

## **Bab II**

### **Tinjauan Pustaka**

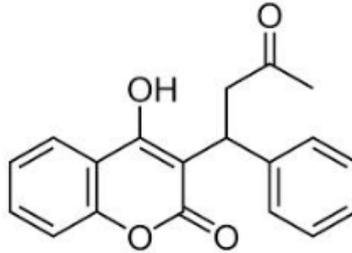
#### **2.1 Warfarin**

##### **2.1.1 Karakteristik Umum Warfarin**

Warfarin merupakan turunan kumarin yang sudah biasa diresepkan sebagai antikoagulan oral untuk mengobati atau mencegah penyakit-penyakit trombotik, diantaranya myocardial infarction, ischemic stroke, venus thrombosis, heart valve replacement dan atrial fibrillation (Poller, 2004). Antikoagulan digunakan untuk mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat pembentukan atau menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah. Atas dasar ini antikoagulan diperlukan untuk mencegah terbentuk dan meluasnya trombus dan emboli, maupun untuk mencegah bekunya darah *in vitro*. Pada trombus yang sudah terbentuk, antikoagulan hanya mencegah membesarnya trombus dan mengurangi kemungkinan terjadinya emboli, tetapi tidak memperkecil trombus (Goodman, 2008).

Warfarin mempunyai rentang terapeutik yang sempit dan memberikan perbedaan respon yang besar diantara individu atau pasien. Kekurangan dosis akan menyebabkan kegagalan dalam mencegah tromboembolisme sedangkan kelebihan dosis akan meningkatkan resiko perdarahan (Fuster, 2006). Derajat antikogulasi setiap pasien diukur dengan parameter waktu protrombin yang dinyatakan dengan *International Normalized Ratio* (PT-INR) (Levine et.al., 2004). Warfarin tidak mempunyai efek langsung terhadap trombus yang sudah terbentuk, tetapi dapat mencegah perluasan trombus. Warfarin telah terbukti efektif untuk pencegahan stroke kardioembolik (*European Heart Rhythm*, 2010). Karena, meningkatnya risiko pendarahan, penderita yang diberi warfarin harus dimonitor waktu protrombinnya secara berkala (Poller, 2004)

Warfarin mempunyai nama dagang coumarin, dengan rumus kimia  $C_{19}H_{16}O_4$ , dan struktur kimia sebagai berikut:



Gambar 2.1 Struktur Kimia Warfarin  
(Chempider, 2019)

Warfarin mempunyai sediaan berbentuk tablet dengan dosis bervariasi mulai dari 1 mg hingga 10 mg (Rosental, 2017). Mekanisme kerja warfarin yaitu dengan cara menghambat sintesis vitamin K di hati, sehingga memengaruhi faktor-faktor pembekuan II, VII, IX dan X, dengan mengubah residu asam glutamat menjadi residu asam gama-karboksiglutamat (Goodman, 2008). Pemberian obat pada umumnya berdasarkan pada dosis rata-rata, yaitu dosis yang diperkirakan memberikan efek terapeutik dengan efek samping minimal. Apabila dosis rata-rata itu tidak menimbulkan efek atau menimbulkan efek yang berlebihan, maka akan dilakukan penghentian obat tanpa perlu mempertimbangkan apakah dosis yang diberikan sudah sesuai dengan kebutuhan penderita (Qiang et.al, 2011).

## 2.1.2 Farmakologi Warfarin

### 2.1.2.1 Farmakokinetik Warfarin

Berdasarkan *Canadian Cardiovascular Society and Heart and Stroke Foundation of Canada* farmakokinetik warfarin adalah sebagai berikut:

1. Mula kerja biasanya sudah terdeteksi di plasma dalam 1 jam setelah pemberian.
2. Kadar puncak dalam plasma: 2-8 jam.
3. Waktu paruh: 20-60 jam, rata-rata 40 jam.
4. Bioavailabilitas: hampir sempurna baik secara oral, 1M atau IV.
5. Metabolisme: ditransformasi menjadi metabolit inaktif di hati dan ginjal.

6. Ekskresi: melalui urine dan feses.

#### **2.1.2.2 Farmakodinamik Warfarin**

Berdasarkan *Canadian Cardiovascular Society and Heart and Stroke Foundation of Canada* Farmakodinamik dari warfarin adalah sebagai berikut:

1. Menghambat Vitamin K *Epoxide reductase* sehingga terjadi deplesi faktor koagulasi Vitamin K-dependent.
2. 99% terikat pada protein plasma terutama albumin.
3. Absorbsinya berkurang bila ada makanan di saluran cerna.

#### **2.1.2.3 Indikasi Warfarin**

Untuk profilaksis dan pengobatan komplikasi tromboembolik yang dihubungkan dengan fibrilasi atrium dan penggantian katup jantung, serta sebagai profilaksis terjadinya emboli sistemik setelah infark miokard (FDA approved). Profilaksis TIA atau stroke berulang yang tidak jelas berasal dari problem jantung (Dhungel, 2011).

#### **2.1.2.4 Kontraindikasi Warfarin**

Semua keadaan dimana risiko terjadinya perdarahan lebih besar dari keuntungan yang diperoleh dari efek anti koagulannya, termasuk pada kehamilan, kecenderungan perdarahan atau blood dyscrasias (Fuster, 2006).

#### **2.1.2.5 Interaksi Obat**

Warfarin berinteraksi dengan sangat banyak obat lain seperti asetaminofen, beta bloker, kortikosteroid, siklofosamid, eritromisin, gemfibrozil, hidantoin, glukagon, kuinolon, sulfonamid, kloramfenikol, simetidin, metronidazol, omeprazol, aminoglikosida, tetrasiklin, sefalosporin, anti inflamasi non steroid, penisilin, salisilat, asam askorbat, barbiturat, karbamazepin (Lucia, 2009).

### **2.1.2.6 Efek Samping**

Warfarin dapat menyebabkan perdarahan dari jaringan atau organ, nekrosis kulit dan jaringan lain, alopesia, urtikaria, dermatitis, demam, mual, diare, kram perut, hipersensitivitas dan priapismus (Lucia, 2009).

### **2.1.2.7 Dosis Warfarin**

Dosis inisial dimulai dengan 2-5 mg/hari dan dosis pemeliharaan 2-10 mg/hari. Obat diminum pada waktu yang sama setiap hari. Dianjurkan diminum sebelum tidur agar dapat dimonitor efek puncaknya di pagi hari esoknya. Lamanya terapi sangat tergantung pada kasusnya. Secara umum, terapi anti koagulan harus dilanjutkan sampai bahaya terjadinya emboli dan trombosis sudah tidak ada. Pemeriksaan waktu protrombin barns dilakukansetiap hari begitu dimulai dosis inisial sampai tercapainya waktu protrombin yang stabil dibatas terapeutik. Setelah tercapai, interval pemeriksaan waktu protrombin tergantung pada penilaian dokter dan respon penderita terhadap obat. Interval yang dianjurkan adalah 1-4 minggu (Garabedian, 2012).

### **2.1.3 Manfaat Warfarin**

Hemostasis adalah penghentian kehilangan darah dari pembuluh darah yang cedera. Trombosit pertama melekat pada makromolekul di region subendotelial dari pembuluh darah yang cedera kemudian beragregasi untuk membentuk plak hemostatis primer. Trombosit merangsang aktivasi lokal darifaktor koagulasi plasma, memicu pembentukan bekuan fibrin yang mendukung agagregasitrombosit. Kemudian seiring penyembuhan luka, agregasi trombosit dan bekuan fibrin didegradasi. Dalam garis besar proses pembekuan darah berjalan melalui tiga tahap: aktivasi tromboplastin, pembentukan trombin dari protrombin, dan pembentukan fibrin dari fibrinogen (Lam, 2017).

Secara *in vitro* aktivasi tromboplastin, yang akan mengubah prothrombin (faktor II) menjadi trombin (faktor IIa) terjadi melalui 2 mekanisme, yaitu mekanisme ekstrinsik dan intrinsik. Pada mekanisme ekstrinsik, tromboplastin jaringan (faktor III, berasal dari jaringan yang rusak) akan bereaksi dengan faktor

VIIa yang dengan adanya kalsium (faktor IV) akan mengaktifkan faktor X. Faktor Xa bersama faktor Va, ion kalsium dan fosfolipidtrombosit akan mengubah protrombin menjadi trombin. Oleh pengaruh trombin, fibrinogen (faktor I) akan diubah menjadi fibrin monomer (faktor Ia) yang tidak stabil. Fibrinmonomer, atas pengaruh faktor VIIa akan menjadi stabil dan resisten terhadap enzim proteolitik misalnya plasmin (Poller, 2014).

Pada mekanisme intrinsik, semua faktor yang diperlukan untuk pembekuan darah berada di dalam darah. Pembekuan dimulai bila faktor Hageman (faktor XII) kontak dengan suatu permukaan yang bermuatan negatif, misalnya kolagen subendotel pembuluh darah yang rusak. Reaksi tersebut dipercepat dengan pembentukan kompleks antara faktor XII, faktor Fitzgerald dan prekalikrein. Faktor XIIa selanjutnya akan mengaktifasi faktor XI, dan faktor Xia bersama ion kalsium akan mengaktifasi faktor IX. Faktor IX aktif, bersama-sama faktor VIII, ion kalsium dan fosfolipid akan mengaktifkan faktor X (Poller, 2014).

Menurut Poller proses pembekuan darah akan dihentikan oleh sistem anti koagulan dan fibrinolitik di dalam tubuh. Faktor-faktor yang menghentikan proses pembekuan darah adalah:

1. Larutnya faktor pembekuan darah dalam darah yang mengalir.
2. Metabolisme bentuk aktif faktor pembekuan darah oleh hati
3. Mekanisme umpan balik di mana trombin menghambat aktifitas faktor V dan VIII.
4. Adanya mekanisme anti koagulasi alami terutama oleh antitrombin III, protein C dan S.

#### **2.1.4 Metabolisme Warfarin**

Warfarin, seperti turunan 4-hydroxycoumarin lainnya digunakan sebagai obat antikoagulan oral yang bertindak sebagai antagonis vitamin K dengan cara menghambat regenerasi reduksi dari vitamin K yang merupakan suatu kofaktor penting dalam proses pembekuan darah (Gambar 1). Enzim target untuk warfarin adalah vitamin K epoksida reduktase kompleks 1 (VKORC1) yang mengkatalisis tahap *ratelimitting* dalam siklus vitamin K dan dihambat secara non-kompetitif oleh

antikoagulan kumarin. Meskipun secara pasti berada dalam ekstrak jaringan mentah, enzim VKORC1 tidak pernah berhasil dimurnikan, mungkin karena merupakan bagian dari protein yang lebih besar yaitu protein kompleks oligomerik (David et.al, 2011).

Warfarin menghasilkan efek farmakologi dengan menghambat VKORC1. VKORC 1 merupakan enzim dalam siklusvitamin K yang mengendalikan regenerasi vitamin K. Vitamin K merupakan kofaktor esensial yang mengatur pembentukan faktor pembekuan darah. CYP2C9 merupakan enzim P450 mayor yang memetabolisme S-warfarin membentuk metabolit inaktif. CYP2C9, Cytochrome P4502C9; VKORC1, vitamin K epoxide reductase complex; GGX, gamma glutamyl carboxylase (David et al, 2011).

## **2.2 CYP2C9**

CYP2C9 adalah obat isoform enzim sitokrom P450 (CYP450) yang memetabolisme obat fase I yang memainkan peran utama dalam oksidasi senyawa xenobiotik dan endogen. Gray et.al (1995) mengidentifikasi CYP2C9 sebagai salah satu dari beberapa gen CYP2C yang dikelompokkan dalam wilayah 500 kb pada kromosom 10q24. Cluster ini terdiri dari empat gen yang diatur dalam urutan CYP2C8-CYP2C9-CYP2C19-CYP2C18. Beberapa penelitian mengidentifikasi hubungan nukleotida polimorfisme (SNP) tunggal antara gen CYP2C8 dan CYP2C9. CYP2C9 terutama diekspresikan dalam hati, dan tingkat ekspresi dilaporkan tertinggi kedua di antara isoform CYP (Soars et.al, 2003). Hanya enzim CYP CYP3A4 yang secara kuantitatif lebih tinggi diekspresikan dalam hati manusia (Rettie, 2005).

### **2.2.1 Polimorfisme Enzim pemetabolisme Warfarin (CYP2C9)**

Gen CYP2C9 bila digambarkan pada kromosom 10q24.2, mengandung 9 ekson dan kode untuk mensintesis protein mikrosomal 60-kDa. Penemuan semi-sintesis SNP telah dilakukan di berbagai populasi etnis dan 30 alel CYP2C9 yang berkaitan dengan daerah pengkodean telah berhasil dilaporkan. Diantara beberapa alel, CYP2C9\*1 menunjukkan urutan referensi dan alel *wildtype*. Alel CYP2C9\*2

dan CYP2C9\*3 mengkode Arg144Cys dan varian Ile359Leu, kedua alel ini hadir dengan frekuensi alel masing-masing sebesar kurang lebih 12% dan 8% pada ras Kaukasia. Sekitar 40% dari penduduk ras ini mengekspresikan satu atau kedua enzim varian dalam tubuh mereka (Basim et al, 2015).

Secara *in vitro*, pembentukan kembali rekombinan dari CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3 yang secara fungsional dibuat cacat, hanya menunjukkan respon masing-masing sebesar 70% dan 5%, dibandingkan dengan enzim *wildtype* yang relatif lebih banyak dalam mengubah S-Warfarin. Akibatnya, perlu diantisipasi bahwa pembawa kedua alel tersebut akan memetabolisme S-warfarin lebih lambat secara *in-vivo* dan karena itu membutuhkan dosis pemeliharaan yang lebih rendah daripada dosis warfarin normal. Pengurangan dosis warfarin untuk pembawa alel CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3 telah dibuktikan oleh beberapa kelompok peneliti, dan alel ini dianggap sebagai faktor resiko yang kuat dalam proses antikoagulasi berlebihan jika pasien diawali dengan pemberian dosis “standar” warfarin yang pada dasarnya lebih tepat diberikan kepada pasien dengan CYP2C9\*1 homozigot (Slawomir et al, 2014).

Dalam kelompok – kelompok etnis, prevalensi dan pola dari alel – alel CYP2C9 sangat berbeda pada ras Kaukasia. Contohnya pada pasien berkulit gelap, CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3 muncul dalam frekuensi alel yang sangat kecil, yaitu (1 – 3%) dibandingkan pasien dengan kulit putih. Dua alel baru, CYP2C9\*5 dan CYP2C9\*6, secara selektif diekspresikan pada keturunan Afrika, dan terdapat bukti *in vivo* bahwa Asia Timur secara keseluruhan tidak memiliki alel CYP2C9\*2. Pada populasi orang Cina, Korea, dan Jepang terdapat alel CYP2C9 \*3 sebanyak sekitar 1 – 3%. Dalam populasi ini, telah ditemukan alel baru yang cacat, yaitu CYP2C9\*4, CYP2C9\*13, dan CYP2C9\*25, CYP2C9\*26, CYP2C9\*28, dan CYP2C9\*30, namun frekuensinya rendah (<1%) (Reddy et al, 2017).

Studi *in-vivo* mendukung defisit fungsional untuk CYP2C9\*4 dan \*13, tetapi hanya tersedia data *in vitro* untuk 4 alel terakhir. Studi lebih lanjut diperlukan untuk menentukan secara keseluruhan komplemen dari alel CYP2C9 yang cacat fungsional dalam kelompok etnis yang berbeda, sehingga dapat ditentukan populasi yang mungkin paling diuntungkan dari genotip CYP2C9. Dalam studi ekstensif

pada populasi Kaukasia, genotipe CYP2C9 memprediksi ~10% variabilitas dalam dosis warfarin (Siamak et al, 2013)

### **2.2.2 Pengaruh Polimorfisme Enzim Pemetabolisme Warfarin terhadap efek Warfarin**

Prevalensi fenotip CYP2C9 pada kelompok pemetabolisme rendah (*Poor Metabolizer*) sekitar 2 – 4% dan > 35% pada *Intermediate Metabolizer*. Obat dimetabolisme oleh enzim ini sekitar 5 – 10%. Persentase jumlah enzim CYP2C9\*2: Kaukasian 8 – 13%, orang Asia 2 – 6%, orang Afrika dan Amerika kurang dari 1%. Sedangkan jumlah enzim CYP2C9\*3: Kaukasian 6 – 10%, orang Asia kurang dari 1%, orang Afrika dan Amerika sekitar 1 – 4%. Menurut Soars pengaruh mutasi CYP2C9 dan VKORC1 terhadap klirens warfarin:

1. CYP2C9\*2 (430C > T) menurunkan metabolisme s-warfarin sekitar 30%, memperpanjang waktu paruh obat, membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai keadaan tunak, kebutuhan rata-rata harian warfarin sekitar 17% lebih rendah pada pasien dengan satu salinan alel CYP2C9\*2 (CYP2C9\*1/\*2); frekuensi alel dalam ras Kaukasia adalah sekitar 11%.
2. CYP2C9\*3 (1075A > C) menurunkan metabolisme warfarin sekitar 80%, memperpanjang waktu paruh obat, membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai keadaan tunak; kebutuhan harian rata-rata warfarin adalah sekitar 37% lebih rendah pada pasien dengan satu salinan CYP2C9\*3 (IMCYP2C9\*1/\*3); frekuensi alel dalam orang kaukasia adalah sekitar 7%.
3. VKORC1 (-1636G>A). Kebutuhan harian rata-rata warfarin sekitar 20% lebih rendah pada pasien dengan satu salinan VKORC1 (A>-1636G) dibandingkan dengan pasien tanpa mutasi VKORC1 (heterozigot G /A), frekuensi alel dalam Kaukasia adalah sekitar 40%.
4. Kombinasi yang menyebabkan mutasi dari satu gen atau lebih akan mengurangi kebutuhan warfarin rata-rata harian lebih lanjut. CYP2C9 mencakup hingga 18% dari variabilitas dalam dosis Warfarin. VKORC1 (-1636G>A) mencakup sekitar 30% dan kombinasi genotip dengan faktor - faktor klinis mungkin mencakup hingga 79% dari variabilitas dalam dosis warfarin.

CYP2C9 merupakan enzim hati yang sangat polimorfik dari golongan sitokrom P450. Enzim ini terlibat dalam metabolisme dan eliminasi obat-obatan yang banyak diresepkan. Polimorfisme genetik dalam CYP2C9 umumnya dapat mempengaruhi respon terapi obat-obatan. Aktivitas enzim ini diekspresikan dengan tingkat variasi yang tinggi. Tiga fenotipe yang telah diidentifikasi, yaitu *poor metabolizers* (PM), *intermediate metabolizers* (IM) dan *normal metabolizers* (NM) (Behzad et al, 2015). Lima varian alel CYP2C9 yang terdeteksi dalam tes genotip CYP2C9 memberikan lebih dari 98% cakupan varian alel yang ditemukan untuk gen ini. CYP2C9\*1 disepakati sebagai alel *Wildtype* dari gen CYP2C9. Individu homozigot *wild-type* memiliki fenotip pemetabolit normal (NM). Fenotip yang paling umum pada pemetabolit rendah telah diidentifikasi sebagai CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3. Perbedaan CYP2C9\*1 normal dari CYP2C9\*2 (C430T) dan CYP2C9\*3 (A1075C) masing-masing terletak pada substitusi nukleotida tunggal, yang mengarah ke gangguan aktivitas enzim. Behzad et.al (2002) menentukan bahwa kedua jenis pemetabolit rendah, yaitu tipe CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3, ditemukan sebanyak 35% pada ras Kaukasia (42% Kroasia). Di antara populasi kulit putih yang berbeda, CYP2C9\*2 dan CYP2C9\*3 merupakan alel yang signifikan dengan frekuensi alelik masing-masing sebesar 8 – 19% dan 4 – 16% (Laura, 2016).

Di Afrika dan Asia kedua varian jauh lebih jarang ditemukan (0,5 – 4%). CYP2C9\*4 telah secara eksklusif diidentifikasi pada orang Jepang. CYP2C9\*5 dan CYP2C9\*6 ditemukan pada orang Afrika Amerika dengan frekuensi alelik rendah (> 2%). Homozigositas untuk genotip CYP2C9\*3 atau CYP2C9\*2 relatif jarang (~ 1 – 2%) pada ras Kaukasia (Pieter 2003). Deteksi variasi genetik dalam enzim pemetabolisme obat bermanfaat dalam mengidentifikasi individu yang dapat mengalami *adverse drug reaction* (ADR) dengan dosis konvensional untuk obat tertentu. Individu yang merupakan pemetabolisme rendah enzim CYP2C9 dapat menunjukkan farmakokinetik yang berbeda (level obat) dibandingkan orang normal. Akibatnya, orang tersebut memerlukan dosis nonkonvensional untuk obat yang dimetabolisme oleh CYP2C9. Sebaliknya, obat yang tidak memerlukan

biotransformasi oleh CYP2C9 dapat menjadi pilihan untuk pasien dengan gangguan potensial CYP2C9 sehingga ADR dapat dihindari (Octavia, 2013).

Studi klinis telah menunjukkan bahwa pasien dengan setidaknya satu salinan alel CYP2C9\*2 memerlukan dosis harian warfarin rata-rata 17% lebih sedikit dibandingkan dengan pasien homozigot *wild-type*. Pada pasien dengan setidaknya satu salinan alel CYP2C9\*3 memiliki dosis harian warfarin rata-rata 37% kurang dari pasien homozigot *wild-type*. Dalam sebuah studi terpisah, risiko terhadap antikoagulasi berlebih (INR > 3) selama 2 minggu pertama terapi adalah sekitar dua kali lipat untuk pasien yang diklasifikasikan sebagai CYP2C9\*2 (\*1/\*2 atau \*2/\*2) atau CYP2C9\*3 (\*1/\*3, \*2/\*3, atau \*3/\*3) dibandingkan dengan fenotip NM (Laura, 2016).

Polimorfisme nukleotida tunggal pada gen VKORC1 telah dikaitkan dengan perlunya dosis yang lebih rendah untuk warfarin. Suatu studi menunjukkan bahwa 30% dari variasi dosis warfarin dapat dikaitkan dengan polimorfisme VKORC1. Sebuah tes mengidentifikasi 5 varian yang paling umum dari CYP2C9 (2C9\*2 - 2C9\*3) dan polimorfisme VKORC1 (-1639G>A) yang mempengaruhi dosis pemeliharaan warfarin (Laura, 2016). Uji CYP2C9 mengelompokkan individu ke dalam 1 dari 3 kategori, yaitu:

1. Pemetabolisme normal (Normal metabolizer / NM) memiliki kapasitas metabolisme yang normal. Pada umumnya, pemetabolisme normal dapat diberikan obat yang merupakan substrat dari enzim CYP2C9 dengan dosis standard. Konsistensi genotip dengan fenotip pemetabolisme normal mengandung 2 alel aktif CYP2C9.
2. Pemetabolisme intermediet (Intermediate metabolizers/IM) kemungkinan memerlukan dosis yang lebih rendah dibandingkan dosis rata-rata untuk menghasilkan respon terapeutik yang optimal dengan pengecualian prodrug. Untuk prodrug yang diaktivasi oleh CYP2C9, perlu dipertimbangkan pemberian obat alternatif atau peningkatan dosis. Konsistensi genotip dengan fenotip pemetabolisme intermediet mengandung 1 alel aktif dan 1 alel inaktif CYP2C9.

3. Pemetabolisme rendah (Poor metabolizer / PM) adalah individu yang memiliki risiko efek samping yang tinggi karena kurangnya eliminasi. Untuk penggunaan prodrug, pada pemetabolisme rendah terjadi kurangnya efek terapeutik yang disebabkan oleh gagalnya pembentukan metabolit aktif dari prodrug. Perlu dipertimbangkan pemberian obat alternative. Konsistensi genotip dengan fenotip pemetabolisme rendah tidak mengandung alel aktif CYP2C9.

### **2.3 DNA**

DNA merupakan materi genetik yang terdiri dari kromosom-kromosom dan berfungsi untuk mengendalikan perkembangan biologi secara seluler. Sehingga pada proses sintesis protein dapat berjalan fungsional dan struktural berdasarkan informasi genetik yang tersedia pada DNA. DNA terdiri dari dua untai nukleotida atau *double helix*, dimana setiap untai terdiri dari gugus fosfat dan basa nitrogen yang terdiri dari Adenin (A), Sitosin (C), Timin (T), dan Guanin (G) (Brian, 2012).

### **2.4 Ekstraksi DNA**

Ekstraksi DNA merupakan tahapan awal dalam analisis *sequencing*. Hasil ekstraksi DNA harus memiliki jumlah dan kualitas yang baik, agar dapat dilanjutkan pada tahapan analisis selanjutnya. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh bagaimana cara mendapatkan sample, cara penanganan dan cara penyimpanan. Hasil ekstraksi DNA yang baik juga dipengaruhi dari sample yang digunakan. Dalam ekstraksi DNA dapat digunakan berbagai sampel seperti jaringan, rambut, ataupun darah (Sutrisno, 2013). Sampel ideal untuk mendapatkan hasil ekstraksi DNA yang banyak dan berkualitas adalah darah (Fatmawati, 2015).

#### **2.4.1 Mekanisme Kerja Ekstraksi DNA**

DNA dengan kemurnian tinggi tidak hanya didapatkan melalui proses ekstraksi namun juga perlu melalui beberapa tahapan untuk membersihkan DNA yang didapatkan dari kontaminan penyusun sel lainnya (Hasrida, 2016). Melalui proses pencucian DNA akan terbebas dari protein, lemak dan RNA (*Ribonucleic acid*). Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan dapat

dimodifikasi sesuai dengan inhibitor yang ada (Fatmawati, 2015). Syarat-syarat yang harus terpenuhi pada proses ekstraksi DNA menurut Pambudiono (2016) :

- a. Proses ekstraksi DNA dimulai dengan menghancurkan dinding sel.
- b. Proses dapat dilanjutkan dengan penambahan deterjen seperti Setil Trimetil Amonium Bromida (CTAB) atau Natrium Dodesil Sulfat (SDS).
- c. Proses ekstraksi DNA harus dilakukan secara hati-hati karena DNA dapat terpotong oleh putaran yang cepat.
- d. DNA dihancurkan menggunakan buffer pengestrak untuk menghindari terjadinya degradasi terhadap DNA.

## **2.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu Teknik yang digunakan untuk memperbanyak jumlah DNA pada urutan tertentu secara *in vitro* dengan bantuan enzyme *polymerase* dan primer melalui perubahan suhu. Melalui PCR akan terbentuk molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target. Sehingga dalam proses PCR diperlukan dNTPs yang meliputi dCTP (*Cytosine*), dTTP (*Thymine*), dATP (*Adenin*) dan dGTP (*Guanine*).

Pada proses PCR digunakan dua macam primer sebagai penyedia gugus hidroksil. DNA untai ganda berfungsi sebagai cetakan yang mengandung DNA target, sehingga pada kondisi tertentu kedua primer akan mengenali dan berkomplementer dengan DNA sebagai pembatas awal dan akhir fragmen DNA target. Selanjutnya terjadi proses polimerasi dengan bantuan DNA polymerase yang berperan mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga terjadi proses pemanjangan kedua primer dengan penambahan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida cetakan dan berjalan dari arah 5' menuju 3' (Deniariasih, 2013). Proses ini juga dipengaruhi oleh tabung PCR yang harus bersifat responsif terhadap perubahan suhu oleh mesin *thermal cycler* (Anugrah, 2013). Proses perbanyak DNA dilakukan dalam tiga tahapan yaitu:

1. Denaturasi atau Peleburan

Pada tahapan ini terjadi proses denaturasi yang membuat terputusnya ikatan hydrogen DNA sehingga DNA menjadi utas tunggal. Ketika dalam bentuk tunggal, DNA akan menjadi tidak stabil sehingga siap menjadi tempat penempelan primer. Tahapan ini membutuhkan suhu yang tinggi antara 94-96°C dan dilakukan pada rentan waktu sekitar 3 menit untuk memastikan semua berkas DNA telah terpisah.

2. Anealing atau Penempelan

Pada tahapan ini terjadi proses penempelan primer pada sekuens DNA yang sesuai dengan urutan basanya, sehingga penempelan yang terbentuk bersifat spesifik. Proses ini dilakukan pada suhu antara 45-60°C.

3. Elongasi atau Pemanjangan

Pada tahapan ini terjadi proses pemanjangan primer oleh DNA komplementer, yang dilakukan dalam satu siklus amplifikasi. Suhu yang digunakan pada proses ini tergantung pada jenis DNA Taq-*polymerase* yang digunakan.

Proses penempelan primer dengan DNA templet dipengaruhi oleh temperatur. Sering dilakukan modifikasi pada temperatur penempelan atau *annealing* untuk meningkatkan keberhasilan dalam proses amplifikasi. Temperatur penempelan yang rendah menyebabkan primer tidak menempel pada situs yang diinginkan, melainkan akan menempel pada situs lain sehingga yang teramplifikasi bukanlah fragmen DNA yang diinginkan. Sedangkan temperature tinggi menyebabkan primer tidak dapat menempel pada templet DNA dengan baik. Sehingga untuk mendapatkan suhu penempelan yang baik dapat digunakan metode *gradient* pada PCR untuk mengetahui optimasi temperature penempelan pada DNA (Putu et al, 2015).

### 2.5.1 Primer

Primer adalah oligonukleotida pendek atau sepasang DNA utas tunggal yang menginisiasi sekaligus membatasi reaksi pemanjangan rantai atau polimerisasi DNA pada proses PCR. PCR pada dasarnya hanya dapat menggandakan DNA dengan panjang maksimum 10000 bp. Sehingga primer

dirancang sesuai dengan DNA target agar pada proses penggandaan didapatkan urutan DNA yang spesifik. Pada proses PCR digunakan dua jenis primer yaitu oligonukleotida dengan sekuen identik pada ujung 5'-fosfat dan oligonukleotida dengan sekuen identik pada ujung 3'-fosfat yang dapat mengikat segmen DNA (Yuwono,2006).

Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan untuk mengoptimalkan agar primer dapat digunakan dengan baik yaitu:

- a. Primer harus didesign seunik mungkin sehingga hanya terdapat kemungkinan penempel pada DNA target yang diinginkan dan tidak terdapat kemungkinan menempel pada posisi atau urutan selain target.
- b. Primer dirancang khusus agar dapat berkomplementer secara sempurna dengan DNA target dan dapat diterapkan kembali pada penelitian-penelitian berikutnya.
- c. Primer yang baik terdiri dari 20 sampai dengan 30 basa.
- d. Primer yang baik dipengaruhi oleh urutan primer dimana harus memiliki komponen GC yang serupa dengan sasaran.

Primer dimer merupakan primer yang paling sering diamati jika terdiri dari jumlah kecil dan digunakan untuk siklus yang banyak.

### **2.5.2 DNA Polymerase (Taq Polymerase)**

DNA polymerase merupakan komponen penting yang berperan pada proses amplifikasi melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*). DNA polymerase bersifat termostabil sehingga dapat mentoleransi tahapan denaturasi PCR tanpa kehilangan aktifitas yang penting (Yuwono,2006). Penggunaan DNA polymerase memungkinkan proses amplifikasi berjalan otomatis serta meningkatkan spesifitas dan efisiensi (Saiki *et al.*, 1988).

### **2.5.3 Firepol® Master Mix Ready to Load**

Pada penelitian ini digunakan 5x Firepol® Master Mix Ready to Load yang telah mengandung semua reagen yang dibutuhkan untuk melakukan PCR kecuali DNA template, primer dan air. Sehingga dalam proses PCR dapat langsung digunakan. Menurut data sheet Solis BioDyne campuran reaksi PCR yang

disarankan untuk penggunaan Firepol® DNA polymerase dipaparkan dalam table berikut.

Tabel 2.1 Panduan Komposisi Pcr Menggunakan Firepol Master Mix

No.	Komponen	Volume	Konsentrasi akhir
1.	5x Firepol® Master Mix Ready to Load	4 µl	1 x
2.	Primer Forward (10pmol/µl)	0,2 - 0,6 µl	0,1 - 0,3 µM
6.	Primer Reverse (10pmol/µl)	0,2 - 0,6 µl	0,1 - 0,3 µM
7.	DNA template	bervariasi	Bervariasi
8.	H <sub>2</sub> O PCR grade	Sampai dengan 100 µl	

Menurut data sheet Solis BioDyne siklus PCR yang disarankan untuk penggunaan Firepol® DNA polymerase dipaparkan dalam tabel 2.2.

Tabel 2.2 Firepol® DNA Polymerase

Tahapan Siklus	Temperatur	Waktu	Siklus
Initial peleburan	95 <sup>0</sup> C	3 - 5 menit	1
Peleburan	95 <sup>0</sup> C	15 - 30 detik	
Penempelan	54 - 66 <sup>0</sup> C	30 - 60 detik	25-30
Pemanjangan	72 <sup>0</sup> C	40 detik - 4 menit	
Pemanjangan akhir	72 <sup>0</sup> C	5- 10 menit	

## 2.6 RFLP (*Reaction Fragment Length Polymorphism*)

Pada proses RFLP (*Reaction Fragment Length Polymorphism*) digunakan enzim restriksi yang digunakan untuk mencerna DNA sehingga didapatkan potongan DNA tertentu (Mohsen *et al*, 2000). Enzim restriksi akan memotong untai ganda DNA pada situs spesifik, sehingga enzim restriksi berbeda memiliki target sekuens yang berbeda (Suryanto, 2003). DNA yang mengalami mutasi atau polimorfisme

dapat menyebabkan enzim restriksi memotong daerah lain yang berbeda. Sehingga menyebabkan terbentuknya potongan DNA yang berbeda ukurannya antara satu orang dengan yang lainnya (Jain, 2004).

## 2.7 Enzim Restriksi

Enzim restriksi digunakan untuk menganalisis lebih lanjut adanya variasi genetik yang mungkin terjadi pada masing-masing individu. Pada penelitian ini digunakan enzim restriksi AVA II, baik untuk menganalisis variasi genetik CYP2C9\*2 ataupun CYP2C9\*3. Namun enzim restriksi AVA II melakukan pemotongan pada urutan yang berbeda. Pada CYP2C9\*2 enzim restriksi AVA II akan memotong pada urutan 296 sedangkan pada CYP2C9\*3 akan memotong pada urutan 25.

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
MsII	CAYNNNNRTG	6	Blunt	1	127
ApoI	RAATTY	6	five_prime	1	266
AvaI	CYCGRG	6	five_prime	1	105
<b>AvaII</b>	<b>GGWCC</b>	<b>5</b>	<b>five_prime</b>	<b>1</b>	<b>296</b>
BsmAI	GTCTC	5	five_prime	1	83

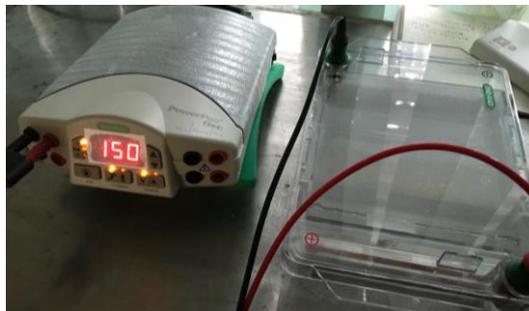
Gambar 2.3 Urutan pemotongan enzim restriksi AVA II pada CYP2C9\*2

Name	Sequence	Site Length	Overhang	Frequency	Cut Positions
ApaLI	GTGCAC	6	five_prime	1	17
<b>AvaII</b>	<b>GGWCC</b>	<b>6</b>	<b>five_prime</b>	<b>1</b>	<b>25</b>
AlwNI	CAGNNNCTG	6	three_prime	1	11
BseSI	GKGCMC	5	three_prime	1	21
Sdcl	GDGCHC	5	three_prime	1	21

Gambar 2.4 Urutan pemotongan enzim restriksi AVA II pada CYP2C9\*3

## 2.8 Elektroforesis

Elektorforesis digunakan untuk menganalisis dan menentukan ukuran fragmen DNA hasil retriaksi dan juga produk PCR. Elektroforesis merupakan metode yang memanfaatkan medan listrik untuk melakukan pemisahan molekul bermuatan dengan bantuan gel atau medium larutan. Prinsip kerjanya dengan meletakkan molekul yang memiliki muatan pada medan listrik maka molekul tersebut akan bergerak menuju medan elektroda yang berlawanan. Sehingga pada pada elektroforesis molekul asam nukleat yang memiliki muatan negatif akan bergerak menuju medan elektroda positif (anoda). Proses elektroforesis juga dipengaruhi oleh konsentrasi gel yang digunakan. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi agarose yang digunakan maka jaringan pori-pori yang terbentuk akan menjadi lebih kompleks, sehingga mempengaruhi kemampuan molekul asam nukleat untuk menembus jarring-jaring gel tersebut. Konsentrasi gel agarose perlu dikurangi ketika ingin memisahkan fragmen besar sedangkan jika ingin memisahkan fragmen kecil dapat dilakukan peningkatan konsentrasi (Dale dan Schantz, 2003).



Gambar 2.5 Elektroforesis yang digunakan dalam penelitian ini (Dok.Pribadi)

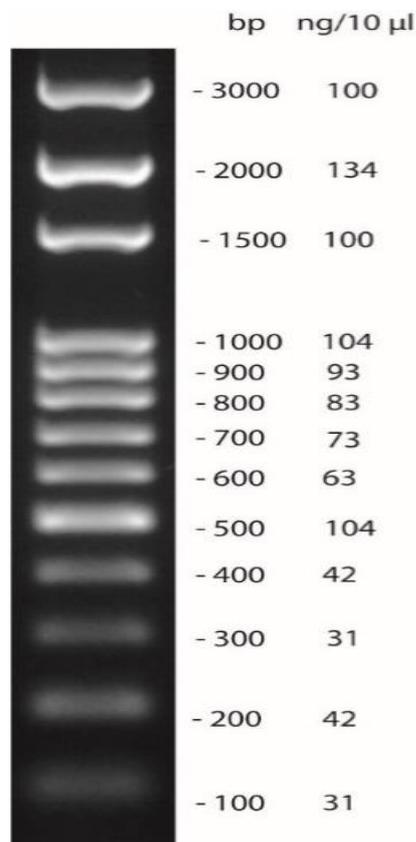
## 2.9 DNA Ladder

Setelah proses elektroforesis analisis dilanjutkan dengan proses pembacaan pita. Pada proses ini digunakan DNA ladder yang digunakan sebagai acuan identifikasi dan membedakan ukuran tiap fragmen yang didapatkan melalui proses elektroforesis. DNA ladder yang digunakan harus sesuai dengan besaran suatu standar ukuran yang dinyatakan dalam bp (*base pair*). Sehingga hasil fragmen yang didapatkan melalui proses elektroforesis dapat teridentifikasi dan teruji sesuai

dengan acuan (Sastry et al, 2016). Fragmen DNA ladder yang terbaca dekat dengan sumuran merupakan fragmen yang memiliki ukuran molekul paling besar.

### 2.9.1 100 bp DNA Ladder Ready to Load

DNA Ladder 100 bp adalah ladder yang siap digunakan sebagai marker yang digunakan untuk menentukan menganalisis hasil elektroforesis gel. Ladder ini diformulasikan untuk berjalan secara akurat dan berfungsi sebagai alat bantu visual untuk memantau kemajuan migrasi selama elektroforesis. DNA ladder 100 bp terdiri dari 13 fragmen DNA diskrit mulai dari 100 bp hingga 3000 bp.



Gambar 2.6 Visualisasi 100 bp DNA Ladder Ready to Load

### 2.10 Analisis Data

Hasil yang didapatkan dari elektroforesis kemudian akan dilihat untuk mengetahui adanya variasi genetik yang terjadi dengan membandingkan data yang didapat dengan DNA ladder.

Pada penelitian sebelumnya belum ada yang melakukan analisis lebih lanjut dan melakukan visualisasi menggunakan elektroforesis dengan primer dan enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini. Sehingga pada penelitian ini digunakan acuan hasil *restriction mapper* yang telah dilakukan.