%-14%), suhu (4-20°C), dan tegangan (5-10 V/cm). Optimalisasi lain umumnya juga diperlukan dalam percobaan PCR-SSCP, termasuk pemilihan format dimensi gel dan kemungkinan gliserol tercampur dengan gel netral. Selain itu, terkadang perlu dilakukan uji pra-elektroforesis sebelum *loading* ampikon PCR ke dalam gel. Meskipun beberapa parameter PCR-SSCP dapat dikendalikan, namun beberapa proses optimalisasi tersebut dapat meningkatkan kompleksitas prosedur PCR-SSCP. Dalam beberapa percobaan PCR terkadang tidak perlu melakukan semua prosedur optimasi di keseluruhan ampikon, karena banyak dari ampikon tersebut dapat menghasilkan pita SSCP yang optimal dengan hanya melalui satu prosedur penelitian (Hashim & Al-Shuhaib, 2019).

Metode PCR-SSCP dapat mendeteksi polimorfisme pada fragmen dengan ukuran hingga 500 bp dan yang dioptimalkan adalah fragmen dengan ukuran antara 200-600 bp. Untuk mengakomodasi asam nukleat sebanyak mungkin tanpa terpengaruh

Buku ini tidak diperjualbelikan.



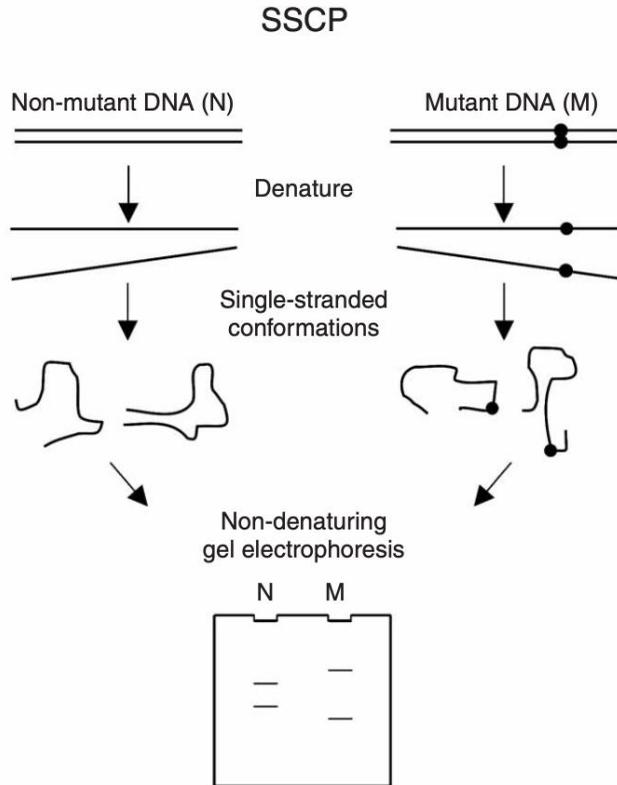
oleh rendahnya efisiensi deteksi PCR-SSCP, maka ukuran amplicon yang optimal harus berkisar antara 330 dan 380 bp. Namun, untuk pemisahan yang optimal, metode PCR-SSCP hanya memerlukan sejumlah kecil amplicon yang di-loading pada elektroforesis gel poliakrilamida. Keunggulan ini didasari kemampuan teknik pewarnaan perak pasca elektroforesis untuk mendeteksi konsentrasi DNA yang sangat rendah. Umumnya konsentrasi amplicon yang dianalisis melalui metode ini berukuran 2  $\mu$ L, sehingga menghemat sampel dan masih terdapat sisa amplicon untuk aplikasi yang lainnya. Selain itu, amplicon dengan ukuran kecil akan meningkatkan sensitivitas pewarnaan perak nitrat (Hashim & Al-Shuhaib, 2019).

Metode SSCP didasarkan pada prinsip bahwa mobilitas elektroforesis molekul DNA untai tunggal dalam gel non-denaturasi sangat ditentukan oleh ukuran dan strukturnya (Gambar 5). Di dalam larutan, molekul DNA untai tunggal cenderung akan membentuk konformasi struktur sekunder maupun tersier karena adanya pasangan basa nukleotida di dalam tiap untai DNA individu. Konformasi ini tergantung pada panjang untai, *sequence*, lokasi serta jumlah daerah pasangan basa. Oleh karena itu, mutasi pada posisi nukleotida tertentu dalam urutan primer dapat mengubah konformasi molekul. Ketika dipisahkan dalam matriks gel non-denaturasi (pada suhu <100C), molekul DNA dengan SNP dapat dilihat berdasarkan adanya perubahan mobilitasnya sebagai akibat dari konformasi yang berbeda. Mengingat teknis yang relatif sederhana dan kemampuannya yang tinggi dalam mendeteksi mutasi, SSCP-PCR menjadi metode

Buku ini tidak diperjualbelikan.



yang bagus untuk secara khusus mengidentifikasi patogen dan efektif untuk skrining variabilitas genetik di dalam maupun di antara sampel, spesimen atau populasi dan yang terpenting untuk skrining mutasi yang belum diketahui sebelumnya (Gasser et al., 2006).



Gambar 5 Prinsip analisis PCR-SSCP. Mutasi titik (*point mutation*) yang ditunjukkan dengan tanda titik hitam pada untai DNA, mengakibatkan perbedaan formasi konformasi untai tunggal DNA yang mengalami mutasi (M) dibandingkan dengan untai DNA non-mutan (N). Hal ini akan menimbulkan perbedaan mobilitas molekul DNA tersebut di dalam matriks gel non-denaturasi (Gasser et al., 2006).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



#### 4. **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

*Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) merupakan teknik terpercaya untuk mengidentifikasi genetik (DNA) berdasarkan perbedaan sekuen DNA. Metode ini didasarkan pada fakta bahwa molekul DNA untai ganda memiliki kecepatan/tingkat denaturasi tertentu yang terkait dengan komposisi nukleotida spesifik pada *sequence* DNA yang dimilikinya (Knapp, 2009). Teknik DGGE mendeteksi varian nukleotida pada *sequence* fragmen DNA yang diamplifikasi berdasarkan perbedaan karakter *melting*/pelelehan yang dimilikinya (Miller et al., 1999).

DGGE umumnya digunakan untuk skrining polimorfisme yang diakibatkan variasi beberapa nukleotida. Namun, teknik ini juga berguna untuk skrining SNPs. Urea dan formamide ditambahkan pada gel akrilamid untuk menciptakan lingkungan yang memicu denaturasi DNA dan ketika konsentrasi kedua senyawa tersebut bervariasi, maka berbagai gradien denaturasi pada gel akrilamid dapat terbentuk. Selain itu, elektroforesis pada suhu konstan 60°C juga membantu proses denaturasi molekul DNA. Saat molekul DNA mulai mengalami denaturasi, maka mobilitasnya di dalam gel akrilamid akan berubah. Molekul DNA dengan tingkat denaturasi paling besar akan bermigrasi lebih lambat dibandingkan dengan molekul yang tingkat denaturasinya lebih kecil. Adanya perbedaan mobilitas ini mengakibatkan molekul DNA akan muncul pada posisi yang berbeda pada gel dengan gradien tertentu dan dapat divisualisasi sebagai band/pita yang terpisah yang tampak pada Gambar 6 (Knapp, 2009).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



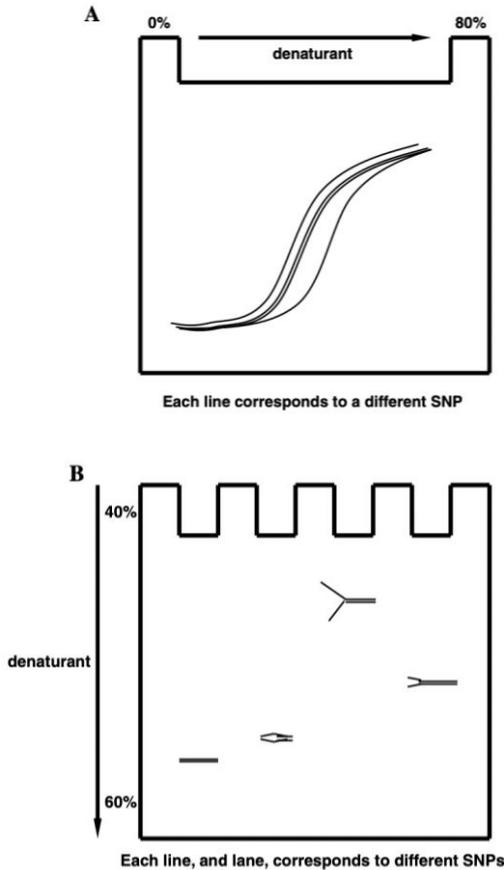
Sejalan dengan hal tersebut, Miller et al. (1999) menunjukkan bahwa pada saat sebuah fragmen DNA mencapai titik denaturasinya di dalam gel poliakrilamid, maka fragmen tersebut mulai terdisosiasi/terpisah dan migrasinya terhambat. Adanya perbedaan (variasi) bahkan satu nukleotida di antara fragmen tersebut akan mengubah karakter *melting*/pelelehan yang dimilikinya sehingga memungkinkan deteksi menggunakan Teknik DGGE. Karena menggunakan gradien denaturasi, maka fragmen dengan *single melting* domain dan memiliki rentang titik denaturasi akan dapat dibedakan melalui satu kali *running* pada gel akrilamid. Hal ini mengakibatkan waktu yang diperlukan untuk mendeteksi variasi *sequence* pada *coding loci* yang sangat polimorfik sebanding dengan waktu yang diperlukan untuk sampel dengan *length variation* pada *locus microsatelit* tunggal. Sebagai alternatif, fragmen dengan dua *melting* domain memerlukan dua kondisi *running* gel akrilamid sehingga memungkinkan sampel dengan dua *melting* domain tersebut dapat dideteksi secara adekuat (Miller et al., 1999).

Teknik DGGE dapat digunakan untuk menganalisis molekul DNA dengan panjang mulai dari 100 bp sampai dengan 1000 bp. Fragmen dengan ukuran yang lebih besar dapat dipisahkan dengan gel akrilamid konsentrasi 6-8%, sedangkan fragmen yang lebih kecil sering kali memerlukan konsentrasi akrilamid yang lebih tinggi untuk memperlambat mobilitas DNA dan memaksimalkan kondisi denaturasi. Oleh karena itu, produk PCR yang lebih pendek (300-400 bp) sebaiknya dipisahkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



menggunakan gel akrilamid konsentrasi 12% (Knapp, 2009).



Gambar 6 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) dapat digunakan untuk skrining SNP dalam amplicon/produk PCR yang berukuran sama, namun memiliki urutan nukleotida yang berbeda. (A) Gradien denaturasi optimal untuk skrining ditentukan dengan menggunakan DGGE perpendikular (horizontal). (B) Beberapa SNP dari individu yang berbeda dipisahkan pada gradien denaturasi yang sesuai secara paralel. *Sequence* DNA yang mengalami denaturasi cepat, akan bergerak pada gel akrilamid dengan kecepatan lebih lambat dibandingkan dengan *sequence* DNA yang mengalami denaturasi lebih lambat (Knapp, 2009).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## B. Metode Deteksi SNPs Mutakhir (*High Throughput Methods*)

### 1. *Direct DNA Sequencing*

Metode *gold-standard* untuk identifikasi mutasi dalam amplicon PCR adalah *direct DNA sequencing*. Namun, *direct sequencing* dari semua amplicon PCR berbiaya mahal, membutuhkan usaha besar, dan memakan waktu lama terutama aplikasinya untuk pemeriksaan dalam skala besar (Gulija et al., 2011).

DNA *sequencing* merupakan metode untuk mengidentifikasi urutan basa nitrogen dalam suatu rangkaian DNA. Dengan metode tersebut, para peneliti, saat ini telah mengetahui urutan basa nitrogen pada keseluruhan genom manusia dan berbagai spesies lain. Pada awalnya, proses DNA *sequencing* genom manusia membutuhkan biaya sekitar 1 juta dolar. Namun, sejalan dengan perkembangan inovasi dan teknologi, semakin tahun biaya yang dibutuhkan untuk metode tersebut semakin terjangkau dan dapat diselesaikan dalam waktu yang lebih cepat. Bahkan saat ini, untuk proses *sequencing* keseluruhan genom manusia hanya membutuhkan biaya sekitar 900 dolar dan dapat diselesaikan dalam waktu 6 jam (Crossley et al., 2020).

Saat ini telah berkembang berbagai metode untuk *Direct DNA Sequencing*, di antaranya:

#### a. **Metode Sanger**

DNA *sequencing* menggunakan metode Sanger DNA *sequencing* pertama kali dilakukan oleh seorang ahli biokimia yang bernama Frederick Sanger dengan teknik *di-deoxyribonucleotide (di-deoxy) Chain Termination Sequencing* atau sering kali disebut dengan teknik/metode Sanger.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Metode Frederick Sanger berhasil memenangkan penghargaan Nobel pada tahun 1980.

Tahapan metode Sanger ditampilkan pada Gambar 7 dan dideskripsikan sebagai berikut:

- 1) Fragmen DNA dengan panjang sekitar 800-1000 bp didenaturasi, dicampur dengan primer, enzim DNA polimerase, 4 macam dNTPs (*deoxyribonucleotide*) yaitu *deoxyadenosine triphosphate* (dATP), *deoxythymidine triphosphate* (dTTP), *deoxyguanosine triphosphate* (dGTP) dan *deoxycytidine triphosphate* (dCTP) serta 4 macam ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*). Senyawa ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) yang digunakan dalam metode Sanger tersebut telah dilabeli dengan fluoresen. Perbedaan antara dNTPs (*deoxyribonucleotide*) dan ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) terletak gugus kimia yang menempel pada ujung 3'. Senyawa dNTPs (*deoxyribonucleotide*) mempunyai gugus -OH pada ujung 3' sedangkan ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) tidak mempunyai gugus -OH pada ujung 3'.
- 2) Jika primer mereplikasi DNA dengan menambahkan dNTPs (*deoxyribonucleotide*) maka proses replikasi DNA tersebut akan terus berjalan karena gugus -OH pada ujung tiga bisa ditemplei oleh dNTPs atau ddNTPs. Namun jika primer mereplikasi DNA dengan menambahkan ddNTPs

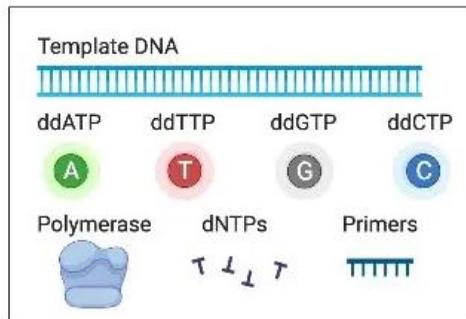
Buku ini tidak diperjualbelikan.



(*dideoxyribonucleotide*) proses replikasi DNA tersebut akan terhenti karena ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) tidak dapat ditempel di dNTPs atau ddNTPs baru pada ujung 3' nya (ujung 3' tidak mempunyai gugus -OH).

- 3) Senyawa dNTPs (*deoxyribonucleotide*) dan ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) dapat menyusun fragmen DNA hasil replikasi dengan ukuran berbeda sebanyak jumlah basa nitrogen dari *template* DNA yang digunakan. Selanjutnya akan melewati pipa kapiler yang dapat memisahkan fragmen DNA berdasarkan panjang fragmen. Fragmen DNA yang terpisah tersebut kemudian dideteksi secara berurutan menggunakan *fluorescence detector*, sehingga dihasilkan urutan ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) yang menempel pada tiap-tiap ujung fragmen. Urutan ddNTPs (*dideoxyribonucleotide*) tersebut merupakan urutan basa komplementer dari DNA *template* (Crossley et al., 2020).

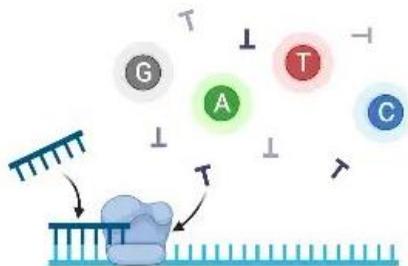
### Reagents



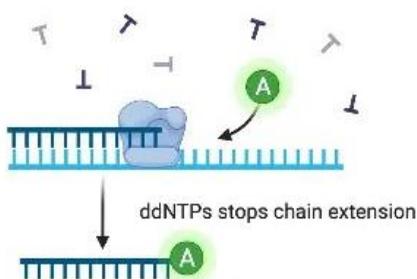
Buku ini tidak diperjualbelikan.



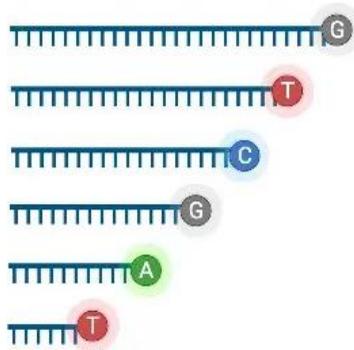
① Primer annealing and chain extension



② ddNTP binding and chain termination



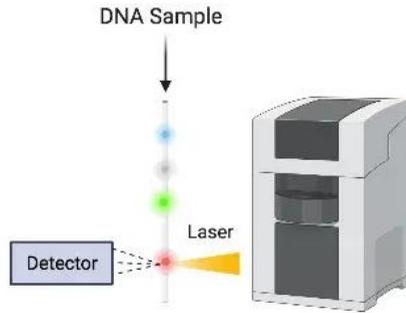
③ Fluorescently labelled DNA sample



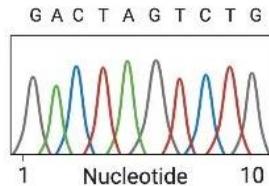
Buku ini tidak diperjualbelikan.



④ Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection



⑤ Sequence analysis and reconstruction



Gambar 7 Tahapan *Sequencing* Metode Sanger  
Sumber: i0.wp.com

Metode *sequencing* Sanger telah sangat diandalkan untuk DNA *sequencing* sejak pertama kali ditemukan. Meskipun metode Sanger masih dianggap sebagai *gold-standart* untuk *sequencing* oleh banyak peneliti, namun metode ini memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya (Fakruddin et al., 2013):

Buku ini tidak diperjualbelikan.



- 1) Untuk menghasilkan *sequence* (urutan *nucleotide*) yang lebih besar, diperlukan gel atau polimer dalam jumlah besar sebagai media pemisahan fragmen DNA yang berlabel fluoresen. Hal ini menjadi keterbatasan yang utama dari metode *sequencing* Sanger.
- 2) Jumlah sampel yang dapat dianalisis secara paralel relatif minimal.
- 3) Otomatisasi keseluruhan tahapan metode preparasi sampel sulit dilakukan.
- 4) Fragmen DNA harus dikloning ke dalam bakteri untuk *sequence* (urutan *nucleotide*) yang berukuran lebih besar.
- 5) Tingginya biaya *sequencing*
- 6) Kesalahan *sequencing*
- 7) Tingkat sensitivitas diperkirakan sebesar 10-20% sehingga tidak cukup baik dalam mendeteksi alel atau organisme dengan tingkat mutase yang rendah namun memiliki relevansi secara klinis.
- 8) Orientasi cis atau trans dari posisi heterozigot mungkin sulit dideteksi selama analisis data.
- 9) Relatif kurang mampu untuk menganalisis genom diploid kompleks secara efisien dengan biaya yang rendah.
- 10) Penyusunan genom *de novo* sulit dilakukan.

Beberapa kelompok peneliti di dunia telah berupaya mengembangkan alternatif untuk *sequencing* DNA di antaranya metode *sequencing* dengan hibridisasi dan *pyrosequencing* (Fakruddin et al., 2013).



## b. Metode Hibridisasi

*Single nucleotide polymorphism* (SNP) merupakan bentuk variasi genetik manusia yang paling umum terjadi dan dapat berfungsi sebagai *biomarker* penting dalam menilai kerentanan individu terhadap penyakit tertentu atau memprediksi respons terhadap obat (Ding et al., 2023). Analisis SNP telah menjadi strategi populer untuk menemukan gen yang terlibat di dalam patogenesis penyakit yang kompleks seperti Alzheimer, obesitas dan diabetes. Selain itu, identifikasi SNPs juga diperkirakan akan memiliki peran krusial pada bidang farmakogenomik. Di bidang farmakogenomik, identifikasi variasi gen spesifik yang relevan dengan efikasi, toksisitas maupun metabolisme obat akan membantu dalam menetapkan strategi terapi yang optimal untuk masing-masing pasien secara individual (Prince & Brookes, 2001).

Metode deteksi mutasi basa dalam genom DNA yang tergolong mutasi langka dengan tingkat selektivitas dan sensitivitas yang tinggi sangat penting untuk diagnosis dini, tindakan preventif maupun pengembangan obat. Oleh karena itu, teknik deteksi SNPs yang efisien dan mutakhir sangat diperlukan. Idealnya, teknik ini memiliki metode yang sederhana, mudah dioperasikan, pengujian memerlukan suhu yang sedang, tanpa peralatan laboratorium yang canggih dan kompatibel dengan teknologi *microarray*. Metode deteksi SNPs yang telah tersedia, terdiri dari 2 kategori utama yaitu *enzyme-assisted*

Buku ini tidak diperjualbelikan.



*discrimination* dan metode berbasis hibridisasi (Ding et al., 2023).

Sebagian besar strategi terbaru yang dirancang untuk identifikasi SNP diturunkan dari teknik yang melibatkan langkah enzimatik pasca-PCR maupun *allele-specific oligonucleotide hybridization* (ASOH) yang terdiri dari *high-density chip arrays* untuk hibridisasi alel spesifik, *5' nuclease* (TaqMan) *assay*, *single-base extension*, atau *real-time pyrophosphate sequencing* (Prince & Brookes, 2001). Metode *enzyme-assisted discrimination* umumnya terdiri dari reaksi enzimatik *single nucleotide* spesifik seperti ekstensi, pemotongan dan ligase yang diikuti oleh deteksi produk reaksi enzimatik tersebut. Namun, sebagian besar metode ini rumit, menggunakan enzim yang tidak stabil dan memerlukan kondisi eksperimen yang ketat. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan metode tanpa enzim yang efisien dan spesifik dan dapat mendeteksi SNPs dalam berbagai kondisi. Dalam metode berbasis hibridisasi, target yang cocok maupun target dengan ketidakcocokan pada nukleotida (*single-base mismatched*) akan dapat diidentifikasi melalui adanya perbedaan hibridisasi dengan *probe* DNA. Selain itu, kesederhanaan dan kepraktisan metode berbasis hibridisasi ini memungkinkan deteksi SNP pada genotip pada sampel dengan signifikan (Ding et al., 2023).

*Dynamic allele-specific hybridization* (DASH) merupakan penyempurnaan dari teknik ASOH. Serupa dengan ASOH, Teknik DASH juga

Buku ini tidak diperjualbelikan.



melibatkan identifikasi posisi varian pada *sequence* DNA (baik SNP maupun polimorfisme delesi-insersi) melalui proses *annealing* (penempelan) *probe oligonucleotide* spesifik alel tertentu pada target *sequence* DNA *single strand* yang mengandung varian. Berbeda dengan teknik ASOH yang menilai hibridisasi antara *probe* dengan target pada suhu tunggal, DASH menilai status hibridisasi tersebut pada beberapa suhu yang meningkat secara dinamis (Prince & Brookes, 2001).

c. ***Pyrosequencing***

Metode *pyrosequencing* merupakan metode baru *sequencing* DNA yang dikembangkan oleh Royal Institute of Technology dan merupakan alternatif pertama dari metode Sanger konvensional untuk *sequencing* DNA *de novo* (Fakruddin et al., 2013).

*Pyrosequencing* adalah teknik yang menggunakan sistem *sequencing-by-synthesis* yang dirancang untuk mengukur SNPs. Pembentukan C/T SNP buatan melalui modifikasi bisulfit memungkinkan pengukuran metilasi DNA secara lokal maupun menyeluruh secara *real time*. Kemampuan *pyrosequencing* untuk mendeteksi dan mengukur pola metilasi DNA mendasari potensinya untuk menentukan *biomarker* maupun deteksi dini target obat untuk beberapa penyakit. *Pyrosequencing* menggunakan teknik mutakhir yang dapat mengidentifikasi banyak situs CpG di dalam amplicon secara *real-time* dan dirancang untuk mendeteksi SNPs yang dapat dibuat secara artifisial di situs CpG melalui modifikasi *bisulfide*.

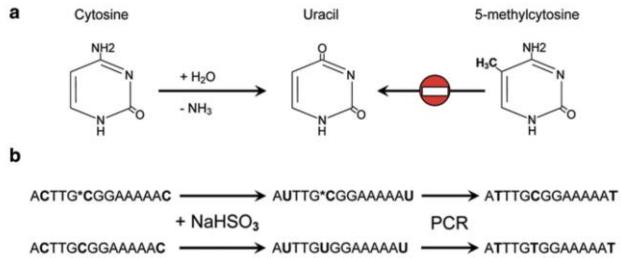
Buku ini tidak diperjualbelikan.



Paparan natrium *bisulfit* pada DNA genom secara selektif akan mengonversi *cytosine* menjadi urasil, namun 5-methylcytosine terlindungi dari proses deaminasi dan *sequence* CG akan dipertahankan pada akhir reaksi (Gambar 8). Teknologi ini berbeda dari Sanger *sequencing*. Pada Sanger *sequencing*, *di-deoxynucleotide* berlabel ditambahkan secara acak pada penghentian reaksi perpanjangan untai DNA yang mewakili setiap posisi nukleotida, sedangkan *pyrosequencing* berdasarkan *sequencing-by-synthesis* di mana nukleotida disalurkan satu per satu dan diintegrasikan ke dalam untai DNA yang sedang mengalami proses pemanjangan dan akan terdegradasi sebelum untaian berikutnya mengalami penambahan nukleotida (Gambar 9) (Delaney et al., 2015).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 8 Deaminasi cytosine melalui konversi natrium bisulfide.

- Deaminasi *cytosine* menjadi urasil dicegah dengan metilasi *cytosine* pada posisi karbon-5.
- DNA yang termetilasi (atas) dan DNA yang tidak termetilasi (bawah) yang mengandung CpG mengalami konversi *bisulfide*. *Cytosine* yang termetilasi tidak berubah, sedangkan *cytosine* yang tidak termetilasi akan diubah menjadi urasil. Setelah proses PCR, *cytosine* akan dipertahankan, sementara urasil akan diubah menjadi *thymine*. \*C menunjukkan *cytosine* yang termetilasi. *Pyrimidine* yang terkait dengan konversi *bisulfide* dicetak tebal. NaHSO<sub>3</sub>: Natrium *bisulfide* (Delaney et al., 2015).

Selain itu, metode ini berdasarkan deteksi luminometri *pyrophosphate* yang dilepaskan selama proses penggabungan nukleotida yang diarahkan oleh primer dan dikatalisis oleh enzim DNA polimerase. Metode *pyrosequencing* ini tepat digunakan untuk proses *sequencing* DNA hingga mencapai 100 basa dan memiliki berbagai keunggulan tertentu. Teknik ini merupakan strategi alternatif yang dapat diaplikasikan secara luas untuk karakterisasi asam nukleat secara rinci. *Pyrosequencing* memiliki keunggulan yang potensial dalam hal akurasi, fleksibilitas,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



kemampuan memproses *sequence* DNA secara paralel dan dapat diotomatisasi dengan mudah. Selain itu, teknik ini tidak memerlukan primer berlabel, nukleotida berlabel, maupun gel elektroforesis. Metode *pyrosequencing* ini telah berhasil untuk konfirmasi *sequence* maupun *sequencing de novo* (Fakruddin et al., 2013).

Selain didasarkan pada prinsip *sequencing-by-synthesis*, teknik *pyrosequencing* juga didasarkan pada deteksi pelepasan *pyrophosphate* (PPi) selama sintesis DNA. Teknik ini menggunakan serangkaian empat enzim sehingga memungkinkan dapat secara akurat mendeteksi urutan asam nukleat selama proses sintesis. Pada teknik *pyrosequencing*, primer *sequencing* dihibridisasi dengan DNA untai tunggal (*single strand* DNA) yang telah dilabel biotin dan dicampur dengan beberapa enzim termasuk DNA *polymerase*, *ATP sulfurylase*, *luciferase* dan *apyrase* serta *substrate* adenosin 5' *phosphosulfate* (APS) dan *luciferin* (Fakruddin et al., 2013).

Siklus empat *deoksinukleotida trifosfat* (dNTPs) ditambahkan secara terpisah ke dalam campuran reaksi secara berulang. Kaskade dimulai dengan reaksi polimerisasi asam nukleat di mana PPi anorganik dilepaskan sebagai hasil penggabungan nukleotida yang diperantarai DNA polimerase. Setiap peristiwa penggabungan nukleotida diikuti dengan pelepasan *pyrophosphate* anorganik (PPi) dalam jumlah yang sama dengan jumlah nukleotida yang ditambahkan. Selanjutnya PPi yang dilepaskan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



secara kuantitatif diubah menjadi ATP oleh ATP sulfurylase dengan adanya APS. ATP yang dihasilkan mendorong konversi luciferin menjadi *oxyluciferin* yang dimediasi oleh luciferase, menghasilkan cahaya dalam jumlah yang sebanding dengan jumlah ATP. Cahaya pada reaksi yang dikatalisis luciferase dengan panjang gelombang maksimum 560 nanometer kemudian dapat dideteksi oleh alat pendeteksi foton seperti kamera *Charge Coupled Device* (CCD) atau photomultiplier. Apyrase adalah enzim pendegradasi nukleotida, yang secara terus menerus mendegradasi ATP dan dNTP yang tidak tergabung dalam campuran reaksi. Ada interval waktu tertentu (biasanya 65 detik) antara setiap dispensasi nukleotida untuk memungkinkan degradasi total. Oleh karena itu, penambahan dNTP dilakukan satu per satu. Oleh karena nukleotida yang ditambahkan diketahui, maka urutan *template* dapat ditentukan (Fakruddin et al., 2013).

Cahaya yang dihasilkan diamati sebagai sinyal puncak dalam pirogram (sesuai dengan elektroferogram dalam sekuensing dideoksi). Sinyal cahaya yang terdeteksi ini sebanding dengan jumlah nukleotida yang dimasukkan (penggabungan tiga dGTP menghasilkan puncak tiga kali lipat lebih tinggi). Selama proses sintesis ini, untai DNA diperpanjang oleh nukleotida komplementer dan urutan DNA ditunjukkan oleh pirogram di layar. Bertambahnya kemiringan kurva pada pirogram menampilkan aktivitas

Buku ini tidak diperjualbelikan.

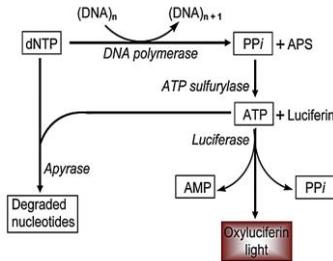
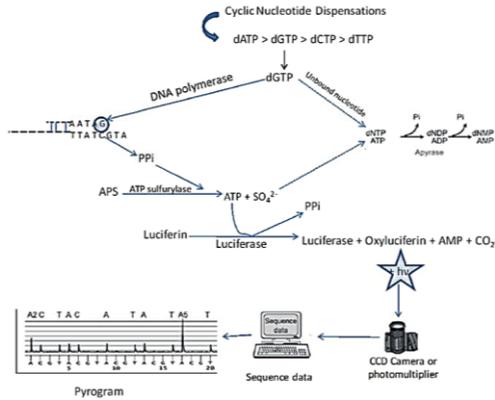


enzim DNA *polymerase* dan ATP *sulfurylase*, ketinggian sinyal menunjukkan aktivitas *luciferase*, dan kemiringan kurva menurun menunjukkan degradasi nukleotida (Fakruddin et al., 2013). Dengan membandingkan emisi puncak cahaya dari proses integrasi C atau T pada situs CpG di antara amplicon akan menghasilkan pengukuran jumlah metilasi pada posisi tersebut secara tepat (Delaney et al., 2015).

*Base-calling* dilakukan dengan perangkat lunak terintegrasi, yang memiliki banyak fitur untuk SNP terkait dan analisis *sequencing*. Reaksi keseluruhan dari polimerisasi hingga deteksi cahaya berlangsung dalam waktu 3-4 detik pada suhu kamar. ATP *sulfurylase* mengubah PPI menjadi ATP dalam waktu sekitar 1,5 detik dan pembentukan cahaya oleh *luciferase* terjadi dalam waktu kurang dari 0,2 detik (Fakruddin et al., 2013).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 9 Skema dan sistem kaskade enzimatik dalam *Pyrosequencing*. *Template* ssDNA dihibridisasi dengan primer dan dicampur dengan enzim serta dua substrat (APS dan lusiferine). Setelah berhasilnya proses penggabungan nucleotida dan pemanjangan untai DNA oleh enzim DNA *polymerase*, PPI yang dilepaskan selama proses tersebut akan bereaksi dengan APS karena adanya penambahan enzim ATP sulfurylase sehingga menaikkan kadar ATP. Naiknya kadar ATP ini, dengan adanya substrat luciferin dan enzim luciferase akan menghasilkan oxyluciferin yang menghasilkan cahaya dan dapat dideteksi oleh kamera CCD. Setiap nukleotida yang tidak berikatan maupun ATP akan didegradasi menjadi bahan penyusunnya oleh enzim apyrase sebelum penambahan nukleotida berikutnya. Reaksi bertingkat ini terjadi secara berulang untuk setiap reaksi penambahan nukleotida. ATP: adenosin trifosfat, APS: adenosin 5' fosfosulfat, PPI: piro-sulfat (Delaney et al., 2015; Fakruddin et al., 2013).

*Pyrosequencing* telah membuka kemungkinan baru untuk melakukan analisis DNA berbasis *sequence* yang dimilikinya.



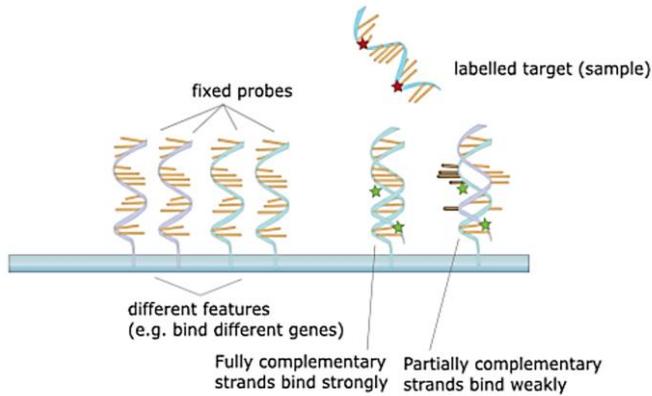
*Pyrosequencing* relatif sesuai untuk *re-sequencing* maupun *sequencing de novo*. Saat ini, metode *pyrosequencing* banyak digunakan dalam berbagai penelitian termasuk analisis *genotip single nucleotide polymorphism* (SNPs). Selain itu, metode ini telah menunjukkan kemampuan untuk menentukan struktur sekunder yang sulit dan melakukan deteksi mutasi maupun analisis metilasi DNA. Aplikasi lain yang sangat signifikan adalah untuk *whole-genome sequencing* (Fakruddin et al., 2013).

## 2. **DNA Microarray Technology**

DNA *microarray* mengacu pada *chip* gen dengan sejumlah besar rangkaian *probe* DNA dalam susunan tertentu yang diimobilisasi pada substrat padat. Teknik ini menggunakan prinsip teori hibridisasi asam nukleat dan sampel DNA yang terdeteksi dihibridisasi dengan DNA *microarray* dan diperbanyak. Selanjutnya fragmen dari reaksi pengikatan non-komplementer yang terbentuk pada *chip* dihilangkan dan *chip* gen tersebut dipindai dengan laser pada mikroskop konfokal. Intensitas sinyal fluoresensi yang merepresentasikan tingkat ekspresi gen kemudian diukur dan diinterpretasi melalui pemrosesan data tertentu (Genomics, 2023). Gambar 10 menunjukkan prinsip DNA *microarray*.

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 10 Prinsip DNA *microarray* (Genomics, 2023).

Teknologi DNA *microarray* pada awalnya dirancang untuk mengukur tingkat transkripsi RNA yang diturunkan dari ribuan gen di dalam suatu genom melalui satu kali proses pengujian. Teknologi ini memungkinkan untuk mengeksplorasi keterkaitan antara kondisi fisiologis sel dengan pola ekspresi gen dalam rangka mempelajari tumor, progresivitas penyakit, respons seluler terhadap suatu stimuli, dan identifikasi target obat. Sebagai contoh, teknik ini telah digunakan untuk identifikasi subset gen tertentu dengan peningkatan maupun penurunan aktivitas yang dikenal sebagai profil transkripsional atau penanda ekspresi gen untuk yang terkait dengan beberapa penyakit seperti leukemia limfoblastik akut, kanker payudara, kanker prostat, kanker paru-paru, kanker usus besar, induksi apoptosis, tumorigenesis maupun respons terapi. Pendekatan dengan teknologi DNA *microarray* ini berguna untuk mendeteksi sifat umum maupun kekhasan ekspresi gen terkait dengan penyakit tertentu. Saat ini, penggunaan DNA

Buku ini tidak diperjualbelikan.

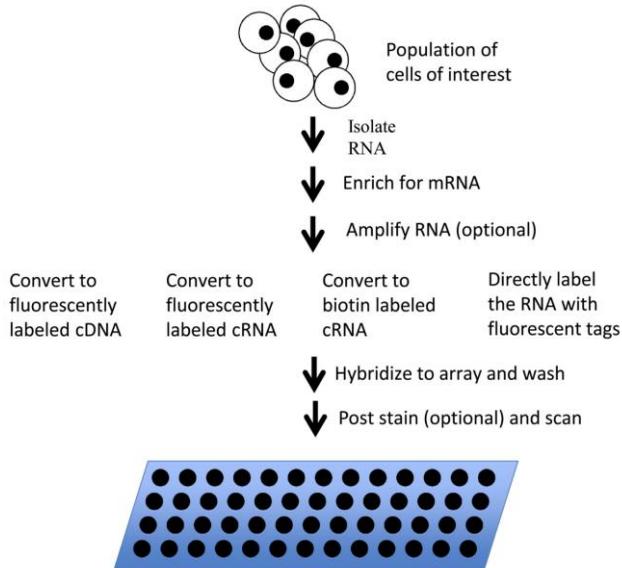


*microarray* pada penelitian biomedis tidak hanya terbatas pada ekspresi gen, namun juga dimanfaatkan untuk mendeteksi SNPs pada genom manusia, penyimpangan pola metilasi, perubahan pada jumlah salinan gen, alternatif RNA *splicing* maupun deteksi patogen (Trevino et al., 2007).

Aplikasi utama dari DNA *microarray* adalah untuk mengukur tingkat ekspresi gen (Gambar 11). Dalam aplikasi ini, diawali dengan ekstraksi RNA dari sel yang diinginkan kemudian diberi label secara langsung dan diubah menjadi cDNA berlabel atau diubah menjadi promotor RNA T7 berekor cDNA yang selanjutnya diubah menjadi cRNA melalui proses amplifikasi Eberwine. Berbagai metode telah dikembangkan untuk pelabelan cDNA atau cRNA. Dua metode yang paling umum digunakan adalah penggabungan nukleotida berlabel dan berfluoresensi selama proses sintesis dan penggabungan nukleotida berlabel biotin yang kemudian diwarnai *streptavidin* berlabel fluoresensi. Molekul cRNA atau cDNA yang telah diberi label kemudian dihibridisasi ke dalam *microarray*. Selanjutnya *array* dicuci dan sinyal dideteksi dengan mengukur fluoresensi di setiap titik. Pada sampel dengan pelabelan biotin, *array* diwarnai pada tahap *post* hibridisasi dengan *streptavidin* yang berlabel fluoresensi. Fluoresensi yang berpendar setelah terinduksi oleh laser akan diukur melalui pemindaian/*scanning* pada mikroskop konfokal. Intensitas sinyal fluoresensi di setiap titik yang tertangkap pada mikroskop konfokal tersebut, merepresentasikan ukuran tingkat ekspresi gen yang sesuai (Bumgarner, 2013).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





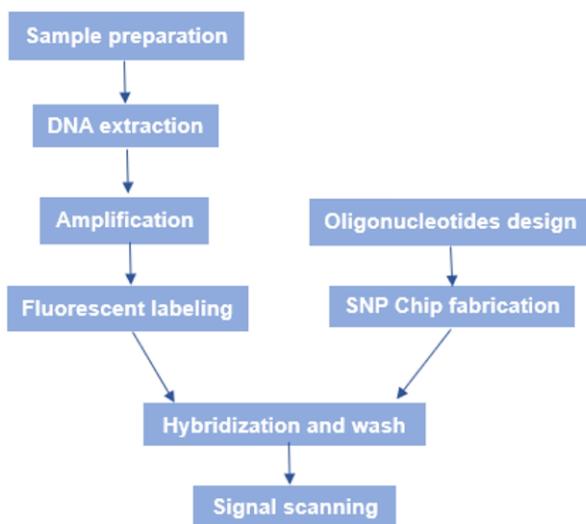
Gambar 11 Analisis ekspresi gen melalui *microarray* RNA yang telah diisolasi dari sampel yang diinginkan, selanjutnya diperbanyak menjadi mRNA. Pada eukariot, poly-A tailed mRNA umumnya diperbanyak menggunakan purifikasi afinitas dengan oligo dT *beads* maupun *columns*. Pada prokariot, RNA yang tidak terseleksi akan didepleksi *datri sequence ribosomal* dengan *beads* atau *columns* yang dilapisi dengan *complementary sequence* dari 16s. Setelah berhasil memperbanyak mRNA, selanjutnya dapat diamplifikasi dan dilabel dengan berbagai variasi metode sehingga menghasilkan hibridisasi sampel yang telah diberi label pada *microarray*. *Array* tersebut selanjutnya dicuci untuk menghilangkan komponen lain yang tidak berikatan dengan sampel. Jika sampel tersebut dilabel dengan biotin, maka *array* akan diwarnai dengan *streptavidin* berlabel fluoesen dan dicuci kembali. *Array* tersebut selanjutnya dipindai untuk mengukur sinyal fluoresensi di setiap titik pada *array* (Bumgarner, 2013).

Selain teknik DNA *microarray*, saat ini juga telah berkembang teknik SNP *microarray*. Teknik ini menggunakan rangkaian (urutan/*sequence*) nukleotida yang telah diketahui sebagai *probe* untuk berhibridisasi dengan urutan/*sequence* nukleotida

Buku ini tidak diperjualbelikan.



DNA yang diuji sehingga memungkinkan analisis SNP secara kualitatif dan kuantitatif melalui deteksi sinyal. Dibandingkan dengan metode tradisional untuk diagnostik sel, SNP *microarray* merupakan teknik mutakhir yang mampu mendeteksi ribuan reaksi sekaligus pada satu permukaan *chip* oligonukleotida (Genomics, 2023). Alur kerja SNP *microarray* tampak pada Gambar 12.



Gambar 12 Prinsip alur kerja SNP *microarray* (Genomics, 2023)

Secara singkat terdapat beberapa proses di dalam teknik SNP *microarray*, yaitu fabrikasi *chip* SNP, persiapan sampel DNA genom, hibridisasi dan pemindaian/*scanning* fluoresensi. Pada tahap fabrikasi *chip* SNP, *chip* oligonukleotida atau cDNA yang telah didesain sebelumnya disusun secara teratur dan dalam densitas yang tinggi pada *glass carrier* untuk membuat *microarray* atau *chip* inti. Berbagai metode untuk

Buku ini tidak diperjualbelikan.



fabrikasi *chip* ini meliputi *light-guided in-situ synthesis*, metode *chemical spray*, *contact dot coating method*, in-situ DNA *controlled synthesis* dan *non-contact micromechanical printing method* TOPSPOT®. Saat ini, total  $4 \times 10^5$  molekul DNA yang berbeda dapat ditempatkan pada *chip* dengan ukuran 1 cm<sup>2</sup>. Teknologi Affymetrix GeneChip® memungkinkan sintesis oligonukleotida in situ dengan kepadatan tinggi, dan telah menjadi pionir dalam bidang ini. Untuk tahap persiapan sampel DNA genom diperlukan bahan sampel untuk diekstraksi DNA genomnya lalu diamplifikasi dengan PCR. Selanjutnya berbagai pewarna fluoresen digunakan untuk memberi label pada DNA tersebut. Pada proses hibridisasi dan pemindaian/*scanning*, DNA genom yang telah terlabel fluoresensi akan dihibridisasi dengan SNP *microarray* dalam kondisi reaksi yang sesuai dan dilakukan pencucian serta aplikasi *scanning* fluoresensi tertentu yang digunakan untuk memindai fluoresensi yang timbul. Selanjutnya dilakukan analisis citra komputer untuk mengolah data sebelum dilakukan analisis gen target secara bioinformatika (Genomics, 2023).

### 3. **Next Generation Sequencing (NGS)**

*Next Generation Sequencing* (NGS) adalah teknologi baru yang digunakan untuk *sequencing* DNA dan RNA dan mendeteksi varian/mutasi. Teknik NGS dapat mengurutkan ratusan dan ribuan gen atau seluruh genom dalam waktu singkat. Varian/mutasi yang terdeteksi dengan teknik NGS, telah banyak digunakan untuk diagnosis penyakit, penentuan prognosis terapi dan tindak lanjut tatalaksana pasien. Kemampuan NGS dalam melakukan *massive parallel sequencing*

Buku ini tidak diperjualbelikan.



menjanjikan dalam menunjang penerapan *personalized precision medicine (individualized therapy)* (Qin, 2019).

Teknik NGS terdiri dari beberapa langkah utama untuk *sequencing*, di antaranya (Qin, 2019):

a. Fragmentasi DNA

Fragmentasi DNA digunakan untuk memecah DNA target menjadi beberapa segmen pendek dengan ukuran 100-300 bp. Berbagai variasi metode dapat digunakan untuk tahap fragmentasi DNA ini. DNA dapat terfragmentasi menggunakan metode mekanis, pencernaan enzimatik maupun metode lainnya seperti sonikasi. DNA segmen pendek yang relevan dengan *sequence* DNA target, dipisahkan menggunakan *probe* yang telah didesain secara spesifik dan merupakan komplementer dari DNA target yang dikenal dengan prinsip hibridisasi. Metode lainnya melibatkan amplifikasi dengan PCR. Dalam metode ini, menggunakan beberapa pasang primer untuk mengamplifikasi DNA target dengan PCR. Produk PCR merupakan segmen pendek DNA target yang dikenal sebagai amplicon. Amplicon ini selanjutnya digunakan untuk preparasi DNA *library*.

b. Preparasi DNA *Library*

Pada tahap ini, segmen DNA dimodifikasi, sehingga setiap sampel DNA dapat mencapai indeks sampel tertentu untuk dapat diidentifikasi dari pasien manakah *sequence* DNA tersebut berasal. Proses ini juga memungkinkan penambahan adaptor *sequencing* pada segmen DNA. Modifikasi tersebut memungkinkan primer



*sequencing* untuk berikatan pada semua segmen DNA, sehingga terjadi *massive parallel sequencing*.

c. *Massive Parallel Sequencing*

*Massive parallel sequencing* dilakukan menggunakan *sequencer* NGS. DNA library diunggah ke matriks *sequencing* dalam *sequencer* tertentu. *Sequencer* yang berbeda memiliki matriks *sequencer* yang berbeda pula. *Sequencer* NGS Illumina menggunakan sel yang dialirkan (*flow cell*), sedangkan *sequencer* NGS Ion Torrent menggunakan *chip sequencer*. Namun tujuannya sama, yaitu untuk memungkinkan terjadinya *massive parallel sequencing* dari keseluruhan segmen DNA sekaligus di waktu yang sama. Data yang dihasilkan dari *massive parallel sequencing* selanjutnya dianalisis menggunakan *software* bioinformatika.

d. Analisis bioinformatik dan interpretasi varian/mutasi

Analisis bioinformatika merupakan proses yang melibatkan pembacaan dan *alignment* basa nukleotida, identifikasi varian dan anotasi varian. Selama proses ini, data informasi *sequence* yang didapat dibandingkan dengan referensi *sequence* genom manusia dalam rangka mengidentifikasi apakah terdapat varian/mutasi pada *sequence* target. Keseluruhan informasi *sequence* dari setiap segmen di satukan untuk menghasilkan *sequence* akhir di sepanjang DNA (*full length sequence* DNA) yang ditargetkan. Hasil *sequence* akhir tersebut dikirimkan kembali ke peneliti untuk diinterpretasikan. Proses anotasi dan interpretasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



ini diperlukan untuk mengidentifikasi setiap varian dan kemungkinan perannya secara biologis maupun klinis.

*Sequencing* DNA menggunakan metode *Next-Generation Sequencing* (NGS) digunakan untuk *sequencing* DNA dalam jumlah besar seperti *sequencing* genom manusia, di mana metode Sanger telah mulai ditinggalkan. Para peneliti mulai menggunakan metode atau teknik yang sering kali disebut dengan “*next-generation sequencing*”. Prinsip kerja *sequencing* DNA dengan teknik / metode NGS adalah sebagai berikut (Gambar 13):

- 1) Genom DNA yang akan diproses *sequencing*, terlebih dahulu harus dipotong dengan ukuran 400 sampai 100 pasang basa per potongan (fragmen).
- 2) Tiap-tiap fragmen DNA diisolasi dalam larutan yang berisi manik (*bead*).
- 3) Fragmen DNA tersebut kemudian diperbanyak dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Manik (*bead*) yang ada dalam larutan tersebut mampu mengikat *single strand* DNA hasil perbanyakan DNA dengan PCR pada ujung 5' sehingga seluruh *copy* DNA hasil PCR terikat pada manik (*bead*).
- 4) Manik (*bead*) yang telah mengikat *single strand* DNA kemudian dimasukkan ke dalam salah satu sumuran (*well*). Sumuran (*well*) tersebut berisi primer dan DNA *polymerase* sehingga dapat memicu hibridisasi *single*



*strand* DNA yang menempel pada manik (*bead*).

- 5) Pada alat tersebut terdapat 2 juta sumuran yang masing-masing diisi fragmen-fragmen DNA genom yang akan disekuensing. Sumuran yang telah terisi *single strand* DNA, primer dan DNA polimerase kemudian ditambahkan dengan 4 jenis dNTPs (*deoxyribonucleotide*) yaitu *deoxyadenosine triphosphate* (dATP), *deoxythymidine triphosphate* (dTTP), *deoxyguanosine triphosphate* (dGTP) dan *deoxycytidine triphosphate* (dCTP) secara bergantian. Setiap akan dilakukan pergantian jenis dNTPs, sumuran dicuci terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi dNTPs yang ada sebelumnya.
- 6) Jika dNTPs yang ditambahkan dalam sumuran komplementer dengan basa nitrogen dari *single strand* DNA, misalnya basa nitrogen dari *single strand* DNA yang belum berpasangan dengan dNTPs adalah Timin (T) sedangkan dNTPs yang ditambahkan dalam sumuran adalah dTTP, maka keduanya akan berpasangan dan melepaskan P<sub>Pi</sub>. P<sub>Pi</sub> tersebut akan menghasilkan cahaya yang kemudian direkam oleh mesin.
- 7) Sumuran kemudian dicuci dan ditambah dNTPs lainnya. Jika dNTPs yang ditambahkan dalam sumuran tidak komplementer dengan basa nitrogen dari *single strand* DNA, misalnya basa nitrogen dari *single strand* DNA yang belum berpasangan dengan dNTPs

Buku ini tidak diperjualbelikan.



adalah Guanin (G) sedangkan dNTPs yang ditambahkan dalam sumuran adalah dTTP, maka keduanya tidak berikatan dan tidak menghasilkan PPI.

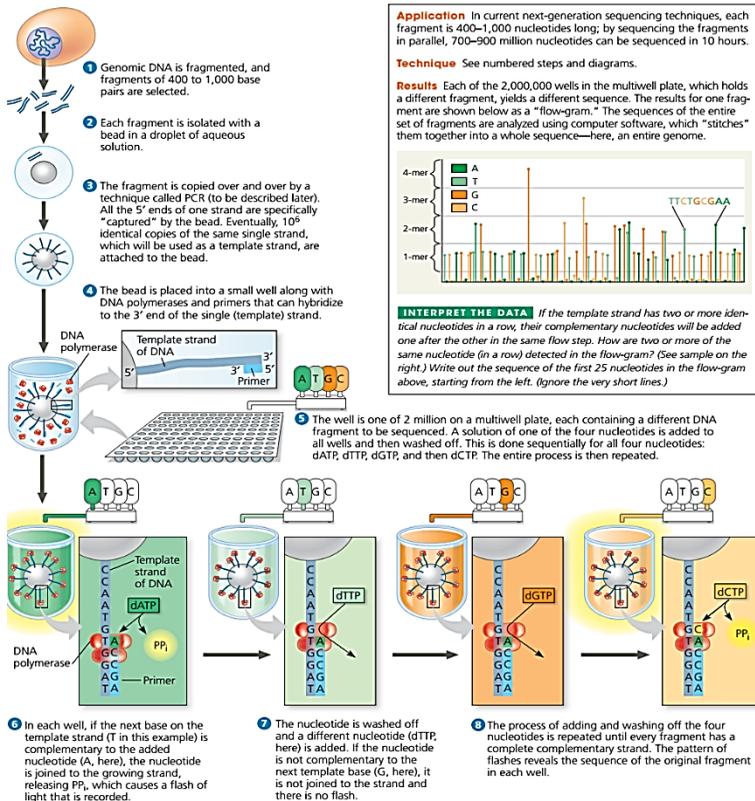
- 8) Proses tersebut diulang-ulang hingga seluruh basa nitrogen dari *single strand* DNA berpasangan dengan komplementernya. Ada tidaknya cahaya PPI tersebutlah yang akan direkam dan diolah, sehingga didapatkan data urutan basa nitrogen dari fragmen *single strand* DNA.

Metode *sequencing* DNA yang pertama kali digunakan adalah metode Sanger (Sanger *dideoxy sequencing*). Metode ini bertujuan untuk reaksi *sequencing* menggunakan DNA *template* dan primer spesifik. Panjang *sequence* yang dihasilkan berkisar antara 1.000-1.200 pasang basa (bp) dan tidak melebihi 2.000 bp. Generasi kedua teknologi *sequencing*, dikenal dengan *Next Generation Sequencing* (NGS). Filosofi dasar pembentukan mesin NGS diadaptasi dari metode *sequencing shotgun* (Abbasi & Masoumi, 2020). Istilah NGS bertujuan untuk mendeskripsikan semua teknologi *sequencing* selain teknologi *sequencing* Sanger. Pada metode NGS, DNA *template* dipotong menggunakan enzim restriksi kemudian fragmen DNA dikloning pada vektor *sequencing* dan masing-masing fragmen DNA dari setiap klon tersebut dilakukan *sequencing* secara terpisah. Hasil *sequence* lengkap dari fragmen DNA yang panjang dapat diperoleh dengan menjajarkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



(alignment) dan menyambung (assembly) sequence fragmen DNA berdasarkan bagian sequence yang berkomplementer (overlapping). Teknik inilah yang memungkinkan pemetaan genom manusia dapat diselesaikan (Haynes et al., 2019; Pereira et al., 2020).



Gambar 13 Tahapan Next Generation Sequencing (Adams, 2020).

Teknologi NGS dapat membaca *template* DNA secara acak (*random*) sepanjang seluruh genom dengan membuat fragmen pendek DNA genom,



kemudian menyambungkannya dengan adapter (fragmen DNA pendek) yang didesain khusus agar dapat dibaca oleh mesin NGS secara *random* selama proses sintesis DNA (Pereira et al., 2020). Oleh karena itu, teknologi NGS disebut sebagai teknik *sequencing* paralel secara masif (*massively parallel sequencing*). Panjang *sequence* DNA yang dihasilkan mesin NGS jauh lebih pendek dibandingkan bila menggunakan mesin *sequencing* dengan metode Sanger. NGS menghasilkan panjang *sequence* DNA antara 50-500 bp. Karena *sequence* yang dihasilkan NGS pendek, maka *sequencing* setiap fragmen DNA harus dilakukan lebih dari sekali ukuran genom (*genome sequence coverage*). Hal ini dilakukan untuk menjaga akurasi data hasil *sequencing* (Salipante et al., 2014).

Tiga teknologi NGS utama yang tersedia saat ini adalah Roche/454 *pyrosequencing* platform, *Illumina Solexa polymerase sequencing* platform, dan ABI/SOLID *ligase sequencing technology*. Jika dibandingkan dengan metode *sequencing* Sanger, ketiga teknologi NGS ini menghasilkan data sekuen yang jauh lebih besar dalam sekali menjalankan alat tersebut. Oleh karena itu alat ini dikenal dengan *high throughput sequencing platforms* (Zhang et al., 2020). Prinsip dasar ketiga alat NGS tersebut berbeda, baik dalam menghasilkan data *sequence*, kualitas data yang dihasilkan maupun biaya proses *sequencing*. Alat Roche/454 menghasilkan data *sequence* terpanjang, tetapi kuantitas data *sequence* yang dihasilkan terendah (*lowest throughput*). Sebaliknya, jumlah *sequence* basa yang dihasilkan *Illumina/Solexa* tertinggi (*highest throughput*), namun panjang bacaannya hanya sekitar 100 basa. Panjang

Buku ini tidak diperjualbelikan.

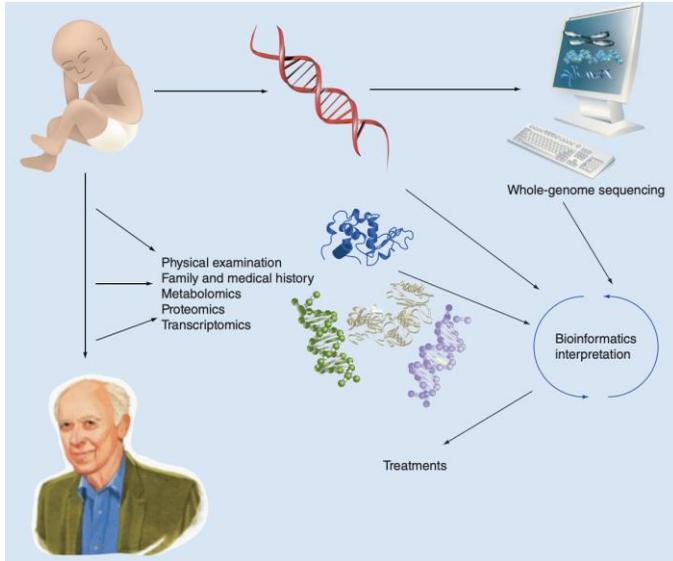


bacaan yang dihasilkan ABI/SOLID terpendek, hanya sekitar 50 basa, tetapi tingkat kesalahan pembacaan DNA pada proses *sequencing* (*error rate*) paling rendah (Zhang et al., 2020).

Adanya pergeseran dari model tradisional dalam pengobatan suatu penyakit ke model individualisasi terapi yang bersifat prediktif maupun preventif sangat menjanjikan untuk menekan biaya perawatan kesehatan terutama pada penyakit dengan beban pembiayaan kesehatan yang besar. Teknik NGS berpotensi besar untuk mempercepat deteksi dini kelainan dan identifikasi *marker* farmakogenetik yang dapat digunakan sebagai pedoman dalam persepan. Penyesuaian pemberian pengobatan pada pasien melalui penerapan individualisasi terapi berpotensi untuk mengoptimalkan keberhasilan terapi dan menekan efek samping yang mungkin timbul. Didasari kemampuannya dalam mendeteksi *marker* farmakogenetik, maka aplikasi teknik NGS berpotensi besar untuk memberi pedoman pengobatan pasien berbasis pendekatan individualisasi terapi. Gambar 14 menjelaskan penerapan NGS dalam menunjang individualisasi terapi (Gonzalez-Garay, 2014).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 14 *Overview* potensi aplikasi dan integrasi NGS ke dalam sistem layanan kesehatan (Gonzalez-Garay, 2014). Pada saat lahir, sejumlah sampel darah diambil dari pasien dan dilakukan *sequencing* pada keseluruhan genomnya. Dokter dan konselor genetik akan memberikan Riwayat keluarga dan riwayat Kesehatan yang terperinci kepada pihak yang berwenang dalam menyimpan dan menganalisis data hasil NGS pasien tersebut. Pihak tersebut juga menerima informasi tambahan seperti metabolomik, proteomik dan transkriptomik. Kemudian dilakukan interpretasi bioinformatik lanjutan yang melibatkan kolaborasi antara ahli biologi molekuler, dokter dan konselor genetik. Dokter akan meninjau laporan tersebut dan merumuskan rekomendasi serta tatalaksana yang sesuai untuk pasien. Proses ini berjalan secara interaktif dan senantiasa melibatkan komunikasi antara dokter, pasien dan pihak-pihak yang bertanggung jawab pada interpretasi data hasil NGS dari pasien.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Referensi

- Abbasi, S., & Masoumi, S. (2020). Next-Generation Sequencing (NGS). *International Journal of Advanced Science and Technology*, 29(3), 6364 - 6377. <http://sersc.org/journals/index.php/IJAST/article/view/7095>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.
- Alavian, S. E., Sharafi, H., Shirmast, P., Alavian, S. M., Behnava, B., Pouryasini, M., Keshvari, M., & Pouryasini, A. (2018). A facile PCR-RFLP method for genotyping of ITPA rs1127354 and rs7270101 polymorphisms. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(7), e22440.
- Alwi, Z. B. (2005). The use of SNPs in pharmacogenomics studies. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 12(2), 4.
- Aquilante, C. L., Zineh, I., Beitelshes, A. L., & Langaee, T. Y. (2006). Common laboratory methods in pharmacogenomics studies. *American journal of health-system pharmacy*, 63(21), 2101-2110.
- Beuzen, N., Stear, M., & Chang, K. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, 160(1), 42-52.
- Borah, P. (2011). Primer designing for PCR. *Science Vision*, 11(3), 134-136.
- Budiarto, B. R. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR) Perkembangan dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan. *BioTrends*, 6(2), 29-38.



- Bumgarner, R. (2013). Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Current protocols in molecular biology*, 101(1), 22.21. 21-22.21. 11.
- Cavalcanti, H. R., Marques, E., Fonseca, L. d. S., & Saad, M. H. F. (2007). Do DNA extraction methods and Taq polimerase quality improve the double repetitive element (DRE) PCR typing method for Mycobacterium tuberculosis strains? *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 409-412.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger *sequencing* and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767-775.
- Darawi, M. N., Ai-Vyryn, C., Ramasamy, K., Hua, P. P. J., Pin, T. M., Kamaruzzaman, S. B., & Majeed, A. B. A. (2013). Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC medical genetics*, 14, 1-8.
- Delaney, C., Garg, S. K., & Yung, R. (2015). Analysis of DNA methylation by *pyrosequencing*. *Immunosenescence: Methods and Protocols*, 249-264.
- Ding, S., Yu, X., Zhao, Y., & Zhao, C. (2023). Identification of single nucleotide polymorphisms by a peptide nucleic acid-based sandwich hybridization assay coupled with toehold-mediated strand displacement reactions. *Analytica Chimica Acta*, 1242, 340810.
- Dorado, G., Besnard, G., Unver, T., & Hernández Molina, P. (2019). *Polymerase chain reaction* (PCR).



- Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., & Nissar, S. (2016). Polymerase chain reaction (PCR): back to basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4(2), 30.
- Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, N., Mahajan, S., & Islam, S. (2013). Pyrosequencing: A next generation sequencing technology. *World Appl Sci J*, 24(12), 1558-1571.
- Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D., Cafarchia, C., Beveridge, I., & Zhu, X. (2006). Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols*, 1(6), 3121-3128.
- Genomics, C. (2023). The Principles and Workflow of SNP Microarray. <https://www.cd-genomics.com/the-principles-and-workflow-of-snp-microarray.html>
- Gonzalez-Garay, M. L. (2014). The road from next-generation sequencing to personalized medicine. *Personalized medicine*, 11(5), 523-544.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018a). The basic polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), pdb. prot095117.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018b). Hot start polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), pdb. prot095125.
- Gulija, T. K., Ivancic-Jelecki, J., Šantak, M., & Forcic, D. (2011). Comparative analysis of CE-SSCP to standard RFLP-CE-FLA method in quantification of known viral variants within an RNA virus quasispecies. *Electrophoresis*, 32(14), 1852-1859.
- Hashim, H. O., & Al-Shuhaib, M. B. S. (2019). Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP



for SNP detection: A review. *Journal of applied biotechnology reports*, 6(4), 137-144.

Haynes, E., Jimenez, E., Pardo, M. A., & Helyar, S. J. (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*, 101, 134-143.

Hong, Q.-J., Ushakov, S. V., van de Walle, A., & Navrotsky, A. (2022). Melting temperature prediction using a graph neural network model: From ancient minerals to new materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(36), e2209630119.

Hunt, R., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., & Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Single nucleotide polymorphisms: Methods and protocols*, 23-39.

Katara, P. (2014). Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 6, 85-92.

Kirk, B. W., Feinsod, M., Favis, R., Kliman, R. M., & Barany, F. (2002). Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Research*, 30(15), 3295-3311.

Klein, K., & Zanger, U. M. (2013). Pharmacogenomics of cytochrome P450 3A4: recent progress toward the "missing heritability" problem. *Frontiers in genetics*, 4, 12.

Knapp, L. A. (2009). Single nucleotide polymorphism screening with denaturing gradient gel electrophoresis. *Single nucleotide polymorphisms: Methods and protocols*, 137-151.

Koopae, H. K., & Koshkoiyeh, A. E. (2014). SNPs Genotyping technologies and their applications in farm animals

Buku ini tidak diperjualbelikan.



- breeding programs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 87-95.
- Kuslich, C. D., Chui, B., & Yamashiro, C. T. (2019). Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 18(1), e27.
- Lando, D. Y., Fridman, A. S., Chang, C.-L., Grigoryan, I. E., Galyuk, E. N., Murashko, O. N., Chen, C.-C., & Hu, C.-K. (2015). Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves. *Analytical biochemistry*, 479, 28-36.
- Leber, A. L. (2020). *Clinical microbiology procedures handbook*. John Wiley & Sons.
- Levin, R. E., Ekezie, F.-G. C., & Sun, D.-W. (2018). DNA-based technique: Polymerase chain reaction (PCR). In *Modern techniques for food authentication* (pp. 527-616). Elsevier.
- Lindpaintner, K. (1999). Genetics in drug discovery and development: challenge and promise of individualizing treatment in common complex diseases. *British Medical Bulletin*, 55(2), 471-491.
- Maksum, I. P., Sriwidodo, S., Gaffar, S., Hasan, K., Subroto, T., Soemitro, S., & Wildan, A. A. (2019). *Buku Teknik Biologi Molekular*.
- Marygold, S. J., Attrill, H., Speretta, E., Warner, K., Magrane, M., Berloco, M., Cotterill, S., McVey, M., Rong, Y., & Yamaguchi, M. (2020). The DNA polymerases of *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 14(1-4), 49-61.
- Medrano, R. F. V., & De Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Molecular biotechnology*, 56, 599-608.



- Miller, K. M., Ming, T. J., Schulze, A. D., & Withler, R. E. (1999). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide *sequence* variation in populations. *Biotechniques*, 27(5), 1016-1030.
- Moriarty, R. V., Fesser, N., Sutton, M. S., Venturi, V., Davenport, M. P., Schlub, T., & O'Connor, S. L. (2021). Validation of multiplex PCR *sequencing* assay of SIV. *Virology Journal*, 18, 1-13.
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120431.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
- Pereira, R., Oliveira, J., & Sousa, M. (2020). Bioinformatics and computational tools for next-generation *sequencing* analysis in clinical genetics. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 132.
- Prince, J. A., & Brookes, A. J. (2001). Towards high-throughput genotyping of SNPs by dynamic allele-specific hybridization. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 1(3), 352-358.
- Puspitaningrum, R., Adhiyanto, C., & Solihin. (2018). *Genetika Molekuler Dan Aplikasinya*. Deepublish.
- Qin, D. (2019). Next-generation *sequencing* and its clinical application. *Cancer biology & medicine*, 16(1), 4.



Salipante, S. J., Kawashima, T., Rosenthal, C., Hoogestraat, D. R., Cummings, L. A., Sengupta, D. J., Harkins, T. T., Cookson, B. T., & Hoffman, N. G. (2014). Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation *sequencing* platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Applied and environmental microbiology*, 80(24), 7583-7591.

Thermo Fisher Scientific. (2023). PCR Setup—Six Critical Components to Consider. <https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>

Shafeeq, N. K. (2021). Polymer Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Sciences*, 34(4), 35-44.

Sophian, A., & Yustina, Y. (2023). Analisis Nilai Kemurnian DNA Menggunakan Nano Fotometer pada Rasio 260/230 yang Diisolasi dari Produk Nugget. *Muhammadiyah Journal of Nutrition and Food Science (MJNF)*, 3(2), 82-86.

Stillman, B. (2013). Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) synthesis and destruction regulate the replication of both cell and virus genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14120-14121.

Takei, F., Akiyama, M., Nobusawa, K., Sabani, N. B., Han, H., Nakatani, K., & Yamashita, I. (2018). PCR under low ionic concentration buffer conditions. *ChemistrySelect*, 3(3), 973-976.

Tarach, P. (2021). Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR)

Buku ini tidak diperjualbelikan.



in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Acta Universitatis Lodziensis. Folia Biologica et Oecologica*, 17, 48-53.

- Trevino, V., Falciani, F., & Barrera-Saldaña, H. A. (2007). DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Mol Med*, 13(9-10), 527-541. <https://doi.org/10.2119/2006-00107.Trevino>
- Wang, J., SY Pang, G., S Chong, S., & GL Lee, C. (2012). SNP web resources and their potential applications in personalized medicine. *Current drug metabolism*, 13(7), 978-990.
- Wang, S., Ding, M., Duan, X., Wang, T., Feng, X., Wang, P., Yao, W., Wu, Y., Yan, Z., & Feng, F. (2017). Detection of the single nucleotide polymorphism at position rs2735940 in the human telomerase reverse transcriptase gene by the introduction of a new restriction enzyme site for the PCR-RFLP Assay. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 47(5), 546-550.
- Weng, L., Zhang, L., Peng, Y., & Huang, R. S. (2013). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics*, 14(3), 315-324.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 29(17), e88-e88.
- Zhang, J., Su, L., Wang, Y., & Deng, S. (2020). Improved high-throughput *sequencing* of the human oral microbiome: from Illumina to PacBio. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020.

Buku ini tidak diperjualbelikan.

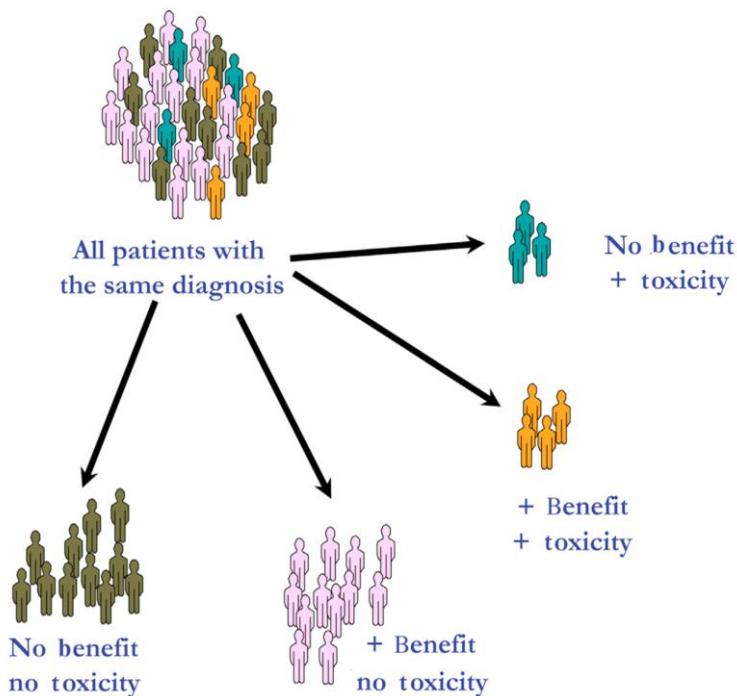


## BAB III

# FARMAKOGENOMIK- FARMAKOGENETIK DAN PRINSIP INDIVIDUALISASI TERAPI

Salah satu yang mendasari bidang ilmu kedokteran merupakan seni dan sains tersendiri, karena adanya variasi yang tinggi dalam respons pengobatan pasien. Keberhasilan terapi maupun timbulnya *adverse drug reaction* (ADR) dan beberapa penyakit yang sulit disembuhkan sering ditemui pada sekelompok pasien dengan diagnosis yang tampaknya sama (Hicks & McLeod, 2017). Respons terapi terhadap pengobatan dapat bervariasi dalam suatu populasi. Beberapa individu menunjukkan efek yang diinginkan, namun beberapa lainnya menunjukkan respons terapeutik yang minimal atau tidak berespons sama sekali (Johnson, 2003). Hal ini seperti skema yang diilustrasikan pada Gambar 15.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Gambar 15 Diversitas di populasi terkait fenotip respons pengobatan (Hicks & McLeod, 2017). Pasien dengan klinis dan diagnosis yang tampak sama serta mendapatkan pengobatan dan dosis yang sama dapat timbul berbagai kemungkinan variasi respons pengobatan di antaranya: pengobatan berespons baik sesuai yang diinginkan dan tanpa menimbulkan toksisitas (warna pink), pengobatan berespons baik sesuai yang diinginkan, namun disertai timbulnya toksisitas (warna kuning), pengobatan tidak berespons baik dan tanpa timbul toksisitas (warna hijau tua), pengobatan tidak berespons dan timbul toksisitas (warna biru).

Pasien tertentu mungkin mengalami efek yang merugikan (*adverse effect*) dari yang ringan sampai mengancam nyawa. Beberapa faktor telah diketahui dapat berkontribusi pada timbulnya variasi respons obat, di antaranya usia, ras, jenis kelamin, interaksi dengan obat lain, penyakit komorbid (penyerta) dan status fungsi ginjal maupun fungsi hati. Namun semakin banyak bukti yang menunjukkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



bahwa perbedaan genetik berperan penting, bahkan pada beberapa kasus menjadi faktor dominan yang menentukan variabilitas respons obat pada individu (Johnson, 2003).

Sebagian besar populasi pasien menunjukkan variabilitas antar individu yang tinggi terkait respons obat dan risiko munculnya toksisitas. Variasi tersebut dapat berasal dari faktor genetik, fisiologis, patofisiologis atau lingkungan. Proses absorpsi, distribusi dan metabolisme obat serta interaksi obat dengan targetnya juga ditentukan oleh perbedaan genetik. Secara umum, faktor genetik diperkirakan berperan sekitar 15-30% terhadap adanya perbedaan antar individu dalam proses metabolisme maupun respons terhadap pengobatan, namun untuk obat golongan tertentu, faktor genetik dapat sebagai penentu utama munculnya variabilitas antar individu (mencapai 95%) pada disposisi maupun efek suatu obat (Eichelbaum et al., 2006). Perbedaan tersebut sering kali lebih besar ditemukan pada suatu populasi dibandingkan pada individu yang sama atau pada kembar monozigot. Diperkirakan dari penelitian skala luas pada multigenerasi dan pada saudara kembar, diketahui bahwa genetika dapat mengakibatkan 20-90% variabilitas dalam disposisi dan efek obat. Saat ini telah terdapat banyak contoh perbedaan respons obat antar individu yang terkait dengan polimorfisme pada gen yang mengkode enzim metabolisme, obat, *transporter* obat maupun target obat (Hicks & McLeod, 2017).

Gagasan bahwa respons obat ditentukan oleh faktor genetik yang berpengaruh pada proses farmakokinetik dan farmakodinamik obat, berkembang pada akhir tahun 1950-an. Hal ini bermula dari temuan bahwa defisiensi enzim glukosa-6-fosfat *dehydrogenase* hereditas menyebabkan hemolisis serius yang teramati pada beberapa pasien yang terpapar anti-malaria primakuin. Kasus ini lebih umum terjadi pada populasi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Afrika-Amerika dan jarang terjadi pada populasi Amerika Kaukasia keturunan Eropa Utara, Barat, dan Timur. Pada tahun 1959, Vogel memperkenalkan istilah Farmakogenetik untuk menunjukkan perbedaan herediter terkait respons obat. Di sisi lain, istilah Farmakogenomik diperkenalkan untuk menggambarkan perkembangan terkini transisi dari genetik ke genomik dan aplikasi pendekatan genom secara luas dalam mengidentifikasi gen yang berkontribusi terhadap penyakit atau perbedaan respons terhadap obat tertentu. Selain itu, pendekatan Farmakogenomik memungkinkan terapi obat ditargetkan secara spesifik pada subkelompok pasien dengan genetik tertentu dan dapat mengarahkan pada klasifikasi penyakit maupun pengobatan baru di tingkat molekuler. Identifikasi gen baru yang terkait dengan suatu penyakit dapat dikembangkan sebagai target baru pengobatan (Eichelbaum et al., 2006).

Faktor genetik berperan dalam patogenesis *adverse drug reaction* (ADR) yang dapat diprediksi. Pemberian pengobatan yang didasari susunan genetik pasien secara individu tidak hanya dapat mengoptimalkan respons terapi, tetapi juga menekan angka ADR yang bermakna secara klinis. Dari 27 jenis obat yang sering dilaporkan dalam penelitian ADR, 59% di antaranya dimetabolisme oleh setidaknya satu enzim dengan varian alel yang terkait dengan penurunan tingkat metabolisme obat. Sebaliknya, hanya 7-20% obat yang dipilih secara acak yang dimetabolisme oleh enzim yang telah diketahui menunjukkan polimorfisme genetik fungsional. Oleh karena itu, variabilitas genetik pada enzim yang memetabolisme obat dapat menjadi kontributor penting pada risiko munculnya ADR. Bukti telah menunjukkan bahwa kerentanan genetik berimplikasi pada beberapa ADR tertentu, seperti hipersensitivitas terhadap abacavir, Stevens-Johnson

Buku ini tidak diperjualbelikan.

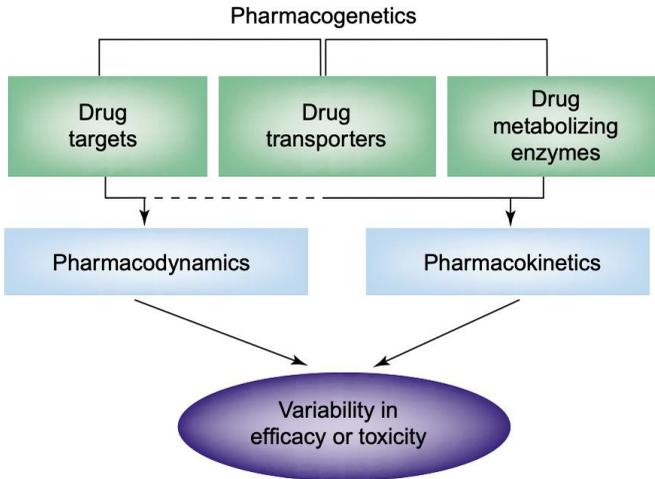


sindrom yang disebabkan karbamazepin dan ADR serius pada kulit yang disebabkan oleh alopurinol (Eichelbaum et al., 2006).

Dalam bidang ilmu farmakologi, obat-obatan umumnya dibahas dari dua perspektif, yaitu farmakodinamik (PD) dan farmakokinetik (PK). Farmakodinamik menggambarkan efek farmakologis suatu obat terhadap tubuh (baik yang diinginkan maupun yang tidak diinginkan). Di sisi lain, farmakokinetik menjelaskan perjalanan obat dan level metabolitnya di berbagai jaringan yang berbeda dan berkaitan dengan proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan eliminasi obat. Oleh karena itu, PD dapat dilihat sebagai apa yang dilakukan obat terhadap tubuh, sedangkan PK adalah apa yang dilakukan tubuh terhadap obat. Mengingat perkembangan ilmu farmakogenetik didasari dari farmakologi, maka penelitian farmakogenetik cenderung mengikuti paradigma yang sama, sebagaimana yang diilustrasikan pada Gambar 16. Perbedaan baik PK maupun PD dapat menimbulkan variabilitas respons obat maupun timbulnya risiko toksisitas (Johnson, 2003).

Buku ini tidak diperjualbelikan.





Gambar 16 Komponen krusial dalam Farmakogenetik. Terdapat 2 bidang utama penelitian farmakogenetik, yaitu farmakogenetik terkait farmakokinetik (PK) dan farmakodinamik (PD). Enzim pemetabolisme obat dan protein *transporter* obat sering berperan dalam menentukan adanya variabilitas farmakokinetik. Protein yang terlibat dalam efek obat, umumnya dikenal sebagai target obat. Protein target ini tidak hanya protein target langsung dari suatu obat, tetapi juga berbagai protein yang terkait dalam aksi obat (seperti protein transduksi sinyal dan protein yang memediasi *adverse drug reaction*). Salah satu jenis protein yang dikode oleh gen tertentu dapat berkontribusi dalam menentukan variabilitas di antara pasien terkait respons pengobatan maupun risiko timbulnya toksisitas obat sehingga dapat menjadi kandidat gen dalam studi farmakogenetik. Garis putus-putus menandakan *transporter* obat, selain berkontribusi pada PK, terkadang juga bisa berperan sebagai target obat (Johnson, 2003).

Adanya perbedaan respons terhadap terapi farmakologis merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pasien. Sekitar 5 dan 13% pasien rawat inap dan rawat jalan mengalami *adverse drug reactions* (ADR) maupun respons sub-terapeutik dari suatu pengobatan. Berbagai faktor tertentu pada pasien, seperti usia, polifarmasi, penyakit penyerta, pola makan dan faktor keturunan berperan dalam menentukan adanya perbedaan respons pengobatan antar

Buku ini tidak diperjualbelikan.



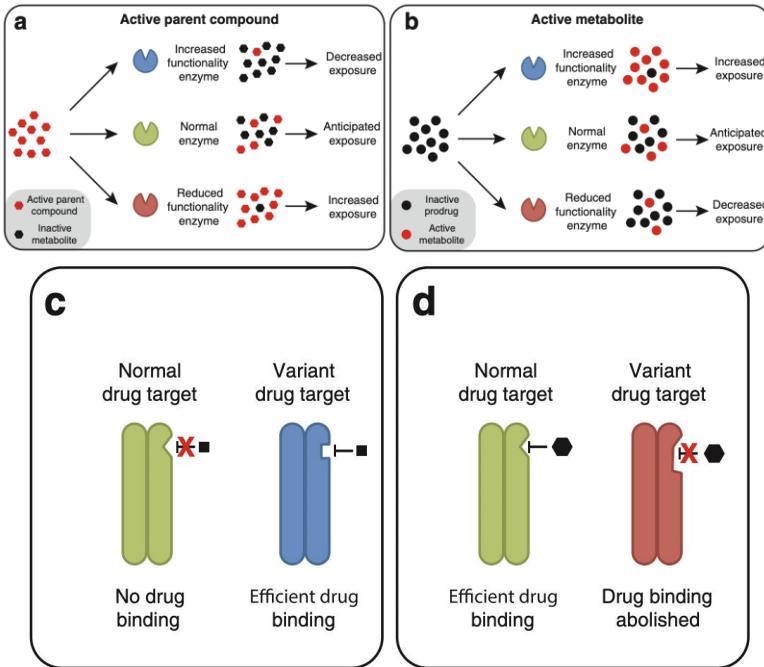
individu dan sekitar 20-30% dari perbedaan respons antar-individu tersebut terkait dengan polimorfisme genetik. Hati merupakan organ pemetabolisme obat yang utama dan terlibat di dalam sekitar 70% proses eliminasi obat. Enzim pemetabolisme obat yang dikode oleh superfamili gen sitokrom P450(CYP) berperan pada > 75% proses metabolisme obat fase 1 di hati dan oleh karenanya merupakan modulator utama respons obat. Selain itu, gen CYP merupakan gen yang sangat polimorfik di antara individu maupun lintas populasi dan dapat memiliki implikasi yang penting bagi proses biotransformasi dan/atau detoksifikasi obat (Lauschke et al., 2017).

*Biomarker* farmakogenomik yang dapat memprediksi respons terhadap suatu pengobatan, menjadi hal yang menjanjikan dan berpotensi besar dalam rangka pengembangan molekuler diagnostik pada praktik klinis. *Biomarker* tersebut berguna sebagai pedoman dalam membedakan *biomarker germline* yang dapat mempengaruhi farmakokinetik dan farmakodinamik obat secara sistemik, maupun *biomarker* dalam genom kanker somatik yang memodulasi respons sel kanker terhadap suatu obat. Variasi genetik pada gen yang menyandi protein penting atau dikenal dengan “farmakogen” yang menentukan respons obat dan risiko ADR, bisa mengakibatkan beberapa hal di antaranya:

1. Paparan obat yang terlalu tinggi atau terlalu rendah;
2. Peningkatan pembentukan metabolik toksik;
3. Peningkatan atau penurunan interaksi dengan target obat;
4. Aktivasi sistem imun tubuh yang selanjutnya dapat mengakibatkan toksisitas obat yang bersifat idiosinkratik.

Peran farmakogen pada variabilitas respons pengobatan dan risiko timbulnya toksisitas dijelaskan dengan Gambar 17 (Lauschke et al., 2017).





Gambar 17 Ilustrasi kemungkinan efek variasi genetik pada Farmakogen (Lauschke et al., 2017)

Mutasi pada gen penyandi protein yang terkait proses absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi obat (ADME) dapat berpengaruh pada paparan obat. Gambar 17(a) mengilustrasikan bahwa untuk obat/senyawa induk (*parent compound*) yang aktif secara farmakologis (heksagon warna merah), adanya peningkatan fungsi alel dapat mengakibatkan penurunan paparan dan efikasi obat karena terjadi peningkatan proses inaktivasi senyawa tersebut menjadi metabolit inaktif (heksagon warna hitam). Salah satu contoh di klinis yang relevan adalah peningkatan inaktivasi metabolik Omeprazole pada pasien dengan peningkatan fungsi alel CYP2C19\*17 selama terapi eradikasi *Helicobacter pylori*.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Sebaliknya, alel dengan penurunan fungsi akan menurunkan eliminasi obat dan meningkatkan paparan pada obat tersebut. Hal ini akan meningkatkan risiko timbulnya toksisitas seperti yang ditunjukkan pada terjadinya peningkatan komplikasi perdarahan pada pasien dengan defisiensi enzim CYP2C9 yang mendapatkan terapi warifarin dosis standar. Gambar 17(b) menunjukkan kondisi sebaliknya, bila senyawa yang diberikan pada pasien merupakan *prodrug* (lingkaran berwarna hitam), alel dengan peningkatan fungsi akan meningkatkan pembentukan metabolit aktif (lingkaran merah) yang mengakibatkan tingkat paparan obat lebih tinggi sehingga meningkatkan potensi terjadinya risiko toksisitas. Salah satu contoh kasus golongan ini adalah keracunan morfin pada pasien dengan multiplikasi alel aktif CYP2D6 yang mendapatkan pengobatan kodein. Di sisi lain, berkurangnya proses aktivasi metabolik dari suatu *prodrug*, umumnya mengakibatkan penurunan efikasi obat jenis *prodrug* tersebut. Contoh dari kasus ini adalah penurunan efek analgesia dengan pemberian kodein, pada pasien dengan penurunan fungsi enzim pemetabolisme CYP2D6 atau kegagalan respons terapi Clopidogrel pada pasien dengan penurunan aktivitas enzim CYP2C19. Sejumlah obat hanya dapat berikatan dengan protein target yang membawa varian tertentu, khususnya di bidang onkologi yang terlihat di Gambar 17(c). Selain itu, selama proses pengobatan di bidang onkologis, target obat sering bermutasi sehingga mengakibatkan berkurangnya respons terhadap pengobatan yang sebelumnya menunjukkan efikasi yang tinggi. Hal ini tampak pada Gambar 17(d) (Lauschke et al., 2017).

Tujuan individualisasi terapi adalah untuk memberikan pengobatan pada pasien secara individual dan memprediksi perbedaan hasil klinis pengobatan yang mungkin

Buku ini tidak diperjualbelikan.



timbul pada pasien yang berbeda. Farmakogenomik merupakan salah satu elemen inti dalam individualisasi terapi. Konsep dasar individualisasi terapi adalah adanya variabilitas interindividual terkait respons pengobatan yang merupakan konsekuensi dari berbagai faktor, termasuk faktor genomik, epigenomik, lingkungan dan karakteristik pasien (jenis kelamin, usia dan/atau obat-obatan lain yang diberikan secara bersamaan. Sejak tiga puluh tahun yang lalu, diketahui bahwa respons pengobatan dipengaruhi oleh polimorfisme genetik pada enzim pemetabolisme obat (misalnya sitokrom P450 2D6 dengan tiopurin S-metiltransferase). Farmakogenomik dalam beberapa tahun terakhir telah menggunakan teknologi generasi baru yang dikenal sebagai pendekatan “omics”. Pendekatan tersebut telah membawa revolusi dalam pemahaman terkait kerentanan dan patofisiologi penyakit sehingga berpotensi besar pada pengembangan strategi terapi yang baru (Schwab & Schaeffeler, 2012).

*Precision medicine* yang terkait prinsip individualisasi terapi memiliki tujuan akhir untuk memberikan setiap intervensi terapeutik secara tepat sesuai profil molekuler pasien. Selama dua dekade terakhir, studi tentang genetik manusia telah didorong dengan adanya kemajuan yang pesat dari teknik *sequencing* yang mutakhir. Kemajuan ini mengarahkan pada pemahaman yang lebih mendalam terkait hubungan antara variasi genetik dengan kesehatan manusia. Studi tentang genetika telah banyak diterapkan untuk mendukung *precision medicine*. Salah satu aplikasi yang utama adalah farmakoterapi berdasarkan data farmakogenomik untuk memberi pedoman pemilihan obat dan dosis sesuai dengan fitur genetik pasien. Saat ini, variasi farmakogenomik memiliki peran penting dalam memprediksi efikasi dan *safety* pengobatan. Namun, penerapan farmakogenomik dalam

Buku ini tidak diperjualbelikan.



praktik klinis masih terbatas. Hal ini disebabkan berbagai tantangan yang telah diidentifikasi, mulai dari tahap penelitian farmakogenomik dasar hingga implementasinya (Cecchin & Stocco, 2020).

Meskipun peran besar pendekatan farmakogenomik dalam mengoptimalkan efikasi obat dan *safety* pengobatan telah dipercaya dan mendorong tersusunnya pedoman pengobatan oleh Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) dan Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG), namun aplikasinya di dalam praktik klinis masih terbatas. Chenoweth et al. (2020) telah mengidentifikasi dan menguraikan sepuluh jenis tantangan yang mempengaruhi keterbatasan aplikasi *genomics* untuk pedoman *precision medicine* secara luas. Tantangan tersebut diuraikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Sepuluh tantangan yang saat ini telah teridentifikasi dan mengakibatkan keterbatasan aplikasi farmakogenomik di praktik klinis secara luas (Chenoweth et al., 2020)

Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
#1 Terbatasnya <i>Global network</i> yang terdiri dari para ahli untuk membantu mendorong penelitian farmakogenomik dasar dan implementasinya di klinis	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="542 979 956 1145">▪ Menciptakan <i>Global network</i> farmakogenomik yang terdiri dari peneliti, dokter, pasien yang representatif, dan profesional lainnya dari akademisi, pemerintah, maupun pihak industri</li> <li data-bbox="542 1150 956 1316">▪ Tujuan dari <i>Global network</i> ini adalah untuk meningkatkan penelitian dan aplikasi farmakogenomik, baik pada negara maju maupun negara yang masih memiliki keterbatasan sumber daya</li> <li data-bbox="542 1321 956 1428">▪ Memberikan akses anggota <i>Global network</i> pada konsorsium yang ada maupun konsorsium baru, akses pada <i>database</i> dan</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
	<p>menyelenggarakan pertemuan rutin.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Membuat daftar standar kualitas data dan implementasinya dalam rangka meningkatkan penerapan uji farmakogenomik di praktik klinis</li> <li>▪ Mempertimbangkan sponsorship maupun kemitraan dengan industri, organisasi yang berwenang menentukan pedoman nasional, badan regulator, dan atau masyarakat ilmiah dalam rangka menyediakan infrastruktur yang diperlukan untuk menunjang aktivitas <i>Global network</i> tersebut sekaligus memastikan keterlibatan semua pihak secara langsung</li> <li>▪ Meningkatkan visibilitas farmakogenomik di dalam area/bidang ilmu genomik manusia</li> </ul>
<p>2. Pemahaman mekanistik tentang fenotip farmakogenomik terhambat oleh minimalnya bio-sampel dan <i>database</i> skala luas yang tersedia</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meningkatkan ketersediaan <i>database</i> yang dapat diakses secara umum dan mencakup kepatuhan obat, dosis, obat-obatan yang diberikan secara bersamaan (<i>concomitant drugs</i>), informasi fenotipik sebelum dan sesudah penggunaan obat pada pasien dari berbagai kelompok etnis, khususnya di luar Eropa</li> <li>▪ Pengumpulan sampel yang besar dari individu, meliputi DNA, RNA, miRNA, metabolit endogen, dan penilaian kinetik sehingga memungkinkan penelitian dengan pendekatan “omics” secara komprehensif</li> <li>▪ Penyusunan dan pemisahan sampel pada bank sampel farmakogenomik dengan mempertimbangkan penyimpanan yang tepat terkait sampel darah dan urine dari individu berbagai kelompok etnis,</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
	<p>individu yang mengonsumsi obat maupun individu kontrol</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mempertimbangkan pengumpulan data dari pasien secara <i>real-world</i> untuk melengkapi penelitian farmakogenomik</li> </ul>
<p>#3 Dibandingkan dengan varian genetik yang umum, pemahaman tentang dampak dan implikasi klinis dari varian genetik yang langka masih minimal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Melakukan studi pada populasi umum dan populasi tertentu dengan tingkat kekerabatan yang tinggi dengan kemungkinan lebih besar untuk memiliki variasi genetik homozigot yang langka.</li> <li>▪ Menyediakan sampel yang cukup besar (meliputi darah, urine dan jaringan) serta mengoptimalkan metode untuk mengidentifikasi pengaruhnya pada fungsional dan dampak klinis dari varian genetik yang langka maupun varian genetik umum secara bersamaan.</li> <li>▪ Menggunakan pendekatan <i>multi-omics</i> untuk menilai konsekuensi fungsional secara <i>in vivo</i> dengan lebih baik.</li> <li>▪ Menggunakan pendekatan <i>multi-machine learning</i> dalam rangka meningkatkan prediksi fungsional dari varian langka, khususnya dimulai dengan farmakogen yang penting</li> <li>▪ Menggunakan pendekatan eksperimental yang inovatif untuk menguji konsekuensi mekanistik dari varian yang jarang secara <i>in vitro</i></li> </ul>
<p>#4 Kurangnya pemanfaatan model untuk memahami variasi farmakogenomik</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Menggunakan model <i>knock-out</i>, <i>knock-in</i> dan <i>humanized rhodent</i> untuk memahami variasi fungsional, termasuk mengidentifikasi peran fisiologis dan farmakologis dari <i>transporter</i> dan enzim</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mempertimbangkan penggunaan <i>humanized mouse model</i> sebagai sarana untuk meningkatkan studi farmakologi, terutama saat spesifitas ligan yang dikode protein dapat berbeda yang ditentukan oleh spesies</li> <li>▪ Meneliti pengaruh varian genetik yang spesifik terhadap sel dan organ dengan menggunakan hewan model</li> <li>▪ Menggunakan tumor xenograft model dari jaringan pasien untuk mengetahui variasi farmakogenomik pada berbagai jenis kanker</li> </ul>
<p>#5 Pemanfaatan <i>biomarker</i> yang telah tervalidasi masih relatif minimal untuk meningkatkan penemuan dan aplikasi farmakogenomik</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Merekrut populasi yang belum pernah terpapar obat untuk mempelajari dan memvalidasi <i>biomarker</i> tertentu sebagai pengganti uji genotip, terutama ketika pengujian genotip tidak tersedia</li> <li>▪ Melakukan <i>genome-wide association study</i> di tingkat obat dan metabolit untuk mengidentifikasi <i>predictor</i> respons pengobatan</li> <li>▪ Meneliti metabolit endogen untuk meningkatkan pemahaman terkait fungsi enzim dan <i>transporter</i></li> <li>▪ Menyusun serangkaian kriteria untuk menentukan <i>biomarker</i> yang spesifik dan valid untuk gen tertentu</li> <li>▪ Menentukan pemanfaatan relatif pengujian farmakogenomik dibandingkan penilaian <i>biomarker</i> dengan tetap <i>mempertimbangkan</i> penyakit, keadaan klinis, pemilihan pengobatan, dosis dan kepatuhan terhadap pengobatan</li> <li>▪ Menggunakan <i>biomarker</i> yang terukur untuk menentukan kontribusi relatif dari genetik dan</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
<p>#6 Studi terkait populasi yang istimewa dan beragam masih minimal</p>	<p>lingkungan terhadap variasi fungsional</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meneliti variasi genom di berbagai populasi di dunia untuk mengoptimalkan kekuatan penemuan genetik, meningkatkan relevansi klinis dan memastikan kesesuaian serta aksesibilitas farmakogenomik</li> <li>▪ Mengembangkan algoritma farmakogenomik sebagai pedoman terapi dengan mempertimbangkan perbedaan populasi dalam frekuensi alel dan variasi fungsional</li> <li>▪ Mendukung kapasitas penelitian farmakogenomik lokal di negara-negara berkembang melalui inisiatif pelatihan dari negara yang maju seperti <i>Western countries</i></li> <li>▪ Memastikan populasi yang beragam dan spesifik memperoleh kebermanfaatan dari penelitian yang dilakukan dan menghindari kesenjangan lebih lanjut.</li> <li>▪ Memanfaatkan <i>machine learning</i> untuk meningkatkan prediksi varian fungsional guna mengurangi tingkat ketergantungan dengan studi di <i>setting</i> klinis</li> <li>▪ Mempertimbangkan populasi khusus (seperti anak-anak dan lansia) untuk memahami kontribusi variasi genetik dan faktor non-genetik (perkembangan dan penyakit komorbid) terhadap timbulnya variabilitas ekspresi dan fungsi farmakogen di antara individu</li> </ul>
<p>#7 Banyak studi farmakogenomik yang tidak terstandarisasi</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Berkolaborasi secara erat dengan industri teknologi medis untuk mendorong terciptanya tes farmakogenomik yang andal dan</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
sehingga membatasi penggunaannya di klinis	<p data-bbox="542 188 921 236">terjangkau dengan standar yang diakui secara universal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="506 242 921 437">▪ Edukasi kepada produsen/manufaktur penyedia pengujian mengenai kompleksitas identifikasi varian farmakogen karena adanya pseudogen, <i>copy number variant</i>, dan variasi struktural</li> <li data-bbox="506 443 921 603">▪ Untuk farmakogen, diperlukan optimalisasi penggunaan <i>whole genome sequence</i> dibandingkan identifikasi varian secara tepat pada area gen yang mengandung varian tersebut</li> <li data-bbox="506 609 921 689">▪ Mengidentifikasi skenario di mana <i>haplotyping sequence</i> spesifik akan berguna</li> <li data-bbox="506 695 921 775">▪ Membuat standar laboratorium untuk menjamin sumber dan kualitas DNA</li> <li data-bbox="506 782 921 916">▪ Melakukan pengujian farmakogenomik dengan waktu penyelesaian yang cepat untuk meningkatkan kegunaannya sebagai pedoman pengobatan di rumah sakit</li> <li data-bbox="506 922 921 1082">▪ Membuat serangkaian pedoman sebagai pendukung keputusan klinis dan melatih praktisi di layanan kesehatan untuk mengelola dan menginterpretasikan hasil pengujian farmakogenomik</li> <li data-bbox="506 1088 921 1311">▪ Mengembangkan infrastruktur untuk secara langsung menghubungkan hasil uji genetik dengan <i>database</i> rekam medik elektronik yang tersedia secara longitudinal serta memastikan adanya perlindungan dan keamanan data</li> <li data-bbox="506 1318 921 1425">▪ Meningkatkan implementasi dan aksesibilitas uji farmakogenetik-farmakogenomik dengan cara memastikan biaya uji tersebut ter-</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
<p>#8 Keberhasilan implementasi farmakogenomik secara luas masih terbatas karena kurangnya bukti kegunaannya secara klinis dan masih minimnya penelitian tentang <i>cost-effectiveness</i></p>	<p><i>cover</i> oleh kementerian kesehatan atau pihak asuransi</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mengembangkan standar peraturan yang seragam untuk pengujian farmakogenomik untuk memastikan pengujian tersebut dapat diterima secara universal</li> <li>▪ Membentuk tim multidisiplin yang terdiri dari pimpinan medis, ilmuwan, teknisi laboratorium dan apoteker</li> <li>▪ Mempromosikan pembelajaran sistem kesehatan melalui uji coba implementasi prospektif berbasis empiris</li> <li>▪ Mendorong sistem kesehatan untuk menjadi pengguna awal (inisiator) implementasi farmakogenomik</li> <li>▪ Mengembangkan model ekonomi kesehatan untuk menunjukkan efektivitas biaya implementasi farmakogenomik</li> <li>▪ Meningkatkan penggunaan rekam medis elektronik, melalui: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Memperkenalkan fenotip terstandar dan menyelaraskan pelaporan data</li> <li>- Menyertakan data tindak lanjut yang relevan</li> <li>- Mempertimbangkan pengembangan dan penerapan sistem berbasis peringatan (<i>alert-based system</i>) yang dapat dicari berdasarkan nama obat atau gen. Hal ini dimungkinkan untuk dioptimalkan dengan <i>machine-learning approaches</i></li> <li>- Memperbaharui pedoman/pendukung keputusan klinis seiring dengan tersedianya lebih banyak informasi mengenai konsekuensi dari varian fungsional</li> </ul> </li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
<p>#9 Inisiatif terkait pendidikan-pelatihan dan upaya advokasi diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan implementasi farmakogenomik</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menyediakan dukungan, misalnya melalui tersedianya koordinator penelitian klinis yang berkolaborasi dengan penyedia layanan kesehatan untuk mengurangi beban waktu dalam menginput informasi</li> <li>▪ Mengembangkan materi pendidikan dan program pelatihan mengenai manfaat kesehatan dan ekonomi dari penerapan pengobatan berdasarkan pedoman genomik</li> <li>▪ Memberikan pemahaman kepada semua pihak yang relevan seperti pasien, penyedia layanan kesehatan, kementerian kesehatan, pihak asuransi, dll terkait manfaat penerapan farmakogenomik berbasis data uji klinik fase IV dan bukti-bukti pasca penerapan farmakogenomik</li> <li>▪ Memberikan pemahaman kepada <i>stakeholder</i> terkait sulitnya pembuktian bahwa intervensi farmakogenomik berhasil meningkatkan perawatan kesehatan yang lebih baik. Hal ini karena: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Klinis pasien dengan pengobatan umumnya akan membaik seiring dengan berjalannya waktu</li> <li>- Pengujian farmakogenomik pada kelompok kontrol (individu sehat) sebagai pembanding tidak semua dimungkinkan untuk dilakukan karena terkendala isu etik</li> <li>- Tidak dimungkinkan untuk melacak semua Tindakan preventisi yang telah dilakukan sebelumnya terkait respons pengobatan yang buruk</li> </ul> </li> <li>▪ Berfokus pada kebutuhan yang belum terpenuhi dengan menekankan tingginya prevalensi</li> </ul>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Tantangan	Strategi untuk Mengatasi Tantangan
<p>#10 Ambang batas (<i>threshold</i>) kemampuan Tindakan klinis berdasarkan tes DNA bebas sel masih belum dipahami sepenuhnya</p>	<p>variasi farmakogenomik yang dapat ditindaklanjuti dalam konteks pola persepan dan penggunaan obat saat ini</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Meneliti potensi tes DNA bebas sel, termasuk mengenai mekanisme epigenetik (metilasi DNA), sebagai komplementer dari tes DNA <i>germline</i></li> <li>▪ Menentukan ambang batas (<i>threshold</i>) tingkat mutasi pada pembacaan DNA bebas sel untuk mempertimbangkan feasibilitas integrasinya dengan praktik klinis</li> <li>▪ Mempertimbangkan muatan antigen tumor dengan muatan mutasi untuk mengoptimalkan terapi berbasis imun pada kanker</li> <li>▪ Menentukan cara membedakan DNA normal dengan DNA tumor</li> <li>▪ Optimalisasi dan prediksi fungsional dari klon minor</li> </ul>

Selain itu, studi tentang varian genetik langka yang terabaikan dan adanya validasi fungsi maupun implikasi klinisnya melalui pengembangan model pra-klinis dan in-silico diperlukan untuk meningkatkan pemahaman terkait farmakogenomik. Sejalan dengan hal tersebut, saat ini telah terdapat upaya kolaborasi internasional yang terkoordinasi dan dibentuk dalam rangka mengatasi tantangan yang ada terkait penerapan farmakogenomik. Hal ini akan memberikan wawasan baru dan juga menyediakan alat mutakhir yang menunjang penerapan farmakogenomik klinis sehingga membuka peluang adopsi farmakogenomik secara lebih luas (Cecchin & Stocco, 2020).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Referensi

- Cecchin, E., & Stocco, G. (2020). Pharmacogenomics and Personalized Medicine. *Genes (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/genes11060679>
- Chenoweth, M. J., Giacomini, K. M., Pirmohamed, M., Hill, S. L., van Schaik, R. H., Schwab, M., Shuldiner, A. R., Relling, M. V., & Tyndale, R. F. (2020). Global pharmacogenomics within precision medicine: challenges and opportunities. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(1), 57-61.
- Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M., & Evans, W. E. (2006). Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, 57, 119-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.082103.104724>
- Hicks, J. K., & McLeod, H. L. (2017). Pharmacogenetics and pharmacogenomics. In *Genomic and Precision Medicine* (pp. 89-107). *Elsevier*.
- Johnson, J. A. (2003). Pharmacogenetics: potential for individualized drug therapy through genetics. *Trends Genet*, 19(11), 660-666. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.008>
- Lauschke, V. M., Milani, L., & Ingelman-Sundberg, M. (2017). Pharmacogenomic *Biomarkers* for Improved Drug Therapy-Recent Progress and Future Developments. *Aaps j*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0161-x>
- Schwab, M., & Schaeffeler, E. (2012). Pharmacogenomics: a key component of personalized therapy. In (Vol. 4, pp. 1-3): *BioMed Central*.



# BAB IV

## FARMAKOGENOMIK- FARMAKOGENETIK DAN PRINSIP INDIVIDUALISASI TERAPI PADA HEPATITIS B KRONIS

### A. Hepatitis B

#### 1. Definisi dan Epidemiologi

Infeksi virus hepatitis B (HBV) kronis merupakan masalah kesehatan utama di dunia. Penyakit ini dapat menyebabkan fibrosis hati progresif yang mengakibatkan sirosis dan gagal hati stadium akhir serta meningkatkan risiko karsinoma hepatoseluler (Lee et al., 2020). Selain itu, infeksi HBV masih menjadi perhatian secara global karena dapat progresif ke arah hepatitis akut-kronis, gagal hati dan memicu morbiditas (kematian) (Guvener & Arıkan, 2020).

HBV adalah virus DNA *double strand* yang memiliki *envelope* (selubung) dan merupakan famili Hepadnaviridae. Virus ini menginfeksi hepatosit, membentuk siklus replikasi dan bertahan di dalam nukleus. Virion HBV memiliki struktur *spheris* yang

berbasis lipid di mana ketiga protein *envelope* virus (kecil, sedang dan besar) terekspose. Protein *envelope* besar, yang mengandung domain pengikat reseptor, terlibat dalam menentukan proses masuknya virus ke dalam sitoplasma melalui endositosis yang dimediasi reseptor via reseptor natrium taurokolat *co-transporter* polipeptida (NTCP) di membran hepatosit (Lee et al., 2020).

Sekitar 240 juta orang secara persisten terinfeksi HBV sehingga menjadikan HBV sebagai salah satu virus patogen yang paling berbahaya bagi manusia dan menjadi permasalahan kesehatan tersendiri bagi masyarakat global (Tacke & Kroy, 2016). Laporan Hepatitis WHO tahun 2017 menunjukkan bahwa pada tahun 2015, infeksi kronis Hepatitis B dan Hepatitis C (HBV dan HCV) terkait dengan 96% dari 1,3 juta kematian yang disebabkan oleh virus hepatitis di seluruh dunia dan 720.000 di antaranya terjadi di tahap sirosis (WHO, 2017). Pada tahun 2019 di dunia terdapat 296 juta *carrier* HBV dengan mortalitas 820.000 per tahun yang terkait dengan komplikasi sirosis dan karsinoma hepatoseluler (Teo & Lok, 2022). HBV termasuk patogen yang sangat infeksius dan ditularkan melalui darah. Tingginya kronisitas HBV beserta komplikasi hepatic maupun ekstrahepatic yang ditimbulkannya menjadikan infeksi HBV sebagai target global untuk dieliminasi dan juga termasuk di dalam *sustained development goals* (SDGs) yang dicanangkan WHO (Raslan et al., 2022).

Angka infeksi HBV Asia Pasifik tergolong tinggi, dan 74% kematian global akibat karsinoma hepatoseluler (HCC) terjadi di Asia (Wait et al., 2016).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Data Riskesdas 2013 menunjukkan prevalensi HBsAg positif di Indonesia mencapai 7,1% dengan sampel 40.791 penduduk dari 33 provinsi sehingga Indonesia tergolong endemis intermediate HBV (Muljono, 2017). Selain itu, di Indonesia diperkirakan angka pengidap Hepatitis B pada populasi sehat mencapai 4-23% dengan proporsi di luar Pulau Jawa yang lebih tinggi dibandingkan di Pulau Jawa dan secara genotip sebagian besar virus Hepatitis B di Indonesia tergolong genotip B (66%), C (26%), D (7%) dan A (0,8%) (Gani et al., 2012).

Beban global infeksi Hepatitis B kronis tidak terdistribusi secara merata di seluruh wilayah di dunia. Insiden infeksi tersebut tinggi di Afrika dan Asia. Tingginya prevalensi infeksi virus Hepatitis B (HBV) dan virus Hepatitis C (HCV) yang endemi disebabkan oleh infeksi persisten. Infeksi HBV menyebabkan beban penyakit yang lebih besar di banyak negara berkembang. Vaksin yang aman dan efektif telah tersedia sejak tahun 1980an, namun strategi vaksinasi berbeda dari satu negara dengan negara lain karena perbedaan prioritas dan alokasi pembiayaan program vaksinasi sehingga pencegahan infeksi HBV masih menjadi tantangan yang besar, terutama bagi negara berkembang (Zhao et al., 2020), termasuk Indonesia.

## 2. Terapi Hepatitis B

Tujuan primer dari terapi infeksi HBV adalah menekan replikasi virus untuk mencegah progresivitas penyakit dan meningkatkan *survival rate* serta usia harapan hidup melalui upaya untuk menekan angka kematian karena karsinoma hepatoseluler, transplantasi hati, memperlambat progresivitas penyakit hati menjadi



fibrosis dan sirosis hati (Guvenir & Arikan, 2020; Lee et al., 2020; Tacke & Kroy, 2016).

Tujuan terapeutik dari pengobatan HBV dengan antivirus terbaru berfokus pada respons virologi dan biokimia terkait dengan perbaikan luaran klinis (Lee et al., 2020). Berdasarkan rekomendasi dari American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), European Association for the Study of Liver (EASL), dan Asian Pacific Association for the study of liver (APASL), tes evaluasi untuk menentukan indikasi terapi HBV meliputi kadar DNA HBV serum kuantitatif, kadar alanine aminotransferase (ALT) dan/atau tingkat keparahan histologis. Sementara itu, penilaian klinis untuk memantau respons pengobatan memerlukan penekanan berkelanjutan terhadap replikasi HBV, remisi biokimia, perbaikan histologis, hilangnya atau serokonversi HBeAg / HBsAg (antigen permukaan virus Hepatitis B) pada pasien dengan HBeAg (+) dan hilangnya atau serokonversi HBsAg pada pasien dengan HBeAg (-) (Lin & Kao, 2013).

Respons virologi selama terapi dengan nucleos(t)ide analog didefinisikan sebagai DNA HBV tidak terdeteksi dalam darah berdasarkan pengujian dengan nilai ambang batas bawah deteksi 10-20 IU/mL. Untuk terapi berbasis IFN, respons virologi didefinisikan sebagai kadar DNA HBV serum di bawah 2000 IU/mL yang dinilai pada saat 6 bulan setelah dimulainya terapi dan pada akhir selesainya terapi. Respons biokimia didefinisikan sebagai normalisasi serum alanin aminotransferase. Normalisasi alanin aminotransferase disertai penurunan *viral load* HBV merupakan tujuan penting yang ingin dicapai pada

Buku ini tidak diperjualbelikan.



tatalaksana HBV. Namun, tatalaksana tersebut umumnya tidak menjanjikan penyembuhan secara fungsional dari penyakit hepatitis B kronis yang merupakan tujuan ideal yang ingin dicapai dengan pemberian pengobatan antivirus (Lee et al., 2020).

Saat ini telah terdapat 7 *approved drug* untuk infeksi HBV, yaitu dua formulasi interferon yang terdiri dari interferon standar (IFN-standar) dan pegylated interferon (Peg-IFN) serta lima nucleos(t)ide analogs (NA) yang terdiri dari lamivudine (LAM), telbivudine, entecavir (ETV), adefovir (ADV), dan tenofovir (TDF) (Guvener & Arikan, 2020). Guidelines terapi merekomendasikan interferon standar (IFN-standar) atau imunomodulator Peg-IFN $\alpha$  atau nucleos(t)ide analogs seperti LAM, ADV, ETV, TDF atau telbivudine sebagai pilihan terapi untuk pasien hepatitis B kronis (Manzoor et al., 2015). Ketujuh jenis *approved drug* untuk infeksi HBV tersebut diuraikan secara rinci sebagai berikut:

**a. Interferon Standar (IFN-Standar)**

IFN-standar merupakan agen antivirus pertama yang disetujui untuk hepatitis B kronis. Agen ini menginduksi efek antivirus secara ganda, yaitu melalui degradasi *messenger RNA* (mRNA) virus untuk menghambat sintesis protein sekaligus melalui peningkatan aktivitas *natural killer cells* (sel NK) dan sel T sitotoksik dari *host*. Mekanisme respons IFN- $\alpha$  pada pasien HBeAg (+) dan HBeAg (-) berbeda. Untuk pasien dengan HBeAg (+), IFN- $\alpha$  menginduksi penurunan replikasi HBV secara dini dan peningkatan kadar ALT serum di kemudian hari (sekitar 2 bulan kemudian).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Dengan demikian, serokonversi HBeAg dapat dicapai, setelah kambuhnya hepatitis (flare-up hepatitis), sebelum atau dalam waktu 6 bulan setelah terapi IFN- $\alpha$  berakhir. Namun, pasien Hepatitis B kronis dengan HBeAg (-) ditemukan adanya replikasi DNA HBV yang dipicu respons imunitas anti-HBe. Pada pasien tersebut, pengendalian infeksi HBV yang efisien dicapai melalui penekanan replikasi HBV yang berkelanjutan. Pada pasien HBeAg (-) yang diobati dengan IFN- $\alpha$  standar, kombinasi efek persisten normalisasi ALT serum dan penekanan DNA HBV serum yang diukur dengan tes non-PCR dicapai pada 10-47% pasien. Namun, kambuhnya virus terjadi pada sekitar setengah dari responden awal setelah penghentian pengobatan IFN (Lin & Kao, 2013).

**b. *Pegylated Interferon (Peg-IFN)***

Dengan adanya pengikatan polimer Peg *inert* ke IFN standar, Peg-IFN $\alpha$  menunjukkan waktu paruh yang lebih lama dibandingkan IFN- $\alpha$  standar. Pada pasien dengan HBeAg (+), monoterapi Peg-IFN $\alpha$ -2a dan -2b selama 1 tahun memberikan hasil (respons terapi) yang lebih baik. Serokonversi HBeAg, 6 bulan setelah penghentian terapi dengan Peg-IFN $\alpha$ -2a dan 2b, masing-masing terjadi pada 32% dan 29% pasien. Selain itu, serokonversi HBsAg dicapai pada 3-5% pasien dalam waktu 6 bulan setelah terapi. Untuk pasien HBeAg (-), penelitian multinasional skala besar terbaru melaporkan bahwa kombinasi respons dengan normalisasi ALT serum dan HBV < 400 copy/mL

Buku ini tidak diperjualbelikan.



DNA tercapai pada 15% pasien yang diobati selama 1 tahun dengan Peg-IFN $\alpha$ -2a, dan HBsAg *loss* ditemukan pada 4% pasien dalam waktu 6 bulan setelah terapi. Setelah *follow up* selama 4 tahun, 17% pasien HBeAg (-) mempunyai < 400 copy/mL DNA HBV yang dinilai dengan uji PCR. Selain itu, seroclearance HBsAg secara progresif meningkat menjadi 11%. Akumulasi berbagai data tersebut menunjukkan bahwa Peg-IFN $\alpha$  cenderung lebih unggul dibandingkan IFN- $\alpha$  standar untuk pengobatan Hepatitis B kronis, terlepas dari status HBeAg (Lin & Kao, 2013).

c. **Lamivudine (LAM)**

*Lamivudine* (LAM) termasuk golongan analog nukleotida yang bekerja pada tahap transkripsi balik dan DNA polimerase saat replikasi HBV (Sokal, 2002). LAM berperan dalam terminasi pemanjangan rantai DNA dengan berkompetisi dengan dCTP (*deoxycytidine triphosphate*) untuk berikatan dengan rantai DNA virus (Gani et al., 2012). Saat di dalam sel, *lamivudine* (2'-deoxy-3'-*thiacytidine*) akan dimetabolisme menjadi *lamivudine triphosphate* (L-TP) dan *lamivudine monophosphate* (L-MP), yang kedua bentuk tersebut akan menghambat sintesis DNA virus (Taylor et al., 2022). Sebuah studi *multi-center* di Cina menunjukkan angka serokonversi HBeAg meningkat seiring dengan durasi terapi LAM pada pasien dengan serum *baseline* ALT > 2x ULN (*Upper Limits of Normal*), di mana pada akhir tahun ketiga terdapat 65% pasien dan tahun kelima terdapat 77% pasien yang mencapai

Buku ini tidak diperjualbelikan.



serokonversi HBeAg. Selain itu, penelitian ini menunjukkan pasien yang tidak mengalami serokonversi tetap mengalami penurunan angka DNA HBV dan angka ALT yang rendah atau normal, di mana hal ini berkaitan dengan menurunnya progresivitas dari penyakit dan hasil yang lebih baik (Yao et al., 2009).

Namun, sebuah studi menunjukkan LAM memiliki angka resistensi virus yang tinggi apabila dibandingkan dengan analog nukleotida lainnya, terutama saat pemakaian jangka panjang (Xing et al., 2017). Pemakaian jangka panjang LAM terkait dengan resistensi virus yang ditandai dengan peningkatan replikasi virus pada pasien yang patuh terapi (Pallier et al., 2006). Insidensi resistensi LAM adalah 14-32% pada tahun pertama terapi, 38% setelah dua tahun terapi, dan 53-76% setelah 3 tahun (Lai et al., 2003). Mutasi utama LAM terletak di lokus YMMD dengan domain katalik gen polimerase HBV (rtM204I (YIDD), rtM204V (YVDD), rtM204S (YSDD)) yang dapat menyebabkan resistensi silang dengan kelompok L-nukleosida, seperti telbivudine (LDT) dan entecavir (ETV) (Pallier et al., 2006; Sarin et al., 2016). Meskipun demikian, LAM masih umum digunakan di banyak negara Asia dikarenakan menunjukkan keamanan yang jangka panjang dan biaya yang rendah (Sarin et al., 2016).

**d. *Telbivudine (LDT)***

*Telbivudine (LDT)* merupakan analog L-nukleosida thymidine yang bekerja dengan menghambat replikasi virus (Gani et al., 2012). LDT diaktifkan



terlebih dahulu melalui fosforilasi dan dimetabolisme menjadi derivat 5-trifosfat, yang kemudian berinteraksi dengan polimerase virus. Hal ini akan menghambat replikasi virus dan menterminasi rantai sintesis DNA. Berbeda dengan LAM yang menghambat sintesis DNA untai pertama (transkripsi balik RNA ke DNA), LDT lebih kuat menghambat rantai DNA untai kedua (transkripsi DNA ke DNA) (Amarapurkar, 2007). Pemakaian LDT menunjukkan serokonversi HBeAg yang lebih tinggi dibandingkan dengan analog nukleotida lainnya, yaitu LAM, adefovir (ADV), ETV, dan tenofovir (TDF) (Xing et al., 2017). LDT menunjukkan superioritas dibandingkan dengan LAM setelah dua tahun penggunaan baik pada pasien hepatitis B kronis dengan HBeAg positif maupun HBeAg negatif, termasuk superioritas dalam penurunan serum DNA HBV, angka PCR yang negatif, dan resistensi virus (Lai et al., 2007; Liaw et al., 2009). Namun, munculnya resistensi LDT membatasi penggunaannya dalam terapi. (Xing et al., 2017). Pada studi GLOBE, resistensi didapatkan pada 21,6% pada pasien HBeAG (+) dan 8,6% pada pasien HBeAg (-) pada akhir tahun kedua. Mutasi primer yang terkait resistensi LDT adalah mutasi rtM204I dan rtM 204V. Sehingga, resistensi LAM diasumsikan menimbulkan resistensi silang dengan LDT (Sarin et al., 2016).

e. **Entecavir (ETV)**

Entecavir (ETV) adalah analog 2-deoxyguanosine. Obat ini bekerja dengan menghambat replikasi



HBV melalui bentuk aktifnya, yaitu 5' - triposfat. Triposfat akan berkompetisi dengan substrat alami *deoxyguanosine-TP* melalui tiga langkah, yaitu *priming* DNA polimerase virus, transkripsi balik dari rantai DNA negatif, dan sintesis rantai DNA dependen (Cheng & Chang, 2008). Bersama dengan TDF, ETV termasuk salah satu obat anti-HBV yang paling efektif, diikuti dengan LDT, LAM, dan ADV. ETV dan TDF direkomendasikan sebagai lini pertama terapi pada orang dewasa dengan *immune-active* CHB sesuai dengan panduan di Eropa, Amerika, dan Asia Pasifik (Xing et al., 2017). ETV memiliki angka resistensi yang kecil atau jarang terjadi. Apabila dibandingkan dengan analog nukleotida lainnya, ETV membutuhkan mutasi yang multipel (Cheng & Chang, 2008; Yamada et al., 2017). Sebuah penelitian di Cina pada tahun 2011-2017 menunjukkan tingkat resistensi ETV di antara semua varian yang resisten terhadap HBV meningkat dari 6,04% menjadi 15,02%. Hal ini dikarenakan penggunaan LAM sebagai salah satu terapi yang umum digunakan di Cina, di mana obat ini memiliki barrier resistensi yang rendah (Shang et al., 2021). Adanya mutasi LAM akan meningkatkan risiko terjadinya resistensi ETV (Fung et al., 2011; Shang et al., 2021). Mutasi yang terjadi pada ETV antara lain *rtM204V* dan *rtL180M* yang juga menyebabkan resistensi LAM, ditambah dengan mutasi *rtI169T*, *rtT184G*, *rtS202I*, atau *rtM250V* (Fung et al., 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan *monitoring* terhadap resistensi ETV (Shang et al., 2021).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



**f. Adefovir (ADV)**

Adefovir dipivoxil (ADV) termasuk analog adenosine monophosphate. ADV akan memutus rantai DNA HBV dengan berkompetisi dengan nukleotida cAMP, serta menghambat polimerase dan transkripsi balik (Gani et al., 2012). ADV termasuk obat yang kurang efektif apabila dibandingkan dengan LAM, LDT, ETV, dan TDF (Xing et al., 2017). Laju penekanan virus dengan ADV relatif lambat. Resistensi yang terjadi pada ADV disebabkan mutasi pada rtA181V/T, rtN236T, dan rtI233V. ADV dikaitkan dengan dose-dependent nefrotoksitas, di mana penggunaan ADV pada pasien CHB adalah dosis rendah. Dosis yang digunakan adalah 10 mg yang merupakan dosis suboptimal (Fung et al., 2011).

**g. Tenofovir (TDF)**

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) adalah prekursor tenofovir yang termasuk analog nukleotida (Gani et al., 2012). Obat ini bekerja dengan berkompetensi dengan *deoxyadenosine 5'-triphosphate*. Saat berhasil masuk ke dalam DNA polimerase dari virus, obat ini akan menterminasi rantai DNA (Fung et al., 2011). TDF termasuk salah satu obat anti-HBV yang paling efektif dan direkomendasikan sebagai lini pertama selain ETV. Sebuah *network meta-analysis* mengindikasikan bahwa TDF memiliki tingkat serokonversi HBeAg yang tinggi setelah LDT (Xing et al., 2017). TDF menunjukkan superioritas jika dibandingkan dengan ADV dalam kemampuan menekan DNA HBV, serokonversi HBeAg, dan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



normalisasi ALT. TDF memiliki barier resistensi yang tinggi sehingga angka kejadian resistensi pada TDF sangat kecil (Fung et al., 2011).

## **B. Farmakogenomik-Farmakogenetik dan Prinsip Individualisasi Terapi Hepatitis B**

Meskipun telah terdapat vaksin dan strategi pengobatan yang efektif untuk tatalaksana hepatitis B, namun infeksi HBV masih persisten dan menjadi masalah kesehatan di seluruh dunia, terutama progresif ke arah gagal hati akut, permanen dan karsinoma hepatoseluler dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Guvenir & Arikan, 2020).

Pengobatan direkomendasikan untuk pasien Hepatitis B aktif yang terdeteksi antigen e virus Hepatitis B (HBeAg) atau DNA virus Hepatitis B (HBV) positif serta terdapat peningkatan kadar alanine aminotransferase (ALT). Terapi dengan interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) selama 4-6 bulan telah terbukti menginduksi remisi berkelanjutan dan jangka panjang pada 25-40% pasien Hepatitis B kronis. Selain itu, pemberian *lamivudine* selama 1 tahun juga menghasilkan respons remisi serupa. Namun, pertanyaan yang masih belum terselesaikan yaitu, mengapa hanya pasien dengan persentase tertentu yang berespons baik dengan terapi tersebut (King et al., 2002).

Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) merupakan obat lini pertama untuk hepatitis B karena aktivitas antivirus dan imunomodulatornya. Namun, keberhasilan respons terapi hanya terjadi pada 25-50% pasien Hepatitis B kronis yang mendapatkan pengobatan IFN $\alpha$  selama 4-6 bulan. Mengingat durasi terapi yang panjang dan efek samping dan biaya yang tinggi pada pengobatan dengan IFN $\alpha$ ,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



maka prediksi respons terapi yang akurat sebelum dimulainya pengobatan menjadi hal yang penting (Wu et al., 2009). Penelitian melaporkan bahwa pada pasien Hepatitis B kronis dengan HBeAg (+) terdapat beberapa prediktor utama yang terkait dengan respons yang baik terhadap terapi IFN, di antaranya, kadar alanine aminotransferase (ALT) yang tinggi ( $> 200$  U/L), kadar DNA HBV di serum yang rendah ( $< 100$  pg/mL), jenis kelamin perempuan, dan aktif fibrosis pada biopsi spesimen hati (King et al., 2002). Namun, mekanisme biologis yang mendasari variasi respons terhadap IFN belum sepenuhnya dipahami. Dengan kemajuan farmakogenomik, terdapat berbagai bukti penelitian yang menunjukkan bahwa *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) pada gen yang mengekspresikan enzim pemetabolisme obat, berhubungan erat dengan metabolisme dan efikasi pengobatan (Wu et al., 2009). Beberapa SNP tersebut diuraikan sebagai berikut:

### **1. Farmakogenomik-Farmakogenetik Gen IL28B dan Prinsip Individualisasi Terapi Hepatitis B**

Beberapa SNPs pada interleukin-28B (IL28B) termasuk genotip CC rs12979860 dan genotip TT rs8099917 dikaitkan dengan tingkat respons yang tinggi dalam pengobatan berbasis Peg-IFN untuk pasien Hepatitis C kronis (Tseng et al., 2011). Beberapa penelitian juga telah melaporkan adanya hubungan antara SNPs yang berlokasi pada atau di dekat gen IL28B dan *sustained virological response rate* (SVR) dengan pengobatan pegylated interferon (Peg-IFN) dan ribavirin (RBV) pada pasien Hepatitis C kronis. Penelitian lainnya mengonfirmasi hubungan antara polimorfisme gen IL28B dengan *clearance* spontan dari

Buku ini tidak diperjualbelikan.



virus Hepatitis C (HCV). Polimorfisme ini juga menjelaskan adanya peran perbedaan ras dalam tingkat SVR pada pengobatan Peg-IFN/RBV untuk Hepatitis C kronis (Takahashi, 2014).

Namun, apakah SNPs pada IL28B juga dapat memprediksi respons pengobatan berbasis Peg-IFN pada pasien Hepatitis B kronis, saat ini sedang diteliti secara intensif dan hasil-hasilnya masih belum konsisten. Penelitian pertama melibatkan 115 pasien Hepatitis B yang mendapatkan pengobatan Peg-IFN selama 6 bulan yang menunjukkan tidak adanya korelasi antara SNPs pada IL28B dengan respons pengobatan (Tseng et al., 2011). Sebaliknya, studi *multicenter* yang melibatkan 205 pasien HBeAg (+) yang mendapatkan pengobatan Peg-IFN ± *lamivudine* dari 11 area di Eropa dan Asia memperlihatkan hasil yang inkonsisten. Dalam penelitian ini, sekitar 65% pasien merupakan keturunan Asia dan ditemukan bahwa genotip CC rs12979860 sangat terkait dengan serokonversi HBeAg. Namun, ini merupakan penelitian yang menunjukkan korelasi positif pada pasien HBeAg (+), sedangkan sebagian besar penelitian berikutnya gagal untuk mengkonfirmasi temuan ini (Lampertico & Liaw, 2012; Sonneveld et al., 2012). Selain itu Wu et al. (2015) menemukan bahwa polimorfisme IL28B dapat memprediksi hasil klinis Peg-IFN $\alpha$  pada pasien Hepatitis B kronis di populasi China. Namun, penelitian sebelumnya yang juga dilakukan pada populasi Asia menemukan bahwa genotip IL28B tidak akurat dalam memprediksi hasil pengobatan Peg-IFN $\alpha$  pada pasien yang terinfeksi virus Hepatitis B (Holmes et al., 2013).

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Penelitian lain yang dipublikasikan tahun 2012 juga menunjukkan kemungkinan adanya hubungan antara IL28B dengan HBeAg (+) pada pasien Hepatitis B kronis di populasi Han China. Sementara itu, terdapat 3 publikasi lain yang diterbitkan pada tahun yang sama menyimpulkan bahwa IL28B tidak berhubungan secara signifikan dengan respons terapi pasien Hepatitis B kronis yang mendapatkan pengobatan Peg-IFN. Tiga SNPs pada gen IL28B (rs12979869C/T, rs8099917G/T dan rs12980275G/A) yang diperiksa di 330 pasien (termasuk 154 pasien karsinoma hepatoseluler (HCC) yang terkait dengan infeksi HBV, 86 pasien non-HCC dengan Hepatitis B kronis, 43 infeksi HBS *self-limited* dan 47 kontrol sehat. Kesimpulan dari studi-studi tersebut mengindikasikan SNP rs12979860C/T kemungkinan mempengaruhi kerentanan terhadap infeksi HBV kronis dan menentukan perkembangannya ke arah HCC (Takahashi, 2014).

Di sisi lain, terkait pasien Hepatitis B kronis dengan HBeAg (-), terdapat satu penelitian retrospektif yang telah dipublikasikan. Penelitian tersebut melibatkan 101 pasien ras Kaukasia yang mendapatkan pengobatan IFN atau Peg-IFN selama 24 bulan dan pasien tersebut diikuti selama rata-rata 11 tahun. Hasil penelitian ini menemukan bahwa genotip CC rs12979860 berhubungan dengan tingkat SVR yang lebih tinggi (level DNA HBV < 2000 IU/ml) dan *clearance* (eliminasi) HBsAg, dibandingkan genotip CT atau TT. Temuan tentang hubungan antara polimorfisme IL28B dan kecenderungan untuk mencapai SVR dengan terapi IFN pada pasien Hepatitis

Buku ini tidak diperjualbelikan.



B kronis yang sulit disembuhkan telah memenuhi ekspektasi. Temuan ini mengindikasikan bahwa polimorfisme IL28B berpotensi menambah daftar prediktor respons terapi IFN sebelum pengobatan tersebut diberikan sehingga dapat dipakai sebagai pedoman untuk pengelolaan penyakit Hepatitis B kronis genotip D HBV, dengan HBeAg (-) yang sulit disembuhkan. Prediktor genetik *pre-treatment* ini memiliki keunggulan dibandingkan prediktor konstitusional klasik atau prediktor terkait virus yang menentukan hasil terapi seperti usia dan jenis kelamin yang kurang terepresentasikan di wilayah geografi tertentu atau faktor viremia dan ALT yang dapat bervariasi sesuai perjalanan alami penyakit hepatitis sehingga memerlukan pemantauan pasien yang ketat untuk mendeteksi waktu terapi IFN yang tepat (Lampertico et al., 2013).

*Predictive value* polimorfisme gen IL28B telah didokumentasikan pada penelitian lainnya yang melibatkan pasien Hepatitis B kronis dengan HBeAg (+) dari populasi Eropa Utara dan Asia yang didominasi dengan HBV genotip D. Penelitian ini memperlihatkan bahwa polimorfisme gen IL28B berkorelasi secara positif dengan serokonversi HBeAg ataupun *seroclearance* HBsAg yang mendukung faktor genetik berpengaruh pada respons anti-HBV terhadap IFN di samping sejumlah faktor lainnya seperti variabel klinis termasuk fase infeksi (HBeAg VS anti-HBe) dan tingkat keparahan penyakit (Sonneveld et al., 2011). Meskipun, beberapa penelitian yang melibatkan pasien Asia gagal mengidentifikasi genotipe IL28B sebagai prediktor untuk menilai respons terapi pada HBV. Namun, pada

Buku ini tidak diperjualbelikan.



pasien ras Kaukasia, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut (Sarin et al., 2016).

Meta-analisis oleh Ying et al. (2021) memperlihatkan hubungan antara polimorfisme genetik IL28B dengan respons terhadap Peg-IFN $\alpha$ , meskipun tidak signifikan secara statistik. Lebih lanjut analisis subgroup memperlihatkan bahwa di antara pasien Hepatitis B kronis HBeAg(-), genotip rs12979860 CC dan genotip rs8099917 TT terkait dengan respons pengobatan yang lebih signifikan terhadap Peg-IFN $\alpha$  (CC vs non-CC: OR 2,78 95% CI 1,00-7,76 I $^2$  = 83%; TT vs non-TT OR 2,16 95% CI 1,35-3,48 I $^2$  = 0%). Selain itu, di antara pasien Asia dengan Hepatitis B kronis, genotip rs12979860 CC ditemukan berhubungan dengan respons pengobatan yang lebih signifikan terhadap Peg-IFN $\alpha$  (CC vs non-CC: OR 1,88 95% CI 1,18-2,99, I $^2$  = 0%). Meta-analisis ini menyimpulkan bahwa genotip IL28B rs12979860 CC dan rs8099917 TT mengindikasikan respons pengobatan yang lebih baik dibandingkan genotip non-CC dan non-TT terhadap Peg-IFN $\alpha$  pada pasien Hepatitis B kronis (Ying et al., 2021).

Salah satu penjelasan yang mungkin terkait hubungan antara polimorfisme pada IL28B dengan respons terapi IFN adalah adanya peran IL28B dalam aktivasi kaskade antivirus oleh Janus kinase/*signal transducer* dan aktivator transkripsi yang merupakan jalur yang telah dikarakterisasi dan dikenal dengan baik pada kasus Hepatitis C kronis. Pada pasien Hepatitis C kronis dengan genotip 1 yang sulit disembuhkan, genotip CC pada IL28B berhubungan dengan penurunan HCV-RNA di serum yang lebih awal,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



dan tercapainya SVR pada sebagian besar pasien. Hal serupa juga perlu diperhatikan bahwa pasien Hepatitis B kronis dengan HBeAg (-) yang sulit disembuhkan dan memiliki profil genotip CC pada IL28B mengalami penurunan HBV DNA serum yang lebih cepat dan dini setelah mendapat terapi IFN dibandingkan dengan *carrier* alel T. Temuan ini memperlihatkan fenomena yang bisa menandakan *seroclearance* HBsAg yang lebih cepat pada pasien dengan genotip CC (Lampertico et al., 2013). Selain itu, beberapa sitokin dan molekul regulator berperan krusial dalam mempengaruhi respons imun dan patogenesis infeksi HBV. Interferon lambda 3 (IFNL3) merupakan sitokin yang disandi oleh IL28B) dan menunjukkan efek antivirus melalui hambatan replikasi HBV. Berdasarkan aksi antivirus dan respons imun dari IL28B, peneliti memprediksi bahwa genotip IL28B terkait dengan infeksi HBV dan turut menentukan efikasi IFN pada pasien dengan Hepatitis B kronis (Ying et al., 2021).

## 2. Farmakogenomik-Farmakogenetik Gen eIF-2 $\alpha$ reg2 dan Prinsip Individualisasi Terapi Hepatitis B

Studi farmakogenetik terapi IFN $\alpha$  dan efeknya pada pasien Hepatitis B pertama kali dilakukan oleh King et al. pada tahun 2002. Penelitian tersebut berfokus pada 22 polimorfisme genetik pada jalur gen interferon (IFN) dan menemukan bahwa polimorfisme pada intron (rs3759756) gen yang menyandi *eukaryotic translation initiation factor 2* subunit 1-alpha, dapat mempengaruhi respons terapi IFN pada pasien Hepatitis B. Analisis lokus secara tunggal maupun analisis regresi logistik yang telah memperhitungkan usia, jenis kelamin dan kadar DNA HBV menunjukkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



nilai signifikansi 0.009 dan 0.023. Analisis tersebut menunjukkan bahwa pasien dengan alel SNP "G" langka (yang menghasilkan genotip heterozigot A/G) cenderung lebih tidak responsif terhadap pengobatan IFN. Selain itu, analisis regresi logistik memberikan nilai signifikansi yang lebih besar untuk alel "G" pada eIF-2 $\alpha$  reg 2 dalam memprediksi tidak adanya respons terapi dengan odds rasio 14,94 (95% CI: 1,45-153,71) dibandingkan dengan kadar DNA HBV saja (OR: 5, 95% CI: 1,01-2,43,  $p = 0,033$ ). Selain itu analisis regresi logistik multipel mengindikasikan bahwa pasien berjenis kelamin laki-laki, usia lebih dari 40 tahun, dengan kadar DNA HBV 2100 pg/mL dan profil eIF-2 $\alpha$  reg2 genotip A/G akan berespons kurang baik dengan pemberian terapi IFN. Hal ini memperlihatkan alel "G" pada eIF-2 $\alpha$  reg 2 berpotensi sebagai *biomarker* untuk memprediksi respons pasien terhadap terapi IFN $\alpha$ . Hasil tersebut mendukung potensi penerapan di klinis, penggunaan salah satu SNP pada *host* sebagai prediktor respons terapi dibandingkan prediktor terapi yang konvensional yang telah ada sebelumnya, seperti kadar DNA HBV, ALT, dll (King et al., 2002).

Meskipun setelah koreksi beberapa pengujian dengan metode Bonferroni, analisis SNP tersebut menjadi tidak signifikan. Namun, terdapat penjelasan ilmiah yang relevan dan menunjukkan bahwa secara biologis terdapat hubungan antara SNP pada gen eIF-2 $\alpha$  dengan respons terapi IFN. Protein eIF-2 $\alpha$  tergolong faktor sintesis dan protein yang diinduksi oleh INF dalam jalur antivirus protein kinase PKR. Pemberian pengobatan IFN akan mengaktifkan PKR yang kemudian berperan dalam memfosforilasi faktor

Buku ini tidak diperjualbelikan.



inisiasi eIF-2 $\alpha$  di Ser-51. Selanjutnya, fosforilasi ini mengakibatkan penghambatan translasi mRNA melalui penekanan regulasi pertukaran nukleotida guanin yang dikatalisis oleh eIF-2B. Adanya penghambatan translasi mRNA dengan pemberian terapi IFN ini diyakini berkontribusi dalam mempertahankan sel *host* terhadap replikasi virus hepatitis (King et al., 2002). Bukti ini menunjukkan kemungkinan bahwa adanya SNP pada eIF-2 $\alpha$  akan menghambat status fosforilasi protein tersebut pada pemberian terapi IFN sehingga mengakibatkan penurunan respons terapi IFN pada *host*.

Meskipun SNP eIF-2 $\alpha$  reg2 berlokasi pada intron 1 di regio regulator dari *leader sequence* yang tidak ditranslasi, namun penelitian sebelumnya mengidentifikasi berbagai *binding site* baik di *upstream* dan *downstream* dari *regio promoter* yang memanjang sampai pada regio intron 1. Selain itu, penelitian lain melaporkan adanya peran fungsional intron 1 melalui delesi/mutasi. Hal ini mengindikasikan *sequence intron 1* berperan penting dalam meregulasi *promoter* untuk memicu terjadinya transkripsi. Menariknya elemen regulasi di bagian hilir *cluster cap-site* telah diidentifikasi, yang berkesesuaian dengan konsensus Inr memiliki orientasi pada arah yang berlawanan dengan *promoter* eIF-2 $\alpha$ . Elemen Inr mengarahkan sintesis transkrip *antisense*, dengan demikian akan meregulasi tingkat transkripsi eIF-2 $\alpha$  (Noguchi et al., 1994). SNP yang diidentifikasi terletak pada intron 1 gen eIF-2 $\alpha$  yang berukuran 1,6-kb di bagian hulu elemen Inr. Temuan ini menimbulkan pertanyaan menarik terkait variasi nukleotida yang melemahkan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



aktivitas antivirus IFN $\alpha$ . Hal ini mendasari relevansi ilmiah bahwa SNP eIF-2 $\alpha$  reg2 mempengaruhi aktivitas transkripsi eIF-2 $\alpha$ , stabilitas mRNA dan akibatnya mempengaruhi respons terhadap protein IFN, meskipun diperlukan studi fungsional lebih lanjut untuk memvalidasi temuan tersebut (King et al., 2002).

### 3. Farmakogenomik-Farmakogenetik Gen *Human Leukocyte Antigen* (HLA) dan Prinsip Individualisasi Terapi Hepatitis B

Varian gen tertentu pada *host*, termasuk alel Human Leukocyte Antigen (HLA) kelas I dan II serta gen non-HLA mempengaruhi riwayat perjalanan klinis alami dari infeksi HBV. Sistem HLA atau *Major Histocompatibility Complex* (MHC), merupakan salah satu faktor *host* terpenting yang berkorelasi dengan perjalanan klinis dari infeksi HBV. Gen HLA kelas I dan II memiliki karakter sangat polimorfik sehingga dapat mempengaruhi kemampuan molekul HLA dalam memicu respons imun yang akan mempengaruhi hasil (manifestasi penyakit) dari infeksi patogen tertentu. Peptida HBV yang dipresentasikan oleh molekul HLA kelas I ke sel limfosit T sitotoksik (CTL) sangat penting di dalam proses eradikasi infeksi HBV melalui perannya dalam meningkatkan kemampuan CTL untuk mengidentifikasi dan menyerang sel yang terinfeksi HBV (Chen et al., 2013; Liu et al., 2012).

Ketidaksesuaian antara repertoire sel T CD8+ spesifik HBV yang terdapat pada kelompok etnis yang berbeda, seperti pasien di populasi Kaukasia dan Cina, menjadi bukti kemampuan mikropolimorfisme HLA untuk mendiversifikasi respons sel T. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan hubungan antara gen

Buku ini tidak diperjualbelikan.



HLA kelas I tertentu dengan perjalanan klinis infeksi HBV. Molekul HLA kelas II adalah glikoprotein permukaan sel dari sel APC yang bertanggung jawab untuk mempresentasikan antigen eksogen ke sel T helper (sel T CD4+). Genome Wide Association Study (GWAS) menunjukkan bahwa SNPs di dekat lokus HLA-DP, HLA-DQ dan HLA-DR berkorelasi secara signifikan dengan hasil klinis infeksi HBV. Variasi gen HLA kelas II sangat terkait dengan tidak hanya infeksi HBV yang persisten namun juga pembersihan dan serokonversi HBV secara spontan, perkembangan penyakit, dan perkembangan ke arah sirosis hati maupun karsinoma hepatoseluler terkait infeksi HBV pada Hepatitis B kronis. Variasi tersebut juga mempengaruhi efikasi pengobatan interferon (IFN) dan nucleot(s)ide analog (NA) dan respons terhadap vaksin HBV (Wang et al., 2016).

Seperti dituliskan sebelumnya, IFN $\alpha$  merupakan terapi lini pertama untuk pasien Hepatitis B kronis, namun hanya menginisiasi respons terapi yang lengkap (*complete response*) pada sebagian kecil pasien. Varian gen HLA juga terbukti berhubungan dengan respons terhadap pengobatan IFN $\alpha$  pada pasien Hepatitis B kronis. *Haplotype* berbeda dari SNP yang sama kemungkinan berkaitan dengan variasi hasil pengobatan klinis. Telah ditunjukkan bahwa *haplotype* "GC" dari lima SNP, termasuk rs9277535 (HLA-DPB1), rs9276370 (HLA-DQA2), rs7756516 dan rs7453920 (HLA-DQB2), dan rs9366816 dekat HLA-DPA3, dikaitkan dengan *sustained therapeutic response* terhadap pengobatan dengan IFN $\alpha$  pada pasien laki-laki ras Han, Taiwan ( $p = 0,0132$ ; OR = 2,49) (Chang et

Buku ini tidak diperjualbelikan.



al., 2014). Pada penelitian *cohort* skala luas yang melibatkan pasien Hepatitis B kronis ras Kaukasia yang terinfeksi HBV genotip A atau D, Brouwer et al. (2014) melaporkan bahwa polimorfisme HLA-DPB1 berhubungan secara independen dengan respons virologi dan serologis terhadap terapi Peg-IFN setelah 6 bulan pengobatan.

Melalui analisis multivariat, Cheng et al. (2014) menunjukkan bahwa pada 6 bulan terapi dengan Peg-IFN $\alpha$  dan 6 bulan setelah terapi dengan obat tersebut, genotip rs3077-GG secara independen dikaitkan dengan lebih tingginya tingkat HBeAg *loss* dan tingkat serokonversi anti-HBeAb. Sementara itu, genotipe rs9277535-GG secara independen dikaitkan dengan penurunan kadar DNA HBV pada pasien Hepatitis B kronis di Tiongkok dan hasil serupa juga diamati di Taiwan (Tseng et al., 2011).

Penelitian lainnya melaporkan bahwa HLA-DQ rs9275572 merupakan prediktor dari respons virus dan respons biokimia (*viral and biochemical response*) terhadap terapi *lamivudine* (LAM) pada pasien di populasi Han Cina (Zhang et al., 2014). Hosaka et al (2015) menunjukkan adanya hubungan antara polimorfisme HLA-DP ( $\geq 2$  A alel) pada rs3077 dan rs9277535 dengan penurunan kadar HBsAg dan *seroclearance* di antara pasien Hepatitis B kronis populasi Jepang yang tergolong HBeAg (+) dan mendapatkan terapi LAM. Sementara itu, alel HLA-DRB1\*010101 berhubungan erat dengan respons virologi yang buruk terhadap inisiasi terapi LAM pada pasien Hepatitis B kronis populasi Korea (Jin et al., 2011). Chang et al. (2014) juga menunjukkan bahwa,

Buku ini tidak diperjualbelikan.



pada pasien dengan genotipe TT rs9276370 (HLA-DQA2), ditemukan *non-sustained response rate* yang lebih tinggi, terutama pada kelompok dengan terapi LAM ( $p = 0,0074$ ) dan Peg-IFN $\alpha$ -2a ( $p = 0,0814$ ), bukan pada individu yang mendapatkan terapi entecavir. Sebuah uji klinis acak [61] yang menilai Peg-IFN $\alpha$ -2a (dengan atau tanpa entecavir pada pasien dengan Hepatitis B kronis HBeAg (-) menyimpulkan bahwa genotip GG rs3077 (HLA-DPA1) sebagai prediktor independen respons terapeutik (Tangkijvanich et al., 2016).

#### 4. Farmakogenomik-Farmakogenetik Gen Nucleos(t)ide Analog *Transporter* dan prinsip Individualisasi terapi Hepatitis B

HBV adalah virus DNA dan ditandai dengan *reverse transcription* pada hepatosit yang terinfeksi (Hagiwara et al., 2015). Nucleos(t)ide analogues (NA) merupakan obat penting yang digunakan di klinis sebagai anti-virus maupun anti-kanker. Mekanisme kerja NA dengan meniru struktur nukleosida endogen, mengeksploitasi metabolisme seluler dan berikatan dengan DNA maupun RNA. Hal ini mendasari efektivitas NA dalam menghambat replikasi virus maupun menghentikan proliferasi sel kanker (Thomson & Lamont, 2019).

*Nucleoside analogs* (NAs) dan interferon merupakan terapi pilihan HBV (Yuan et al., 2016). Berbagai NAs telah digunakan sebagai agen antivirus pada pasien Hepatitis B kronis, di antaranya *Lamivudine*, *adefovir*, dan *entecavir* (Hagiwara et al., 2015). Dibandingkan dengan interferon, NAs memiliki efek samping yang lebih minimal dan profil keamanan

Buku ini tidak diperjualbelikan.



lebih baik (Yuan et al., 2016). NAs jangka panjang mengurangi inflamasi dan derajat fibrosis hati, sehingga memperbaiki sirosis (Fung et al., 2011).

Varian genetik host sebagai salah satu faktor yang mendasari perbedaan respons terapi antar individu. Varian genetik penyandi *transporter* obat dapat mempengaruhi perbedaan respons terapi tersebut. Varian pada *transporter nucleoside efflux* maupun influx yang memengaruhi respons terapi telah diidentifikasi (Errasti-Murugarren & Pastor-Anglada, 2010; Grossman, 2009).

*Multidrug resistant proteins* (MRP) merupakan famili dari *ATP-binding cassette* (ABC) yang berperan sebagai *membrane protein efflux pumps*. *Multidrug resistant-4* (MRP4) yang dikode *ATP-binding cassette-4* (ABCC4) dan terkait dengan *ATP-dependent efflux* dari *nucleoside monophosphates* (Borst et al., 2007). MRP4 juga mempengaruhi efflux beberapa agen anti-viral, termasuk NAs (*Lamivudin* dan *Tenofovir*) (Nakagawa et al., 2011). NAs dapat mengubah rangkaian nukleotida intraseluler endogen alami yang berperan pada inisiasi *reverse transcription virus*. Varian ABCC4 dipercaya mempengaruhi respons terapi NAs pada pasien Hepatitis B kronis. *Genotyping ABCC4* varian (rs3751333GG) secara signifikan lebih banyak ditemukan pada pasien Hepatitis B kronis yang berespons baik dengan terapi NAs (Entecavir) di populasi Chinese Han (Yuan et al., 2016).

Di sisi lain, Tenofovir (TFV) juga merupakan salah satu substrat dari MRP4 (ABCC4) dan penelitian menemukan bahwa akumulasi tenofovir intraseluler mengalami penurunan pada sel dengan over ekspresi

Buku ini tidak diperjualbelikan.



MRP4 (Archampong et al., 2019). Hal ini kemungkinan karena varian alel ABCC4 rs11568695 berperan dalam meningkatkan aktivitas MRP4 yang mengakibatkan penurunan akumulasi TFV intraseluler (Ray et al., 2006).

## Referensi

Amarapurkar, D. N. (2007). Telbivudine: a new treatment for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*, 13(46), 6150-6155.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i46.6150>

Archampong, T., Ojewale, O., Bears, K., Chen, Y., Lartey, M., Sagoe, K. W., Obo-Akwa, A., Gong, Y., Langae, T., & Kwara, A. (2019). Relationship between ABCC4 SNPs and hepatitis B virus suppression during tenofovir-containing antiretroviral therapy in patients with HIV/HBV coinfection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 82(4), 421.

Borst, P., de Wolf, C., & van de Wetering, K. (2007). Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 453, 661-673.

Brouwer, W. P., Sonneveld, M. J., Tabak, F., Simon, K., Cakaloglu, Y., Akarca, U. S., Zeuzem, S., Ferenci, P., Heathcote, J. E., & de Knegt, R. J. (2014). Polymorphisms of HLA-DP are associated with response to peginterferon in Caucasian patients with chronic hepatitis B. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 40(7), 811-818.

Chang, S.-W., Fann, C. S.-J., Su, W.-H., Wang, Y. C., Weng, C. C., Yu, C.-J., Hsu, C.-L., Hsieh, A.-R., Chien, R.-N., & Chu, C.-M. (2014). A genome-wide association study on chronic



HBV infection and its clinical progression in male Han-Taiwanese. *PLoS One*, 9(6), e99724.

Chen, X., Wang, W., Wang, S., Meng, G., Zhang, M., Ni, B., Wu, Y., & Wang, L. (2013). An immunodominant HLA-A\* 1101-restricted CD8+ T-cell response targeting hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B patients. *Journal of General Virology*, 94(12), 2717-2723.

Cheng, L., Sun, X., Tan, S., Tan, W., Dan, Y., Zhou, Y., Mao, Q., & Deng, G. (2014). Effect of HLA-DP and IL28B gene polymorphisms on response to interferon treatment in hepatitis B e-antigen seropositive chronic hepatitis B patients. *Hepatology Research*, 44(9), 1000-1007.

Cheng, P. N., & Chang, T. T. (2008). Entecavir: a potent antiviral with minimal long-term resistance in nucleoside-naive chronic hepatitis B patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(5), 569-579.  
<https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.569>

Errasti-Murugarren, E., & Pastor-Anglada, M. (2010). Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics*, 11(6), 809-841.

Fung, J., Lai, C.-L., Seto, W.-K., & Yuen, M.-F. (2011). Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(12), 2715-2725.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr388>

Gani, R. A., Hasan, I., Djumhana, A., & Setiawan, P. B. (2012). *Konsensus nasional penatalaksanaan hepatitis B di Indonesia*.

Grossman, I. (2009). ADME pharmacogenetics: current practices and future outlook. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 5(5), 449-462.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



- Guvenir, M., & Arikan, A. (2020). Hepatitis B virus: from diagnosis to treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 69(4), 391-399.
- Hagiwara, S., Nishida, N., & Kudo, M. (2015). Antiviral therapy for chronic hepatitis B: Combination of nucleoside analogs and interferon. *World journal of hepatology*, 7(23), 2427.
- Holmes, J. A., Nguyen, T., Ratnam, D., Heerasing, N. M., Tehan, J. V., Bonanzinga, S., Dev, A., Bell, S., Pianko, S., & Chen, R. (2013). IL 28 B genotype is not useful for predicting treatment outcome in Asian chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon- $\alpha$ . *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(5), 861-866.
- Hosaka, T., Suzuki, F., Kobayashi, M., Fukushima, T., Kawamura, Y., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, Y., Saitoh, S., & Arase, Y. (2015). HLA-DP genes polymorphisms associate with hepatitis B surface antigen kinetics and seroclearance during nucleoside analogue therapy. *Liver International*, 35(4), 1290-1302.
- Jin, Y.-J., Shim, J. H., Chung, Y.-H., Kim, J. A., Choi, J. G., Park, W. H., Lee, D., Kim, S. E., Lee, Y. S., & Kim, S. H. (2011). HLA-DRB1\* 010101 allele is closely associated with poor virological response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Digestion*, 84(Suppl. 1), 35-42.
- King, J. K., Yeh, S.-H., Lin, M.-W., Liu, C.-J., Lai, M.-Y., Kao, J.-H., Chen, D.-S., & Chen, P.-J. (2002). Genetic polymorphisms in interferon pathway and response to interferon treatment in hepatitis B patients: A pilot study. *Hepatology*, 36(6), 1416-1424.
- Lai, C.-L., Gane, E., Liaw, Y.-F., Hsu, C.-W., Thongsawat, S., Wang, Y., Chen, Y., Heathcote, E. J., Rasenack, J., Bzowej, N., Naoumov, N. V., Di Bisceglie, A. M., Zeuzem, S., Moon, Y.



- M., Goodman, Z., Chao, G., Constance, B. F., & Brown, N. A. (2007). Telbivudine versus Lamivudine in Patients with Chronic Hepatitis B. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2576-2588. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066422>
- Lai, C. L., Dienstag, J., Schiff, E., Leung, N. W., Atkins, M., Hunt, C., Brown, N., Woessner, M., Boehme, R., & Condeay, L. (2003). Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*, 36(6), 687-696. <https://doi.org/10.1086/368083>
- Lampertico, P., & Liaw, Y. F. (2012). New perspectives in the therapy of chronic hepatitis B. *Gut*, 61(Suppl 1), i18-i24.
- Lampertico, P., Viganò, M., Cheroni, C., Facchetti, F., Invernizzi, F., Valveri, V., Soffredini, R., Abrignani, S., De Francesco, R., & Colombo, M. (2013). IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 57(3), 890-896.
- Lee, H. W., Lee, J. S., & Ahn, S. H. (2020). Hepatitis B virus cure: targets and future therapies. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 213.
- Liaw, Y. F., Gane, E., Leung, N., Zeuzem, S., Wang, Y., Lai, C. L., Heathcote, E. J., Manns, M., Bzowej, N., Niu, J., Han, S. H., Hwang, S. G., Cakaloglu, Y., Tong, M. J., Papatheodoridis, G., Chen, Y., Brown, N. A., Albanis, E., Galil, K., & Naoumov, N. V. (2009). 2-Year GLOBE Trial Results: Telbivudine Is Superior to Lamivudine in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*, 136(2), 486-495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.026>



- Lin, C.-L., & Kao, J.-H. (2013). Hepatitis B viral factors and treatment responses in chronic hepatitis B. *Journal of the Formosan Medical Association*, 112(6), 302-311.
- Liu, Q., Zheng, Y., Yu, Y., Tan, Q., & Huang, X. (2012). Identification of HLA-A\* 0201-restricted CD8+ T-cell epitope C64–72 from hepatitis B virus core protein. *International Immunopharmacology*, 13(2), 141-147.
- Manzoor, S., Saalim, M., Imran, M., Resham, S., & Ashraf, J. (2015). Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us? *World journal of gastroenterology*, 21(44), 12558.
- Muljono, D. H. (2017). Epidemiology of hepatitis B and C in Republic of Indonesia. *Euroasian journal of hepatogastroenterology*, 7(1), 55.
- Nakagawa, H., Toyoda, Y., Wakabayashi-Nakao, K., Tamaki, H., Osumi, M., & Ishikawa, T. (2011). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of ABC transporters: a new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(9), 3602-3619.
- Noguchi, M., Miyamoto, S., Silverman, T. A., & Safer, B. (1994). Characterization of an antisense Inr element in the eIF-2 alpha gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 29161-29167.
- Pallier, C., Castéra, L., Soulier, A., Hézode, C., Nordmann, P., Dhumeaux, D., & Pawlotsky, J.-M. (2006). Dynamics of Hepatitis B Virus Resistance to Lamivudine. *Journal of Virology*, 80(2), 643-653. <https://doi.org/doi:10.1128/jvi.80.2.643-653.2006>
- Raslan, E., AbdAllah, M., & Soliman, S. (2022). The prevalence and determinants of hepatitis B among Egyptian adults:



a further analysis of a country-representative survey. *Egyptian Liver Journal*, 12(1), 46.

- Ray, A. S., Cihlar, T., Robinson, K. L., Tong, L., Vela, J. E., Fuller, M. D., Wieman, L. M., Eisenberg, E. J., & Rhodes, G. R. (2006). Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(10), 3297-3304.
- Sarin, S. K., Kumar, M., Lau, G. K., Abbas, Z., Chan, H. L., Chen, C. J., Chen, D. S., Chen, H. L., Chen, P. J., Chien, R. N., Dokmeci, A. K., Gane, E., Hou, J. L., Jafri, W., Jia, J., Kim, J. H., Lai, C. L., Lee, H. C., Lim, S. G., . . . Kao, J. H. (2016). Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatol Int*, 10(1), 1-98. <https://doi.org/10.1007/s12072-015-9675-4>
- Shang, J., Zhou, J., Liu, H., Ise, R. M., Tu, Y., Ran, J., Bai, L., & Tang, H. (2021). Efficacy of different nucleoside analog rescue therapies for entecavir-resistant chronic hepatitis B patients. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 912. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06554-1>
- Sokal, E. (2002). Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 3(3), 329-339.
- Sonneveld, M., Wong, V.-S., Woltman, A., Wong, G., Buster, E., Hansen, B., Chan, H., & Janssen, H. (2011). Polymorphisms at rs12979860 and rs12980275 near predict serological response to (Peg-) Interfereon in HBeAg- Positive Chronic Hepatitis B. *Journal of Hepatology*(54), S32.
- Sonneveld, M. J., Wong, V. W. S., Woltman, A. M., Wong, G. L., Cakaloglu, Y., Zeuzem, S., Buster, E. H., Uitterlinden, A. G., Hansen, B. E., & Chan, H. L. (2012). Polymorphisms

Buku ini tidak diperjualbelikan.



near IL28B and serologic response to peginterferon in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 142(3), 513-520. e511.

Tacke, F., & Kroy, D. C. (2016). Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Annals of translational medicine*, 4(18).

Takahashi, T. (2014). Interleukin 28B genetic polymorphism and hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(34), 12026.

Tangkijvanich, P., Chittmittraprap, S., Poovorawan, K., Limothai, U., Khlaiphuengsin, A., Chuaypen, N., Wisedopas, N., & Poovorawan, Y. (2016). A randomized clinical trial of peginterferon alpha-2b with or without entecavir in patients with HB eAg-negative chronic hepatitis B: Role of host and viral factors associated with treatment response. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(6), 427-438.

Taylor, K., Fritz, K., & Parmar, M. (2022). Lamivudine. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/abstract/MED/32644678>

Teo, E.-K., & Lok, A. S. (2022). Epidemiology, transmission, and prevention of hepatitis B virus infection. *UpToDate*. <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-transmission-and-prevention-of-hepatitis-b-virus-infection>

Thomson, J. M., & Lamont, I. L. (2019). Nucleoside analogues as antibacterial agents. *Frontiers in microbiology*, 10, 952.

Tseng, T.-C., Yu, M.-L., Liu, C.-J., Lin, C.-L., Huang, Y.-W., Hsu, C.-S., Liu, C.-H., Kuo, S. F.-T., Pan, C. J.-H., & Yang, S.-S. (2011). Effect of Host and Viral Factors on Hepatitis BE Antigen-Positive Chronic Hepatitis B Patients

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Receiving Pegylated Interferon- $\alpha$ -2A Therapy. *Antiviral therapy*, 16(5), 629-637.

Wait, S., Kell, E., Hamid, S., Muljono, D. H., Sollano, J., Mohamed, R., Shah, S., Abbas, Z., Johnston, J., & Tanwandee, T. (2016). Hepatitis B and hepatitis C in southeast and southern Asia: challenges for governments. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 1(3), 248-255.

Wang, L., Zou, Z.-Q., & Wang, K. (2016). Clinical relevance of HLA gene variants in HBV infection. *Journal of immunology research*, 2016.

World Health Organization. (2017). *Global hepatitis report 2017*. Geneva, Switzerland: World Health Organization., <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565455>

Wu, H., Zhao, G., Qian, F., Liu, K., Xie, J., Zhou, H., Xu, J., Xu, Y., Han, Y., & Xie, Q. (2015). Association of IL 28B polymorphisms with peginterferon treatment response in Chinese Han patients with HB eAg-positive chronic hepatitis B. *Liver International*, 35(2), 473-481.

Wu, X., Zhu, X., Zhu, S., Li, J., Ma, J., Li, Z., Li, H., & Liu, Y. (2009). A pharmacogenetic study of polymorphisms in interferon pathway genes and response to interferon-alpha treatment in chronic hepatitis B patients. *Antiviral Res*, 83(3), 252-256. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.06.003>

Xing, T., Xu, H., Cao, L., & Ye, M. (2017). HBeAg seroconversion in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients receiving long-term nucleos (t) ide analog treatment: a systematic review and network meta-analysis. *PLoS One*, 12(1), e0169444.



- Yamada, N., Sugiyama, R., Nitta, S., Murayama, A., Kobayashi, M., Okuse, C., Suzuki, M., Yasuda, K., Yotsuyanagi, H., Moriya, K., Koike, K., Wakita, T., & Kato, T. (2017). Resistance mutations of hepatitis B virus in entecavir-refractory patients. *Hepatol Commun*, 1(2), 110-121. <https://doi.org/10.1002/hep4.1022>
- Yao, G. B., ZHU, M., CUI, Z. Y., WANG, B. E., YAO, J. L., & ZENG, M. D. (2009). A 7-year study of lamivudine therapy for hepatitis B virus e antigen-positive chronic hepatitis B patients in China. *Journal of Digestive Diseases*, 10(2), 131-137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1751-2980.2009.00375.x>
- Ying, S.-Y., Hu, Y.-R., Gao, G.-S., Lou, K.-H., & Huang, Z. (2021). Interleukin-28B polymorphisms predict the efficacy of peginterferon alpha in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, 8, 691365.
- Yuan, M., Wang, W., Chen, H., Lu, J., He, M., Liu, C., Tang, H., & Wang, L. (2016). ABCC4, ABCC5 and SLC28A1 polymorphisms: host genome on responses of chronic hepatitis B patients with entecavir treatment. *Antiviral therapy*, 21(8), 689-696.
- Zhang, X., Jia, J., Dong, J., Yu, F., Ma, N., Li, M., Liu, X., Liu, W., Li, T., & Liu, D. (2014). HLA-DQ polymorphisms with HBV infection: different outcomes upon infection and prognosis to lamivudine therapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 21(7), 491-498.
- Zhao, J., Zhang, X., Fang, L., Pan, H., & Shi, J. (2020). Association between IL28B polymorphisms and outcomes of hepatitis B virus infection: a meta-analysis. *BMC medical genetics*, 21, 1-13.



# Profil Penulis

## Penulis 1



**Dr. dr. Ratih Dewi Yudhani, M.Sc.**

Penulis menyelesaikan Pendidikan Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran UNS (FK UNS) tahun 2006, Profesi Dokter di FK UNS tahun 2008, Pendidikan Pascasarjana (*Master of Science*) di Ilmu Kedokteran Dasar dan Biomedis Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan UGM (FKKMK UGM) pada tahun 2014 dan tahun 2022 lulus Doktor di Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan FKKMK UGM. Saat ini, merupakan staf pengajar (dosen tetap) di Bagian Farmakologi FK UNS dalam bidang ilmu Kedokteran dengan kepakaran farmakologi molekuler, *genomics and bioinformatics*, farmakogenetik-farmakogenomik, imunologi, *drug discovery development* kanker, penyakit degeneratif, diabetes, dan toksikologi. Beliau juga merupakan pengelola Laboratorium Biomedik FK UNS sejak tahun 2015 sampai sekarang.

## Penulis 2



**Dr. Yulia Sari, S.Si., M.Si.**

Penulis menyelesaikan Pendidikan Sarjana di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada tahun 2002, Pendidikan Pascasarjana di Program Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada tahun 2006 dan lulus Doktor di Program Studi Ilmu Kedokteran (PSIK) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret tahun 2021. Saat ini, merupakan dosen tetap di Bagian Parasitologi dan Mikologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret dalam bidang Ilmu Kedokteran dengan minat penelitian pada Parasitologi, Imunologi, Infeksi Penyakit Tropis, *Gut Microbiome*, Zoonosis, Covid-19, dan Herbal. Beliau juga merupakan pengelola Laboratorium Biomedik FK UNS sejak tahun 2013 sampai sekarang.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



### Penulis 3



**dr. Dyonisa Nasirochmi Pakha, M.Sc.**

Penulis merupakan staf pengajar di Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta sejak 2019 sampai sekarang. Gelar dokter diperoleh dari FK UNS pada tahun 2017 dan gelar *Master of Science* diperoleh dari Pendidikan Master di King's College London (KCL) University dengan jurusan *Clinical Pharmacology* tahun 2022. Kepakaran beliau di bidang farmakologi molekuler, *genomics, and bioinformatics*, farmakogenetik-farmakogenomik, dan penelitian *drug discovery development*.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Penulis 4



**Dr. dr. Triyanta Yuli Pramana, Sp.PD-KGEH., FINASIM.**

Penulis merupakan Dosen Ilmu Penyakit Dalam dan konsultan di bidang Gastroentero Hepatologi di Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Beliau merupakan lulusan dokter dari Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro Semarang, dan menyelesaikan pendidikan Konsultan Gastroentero Hepatologi di Universitas Indonesia, Jakarta. Beliau juga tercatat sebagai lulusan Doktor (S3) dari Program Studi Ilmu Kedokteran (PSIK) Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Saat ini beliau menjabat sebagai Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam di RSUD Dr. Moewardi Surakarta dan juga sebagai kepala divisi Gastroentero Hepatologi RSUD Dr. Moewardi Surakarta.

Buku ini tidak diperjualbelikan.



## Penulis 5



**dr. Didik Prasetyo, Sp.PD-KGEH., M.Kes., FINASIM.**

Penulis merupakan staf di bagian Ilmu Penyakit Dalam dan konsultan di bidang Gastroentero Hepatologi di Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret dan RSUD Dr. Moewardi Surakarta. Beliau merupakan lulusan dokter dari Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret pada tahun 2005, dan menyelesaikan Pendidikan Spesialis Ilmu Penyakit Dalam serta Konsultan Gastroentero Hepatologi dari Universitas Sebelas Maret tahun 2012 dan 2022. Beliau juga telah menyelesaikan *short course* prosedur Endoskopi lanjut dan ERCP di Asian Institute of Gastroenterology (AIG), Hyderabad, India dan di Divisi Gastroenterology and Hepatology, Niigata University, Jepang pada tahun 2019. Pada tahun 2023, beliau telah menyelesaikan *short course* prosedur EUS dari Rajavithi Hospital, Thailand.

Buku ini tidak diperjualbelikan.





# Profil Editor



**dr. Betty Suryawati, M.Biomed.Sci., Ph.D.**

Editor merupakan staf pengajar di Bagian Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret (UNS). Beliau menyelesaikan Pendidikan S1 Kedokteran dan Profesi Dokter di Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM) pada tahun 2001, menyelesaikan program S2 bidang *Biomedical Science* di Curtin University of Technology, Western Australia pada tahun 2006, dan menyelesaikan program *doctoral* (Ph.D) di Flinders University, South Australia pada tahun 2017. Kepakaran beliau di bidang Mikrobiologi molekuler, *Bacterial Genomic* Imunologi, Infeksi Penyakit Tropis, dan *Gut Microbiome*

Buku ini tidak diperjualbelikan.

