

# OPTIMASI METODE SANGER *SEQUENCING* UNTUK DETEKSI POLIMORFISME GEN MTHFR (C677T) PADA PASIEN LLA ANAK

Reihanatul Mawaddah<sup>1</sup>, Puji Lestari<sup>1</sup>, Radhita Karima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>D IV Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Jakarta III

<sup>2</sup>Laboratorium Penelitian dan Pengembangan, Rumah Sakit Kanker Dharmais  
reyhanatulmawaddah@gmail.com

## ABSTRACT

*Acute Lymphoblastic Leukemia (LLA) is a cell malignancy that occurs due to the proliferation of immature lymphoid cells in the form of T cells or B cells in the marrow, blood, and extramedullary sites that are most commonly found in children. One of the causes of failure of therapy in LLA is due to toxicity to the chemotherapy drug methotrexate (MTX). Toxicity in MTX occurs due to polymorphism in genes that encode the enzyme methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR). Polymorphism that occurs in the MTHFR gene is Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) in C677T. This study aims to determine the optimal conditions and polymorphism picture of the MTHFR gene (C677T) in pediatric LLA patients using the Sanger Sequencing Technique. This study is an observational descriptive study with a cross-sectional design carried out in the Research and Development Section of Dharmais Cancer Hospital on 58 patient samples in January-June 2022. Through this study, it can be concluded that the sanger sequencing method is in optimal conditions when using PCR with an annealing temperature of 59°C and there are as many as 1 (1.70%) samples experiencing homozygous polymorphism (TT), 13 (22.40%) samples experiencing heterozygous polymorphism (CT) and 44 (75.90%) other samples Wild-type homozygous (CC).*

*Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL); MTX; MTHFR; Sanger Sequencing*

## ABSTRAK

Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) adalah keganasan sel yang terjadi akibat proliferasi sel limfoid yang belum matang berupa sel T atau sel B di sumsum tulang, darah, dan *extramedullary sites* yang paling banyak ditemukan pada anak. Salah satu penyebab kegagalan terapi pada LLA adalah karena toksisitas terhadap obat kemoterapi methotrexate (MTX). Toksisitas terhadap MTX terjadi karena terjadinya polimorfisme pada gen yang menyandi enzim metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR). Polimorfisme yang terjadi pada gen MTHFR merupakan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) C menjadi T pada posisi 677 (C677T). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimal deteksi dan gambaran polimorfisme gen MTHFR (C677T) pada pasien LLA anak menggunakan Teknik Sanger *Sequencing*. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan desain cross sectional yang dilaksanakan di Bagian Penelitian dan Pengembangan Rumah sakit Kanker Dharmais menggunakan 58 sampel pada bulan Januari-Juni 2022. Melalui penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode sanger sequencing dapat digunakan untuk mendeteksi polimorfisme gen MTHFR C677T dengan suhu annealing 59°C. Hasil deteksinya menunjukkan bahwa terdapat 1 (1,70%) sampel mengalami polimorfisme homozigot (TT), 13 (22,40%) sampel mengalami polimorfisme heterozigot (CT) dan 44 (75,90%) sampel lainnya Wild-type (CC).

Kata Kunci: Leukemia limfoblastik akut (LLA); MTX; MTHFR; Sanger *Sequencing*

## PENDAHULUAN

Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) merupakan kanker darah yang paling sering terjadi pada anak, yaitu 25–30% dari seluruh jenis kanker pada anak usia 0-14 tahun (Wijayanti & Supriyadi, 2017). Kasus leukemia di Indonesia, sebanyak 2,5–4,0 per 100.000 anak dengan estimasi 2.000–3.200 kasus baru jenis LLA tiap tahunnya (Juniasari *et al.*, 2020). Leukemia limfoblastik akut (LLA) adalah keganasan berupa proliferasi sel progenitor limfoid berupa sel T atau sel B di sumsum tulang, darah, dan *extramedullary sites* yang paling banyak ditemukan pada anak (Juniasari *et al.*, 2020). Kasus LLA memuncak pada anak usia 2-5 tahun, dan lebih banyak terjadi pada anak laki-laki dibandingkan anak perempuan dengan rasio 55% dibanding 45% (Reynaldo *et al.*, 2020).

Dilihat dari tingginya kasus LLA pada anak dibandingkan jenis leukemia lain, diperlukan untuk mengetahui keberhasilan pengobatan yang didapat berdasarkan angka kesintasan (*survival rate*). LLA sebenarnya merupakan jenis kanker yang potensial untuk disembuhkan dengan kemoterapi (Elisafitri *et al.*, 2018). Namun, salah satu penyebab kegagalan terapi pada LLA adalah terjadinya toksisitas karena obat kemoterapi *methotrexate* (MTX) yang digunakan. Toksisitas terhadap MTX terjadi karena adanya polimorfisme pada gen yang menyandi enzim yang berperan dalam metabolisme folat, yaitu enzim metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR).

Polimorfisme yang terjadi pada gen MTHFR merupakan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs). SNPs yang terjadi pada gen MTHFR antara lain C677T dan A1298C. SNPs yang paling umum terjadi adalah C677T, yaitu perubahan basa nukleotida sitosin menjadi timin pada posisi 677, yang berakibat pada perubahan asam amino valin menjadi alanine. Perubahan ini menghasilkan enzim MTHFR termolabil dengan aktivitas katalitik yang berkurang, sehingga hal ini dapat mempengaruhi kondisi LLA (Maskoen *et al.*, 2016).

Polimorfisme gen MTHFR C677T dapat dideteksi menggunakan *sequencing* dengan metode sanger. Sanger *sequencing* dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi susunan basa DNA dengan cara membandingkan susunan basa DNA dari sampel dengan susunan basa DNA yang tersedia di *gene bank*. DNA yang akan ditentukan urutannya dijadikan sebagai cetakan (*template*) untuk kemudian diamplifikasi (diperbanyak) menggunakan enzim dengan penambahan beberapa pereaksi tertentu. Proses ini dinamakan *cycle sequencing* (Fadhilah *et al.*, 2016).

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi metode sanger *sequencing* untuk mendeteksi polimorfisme gen MTHFR (C677T). Hasil penelitian ini adalah ditemukannya kondisi optimum untuk deteksi polimorfisme gen MTHFR C677T dan diperoleh gambaran prevalensi polimorfisme gen MTHFR C677T pada pasien LLA anak.

## **METODE**

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif dengan desain potong lintang. Sampel penelitian berupa 58 spesimen darah perifer pasien LLA anak yang telah tersimpan di Biobank Rumah Sakit Kanker Dharmas (RSKD). Seluruh sampel berasal dari pasien LLA yang telah menyelesaikan kemoterapi fase induksi. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari-Juni 2022.

Tahap pertama adalah ekstraksi DNA yang dikerjakan sesuai dengan protokol DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen (LOT no. 154026204). Konsentrasi dan kemurnian DNA dihitung menggunakan alat Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Tahap kedua adalah PCR dengan komponen reaksi sebagai berikut: 25 µl MyTaq HS Mix 2x, 1 µl Primer *forward* (10 µM), 1 µl Primer *reverse* (10 µM), 18 µl ddH<sub>2</sub>O dan 5 µl DNA *template* (10 ng). Berikut adalah sekuen primer *forward* dan *reverse*: primer *forward* TGTGGTCTCTTCATCCCTCGC dan primer *reverse* CCTTTTGGTGATGCTTGTTGGC.

Telah dilakukan optimasi terhadap komponen reaksi PCR di atas dengan menggunakan ½ reaksi untuk efisiensi reagen. Tabung PCR yang berisi seluruh komponen reaksi dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* ProFlex, dengan program sebagai berikut : denaturasi awal digunakan suhu 95°C selama 1 menit, kemudian diikuti 25 siklus berikutnya untuk setiap tahapan mulai dari denaturasi dengan suhu 95°C selama 15 detik, Suhu *annealing* ditentukan secara gradien, yaitu antara 55°C -65°C dengan *range* 2°C, yaitu 55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C dan 65°C. Untuk tahapan terakhir yaitu *extension* pada suhu 72°C selama 10 detik dan *hold* pada suhu 4°C dengan waktu tak terhingga ( $\infty$ ).

Selanjutnya, produk PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis agarose. Gel agarose yang digunakan adalah 1,5% dan di-*running* dengan besar tegangan 100 *volt* dalam waktu 30 menit. Volume PCR yang digunakan adalah 3

µl ditambah dengan 1 µl *loading dye*. Hasil elektroforesis di baca menggunakan GelDoc Biorad. Hasil yang diharapkan adalah *single band* dengan ukuran 513 bp.

Sebanyak 20 µl produk PCR dipurifikasi sesuai dengan protokol QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen (LOT no. 157026990). Konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh ditentukan dengan alat Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Selanjutnya sampel hasil purifikasi distandarisasi menjadi 5 ng untuk digunakan dalam proses *cycle sequencing*. Komposisi reaksi *cycle sequencing* adalah *Nuclease Free Water* (NFW) sebanyak 10,55 µl, primer *forward* dan/atau *reverse* (1 uM) sebanyak 3,2 µl, *big dye buffer* sebanyak 3,75 µl, *big dye* 0,5 µl, dan DNA *template* (5 ng/ µl) sebanyak 2 µl. Proses *cycle sequencing* menggunakan alat *thermal cycler* Biorad T100 dengan program sebagai berikut: *precycle* dengan suhu 95°C selama 15 menit, kemudian diikuti 25 siklus berikutnya untuk setiap tahapan mulai dari denaturasi 96°C selama 10 detik, *annealing* 50°C selama 5 detik, *extension* 60°C selama 4 menit, dan *hold* 15°C dengan waktu tak terhingga ( $\infty$ ).

Setelah *cycle sequencing*, sampel dipurifikasi ulang dengan menambahkan 45 µl SAM *solution* dan 10 µl larutan Xterminator (*Applied Biosystems*) kemudian di-*vortex* dengan kecepatan penuh selama 30 menit. Setelah itu, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 1000 g selama 1 menit. Supernatan diambil sebanyak 20 µl untuk dilanjutkan ke proses sanger *sequencing* menggunakan alat *Genetic Analyzer 3500* (*Applied Biosystem*). Analisis data hasil *sequencing* menggunakan *software* SeqScape v2.7.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Optimasi

Kualitas hasil ekstraksi dan purifikasi DNA seluruh sampel diukur secara kuantitatif menggunakan Nano Drop 2000 (*Thermo Scientific*) dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Hasil konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 Konsentrasi dan Kemurnian DNA

DNA Hasil Ekstraksi	Konsentrasi DNA (ng/ µl)	n	%	
		<10	9	15,5
	10-100	38	65,5	
	>100	11	19	
DNA Hasil Purifikasi	Kemurnian DNA	<1,8	19	32,8
		1,8-2,0	37	63,8
		>2,0	2	3,4
DNA Hasil Purifikasi	Konsentrasi DNA (ng/µl)	<10	0	0
		10-100	57	98,3
		>100	1	1,7
	Kemurnian DNA	<1,8	1	1,7
		1,8-2,0	2	3,4
		>2,0	55	94,9
Total		58	100	

Berdasarkan tabel 1 dapat diketahui bahwa sebagian besar sampel memiliki konsentrasi pada rentang 10-100 ng/ µl untuk DNA hasil ekstraksi dan DNA hasil purifikasi. Konsentrasi DNA didapatkan dari pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Kemurnian DNA hasil ekstraksi mayoritas berada pada rentang 1,8-2,0 yaitu sebanyak 37 sampel (63,8%) dan kemurnian DNA hasil purifikasi terbanyak berada pada rentang >2 yaitu sejumlah 55 sampel (94,9%).

Menurut Fathimah (2017) menyatakan bahwa konsentrasi DNA yang rendah (<10 ng/ µl) menjadi salah satu faktor yang dapat menyebabkan kemurnian DNA menjadi rendah. Melalui penelitian Iqbal, Dwi Buwono dan Kurniawati (2016) diketahui bahwa nilai konsentrasi tidak berbanding lurus dengan nilai kemurnian dikarenakan nilai kemurnian dipengaruhi oleh nilai kontaminan yang diserap pada panjang gelombang 280 nm. Konsentrasi DNA yang didapatkan kemungkinan dipengaruhi oleh teknik pengerjaan selama proses ekstraksi DNA berlangsung, dan kondisi spesimen yang berbeda-beda dikarenakan sudah lama disimpan.

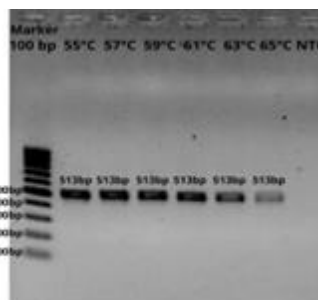
Kemurnian DNA diperoleh dari nilai rasio absorbansi pada  $\lambda$  260 nm dibandingkan dengan absorbansi pada  $\lambda$  280 nm ( $\text{Å}260:\text{Å}280$ ). DNA dikatakan murni bila berada pada rentang 1,8-2,0 (Wasdili & Gartinah, 2018). Pada Tabel 1, terdapat sebanyak 37 (63,8%) sampel memiliki kemurnian DNA yang baik (1,80-2,00). Namun, masih didapatkan pula sampel dengan kemurnian yang rendah <1,80 sebanyak 32,8%. Kemurnian DNA yang rendah atau tinggi dikarenakan adanya kontaminasi protein, RNA, atau fenol pada DNA. Kemurnian DNA > 2,00 menunjukkan adanya buffer yang terbawa saat proses ekstraksi (Mustafa *et al.*, 2016).

Tahapan optimasi selanjutnya ialah optimasi PCR yang dilakukan dengan variasi komposisi input bahan PCR. Pada pembuatan *mastermix* dilakukan menggunakan ½ reaksi dari komposisi bahan-bahan PCR. Komposisi yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.2.

Tabel 2 Komposisi *Mastermix* PCR

Bahan	Volume (µl)
MyTaq HS Mix, 2x	12,5
Primer <i>Forward</i> (10 uM)	0,5
Primer <i>Reverse</i> (10 uM)	0,5
DNA <i>template</i> (10 ng)	2,5
ddH <sub>2</sub> O	9
Volume Total Reaksi	25

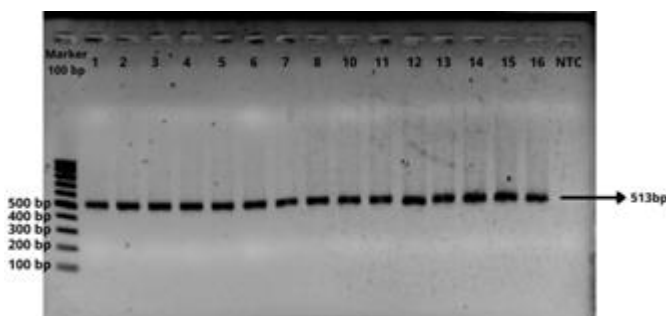
Tahap optimasi PCR yang dilakukan dalam proses penelitian ini meliputi variasi suhu *annealing*. Terdapat 6 gradien suhu yang digunakan yaitu 55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C dan 65°C dengan waktu *annealing* 15 detik di tiap suhunya. Setelah proses PCR, dilanjutkan dengan visualisasi menggunakan gel elektroforesis guna melihat *band* DNA yang dihasilkan dari proses optimasi. Hasil visualisasi elektroforesis dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1 Hasil Elektroforesis Optimasi Suhu *Annealing* PCR  
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Pada gambar 1 terlihat semua varian suhu *annealing* telah menghasilkan *single band* berukuran 513 bp dengan ketebalan *band* yang berbeda-beda. Pada suhu 55°C dan 57°C terdapat *band* yang sangat tebal, pada suhu 59°C terdapat *band* yang cukup tebal, pada suhu 61°C dan 63°C mulai terlihat penipisan *band*, dan pada suhu 65°C *band* terlihat sangat tipis. Pada penelitian ini diperoleh suhu 59°C sebagai suhu yang optimal untuk deteksi polimorfisme gen MTHFR C677T. Tidak terdapat band pada *well* NTC menandakan tidak ada kontaminan selama proses pengerjaan.

*Annealing* merupakan tahap terjadinya penempelan primer pada DNA *template*. Primer dapat menempel pada DNA *template* apabila suhu yang digunakan merupakan suhu optimum, sehingga suhu yang digunakan dalam tahap *annealing* merupakan faktor penting keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR. Suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakberhasilan amplifikasi DNA karena primer yang tidak bisa menempel, sedangkan suhu *annealing* yang terlalu rendah dapat menyebabkan primer menempel pada tempat yang tidak spesifik (Amanda *et al.*, 2020). *Band* DNA yang tebal dan tunggal/mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA juga utuh (tidak terfragmentasi), sedangkan *band* DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (terfragmentasi) (Setyawati *et al.*, 2021).



Gambar 2 Elektroforesis sampel LLA  
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Setelah didapatkan hasil *single band* maka sampel siap untuk dipurifikasi. Purifikasi berfungsi untuk mendapatkan DNA murni hasil amplifikasi PCR. Setelah tahapan purifikasi ini, konsentrasi dan kemurnian DNA diukur kembali. Berdasarkan tabel 1 didapatkan hasil konsentrasi yang lebih besar



dibandingkan saat sebelum di purifikasi. Semua konsentrasi sampel berada pada rentang 10-100 ng/μl. Seluruh sampel kemudian dilakukan standarisasi menjadi 5 ng/μl untuk menuju ke tahapan *cycle sequencing*, dan dilakukan pengenceran primer menjadi 1 ng.

Langkah berikutnya adalah *cycle sequencing* menggunakan PCR Biorad, pada tahap ini ditambahkan ddNTPs (*dideoxy-Nucleotide Triphosphate*) yang berperan untuk menghentikan perpanjangan polinukleotida pada saat dilakukan sanger *sequencing*. Tahap berikutnya adalah purifikasi, dimana terdapat 2 macam reagen, yaitu *SAM Solution* dan *Big Dye X-Terminator*. *SAM Solution* berfungsi untuk meningkatkan kinerja larutan XTerminator™ dan menstabilkan reaksi pasca-pemurnian. *Big Dye X-Terminator* berfungsi untuk mengeliminasi terminator pewarna yang tidak menempel dari reaksi sekuensing. Selanjutnya sampel di *vortex* selama 30 menit agar semua komponen tercampur dengan maksimal dan di-*running* pada alat.

Kemudian dilakukan proses *sequencing* dengan metode sanger menggunakan alat Genetic Analyzer 3500 (*Applied Biosystem*). Proses *sequencing* pada alat ini menggunakan prinsip *capillary electrophoresis*, merupakan teknik analisis yang digunakan untuk memisahkan ion berdasarkan mobilitas elektroforesisnya dengan menggunakan tegangan tinggi. Laju pergerakan partikel berbanding lurus dengan medan listrik yang digunakan. Semakin besar kekuatan medan, semakin cepat mobilitasnya (Gummadi & Kandula, 2020).

Akurasi keseluruhan sanger *sequencing* yaitu 99,95%, atau kesalahan keseluruhan 0,05%. Dengan panjang baca 800 hingga 1000 pasangan basa, kedua aspek sanger *sequencing* ini (akurasi dan panjang baca) menjadikannya *gold standard* untuk sekuensing (Thermo Fisher Scientific, 2015). Data yang diperoleh berupa elektroferogram, dimana setiap nukleotida ditunjukkan oleh warna yang berbeda. Nukleotida Adenin (A) ditunjukkan dengan warna hijau, Guanin (G) ditunjukkan dengan warna hitam, Timin (T) ditunjukkan dengan warna merah dan Sitosin (C) ditunjukkan dengan warna biru.

## B. Hasil Identifikasi Polimorfisme Gen MTHFR (C677T)

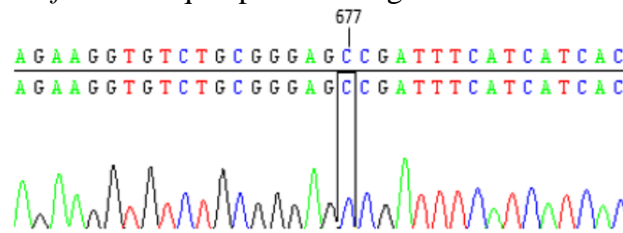
Berikut ini merupakan interpretasi hasil deteksi polimorfisme gen MTHFR C677T pada 58 sampel dengan metode sanger *sequencing*.

Tabel 3 Hasil Analisis Polimorfisme gen MTHFR (C677T)

<i>Genotype</i>	Hasil Pemeriksaan	
	N	%
Homozigot (TT)	1	1,70%
Heterozigot (CT)	13	22,40%
<i>Wild-type</i> (CC)	44	75,90%
Total	58	100,00%

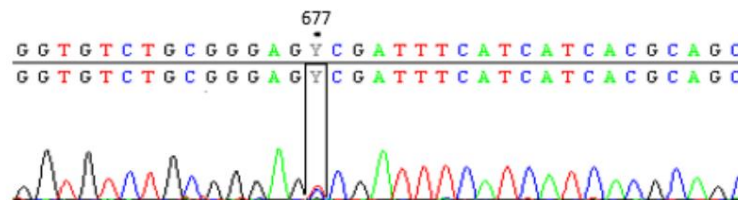
Berdasarkan tabel 3 didapatkan 1 orang dengan polimorfisme homozigot (TT) atau sebesar (1,70 %), 13 orang mengalami polimorfisme heterozigot (CT) yaitu sebesar (22,40%) dan 44 orang lainnya *Wild-type* (CC) yaitu sebesar (75,9 %.). Selanjutnya untuk menentukan titik polimorfisme gen MTHFR (C677T) digunakan *software* SnapGene. Pada *software* ini peneliti memasukkan sekuens

dari penelitian terdahulu pada NCBI *genebank* (NG\_013351.1) serta susunan primer MTHFR, dan didapatkan hasil primer yang menempel spesifik dengan target DNA dengan panjang sekuen 513 bp. Kemudian dilanjutkan dengan analisis menggunakan *software* SeqScape v2.7 dengan hasil berikut ini.



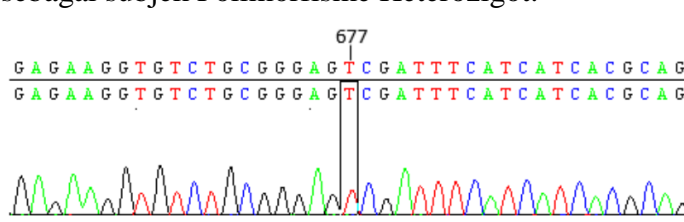
Gambar 3 Hasil *Sequencing* MTHFR *Wild Type*  
(Sumber : Doumentasi Pribadi)

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa pada sampel tidak terjadi perubahan basa ditandai dengan *peak* dengan lengan kromosom mengkode sitosin sehingga sampel dikategorikan sebagai subjek *wildtype* (CC) atau tidak mengalami polimorfisme gen MTHFR C677T.



Gambar 4 Hasil *Sequencing* MTHFR Polimorfisme Heterozigot  
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Pada gambar 4 dapat dilihat bahwa pada sampel terjadi perubahan dimana munculnya *peak* yang tumpang tindih karena pada satu lengan kromosom mengkode sitosin dan satu lengan lainnya mengkode timin sehingga sampel dikategorikan sebagai subjek Polimorfisme Heterozigot.



Gambar 5 Hasil *Sequencing* MTHFR Polimorfisme Homozigot  
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Pada gambar 5 dapat dilihat bahwa pada sampel terjadi perubahan dimana munculnya *peak* dengan lengan kromosom mengkode timin sehingga sampel dikategorikan sebagai subjek Polimorfisme Homozigot.

Berdasarkan tabel 3 didapatkan 1 orang dengan polimorfisme homozigot (TT) atau sebesar (1,70 %), 13 orang mengalami polimorfisme heterozigot (CT) yaitu sebesar (22,40%) dan 44 orang lainnya *Wild-type* (CC) yaitu sebesar (75,9 %). Berdasarkan hasil penelitian El-Khodry, *et al* (2012), pasien dengan *genotype* CC memiliki kelangsungan hidup yang bebas dari *relapse* sebesar 86,36% sedangkan, pada pasien dengan *genotype* CT sebesar 71,43% dan pada pasien



dengan *genotype* TT sebesar 30%. Oleh karena itu, mengidentifikasi *genotype* ini sangat penting dalam rangka meningkatkan strategi pengobatan LLA anak serta pengurangan dampak toksisitas obat. Ditemukannya polimorfisme gen MTHFR (C677T) pada populasi pasien LLA anak di RSKD dengan metode Sanger *Sequencing* akan memungkinkan untuk dilakukan pengkajian lebih lanjut mengenai dampak klinis dari kondisi ini terhadap kemungkinan terjadinya toksisitas maupun *relapse* pasca kemoterapi.

## SIMPULAN

Konsentrasi DNA hasil purifikasi lebih tinggi dibandingkan konsentrasi DNA hasil ekstraksi dan kemurnian DNA meningkat setelah dilakukan purifikasi; Suhu optimal untuk *annealing* PCR adalah 59°C; dan dari 58 sampel yang diperiksa didapatkan hasil 1 orang (1.70%) mengalami polimorfisme homozigot (TT), 13 orang (22,40%) mengalami polimorfisme heterozigot (CT), dan 44 orang (75,90%) *wildtype* (CC) atau tidak mengalami polimorfisme. Diharapkan dapat mengkaji lebih lanjut hubungan antara status *relapse* pasien LLA anak dengan polimorfisme gen MTHFR (C677T) dan hubungan antara toksisitas MTX dengan status polimorfisme gen MTHFR (C677T).

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan pada segenap pimpinan dan staf litbang Rumah Sakit Kanker Dharmais, Jakarta.

## DAFTAR RUJUKAN

- Amanda, K., Sari, R., dan Apridamayanti P. 2020. Optimasi Suhu *Annealing* Proses PCR Amplifikasi Gen *Shv* Bakteri *Escherichia coli* Pasien Ulkus Diabetik. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. Vol 4 No 1, (<https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jmfarmasi/article/view/39969>), diakses 25 Mei 2022
- El-Khodary, N.M., El-Haggar, S.M., Eid, M.A, dan Ebeid, E.N. 2012. Study of The Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Contribution to The Toxicity of High-dose Methotrexate in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Med Oncol*. Vol 29 No 1: 2053-2062, (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21644011/>), diakses 11 Maret 2022
- Elisafitri, R., Arsin A.A., dan Wahyu, A. 2018. Kesintasan Pasien Leukemia Limfoblastik Akut pada Anak di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar. *JKKM*. Vol 1 No 3: 283-292, (<https://journal.unhas.ac.id/index.php/jkmmunhas/article/view/8819>), diakses 15 Maret 2022
- Gummadi, S., dan Kandula, N. 2020. A review on electrophoresis, capillary electrophoresis and hyphenations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 11(12): 6038-6056, (<https://ijpsr.com/bft-article/a-review-on-electrophoresis-capillary-electrophoresis-and-hyphenations/>), diakses 4 April 2022

- Juniasari, C., Fitriyana, S., Afgani, A., Yuniarti, L., dan Triyani, Y. 2020. Klasifikasi Morfologi Leukemia Limfoblastik Akut Berhubungan dengan Kejadian Relaps pada Pasien Anak. *Jurnal Integrasi Kesehatan & Sains (JKS)*. Vol 2 No 1: 1-5, (<https://ejournal.unisba.ac.id/index.php/jiks/article/view/4338> ), diakses 15 April 2022
- Maskoen, A. M., Kurniawan, C., Sahiratmadja, E., & Susanto, H. (2016). Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Distribution among Cervical Cancer Patients at Dr. Hasan Sadikin General Hospital. *Majalah Kedokteran Bandung*, 48(4), 216–221. (<https://doi.org/10.15395/mkb.v48n4.754> ), diakses 15 Mei 2022
- Mustafa, H., Rachmawati, I. dan Udin, Y. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk Anopheles barbirostris. *Jurnal Vektor Penyakit*. Vol 10 No 1: 7-10, (<https://doaj.org/article/4147a78d0c7c48f295f77788c9a98c91> ), diakses 1 Juni 2022
- Reynaldo, G., Carsantiningrum, B., dan Susanti, Y. 2020. Obesitas Sebagai Faktor Prognosis Buruk pada Anak dengan Leukemia Limfoblastik Akut. *Jurnal Kedokteran Meditek*, (<http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/1828> ), diakses 20 Mei 2020
- Wasdili, F., Gartinah, T. 2018. Penentuan kualitas isolasi dna salmonella typhimurium dengan metode spektrofotometri dan elektroforesis. *PINLITAMAS 1*. Vol 1, No.1, (<https://repository2.stikesayani.ac.id/index.php/pinlitamas1/article/view/431/388> ), diakses 3 Juni 2022
- Wijayanti, L., dan Supriyadi, E., 2017. Faktor Prognostik dan Kesintasan Pasien Leukemia Limfoblastik Akut Anak di RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta, 2010–2015. *Indonesian Journal of Cancer* Vol. 11, No. 4 (<https://www.indonesianjournalofcancer.or.id/e-journal/index.php/ijoc/article/view/532>, diakses 10 Maret 2022.