

Pengembangan Uji Diagnostik melalui Teknik Molekuler

Rochman Na'im

Jurusan Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor, Bogor

PENDAHULUAN

Dalam bidang kedokteran (manusia maupun hewan), uji-uji diagnostik merupakan salah satu metode untuk menangani kasus penyakit. Berbagai uji diagnostik telah dikembangkan, baik yang didasarkan pada teknik kultur agen penyakit, reaksi kimia/biokimia maupun reaksi imunologik. Dengan berkembangnya teknologi dalam bidang biologi molekuler, maka pengembangan uji-uji diagnostik mulai diarahkan kepada teknologi tersebut yang menggunakan materi genetik sebagai dasar pengujiannya.

Materi genetik yang berupa asam nukleat baik DNA (*Deoxy-ribose Nucleic Acid*) maupun RNA (*Ribo Nucleic Acid*) mengandung tiga komponen, yaitu: 1) basa (purin dan pirimidin); 2) gula (deoksiribosa untuk DNA dan ribosa untuk RNA); dan 3) fosfat. Basa purin yang terdapat pada DNA maupun RNA adalah sama, yaitu Adenine [A] dan Guanine [G] sedangkan basa pirimidin berbeda, untuk DNA adalah Cytocine [C] dan Thymine [T] dan untuk RNA kedudukan Thymine digantikan oleh Uracil [U]. Kedua unsur basa tersebut (purin dan pirimidin) akan berpasangan membentuk kode-kode genetik pada DNA maupun RNA melalui ikatan hidrogen (A akan berpasangan dengan T [pada DNA] atau A dengan U [pada RNA]; dan G dengan C). Unsur gula dan fosfat akan membentuk struktur DNA dan RNA. DNA memiliki struktur rantai ganda sedangkan RNA memiliki rantai tunggal. Struktur DNA lebih stabil bila dibandingkan dengan RNA.

Berdasarkan materi genetik tersebut, uji-uji diagnostik dikembangkan melalui teknik-teknik molekuler seperti hibridisasi dengan *probe* asam nukleat; *polymerase chain reaction* (PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan sekuensing asam nukleat.

HIBRIDISASI

Mekanisme dasar di balik uji-uji diagnostik yang meng-

gunakan *probe* asam nukleat adalah hibridisasi. Teknik ini didasarkan pada perpaduan dua basa nukleotida dan rantai asam nukleat yang komplementer (DNA dengan DNA atau RNA; dan RNA dengan RNA).

Teknik hibridisasi meliputi dua proses, yaitu proses denaturasi atau pemisahan dua rantai asam nukleat yang komplementer dari proses renaturasi atau perpaduan kembali dua rantai asam nukleat. Proses denaturasi biasanya dilakukan dengan cara pemanasan DNA untuk memecah ikatan hidrogen yang terdapat di antara pasangan basa sehingga rantai asam nukleat akan terpisah. Proses ini kemudian diikuti dengan proses renaturasi dengan cara pendinginan.

Uji-uji yang menggunakan hibridisasi membutuhkan proses denaturasi dan fragmen asam nukleat yang tidak diketahui dan memfiksasi fragmen tersebut pada bahan solid seperti filter nitroselulosa. Kemudian suatu *probe* asam nukleat yang komplementer dicampurkan dengan fragmen asam nukleat yang terdapat pada bahan *solid* tersebut pada kondisi yang mendukung terjadinya hibridisasi. Proses hibridisasi dapat juga dilakukan dalam larutan (bukan bahan *solid*). Baik DNA yang hendak didiagnosis (*target*) maupun *probe* dimasukkan dalam larutan *buffer*. Kedua DNA tersebut bebas bergerak dan proses hibridisasinya berlangsung 5–10 kali lebih cepat daripada di bahan *solid*. Keadaan tersebut sangat penting dalam aplikasi kebanyakan diagnostik mikrobiologi yang memiliki konsentrasi DNA *target* sangat sedikit dan membutuhkan waktu diagnosis lebih cepat.

Kondisi yang dapat mempengaruhi apakah dua rantai asam nukleat akan berhibridisasi disebut *stringency*. Kondisi *stringency* yang kuat akan mendukung perpaduan dua basa dari dua rantai yang komplementer dengan tepat. Sedangkan kondisi *stringency* yang lemah akan menyebabkan banyaknya perpaduan dua basa yang tidak sesuai di antara dua rantai asam nukleat.

Salah satu kondisi yang mempengaruhi hibridisasi adalah tipe asam nukleat yang akan dihibridisasi. Perpaduan dua basa antara dua rantai DNA tidak sekuat pasangan basa antara DNA dan RNA. Rantai asam nukleat yang lebih panjang dengan jumlah pasangan basa yang komplementer lebih banyak akan berhibridisasi lebih kuat daripada rantai yang pendek. Komposisi basa asam nukleat juga akan mempengaruhi hibridisasi, karena pasangan basa G-C lebih kuat daripada pasangan A-T. Selain itu temperatur dan kekuatan ionik *buffer* yang digunakan juga akan mempengaruhi reaksi hibridisasi.

Probe asam nukleat adalah suatu fragmen rantai tunggal dari DNA atau RNA yang komplementer yang telah dilabel. *Probe* ini dapat dibuat sesuai dengan komposisi basa yang terdapat pada gen dan suatu agen penyakit sehingga *probe* tersebut hanya dapat berhibridisasi dengan gen dan agen penyakit tersebut dan secara spesifik akan mendeteksi adanya agen penyakit.

Ada berbagai cara untuk memperoleh dari melabel *probe* asam nukleat. Sebuah gen dan agen penyakit yang akan dideteksi harus dimurnikan terlebih dahulu, kemudian dilabel apakah dengan radioisotop seperti ³²P atau dengan substansi non-radioisotop. Walaupun substansi non-radioisotop dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Sensitifitas uji diagnostik menggunakan *probe* yang dilabel dengan non-radioisotop dapat ditingkatkan dengan penggunaan PCR. Substansi non-radioisotop yang paling sering digunakan sebagai label adalah biotin dan digoxigenin.

Probe yang dilabel dengan biotin akan dideteksi dengan menggunakan konjugat streptavidin-alkaline phosphatase (atau enzim lain) dan pewarna yang sesuai untuk menghasilkan reaksi yang berwarna seperti pada reaksi ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Untuk *probe* yang dilabel dengan digoxigenin, konjugat antibodi terhadap digoxigenin dengan berbagai enzim dapat digunakan dengan substrat yang sesuai untuk menghasilkan reaksi berwarna. Bila antibodi terhadap digoxigenin dikonjugasikan dengan alkaline phosphatase, substrat *chemiluminescent* dapat digunakan untuk menghasilkan reaksi bercahaya, yang bila diekspos ke film sinar X akan memberikan metode deteksi yang sensitif.

Probe dapat juga dibuat dari oligonukleotida (biasanya terdiri dari 30-40 nukleotida) yang dibuat secara sintetik. Oligonukleotida tersebut dapat berupa fragmen DNA rantai tunggal atau fragmen RNA yang dilabel.

Probe asam nukleat dapat digunakan pada hampir seluruh agen patogen, baik untuk digunakan dalam laboratorium riset sebagai alat eksperimental atau untuk uji-uji diagnostik yang sifatnya komersial.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Salah satu perkembangan teknik biologi molekuler yang sangat membantu dalam pengembangan uji-uji diagnostik adalah PCR. PCR dapat mengamplifikasi DNA dan jumlah yang sedikit menjadi jumlah yang dapat dideteksi/banyak.

Adanya penemuan DNA polymerase (Taq polymerase) yang stabil pada temperatur tinggi dan pengembangan alat yang mengatur temperatur proses PCR secara otomatis, telah mem-

buat PCR dapat digunakan untuk uji-uji diagnostik secara praktis.

DNA *polymerase* adalah enzim yang dapat mensintesis rantai DNA yang baru dan DNA yang sudah ada. Penemuan enzim yang tahan panas sangat membantu untuk mensintesis DNA baru, karena tahap awal proses PCR dilakukan dengan cara pemanasan rantai DNA yang sudah ada pada temperatur 90°C.

Untuk mengamplifikasi DNA dilakukan 30-40 kali siklus proses PCR. Satu siklus terdiri dari 3 tahap, yaitu tahap denaturasi pada temperatur 95°C, tahap hibridisasi *primer* pada temperatur 37° sampai 56°C dan tahap polimerisasi pada temperatur 72°C.

Secara umum, DNA yang akan diamplifikasi diapit oleh sepasang *primer* sintetik yang merupakan potongan pendek dari DNA yang spesifik/komplementer yang berfungsi sebagai *template* dari DNA yang akan diamplifikasi. DNA target yang akan diamplifikasi didenaturasi terlebih dahulu dengan pemanasan, kemudian *primer* ditambahkan pada DNA target dan temperatur diturunkan agar terjadi proses hibridisasi. Bila tahap polimerisasi dimulai, maka rantai DNA target yang terdapat di antara primer akan diperbanyak menjadi dua rantai dengan panjang yang sama seperti DNA target. Dengan adanya pengulangan tahap-tahap denaturasi, hibridisasi dan polimerisasi beberapa kali, maka DNA target akan diperbanyak secara efektif.

Bila enzim *reverse transcriptase* yang mensintesis DNA dan *template* RNA, digunakan pada tahap awal proses PCR, maka RNA ribosom dan genomik dan virus RNA juga dapat diamplifikasi.

PCR dapat digunakan dalam uji-uji diagnostik untuk mengamplifikasi asam nukleat dan agen-agen penyakit yang ada dalam jumlah sedikit sehingga sensitifitas uji dapat ditingkatkan. DNA yang telah diamplifikasi selanjutnya diidentifikasi dengan teknik hibridisasi yang menggunakan *probe* asam nukleat yang spesifik, atau dengan analisis *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan elektroforesis pada gel agarose atau dengan cara sekuensing.

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Teknik ini menggunakan enzim-enzim restriksi yang berfungsi sebagai pemotong DNA rantai ganda pada sekuens yang spesifik, untuk menentukan apakah dua fragmen DNA memiliki kesamaan. Dalam teknik ini, DNA didigesti atau dipotong dengan enzim restriksi tertentu, kemudian dielektroforesis pada gel agarose yang akan memisahkan fragmen DNA yang dipotong sesuai dengan ukurannya. Kalau DNA tidak identik ukurannya, maka pola fragmen DNA pada gel tidak akan sepadan. Bila pola fragmen DNA sama, maka enzim restriksi tersebut akan digunakan untuk menentukan apakah dua rantai DNA memiliki kesamaan.

Satu rantai DNA yang tidak diketahui dapat diidentifikasi apakah berasal dari agen penyakit tertentu atau tidak dengan cara pembar pola RFLP dengan referensi standar.

SEKUENSING ASAM NUKLEAT

Sekuensing asam nukleat merupakan suatu metode untuk menentukan urutan-urutan basa nukleotida (A, C, G dan T) dalam suatu gen dan asam nukleat. Saat ini sekuensing asam nukleat dapat dilakukan secara otomatis dengan suatu alat yang disebut *nucleic acid sequencer*. Peralatan tersebut dapat mengidentifikasi secara cepat suatu mikroorganisme berdasarkan sekuens dan genomiknya. Bila alat tersebut aplikasinya dikombinasikan dengan PCR, maka dapat dijadikan suatu alat uji diagnostik yang sensitif dan spesifik.

Bagaimanapun uji-uji diagnostik yang didasarkan pada teknik molekuler bukanlah sesuatu yang mudah, melainkan membutuhkan keterampilan khusus. Teknik molekuler tersebut seharusnya digunakan untuk mengembangkan uji-uji diagnostik yang lebih sensitif dan lebih spesifik dengan biaya yang relatif tidak mahal.

Untuk agen-agen penyakit tertentu metode diagnosis seperti antibodi monoklonal, ELISA, mikroskop elektron, immunofluoresensi ataupun uji-uji diagnostik konvensional lainnya masih memberikan hasil yang cukup baik. Dengan demikian

teknik molekuler hanya akan berfungsi sebagai pelengkap uji-uji diagnostik yang telah ada.

Teknik-teknik molekuler yang telah diuraikan tersebut sebaiknya digunakan untuk memahami atau mempelajari agen penyakit pada tingkat molekuler dan interaksinya dengan induk semang.

KEPUSTAKAAN

1. Brock TD, Madigan MT. *Biology of Microorganisms*. 5th ed. Prentice Hall. New Jersey. 1988.
2. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. San Diego. California. 1990.
3. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers Biochemistry*. 23rd ed. Prentice Hall International Inc. USA. 1993.
4. Old RW, Primrose SB. *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*. Blackwell Scientific Publications. London. 1989.
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989.
6. Swaminathan B, PrakashG. *Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes: Application in Diagnostic Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York. 1989.



Half the ease of life oozes away through the leaks of unpunctuality