

SKRIPSI

BHAKTI MAULANA ASNAR

**SKRINING DELESI 9pb DNA MITOKONDRIA
PADA MANUSIA**

FP 114/06

Asn

S



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2005**

**MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Lembar Pengesahan

**SKRINING DELESI 9pb DNA MITOKONDRIA
PADA MANUSIA**

SKRIPSI

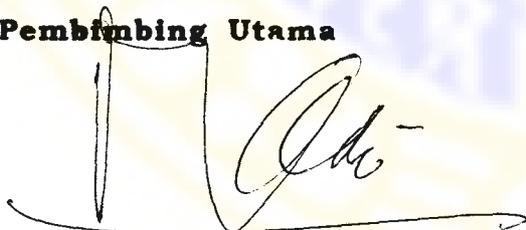
**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2005**

Oleh :

**BHAKTI MAULANA ASNAR
059912194**

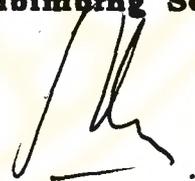
Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama



**Prof. Drs. Soemadi
NIP. 130 189 849**

Pembimbing Serta



**Drs. Soebahagiono
NIP. 130 517 153**

Bacalah dengan nama Tuhanmu Yang Menciptakan
(Q.S. Al 'Alaq (Segumpal darah):1)

*Demi matahari dan cahayanya di pagi hari.
Demi bulan bila ia mengiringi.
Demi siang bila ia menampakkan.
Demi malam bila menutupinya.
Demi langit serta yang membangunnya.
Demi bumi serta yang dipermukaannya.
Demi jiwa serta penyempurnaannya.*
(Q.S. Asy Syams (Matahari):1-7)

Dan milikNya apa yang di langit dan di bumi, dan kepadaNya lah ibadah selama-lamanya. Maka mengapa kamu takutkan yang selain Allah?
(Q.S. An Nahl (Lebah):52)

*Hari ini setiap orang mendapat balasan menurut usahanya. Hari ini tiada kezaliman.
Allah sungguh cepat membuat perhitungan.*
(Q.S. Al Mu'min (Orang Beriman):17)

Barangsiapa yang keluar rumah untuk belajar satu bab dari ilmu pengetahuan, maka ia telah berjalan fuisabilillah sampai ia kembali ke rumahnya.
H.R. Tirmidzi dari Anas r.a.

Katakanlah: "Samakah orang yang berilmu, dan orang yang tiada berilmu...?"
(Q.S Az Zumar (Rombongan):9)

Ia memberi hikmah kepada siapa yang ia berkenan. Dan barangsiapa yang diberinya hikmah, kepadanya telah diberikan kebaikan melimpah. Namun tiada yang mengambil peringatan, kecuali orang yang punya pikiran.
(Q.S Al Baqarah (Sapi Betina):269)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji kehadirat Allah SWT hanya dengan karuniaNya lah penulis dapat menyelesaikan naskah penelitian ini dan dengan segala kerendahan hati dan rasa syukur yang tak henti-hentinya saya haturkan. Sungguh suatu nikmat yang tak dapat diuraikan dengan kata-kata.

Selama penyusunan ini tentu penulis tidak bekerja seorang diri, banyak pihak-pihak yang turut mendukung untuk tersusunnya naskah yang berjudul "SKRINING DELESI 9pb DNA MITOKONDRIA PADA MANUSIA" ini. Karenanya penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof Drs. Soemadi selaku pembimbing utama dan Drs. Soebahagiono selaku pembimbing serta juga kepada Dr. Sudjarwo, MS. selaku konsultan dalam penelitian ini. Tanpa Bapak-bapak penelitian ini tidak akan selesai.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof Dr. H. Noor Cholies Zaini, Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof Dr. Siswandono, Apt., MS atas semua fasilitas dan bantuan yang telah diberikan.

Bapak Drs. Robby Sondach, MS., Apt. dan bapak Dr. Marcellino Rudyanto, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang berguna bagi perbaikan skripsi ini.

Seluruh dosen dan staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas segala bimbingan dan bekal ilmu yang telah diwariskan sehingga penulis bisa merasa percaya diri bahwa penulis bisa melakukan apa yang penulis inginkan dengan apa yang sudah penulis miliki.

Ibu Afaf dan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas bantuannya selama ini. Teman dari Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang sudah banyak membantu.

Ibu dan Bapak, yang selalu mendampingi disaat-saat sulit maupun senang. Mbak Erti yang selalu memberi pikiran-pikiran baru melalui obrolan-obrolan kita, Mas Yoyok yang siap membantu kapan pun diminta, Mas Didit yang memberikan

RINGKASAN

DNA sebagai struktur molekul terkecil dalam sel merupakan penentu sifat yang diturunkan. Di dalam sel, selain terdapat dalam inti sel, DNA juga terdapat pada mitokondria dan disebut dengan DNA mitokondria (mtDNA). DNA mitokondria berbentuk lingkaran dengan panjang 16569pb.

Fungsi utama mitokondria adalah untuk respirasi sel melalui reaksi enzimatik yaitu reaksi rantai *Oxidative Phosphorylation* (OXPHOS). Peran mtDNA pada fungsi respirasi adalah mengkode elemen-elemen inti (13 subunit polipeptida, 22 tRNA, dan 2 rRNA) bagi fungsi OXPHOS dan sintesis protein mitokondria. Fungsi mtDNA dapat mengalami penurunan karena terjadi mutasi.

Kecepatan mutasi mtDNA dapat mencapai 5-10 kali DNA inti. Tingginya kecepatan mutasi pada mtDNA menghasilkan variasi sekuens antar individu dan populasi sehingga akan terjadi akumulasi polimorfisme dalam populasi manusia yang dapat dihubungkan dengan letak geografis.

Variasi ini dapat digunakan untuk menelusuri asal-usul suatu populasi manusia karena susunan yang unik dimiliki oleh kelompok populasi dengan kekerabatan yang saling berdekatan. Menurut analisis mtDNA, manusia pertama berasal dari Afrika Barat yang lalu bermigrasi dan penyebarannya dapat diamati melalui variasi mtDNA yang diwariskan. Variasi mtDNA ini dapat diamati diberbagai benua termasuk Asia.

Manusia dari bangsa Asia dapat diidentifikasi dengan adanya variasi yang termasuk dalam haplotipe B. Haplotipe B ini dapat diidentifikasi dengan adanya delesi 9pb dan situs 16517+*HaeIII*. Delesi 9pb adalah marker bagi bangsa Asia, termasuk juga Indonesia. Haplotipe adalah rangkaian polimorfisme pada individu dan pengelompokan haplotipe disebut haplogroup.

Delesi 9pb mtDNA, bersama dengan mutasi pada situs lain, juga mempunyai hubungan dengan beberapa penyakit. Pada pasien dengan miopati pada anggota gerak, delesi 9pb mtDNA ditemukan bersama substitusi *adenine* dengan *guanine* pada pasangan nukleotida ke-8291. Pada pasien dengan kanker usus besar delesi 9pb mtDNA ditemukan bersama 3107delG (ND1), T2914G (16SrRNA), A2706G (16SrRNA), A2768G (16SrRNA), T2885C (16SrRNA), C7521T (tRNA^{Asp}), 7335insC (COI), G7256A (COI), T7146A (COI), G8206A (*D-Loop*), G16294A (*D-Loop*), G16266A (*D-Loop*), G16233A (*D-Loop*).

Pada penelitian ini dilakukan skrining delesi 9pb (gen antara COII dan tRNA^{Lys}, 8271-8281) untuk mengetahui kekerabatan dan prevalensi pada sampel darah yang diperoleh dari Pusat Endokrin Ilmu Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Metode yang digunakan untuk mendeteksi delesi ini adalah dengan menggunakan PCR untuk amplifikasi fragmen mtDNA. Kondisi denaturasi yang digunakan adalah suhu 95°C selama 1 menit, 56 °C untuk *annealing* selama 1 menit 30 detik, dan 72 °C untuk *extension* selama 1 menit 30 detik.

Kemudian hasil amplifikasi DNA dideteksi dengan elektroforesis pada tegangan 60V selama 3 jam. Elektroforesis menggunakan fasa diam gel agarose 4% dalam buffer TBE (Tris-Boric Acid-EDTA), dimana DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif bila diberikan arus listrik.

Hasil penelitian menunjukkan sebanyak 48,57% dari populasi sampel memiliki delesi 9pb mtDNA. Adanya delesi 9pb mtDNA yang terjadi menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang dekat dengan suku Asia. Dari penelitian ini diketahui bahwa delesi 9pb mtDNA dapat digunakan untuk menentukan asal-usul (kekerabatan) manusia dan memprediksi diagnosa suatu penyakit.

ABSTRACT

The human mitochondrial (mt) DNA is a closed circular molecule consist of 16.569 base pairs (bp). The mtDNA has a unique features, a rapid rate of mutation 5-10 times faster than nuclear DNA, that can be used to study the history of human ancestor.

As a result, studies of mtDNA sequence variation have provided a magnified view of genetic diversity between individuals within populations as well as between different racial groups. Analysis variant of mitochondrial DNA (mtDNA) has permitted the reconstruction of the ancient migrations.

These polymorphisms are associated with specific mtDNA haplotypes, and groups of related haplotypes (haplogroups). 9bp mtDNA deletion is a valuable anthropological marker for peoples of Asian origin. The mtDNA deletion, together with 16517+*HaeIII*, was found to be associated with haplogroup B.

The mtDNA deletion was found to be associated with some clinical features. Together with A8291G, the deletion was found in adult onset limb-girdle type mitochondrial myopathy. Meanwhile, in patients with colorectal tumorigenesis, the mtDNA deletion was found together with 3107delG (ND1), T2914G (16SrRNA), A2706G (16SrRNA), A2768G (16SrRNA), T2885C (16SrRNA), C7521T (tRNA^{Asp}), 7335insC (COI), G7256A (COI), T7146A (COI), G8206A (*D-Loop*), G16294A (*D-Loop*), G16266A (*D-Loop*), G16233A (*D-Loop*).

Detection 9 bp deletion of mtDNA (gene between COII and tRNA^{Lys}, np 8271-8281) in 35 Indonesians has been done to study the genetic diversity. Isolated DNA was amplified using Polymerase Chain Reaction (PCR) for 30 cycles of 1' at 95 °C, 1'30'' at 56 °C, and 1'30'' at 72 °C with 5'-3' primer sequence L8211 (TCGTCCTAGAATTAATTCCC) - H8310 (AGTTAGCTTTAC AGTGGGCT). The PCR product (amplified DNA) is then electrophoresed for 3 hours at 60V on a 4% agarose gel in TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) buffer and stained with ethidium bromide. Positive detection of 9 bp deletion read as 90 bp, while negative read as 99 bp.

In the population of sample examined the deletion subsequently found at a frequency of 48,57%, which conclusively indicate that the Indonesian have a predominantly maternal Oriental ancestry.

Keyword: 9bp mtDNA deletion (8271-8281), haplogroup B, PCR, electrophoresis.

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
RINGKASAN	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mitokondria	5
2.1.1 Struktur DNA Mitokondria	5
2.1.2 Fungsi DNA Mitokondria	7
2.1.3 Mutasi pada DNA Mitokondria	8
2.1.4 Haplotipe mtDNA	11
2.2 PCR (Polimerase Chain Reaction)	12
2.3 Elektroforesis	14
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	18
BAB IV BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Alat	21
4.2 Bahan	21
4.3 Metode Penelitian	21
4.3.1 Pengambilan Sampel	21
4.3.2 Isolasi DNA	21

4.3.3	Penentuan Konsentrasi DNA	21
4.3.4	Amplifikasi DNA dengan PCR	21
4.3.5	Deteksi Hasil PCR	22
4.3.6	Analisa Sampel	22
BAB V	HASIL PENELITIAN	24
BAB VI	PEMBAHASAN	26
BAB VII	KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1	Kesimpulan	30
7.2	Saran	30
	DAFTAR PUSTAKA	31
	LAMPIRAN	35

DAFTAR GAMBAR

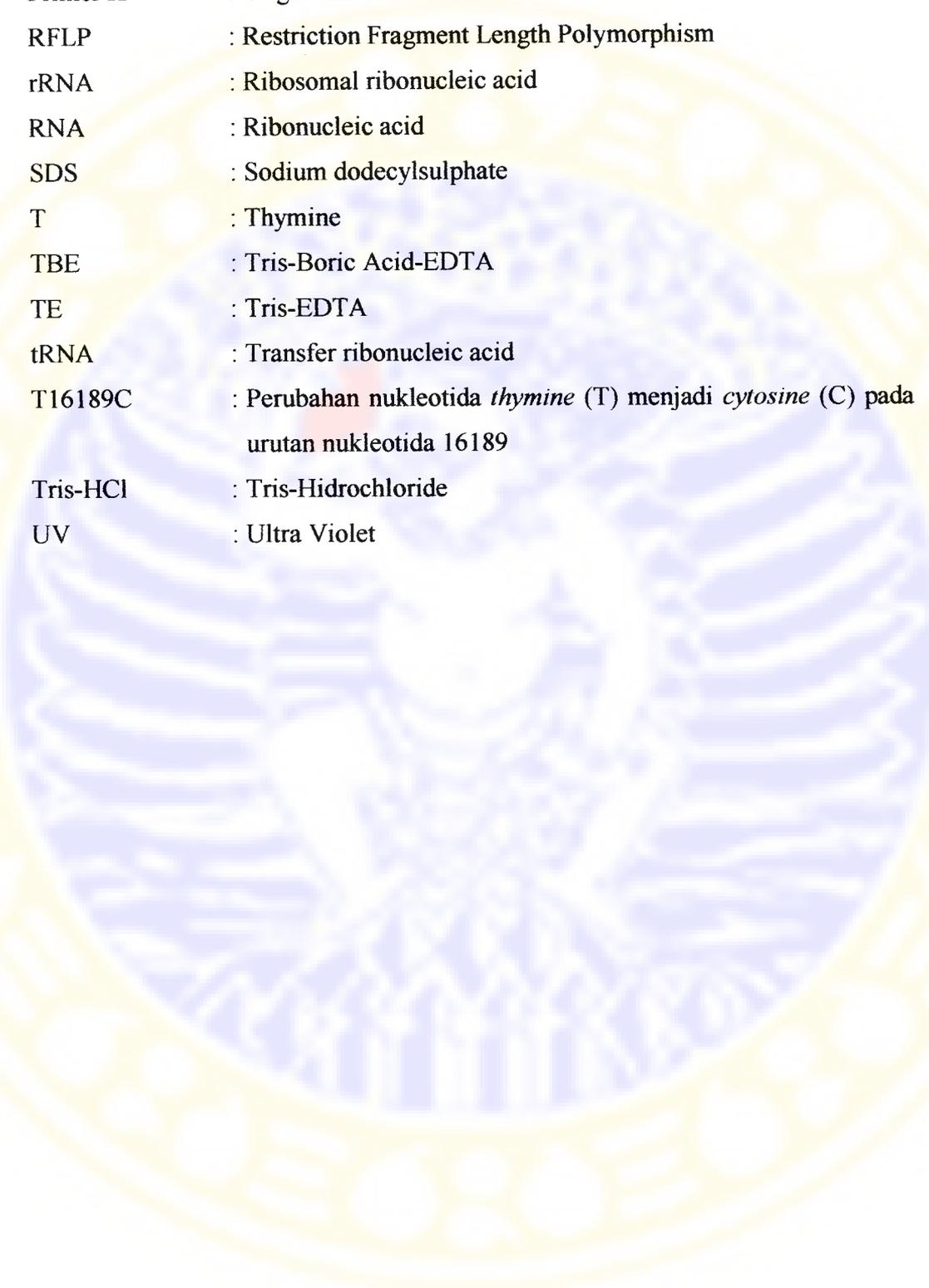
	Halaman
Gambar 2.1 Struktur dan organisasi DNA mitokondria	6
Gambar 2.2 Struktur DNA	8
Gambar 2.3 Mutasi geser	9
Gambar 2.4 Mutasi inversi	10
Gambar 2.5 Siklus amplifikasi dalam PCR	12
Gambar 2.6 Amplifikasi secara eksponensial pada PCR	13
Gambar 2.7 Mekanisme pemisahan DNA	15
Gambar 2.8 Perbedaan kecepatan migrasi fragmen DNA pada gel agarose	16
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian	20
Gambar 5.1 Hasil elektroforesa produk PCR	24

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman	
Lampiran 1	Prosedur pengambilan sampel dan isolasi DNA	35
Lampiran 2	Data populasi Sampel	36
Lampiran 3	Perhitungan prevalensi delesi 9pb mtDNA	37
Lampiran 4	Surat keterangan sampel	38

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

3107delG	: Delesi basa nukleotida <i>guanine</i> (G) pada posisi 3107
7335insC	: Insersi basa nukleotida <i>cytosine</i> (C) pada posisi 7335
A	: Adenine
ATP	: Adenosine triphosphate
C	: Cytosine
COI	: Cytochrome oxidase I
COII	: Cytochrome oxidase II
COIII	: Cytochrome oxidase III
Cyt b	: Cytochrom b
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxynucleotide triphosphate
delesi	: Hasil mutasi pada struktur DNA berupa penghapusan basa nukleotida
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetate
G	: Guanine
H-strand (O _H)	: Heavy-strand
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
Heteroplasm	: Keadaan individu yang memiliki DNA normal dan termutasi
L-strand (O _L)	: Light-strand
mtDNA	: Mitochondrial deoxyribonucleic acid
Mutagen	: Zat yang dapat menyebabkan mutasi
Myopati	: Penyakit dimana otot-otot tidak mampu mengendur (relaksasi) secara normal setelah berkontraksi, sehingga bisa menyebabkan kelemahan, kejang otot dan pemendekan otot (kontraktur)
ND	: NADH dehydrogenase
nDNA	: Nuclear deoxyribonucleic acid
nt	: Nucleotide
OXPHOS	: Oxidative Phosphorylation
PCR	: Polimerase Chain Reaction
Phylogenetic	: Pohon silsilah genetik



Polimorfisme	: Variasi mtDNA pada individu
Primer L	: Oligonukleotida sintetik arah <i>forward</i>
Primer H	: Oligonukleotida sintetik arah <i>reverse</i>
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	: Ribosomal ribonucleic acid
RNA	: Ribonucleic acid
SDS	: Sodium dodecylsulphate
T	: Thymine
TBE	: Tris-Boric Acid-EDTA
TE	: Tris-EDTA
tRNA	: Transfer ribonucleic acid
T16189C	: Perubahan nukleotida <i>thymine</i> (T) menjadi <i>cytosine</i> (C) pada urutan nukleotida 16189
Tris-HCl	: Tris-Hidrochloride
UV	: Ultra Violet

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pada suatu sel terutama sel eukariotik, struktur organisasinya terdiri dari antara lain nukleus (inti), mitokondria, retikulum endoplasma. Komponen didalam sel yang berhubungan dengan informasi genetik adalah DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). DNA sebagai struktur molekul terkecil dalam sel merupakan informasi genetik yang berfungsi sebagai pengatur sel-sel hidup dan juga menentukan sifat yang diturunkan (*Spector et. al., 1998*).

DNA terdapat disetiap sel yang menyusun jaringan yang berada di seluruh tubuh manusia. Di dalam sel, DNA selain terdapat pada inti sel (nDNA) juga terdapat pada mitokondria dan disebut dengan DNA mitokondria (mtDNA). DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk lingkaran dan terletak di dalam mitokondria pada sitoplasma dari sel (*Wallace et al. 1999*). Jumlah DNA mitokondria berbeda pada setiap jaringan. Jumlah tertinggi terdapat pada otak, kemudian hati, ginjal, jantung, dan terendah pada platelet. Hal ini berhubungan dengan kebutuhan energi dari organ yang bersangkutan. Sel-sel somatik membutuhkan lebih banyak energi dalam bentuk ATP untuk melakukan pembelahan (*Shoffner et al. 1995*).

Fungsi mitokondria pada sel eukariotik adalah respirasi sel melalui reaksi enzimatik yaitu reaksi rantai *Oxidative Phosphorylation* (OXPHOS). OXPHOS dimediasi oleh lima kompleks enzim intramitokondria (kompleks I, III, IV, dan V) yang ikut serta dalam memproduksi ATP yang dibutuhkan untuk fungsi selular yang normal. Enzim kompleks II terdapat di dalam inti, sehingga respirasi sel adalah suatu proses yang terkoordinasi antara mitokondria dan inti. Peran mtDNA adalah mengkode 13 subunit polipeptida yang berfungsi untuk OXPHOS, 22 tRNA, dan 2 rRNA, yang merupakan elemen inti bagi fungsi OXPHOS dan sintesis protein mitokondria.

Penurunan fungsi DNA mitokondria (OXPHOS) dapat terjadi akibat mutasi (*Shoffner et al. 1995*) dan mutasi umumnya terjadi akibat salah satu dari dua penyebab: kerusakan karena pengaruh lingkungan seperti sinar UV (sinar

Pada mulanya manusia bermigrasi dari Afrika Barat sekitar 150.000 tahun yang lalu, mereka mempunyai variasi mtDNA yang terakumulasi dengan frekuensi yang tinggi dan spesifik. Rangkaian polimorfisme mtDNA tersebut disebut haplotipe dan pengelompokan haplotipe mtDNA disebut haplogrup (Wallace, 1995).

Penelitian mengenai keberagaman sekuens mtDNA telah menunjukkan adanya variasi genetik antar individu dalam sebuah populasi, seperti juga yang telah ditunjukkan pada perbedaan antar ras (Cann et al. 1987). Sehingga dapat digunakan untuk mengetahui asal-usul (kekerabatan) manusia (Cann et al. 1987).

Salah satu mutasi mtDNA yang mempunyai hubungan dengan asal-usul adalah delesi 9pb. Mutasi ini terjadi pada posisi 8271-8281 yaitu pada daerah yang tidak mengkode (gen antara COII dan tRNA^{Lys}) dengan sekuens CCCCTCTA. Delesi 9pb merupakan marker bagi penduduk Asia yang bersama dengan situs 16517+HaeIII termasuk dalam haplogroup B (Wrischnik et al., 1987).

Delesi 9pb mtDNA, bersama dengan mutasi pada situs lain, juga mempunyai hubungan dengan beberapa penyakit. Pada pasien dengan miopati pada anggota gerak, delesi 9pb mtDNA ditemukan bersama substitusi adenine dengan guanine pada pasangan nukleotida ke-8291 (Hirata et al., 1999). Pada pasien dengan kanker usus besar delesi 9pb mtDNA ditemukan bersama 3107delG (ND1), T2914G (16SrRNA), A2706G (16SrRNA), A2768G (16SrRNA), T2885C (16SrRNA), C7521T (tRNA^{Asp}), 7335insC (COI), G7256A (COI), T7146A (COI), G8206A (D-Loop), G16294A (D-Loop), G16266A (D-Loop), G16233A (D-Loop) (Aikhionbare et al., 2004).

Pada penelitian ini dilakukan skrining delesi 9pb (gen antara COII dan tRNA^{Lys}, 8271-8281) untuk mengetahui kekerabatan dan prevalensi pada sampel. Sampel darah diperoleh dari Pusat Endokrin Ilmu Penyakit Dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Metode yang digunakan untuk mendeteksi delesi ini adalah dengan menggunakan PCR untuk amplifikasi fragmen mtDNA. Kondisi denaturasi yang digunakan adalah suhu 95°C selama 1 menit, 56 °C untuk *annealing* selama 1 menit 30 detik, dan 72 °C untuk *extension* selama 1 menit 30 detik.

Kemudian hasil amplifikasi DNA dideteksi dengan elektroforesis pada voltase 60V selama 3 jam. Elektroforesis menggunakan fasa diam gel agarose 4% dalam buffer TBE (Tris-Boric Acid-EDTA), dimana DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif bila diberikan arus listrik.

1.2 Rumusan Masalah

- (1) Apakah pada populasi sampel terdapat delesi 9pb mtDNA yang berhubungan dengan kekerabatan orang Asia?
- (2) Berapakah prevalensi delesi 9pb mtDNA pada populasi sampel?

1.1 Tujuan Penelitian

- (1) Tujuan Umum
Menjelaskan adanya delesi 9pb, yang mempunyai hubungan kekerabatan dengan orang Asia, pada populasi sampel penelitian.
- (2) Tujuan Khusus
 - a. Menentukan adanya delesi 9pb mtDNA yang berhubungan dengan kekerabatan orang Asia.
 - b. Menentukan prevalensi delesi 9pb mtDNA pada sampel.

1.2 Manfaat Penelitian

Adanya variasi genetik yang berupa delesi 9pb dapat digunakan untuk menentukan asal-usul dari sampel penelitian atau memprediksi diagnosa suatu penyakit.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mitokondria

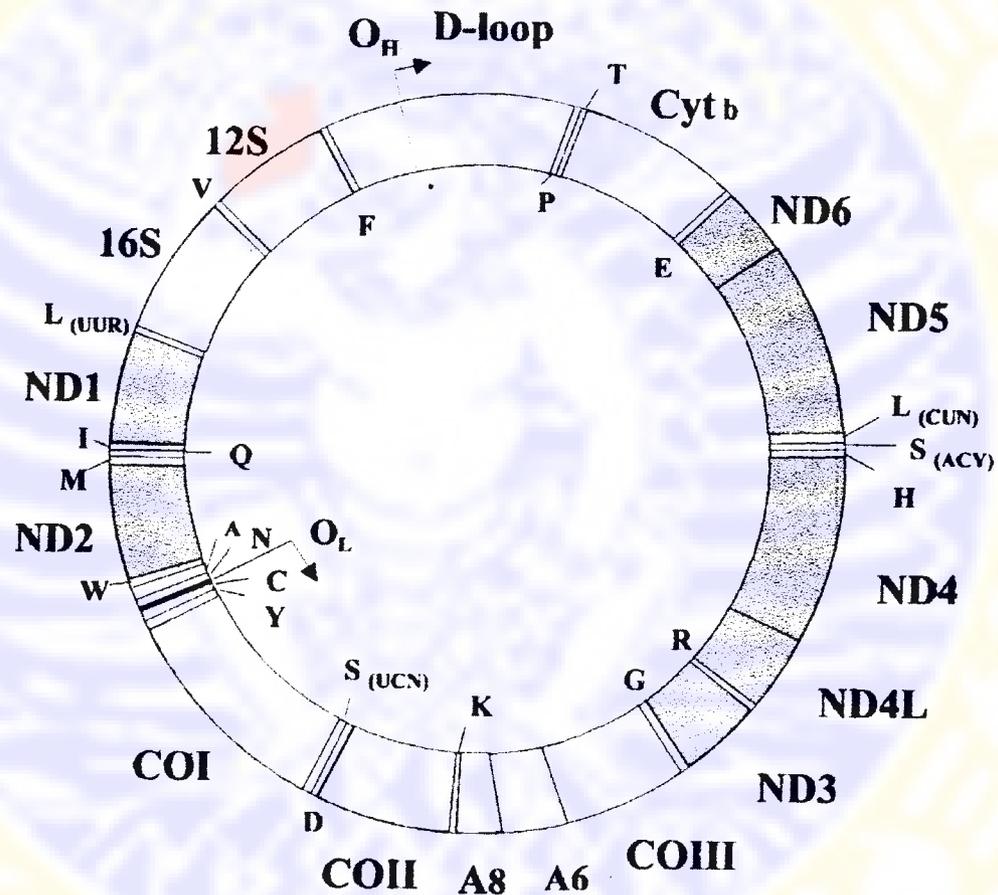
2.1.1 Struktur DNA Mitokondria

Mitokondria adalah suatu organel yang berada di dalam sel. Didalam mitokondria terdapat DNA (mtDNA) yang penting untuk respirasi sel melalui reaksi enzimatik fosforilasi-oksidasi yang melibatkan enzim respirasi kompleks I, III, IV, dan V. Dalam proses fosforilasi-oksidasi tersebut akan dihasilkan suatu energi dalam bentuk ATP (*Shoffner et al., 1995*).

Pada manusia, DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk DNA sirkuler untai ganda tertutup yang panjangnya 16569pb dan telah diketahui urutan nukleotidanya (*Anderson et.al.1981*). Untai ganda mtDNA yaitu *heavy (H)-strand* (untai berat) yang banyak mengandung guanin (G), dan *light (L)-strand* (untai ringan) banyak mengandung sitosin (C). DNA mitokondria sangat padat dan hampir tidak mempunyai intron (*non coding region*), dimana kurang lebih hampir 93% merupakan daerah yang menyandi (*exon*) atau *coding region*. DNA mitokondria menyandi 37 produk gen, 28 gen disandi oleh H-strand dan 9 gen disandi oleh L-strand. Ketigapuluhtujuh produk gen tersebut terdiri atas 13 polipeptida yang penting dalam proses OXPHOS, dua rRNA dan 22tRNA yang penting untuk translasi protein mitokondria. Ketiga belas polipeptida tersebut meliputi tujuh subunit (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, dan 6) dari kompleks I enzim rantai respirasi, satu subunit (apositokrom b) dari kompleks III, tiga subunit (COI, COII, COIII) dari kompleks IV dan dua subunit (ATPase 6 dan ATPase 8) dari kompleks V (gambar 2.1) (*Wallace 1992;Wallace 1995*). Disamping itu terdapat struktur spesifik pada mtDNA yang merupakan daerah yang tidak menyandi (*non coding region*), berperan dalam awal replikasi dan transkripsi mtDNA dan terdiri dari *triple-strand* DNA. Daerah ini disebut sebagai *D-loop region* (daerah gelung-D). Setiap individu memperlihatkan adanya urutan yang

berbeda pada daerah gelung-D ini, sehingga sangat penting untuk mengetahui adanya variasi antar individu (Wallace, 1992). Apabila terjadi variasi urutan dari DNA mitokondria pada daerah gelung-D, maka akan berpengaruh pada proses replikasi dan transkripsi (Brown dan Wallace, 1993).

Pada kenyataannya hanya sebagian kecil protein enzim rantai respirasi yang disandi oleh DNA mitokondria dan disintesis oleh ribosom



Gambar 2.1: Struktur dan organisasi DNA mitokondria

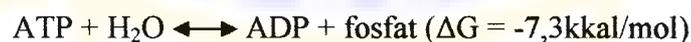
Organisasi genom mitokondria yang tersusun padat, mengandung gen struktural untuk 13 polipeptida: tujuh subunit NADH-koenzim Q oksido-reduktase (ND1-ND6), satu subunit sitokrom C oksido-reduktase (cyt b), tiga subunit sitokrom C oksidase (COI-COIII) dan dua ATPsintase (ATPase 6 dan 8). DNA mitokondria juga menyandi dua rRNA (12S dan 16S) serta tRNA. Puncak diagram menunjukkan daerah gelung D (diambil dari Shoffner, 1995)

mitokondria. Sebagian besar disandi oleh DNA inti dan disintesis di ribosom sitoplasma sebagai prekursor yang selanjutnya ditranspor ke dalam mitokondria. Meskipun yang disandi oleh DNA mitokondria hanya 5-10%, tetapi karena kompleks enzim rantai respirasi merupakan kompleks multi subunit, maka subunit rantai respirasi yang disandi DNA mitokondria mutlak diperlukan. Akibat kegagalan sintesis salah satu subunit dapat menyebabkan gangguan pada seluruh kompleks enzim yang dapat dilihat pada kegagalan fungsi enzim (Ozawa *et al.* 1987; Sudoyo *et.al.* 1990).

Disamping itu mtDNA mengalami kejadian mutasi kira-kira 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan nDNA. Hal ini disebabkan mtDNA tidak mempunyai mekanisme *repair* (Wallace, 1992). Berbeda dengan nDNA yang mempunyai histon sebagai protein pelindung, sedangkan mtDNA tidak mempunyai proteksi tersebut. Faktor lain penyebab mtDNA rentan terhadap mutasi adalah kecepatan *turn over* dan kandungan radikal bebas (anion superoksida dan hidrogen peroksida) yang tinggi dalam mitokondria (Linnance *et.al.* 1989; Wallace 1992). Tingginya laju mutasi mtDNA menghasilkan variasi urutan yang ekstensif diantara individu dan populasi (Wallace *et.al.* 1999).

2.1.2 Fungsi DNA Mitokondria

Mitokondria adalah suatu organel sel yang penting dalam penyediaan energi, terutama melalui rantai reaksi enzimatik. Oksidasi-fosforilasi (*oxidative phosphorylation*, OXPHOS) akan melepaskan energi bebas, dan kemudian dikonversi menjadi molekul ATP, yang merupakan sumber energi untuk metabolisme sel. Energi yang dihasilkan dari hidrolisis ATP adalah sebagai berikut:

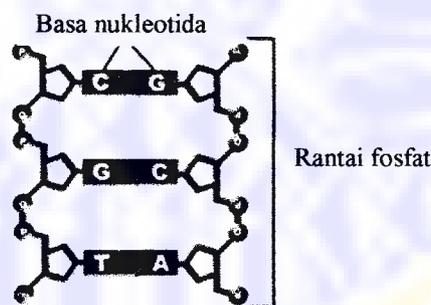


(Lehninger, 1975)

Mitokondria terdiri dari dua membran, yaitu membran luar yang merupakan batas antara mitokondria dan sitoplasma dan membran dalam yang membagi ruang dalam mitokondria menjadi ruang antar membran (*intermembrane space*) dan matriks. Lipatan membran dalam mitokondria yang menonjol ke dalam matriks akan membentuk krista (*Ozawa et al. 1987*). Enzim-enzim yang berperan dalam OXPHOS terletak pada membran dalam mitokondria. Proses OXPHOS yang berlangsung dalam mitokondria melibatkan lima kompleks enzim rantai respirasi, yang masing-masing dibentuk dari subunit-subunit yang disandi oleh DNA inti (nDNA) dan DNA mitokondria (mtDNA). Kebanyakan sel mengandung ratusan sampai ribuan organel mitokondria, kecuali sel darah merah yang tidak mempunyai mitokondria (*Shoffner et al., 1995*).

2.1.3 Mutasi pada DNA Mitokondria

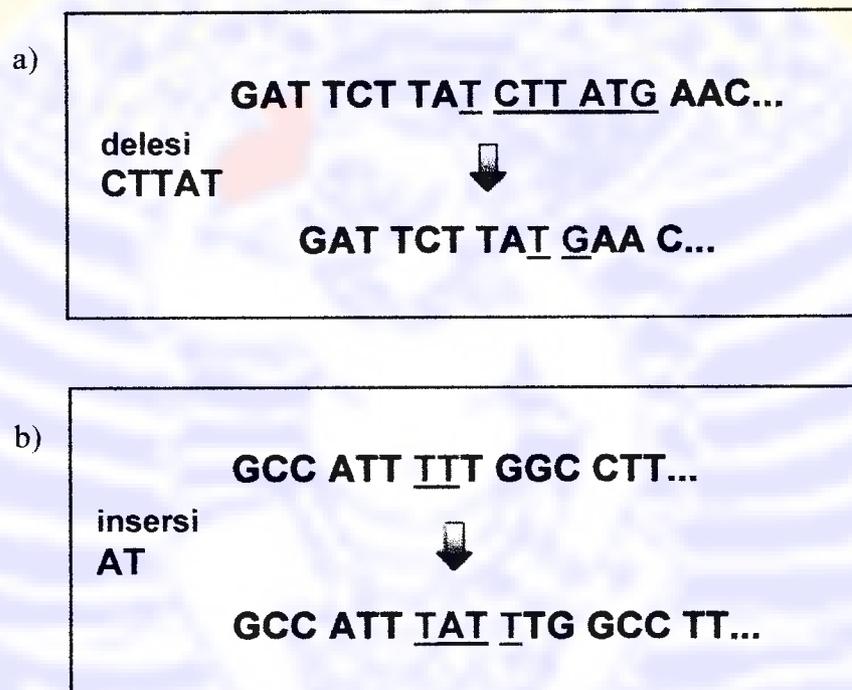
Struktur DNA yang digambarkan pada gambar 2.2 dapat mengalami mutasi. Mutasi dapat disebabkan oleh dua hal, yaitu kerusakan yang dipengaruhi oleh lingkungan seperti sinar UV (sinar matahari), radiasi nuklir, atau bahan kimia tertentu, serta kesalahan yang timbul pada pengkopian DNA saat sel akan melakukan pembelahan. Bahan-bahan yang menyebabkan terjadinya mutasi disebut mutagen (*anonim, 2002*).



Gambar 2.2 Struktur DNA

DNA terdiri dari 4 macam basa nukleotida: *adenine* (A), *guanine* (G), *cytosine* (C), dan *thymine* (T). Guanin selalu berpasangan dengan Cytosin dan Timin selalu berpasangan dengan Adenin (*dikutip dari glsc.genetics.utah.edu*).

Dilihat dari jenisnya, mutasi dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu mutasi substitusi, mutasi geser, dan mutasi inversi, sedang mutasi geser dapat disebabkan oleh mutasi delesi dan mutasi insersi. Mutasi substitusi adalah mutasi yang mengubah satu basa nukleotida menjadi basa nukleotida lain. Pada mutasi ini satu basa nukleotida, misalnya *adenine* (A), dapat berubah menjadi basa nukleotida yang lain, *guanine* (G), *cytosine* (C), atau *thymine* (T), juga demikian basa nukleotida yang lain (Toland, A.E., 2001).



Gambar 2.3 Mutasi geser

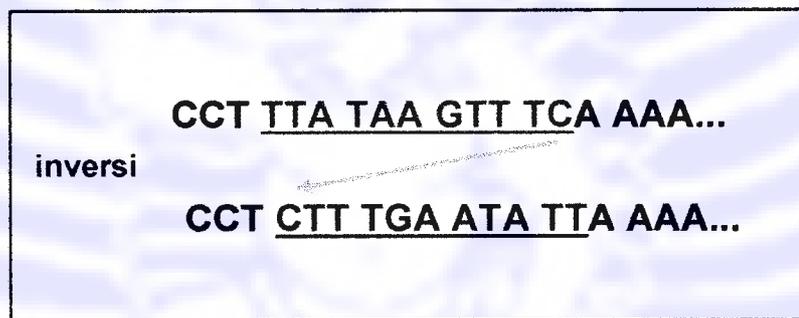
a) Hasil dari delesi CTTAT diperoleh urutan nukleotida yang lebih pendek. b) hasil insersi AT diperoleh urutan nukleotida yang lebih panjang. (dari Toland, A.E., 2001).

Pada mutasi geser, satu atau lebih basa nukleotida mengalami insersi atau delesi. Perhatikan gambar 2.3, pada mutasi delesi (penghapusan), misal terjadi delesi pada sekuen CTTAT, akan menyebabkan pergeseran basa nukleotida yang berada setelahnya untuk melanjutkan sekuen yang terputus akibat delesi. Juga jika terjadi mutasi insersi (penambahan) basa nukleotida, misal terjadi insersi sekuen AT, akan menyebabkan pergeseran basa

nukleotida yang berada setelah sekuen insersi (AT). Pergeseran ini terjadi karena adanya penambahan sekuen (insersi) (Toland, A.E., 2001).

Pada mutasi inversi, daerah yang mengalami mutasi sekuen basa nukleotidanya akan mengalami penyusunan terbalik dari belakang ke depan seperti pada gambar 2.4 di bawah. Mutasi ini dapat melibatkan hanya beberapa basa nukleotida atau puluhan hingga ratusan basa nukleotida sehingga mempengaruhi daerah yang lebih luas (Toland, A.E., 2001).

Mutasi dapat tidak berekspresi fenotipik jika terjadi pada intron atau terjadi pada ekson namun tidak merubah asam amino yang dikode. Namun mutasi akan berekspresi fenotip jika terjadi pada ekson dan merubah asam amino yang dikode (Shoffner et al., 1995).



Gambar 2.4 Mutasi inversi

Pada inversi, susunan basa nukleotida mengalami pembalikan susunan basa nukleotida tanpa terjadi penambahan atau pengurangan basa nukleotida (dari Toland, A.E., 2001).

Seperti telah diutarakan di atas mutasi dapat terjadi pada saat DNA melakukan duplikasi. Saat sel melakukan pembelahan, tiap sel menduplikasi seluruh susunan DNAny, proses ini dinamakan replikasi DNA. Replikasi DNA dimulai saat enzim DNA helicase memisahkan DNA menjadi dua untai tunggal. Lalu enzim DNA taq polimerase mengkopi kedua untai tunggal tersebut untuk membuat dua molekul DNA untai ganda. Mutasi terjadi ketika DNA taq polimerase melakukan kesalahan dalam pengkopian, yang terjadi pada kurang lebih 1:100.000.000 basa (anonim, 2002).

2.1.4 Haplotipe mtDNA

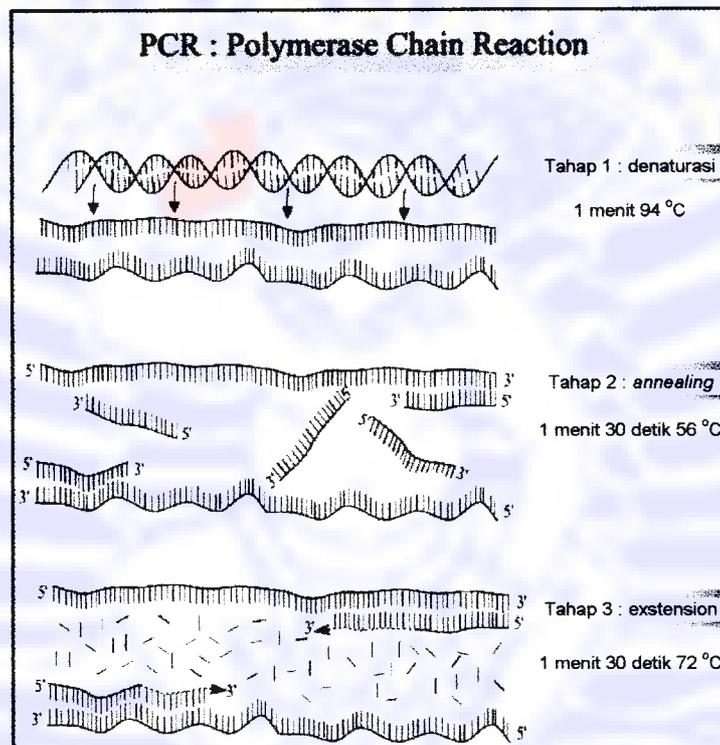
Variasi sekuen mtDNA bangsa Asia dari bangsa Asia Tengah dan Tenggara, termasuk Malay aborigin dan Borneo aborigin, Cina Han, Vietnam, Korea dan Malaysia India (*Ballinger et al, 1992*), juga 54 bangsa Tibet (*Torrioni et al. 1993* seperti dikutip *Wallace et al, 1999*) *phylogenetic* Asia meliputi 42 haplotipe Bangsa Tibet, 106 haplotipe Asia dan 34 haplotipe Siberia. Pada *phylogenetic* semua bangsa Asia terdiri dari dua besar haplogroup dengan ada dan tidak adanya polimorfik *DdeI* pada np 10394. Selain pada 10394 dengan *DdeI*, setiap mtDNA Asia juga mempunyai polimorfik pada 10397 dengan *AluI* (C menjadi T pada np 10400). Haplogroup makro yang dinyatakan dengan adanya polimorfik pada np 10394 dengan *DdeI* dan np 10397 dengan *AluI* disebut haplogroup makro M. Polimorfik np 10394 dengan *DdeI* dan np 10397 dengan *AluI* pada bangsa Asia, tetapi tidak pada bangsa Afrika atau Eropa, dan secara tidak langsung mutasi np 10397 dengan *AluI* timbul pada mutasi mtDNA np 10394 dengan *DdeI* seperti migrasi wanita Afrika ke Asia (*Wallace et al, 1999*).

Dua cabang besar *phylogenetic* mtDNA Asia khusus diwariskan pada bangsa Asia dan Amerika. Haplogroup A, B, C, dan D ternyata berasal dari mtDNA leluhur bangsa Amerika. Haplogroup A ditetapkan dengan 663+*HaeIII* (pada np 663 terjadi perubahan nukleotida A menjadi G), haplogroup B dengan delesi 9pb (gen antara COII dan tRNA^{Lys}, 8271-8281) dan 16517+*HaeIII*, haplogroup C dengan 13259-*HincII* dan 13262-*AluI* (perubahan A menjadi G pada 13262), haplogroup D dengan 5176-*AluI* (perubahan dari C menjadi A pada np 5178), haplogroup F dengan 124-*HpaI/HincII* (*Wallace et al, 1999*).

Haplogroup B yang ditetapkan dengan delesi 9pb (antara gen COII-tRNA^{Lys}) mempunyai distribusi yang berbeda, yang terdapat pada Asia Tengah dan Selatan dan banyak pada populasi Asia pesisir, 100% pada populasi di kepulauan Pasifik (*Ballinger et al, 1992*) polimorfisme mtDNA 10397+*AluI* dan 10394+*DdeI* pada haplogroup-makro M menunjukkan habitat bangsa Asia (*Wallace et al, 1999*).

2.2 PCR (Polimerase Chain Reaction)

PCR (Polymerase Chain Reaction) merupakan teknik *in vitro* untuk mengamplifikasi urutan DNA yang spesifik dengan pemanjangan primer secara berulang terhadap untai DNA komplementer sebagai *template*. Pada proses PCR, primer akan melakukan sintesis untai komplementer DNA dari arah 5' ke 3' dengan arah yang berlawanan. DNA *template* akan digandakan oleh primer setelah mengalami denaturasi karena pemanasan (Powledge, 1998).



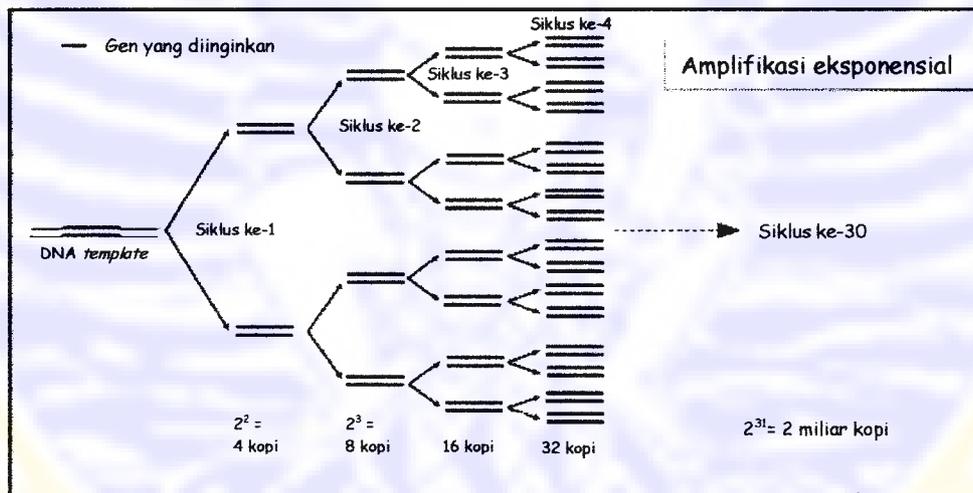
Gambar 2.5

Siklus amplifikasi dalam PCR:

Satu siklus terdiri dari tiga tahap; tahap pertama, denaturasi pada 94 °C adalah proses memisahkannya untai ganda DNA menjadi untai tunggal; tahap kedua, *annealing* pada 56 °C merupakan proses melekatnya primer pada *template* (DNA untai tunggal); tahap ketiga, *extension* pada 72 °C adalah proses memanjangnya *template* yang melibatkan enzim DNA taq polimerase dan deoksinukleotida trifosfat (diambil dari <http://allserv.rug.ac.be>, anonim, 1999).

Syarat terjadinya reaksi adalah adanya deoksinukleotida trifosfat (dNTP) yang menyediakan energi dan sekaligus nukleotida untuk sintesis DNA, DNA taq polimerase, primer, *template* dan buffer yang mengandung magnesium.

Selama proses PCR, DNA diduplikasi terus menerus seperti digambarkan pada gambar 2.5. Proses amplifikasi adalah sebagai berikut: Pada awalnya *template* mengalami denaturasi, pemisahan DNA dari untai ganda menjadi untai tunggal, pada suhu 94 °C selama 1 menit. Kemudian suhu diturunkan hingga 56 °C selama 1 menit 30 detik untuk proses *annealing*, yaitu melekatnya primer pada *template* diposisi yang sesuai dengan urutan basa nukleotida primer. Lalu dilanjutkan proses *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik. Pada proses ini melibatkan enzim DNA taq polimerase dan deoksinukleotida trifosfat. Primer yang sudah melekat pada *template* akan memanjang dengan arah 5'-3' dengan menempelkan basa sesuai dengan pasangan dari *template*-nya (anonim, 1999).



Gambar 2.6

Amplifikasi secara eksponensial pada PCR:

Jumlah kopi dari *template* meningkat secara eksponensial, pada siklus pertama diperoleh dua pasang atau empat kopi, lalu pada siklus kedua diperoleh delapan kopi, dan meningkat terus secara eksponensial hingga n siklus. Jumlah kopi yang diperoleh adalah sebanyak 2ⁿ kopi (diambil dari <http://allserv.rug.ac.be>, anonim, 1999).

Tahap sintesis dilakukan berulang-ulang maka deoksinukleotida trifosfat dan primer dibutuhkan dalam jumlah yang banyak. Proses diatas, denaturasi-*annealing-extension*, adalah satu siklus. Jumlah hasil kopi dari *template* adalah eksponensial 2^n (gambar 2.6) karena tiap produk dari satu siklus akan ikut diduplikasi pada siklus berikutnya. Reaksi akan berhenti saat salah satu bahan reaksi habis atau enzim tidak dapat mensintesis DNA baru lagi (*anonim, 1999*).

Jumlah siklus untuk amplifikasi yang optimal berbeda-beda tergantung dari jumlah bahan awal dan tingkat efisiensi dari tahap amplifikasi. Siklus pada proses PCR dilakukan sebanyak 25-35 siklus, namun pada umumnya dilakukan sebanyak 30 siklus (*anonim, 1999*).

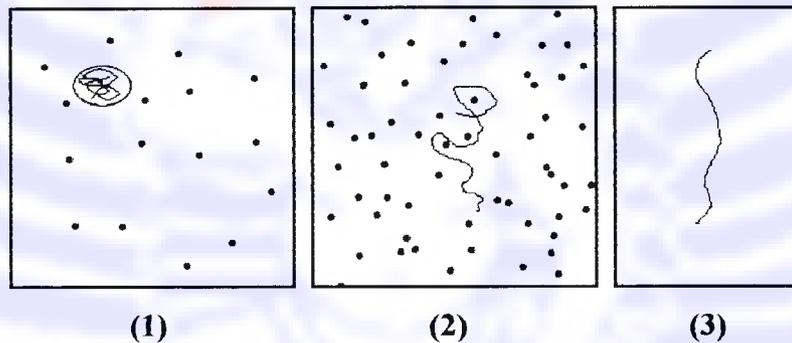
2.3 Elektroforesis

Secara teoritis, elektroforesis adalah teknik sederhana yang memungkinkan kita untuk menentukan muatan dan berat molekuler dari berbagai jenis makromolekul. Teori dasarnya sangat sederhana, molekul yang bermuatan negatif akan bergerak menuju kutub positif. Elektroforesis berguna sebagai alat pengukur kualitatif untuk memperkirakan berat molekul, tapi fungsinya yang paling utama adalah memisahkan campuran kompleks makromolekul menjadi komponennya (*Sambrook et. al., 1989*).

Elektroforesis merupakan metode standar untuk separasi (pemisahan), identifikasi dan purifikasi fragmen DNA (*Sambrook et. al., 1989*). Teknik ini sederhana, cepat dan mampu untuk memisahkan fragmen DNA. Untuk membedakan fragmen DNA hasil gel elektroforesis diperlukan suatu penanda (*marker*) atau *ladder* untuk menyesuaikan besaran pasang basa DNA yang akan dianalisa. *DNA marker* umumnya dibuat dari hasil pemotongan suatu plasmid dengan enzim restriksi yang akan menghasilkan beberapa fragmen DNA (*Gitelman, C.I., 1997*).

Elektroforesis dengan menggunakan fasa diam gel agarose secara khusus dimanfaatkan untuk memisahkan DNA dan RNA. Karena bermuatan negatif, maka DNA berpindah menuju kutub bermuatan positif. Matriks agarose menghambat perpindahan DNA sesuai dengan ukurannya, semakin besar ukuran semakin besar hambatannya (*Gitelman, C.I., 1997*).

Ada dua mekanisme pemisahan DNA pada gel elektroforesis yang ditunjukkan secara skematis pada gambar 2.7 di bawah. Pertama, dikenal sebagai mekanisme Ogston, yaitu berupa gulungan/gumpalan yang DNA melewati serat jaring polimer. DNA dianggap bergerak melewati gel sebagai partikel yang padat. Kecepatan mobilitas pada elektroforesis seimbang dengan kemampuan fraksi pori-pori dari gel yang dilewati DNA. Meningkatnya kepekatannya memberikan pengaruh mengecilnya ukuran pori-pori partikel gel sehingga mobilitas menurun dengan naiknya berat molekul DNA. Namun teori Ogston tidak memperhitungkan keadaan molekul DNA yang berukuran relatif besar dapat meregang membentuk benang lurus atau berubah bentuk menjadi gumpalan sehingga dapat menekan partikel gel yang dilaluinya (*Guttman et. al., 1998*).



Gambar 2.7

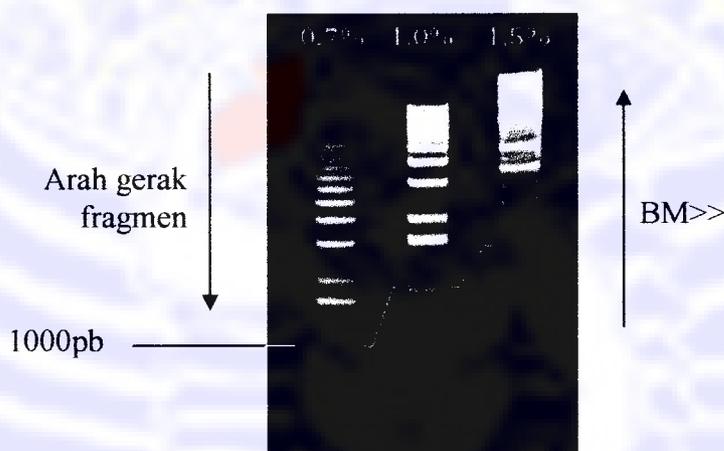
Mekanisme pemisahan DNA

Mekanisme pemisahan DNA ada dua macam: (1) Mekanisme Ogston (2) Model reptation. DNA pada kondisi *high field* (3) lebih sulit untuk melewati partikel gel (*diambil dari Guttman et. al., 1998*).

Pada model *reptation* diperkirakan DNA memadat pada saat melalui partikel gel karena hambatan ruang yang diberikan. Model ini sudah memperhitungkan fakta dari eksperimen, yaitu berpengaruhnya berat molekul terhadap kecepatan mobilitas DNA dan berkurangnya pengaruh berat molekul terhadap mobilitas DNA yang berada pada kondisi *high field*. Pada kondisi ini DNA berada dalam posisi membentuk benang yang memanjang terurai akibat pengaruh medan elektrik dan lebih sulit melewati partikel gel karena hambatan ruang yang besar (*Guttman et. al., 1998*).

Proses pemisahan DNA dalam gel agarose dipengaruhi oleh beberapa faktor yang akan menentukan kecepatan mobilitasnya, yaitu ukuran fragmen DNA, kepekatan dan kekompakkan agarose, tegangan yang diberikan pada saat elektroforesis (*Guttman et. al., 1998*).

Fragmen DNA bermigrasi melalui agarose dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan ukuran dari fragmen. Semakin panjang fragmen DNA semakin lambat bermigrasi, sedang semakin pendek fragmen DNA migrasi akan terjadi makin cepat (*Guttman et al., 1998*).



Gambar 2.8

Perbedaan kecepatan migrasi fragmen DNA pada gel agarose: Perbedaan konsentrasi dari gel akan mempengaruhi kecepatan migrasi. Arah gerak fragmen adalah dari atas kebawah dengan fragmen berukuran lebih besar berada diatas fragmen yang berukuran lebih kecil. Ini dikarenakan fragmen berukuran kecil lebih mudah melewati partikel gel. Pada penggunaan gel agarose dengan beda konsentrasi; 0,7%, 1%, dan 1,5%, terlihat pada konsentrasi terendah, 0,7%, fragmen DNA dengan ukuran yang sama bergerak lebih cepat (*diambil dari <http://arbl.cvmbbs.colostate.edu>, anonim, 2000*).

Perbedaan konsentrasi gel menyebabkan perbedaan kekompakkan agarose sehingga jarak antar partikel gel berbeda pada konsentrasi gel yang berbeda. Perbedaan konsentrasi agarose dapat dipergunakan untuk memisahkan berbagai ukuran fragmen DNA. Konsentrasi agarose yang tinggi dapat digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran pendek, sedang konsentrasi rendah

dapat untuk memisahkan fragmen DNA berukuran panjang. Jarak antar partikel yang terlalu besar menjadikan fragmen DNA mudah lewat sehingga fragmen panjang dapat terpisah dengan baik. Sedang jarak antar partikel yang sempit akan menyulitkan fragmen DNA lewat terutama fragmen panjang, karenanya tidak terpisah dengan baik. (*Guttman et al., 1998*).

Gambar 2.8 menunjukkan migrasi DNA dengan berbagai ukuran fragmen pada tiga konsentrasi gel agarose yang berbeda. Ketiganya di elektroforesis dengan voltase dan waktu yang sama. Fragmen DNA berukuran besar (>1000pb) terlihat terpisah lebih baik pada gel agarose dengan konsentrasi 0,7%, sedang fragmen DNA berukuran kecil (<1000pb) terpisah dengan lebih baik pada gel agarose berkonsentrasi 1,5% (*Guttman et al., 1998*).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

DNA sebagai struktur molekul terkecil dalam sel merupakan informasi genetik yang berfungsi sebagai pengatur dan memerintah sel-sel hidup dan menentukan sifat yang diturunkan (*Spector et al., 1998*).

Pada sel eukariotik DNA selain terdapat pada inti (nDNA) juga terdapat pada mitokondria (mtDNA). Mitokondria tidak memiliki histon untuk memperbaiki kerusakan akibat mutasi sehingga akan mengakibatkan variasi urutan mtDNA pada berbagai individu (*Wallace et al. 1999*).

Karena kecepatan mutasi mtDNA yang mencapai 5-10 kali DNA inti (*Brown et al., 1979*), maka mtDNA banyak terjadi variasi sehingga dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan karena kemiripan DNA yang diturunkan (*Giles et al., 1980*) dan memprediksi diagnosa suatu penyakit (*Hirata et al., 1999*). Akumulasi mutasi mtDNA mengakibatkan terjadinya polimorfisme mtDNA (*Wallace et al. 1999*).

Polimorfisme mtDNA pada populasi manusia dapat diamati diberbagai benua antara lain bangsa Asia Tengah dan Tenggara. Variasi DNA, terutama mtDNA dapat digunakan untuk menelusuri etnik dan asal populasi manusia (*Horai et al, 1987; Harihara et al, 1988*). Selain itu, beberapa penyakit dapat dihubungkan dengan mutasi mtDNA (*Wallace, 1995*).

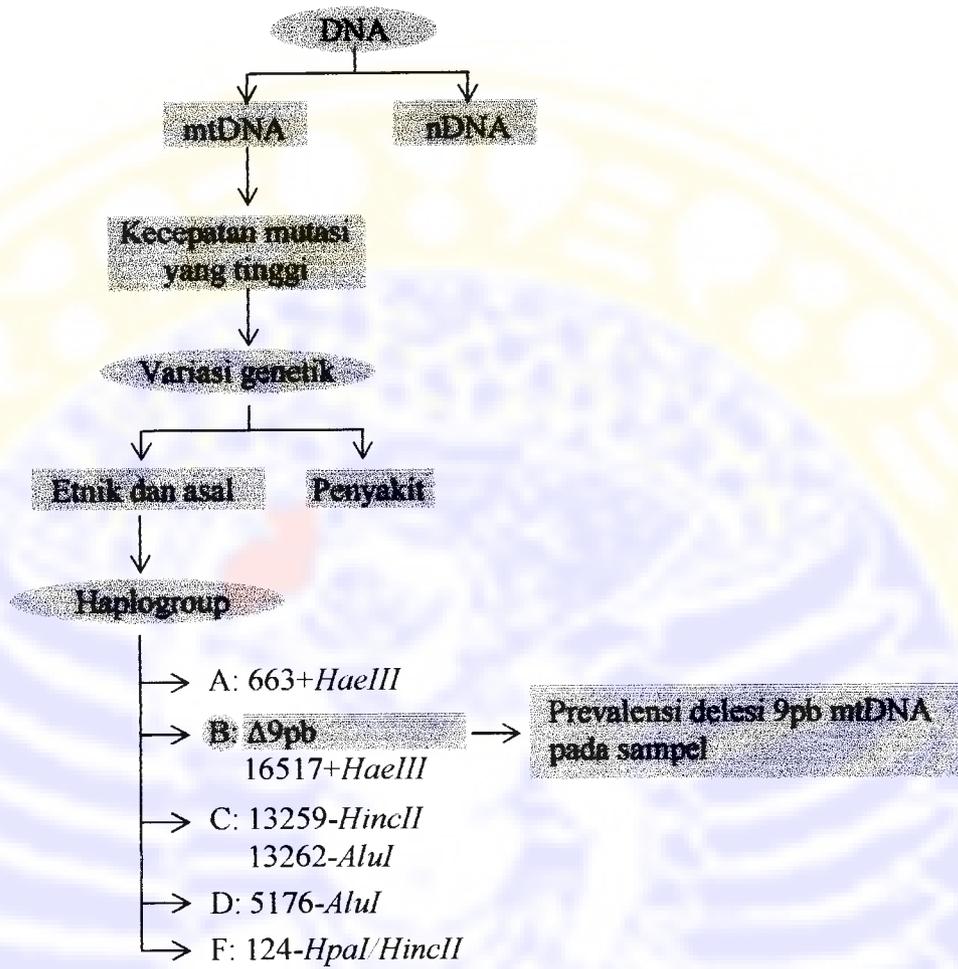
Rangkaian polimorfisme mtDNA tersebut disebut haplotipe, sedangkan pengelompokan haplotipe mtDNA disebut haplogroup (*Wallace, 1995*). Variasi mtDNA ini memiliki hubungan kuat dengan letak geografis. Untuk penduduk Asia dapat ditetapkan dengan haplogroup A, B, C, D, F. Namun penyebaran untuk haplogroup B bergerak ke arah Asia tengah, selatan, dan tenggara (*Wallace et al. 1999*).

Haplogroup A ditetapkan dengan 663+*HaeIII* (pada np 663 terjadi perubahan nukleotida A menjadi G), haplogroup B dengan delesi 9pb (gen antara COII dan tRNA^{Lys}, 8271-8281) dan 16517+*HaeIII*, haplogroup C dengan 13259-*HincII* dan 13262-*AluI* (perubahan A menjadi G pada 13262), haplogroup D

dengan 5176-*AluI* (perubahan dari C menjadi A pada np 5178), haplogroup F dengan 124-*HpaI/HincII* (Wallace *et al*, 1999).

Salah satu contoh delesi, yang mempunyai hubungan dengan kekerabatan bangsa Asia, yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah delesi 9pb mtDNA (gen antara COII dan tRNA^{Lys}) yang merupakan bagian dari haplogroup B.

Secara diagramatis, kerangka konseptual penelitian akan terlihat seperti gambar 3.1.



Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian

BAB IV

BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

4.1 Alat

Vortex Maxi Mix II (Type 37600 Mixer), Microwave (National 8—W; IEC-705), Chamber running elektroforesis, (Sub-Cell GT; Nide Mini-Sub-Cell GT; Mini Sub DNA Cell, BioRad, USA), Kamera Digital (Canon), Spectrophotometer UV-VIS (Pharmacia LKB-Ultraspec III), waterbath, Sentrifuge 14000rpm (Eppendorf 5415-C), Gene Amp^(R) PCR System 2700

4.2 Bahan

Dapar amplifikasi PCR (Tris-HCl 10mM pH 8.3, KCl 5mM, gelatin 0.01%), MgCl₂, dNTP, primer oligonukleotida sintetik, tris base, DNA taq polimerase, gel agarosa 4%, etidium bromida, Marker DNA Φx/174 Hind III, asam borat.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Pengambilan sampel

Sampel adalah darah yang diambil dari pembuluh vena manusia. Pengambilan sampel dilakukan oleh Divisi Endokrin Metabolik RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Prosedur pengambilan sampel disertakan secara terlampir pada halaman 35.

4.3.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan di Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta. Prosedur untuk isolasi DNA disertakan secara terlampir pada halaman 35.

4.3.3 Amplifikasi DNA dengan PCR

Sebanyak kurang lebih 100ng DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan menambahkan 1,25 unit *Taq Polymerase* pada volume akhir 50µl campuran reaksi yang mengandung larutan dapar amplifikasi (10mM Tris-HCl pH 8,3,

50mM KCl dan 0,01% gelatin), 15mM MgCl₂, 200μM dNTP, 40pmol pasangan primer oligonukleotida sintetik yang spesifik. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus dengan suhu inkubasi 95°C selama satu menit untuk tahap denaturasi, 56°C selama satu menit untuk tahap *annealing* dan 72°C selama satu menit 30 detik untuk tahap ekstensi dengan pasangan primer L8211-H8310.

Salah satu contoh delesi yang mempunyai hubungan dengan kekerabatan bangsa Asia yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah delesi 9pb mtDNA (gen antara COII dan tRNA^{Lys}) dengan sekuens primer 5'-3' L8211 (TCGTCCTAGAATTAATTCCC) - H8310 (AGTTAGCTTTA CAGTGGGCT) dengan situs restriksi 8271-8281. Delesi 9pb mtDNA (COII/tRNA^{Lys}) masuk dalam haplogroup B (*Sudjarwo, 2001*).

4.3.4 Deteksi Hasil PCR

Hasil amplifikasi diperiksa dengan memisahkan fragmen DNA menggunakan apparatus elektroforesis *Horizontal Mini Sub DNA* pada gel agarosa 4%. Tujuh mikroliter larutan DNA hasil amplifikasi ditambah 3μl *loading dye* PCR (1g bromophenol blue, sukrosa 40%^{b/v}) dipisahkan pada tegangan 60 Volt selama 3 jam dalam larutan dapar *Tris-Boric acid-EDTA* (TBE) yang mengandung 1μg/ml etidium bromida. Visualisasi mobilitas DNA sampel dilakukan dengan membandingkan pada DNA standar Φx174/*HaeIII* sebagai marka ukuran DNA. Φx174/*HaeIII* dibuat dari DNA lambda phage yang dipotong dengan *HaeIII*. Visualisasi pita-pita DNA menggunakan sinar ultra violet pada panjang gelombang 300nm.

Deteksi delesi 9pb mtDNA yang terjadi pada nt 8271-8281 (gen antara COII dan tRNA^{Lys}), dilakukan pada pita DNA sepanjang 99pb (L8211-H8310). Delesi 9pb terjadi atau hasil positif (+) bila diperoleh pita DNA sepanjang 90pb dan negatif (-) bila diperoleh pita DNA sepanjang 99pb.

4.3.5 Analisa sampel

Dari 35 sampel dihitung prevalensi delesi 9pb mtDNA pada populasi sampel dengan rumus:

$$P = \frac{\text{Jumlah delesi 9pb mtDNA}}{35 \text{ (Jumlah sampel)}} \times 100\%$$

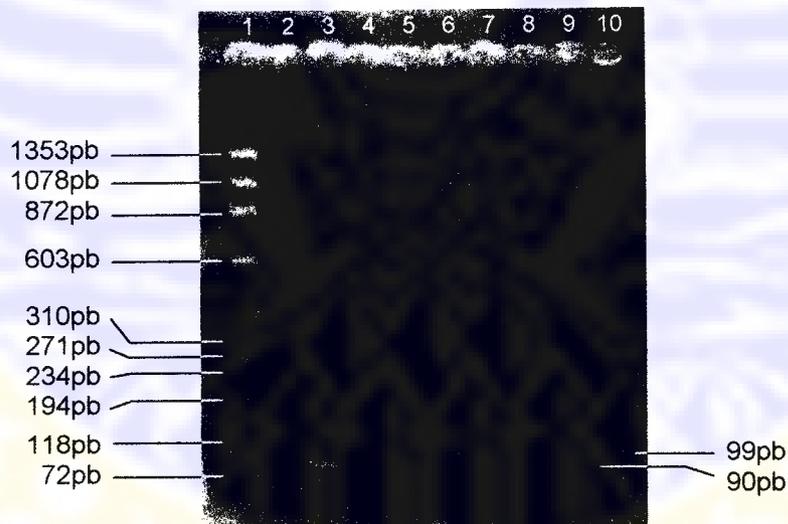
Keterangan: P : Prevalensi delesi 9pb mtDNA

BAB V

HASIL PENELITIAN

Sebanyak 35 sampel yang diuji dalam penelitian ini adalah sampel darah yang diperoleh dari Divisi Endokrin Metabolik RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang kemudian diisolasi di Lembaga Biologi Molekul Eijkman untuk diambil DNA-nya.

Delesi 9pb mtDNA (gen antara COII dan tRNA^{Lys}) dengan sekuens primer 5'-3' L8211 (TCGTCCTAGAA TTAATTCCC) - H8310 (AGTTAGCTTTACAG TGGGCT) dengan situs restriksi 8271-8281 (*Sudjarwo, 2001*). Deteksi delesi 9pb mtDNA yang terjadi pada nt 8271-8281 (gen antara COII dan tRNA^{Lys}), dilakukan pada pita DNA sepanjang 99pb. Delesi 9pb terjadi atau hasil positif (+) bila diperoleh pita DNA sepanjang 90pb dan negatif (-) bila diperoleh pita DNA sepanjang 99pb. Untuk menunjukkan ukuran pasangan basa digunakan pembandingan marker Φ x 174/HaeIII (Gibco BRL). Hasil elektroforesa dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5.1

Hasil elektroforesa produk PCR:

Jalur 1 DNA marker Φ x 174/HaeIII, jalur 2 kontrol negatif, jalur 3 kontrol positif (delesi 9pb), jalur 4, 6, 7, 8, 10 adalah sampel yang tidak mengalami delesi 9pb (negatif), jalur 5 dan 9 adalah sampel yang mengalami delesi 9pb (positif).

Dari seluruh sampel yang diuji terdapat sebanyak 17 sampel yang mengalami mutasi delesi 9pb dan 18 sampel tidak mengalami mutasi (normal). Data perolehan sampel disertakan secara terlampir pada halaman 36. Dengan demikian sebanyak 48,57% dari sampel mengalami delesi 9pb. Pengolahan data disertakan secara terlampir pada halaman 36.

BAB VI

PEMBAHASAN

Sampel yang diamati pada penelitian ini adalah DNA mitokondria manusia yang sudah diisolasi, kemudian di amplifikasi dengan primer L8211-H8310 menggunakan mesin *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dan dilakukan pemisahan menggunakan apparatus elektroforesis.

PCR adalah suatu proses duplikasi DNA secara *in vitro* yang mekanismenya dibuat mirip dengan mekanisme dalam tubuh. Teknik PCR memungkinkan proses pengkopian sekuen DNA terjadi dengan cepat. Siklus pada PCR membuat sintesis DNA menjadi cepat karena produk pada siklus pertama menjadi *template* untuk siklus berikutnya dan seterusnya (Hughes., 1998).

Pada proses PCR diperlukan bahan-bahan yang terdiri dari: Buffer PCR (Tris-HCl 10mM pH 8.3, KCl 5mM, gelatin 0.01%), ion Mg^{2+} (dalam bentuk garam, $MgCl_2$), deoksinukleotida trifosfat (dNTP), oligonukleotida sintetik (primer oligonukleotida) *forward* dan *reverse*, isolat DNA yang menjadi *template*, serta enzim DNA taq polimerase. Reaksi PCR harus dilakukan dalam buffer untuk menjaga keasaman selama proses reaksi sehingga tidak terjadi perubahan tingkat keasaman dalam larutan (Hughes., 1998).

Ion Mg^{2+} yang diperoleh dari garam $MgCl_2$ dapat mempengaruhi proses *annealing*. Jika Mg^{2+} terlalu encer primer melekat (*annealing*) pada lokasi yang tidak spesifik dan terjadi amplifikasi sekuen diluar target. Sebaliknya, ion Mg^{2+} yang pekat akan mengurangi jumlah primer yang akan menempel (*annealing*) pada untai DNA sehingga amplifikasi menjadi tidak efisien. Selain itu Mg^{2+} berperan sebagai co-enzim untuk DNA taq polimerase (Podzorski et al., 1997).

Untuk mensintesis untai DNA baru dibutuhkan nukleotida-nukleotida (dNTP) yang terdiri dari empat macam deoksinukleotida trifosfat, *adenine* (A), *guanine* (G), *cytosine* (C), and *thymine* (T). Masing-masing nukleotida memiliki pasangan yang saling melengkapi, *adenine* dengan *thymine*, dan *guanine* dengan *cytosine*. DNA taq polimerase akan menambahkan basa nukleotida-basa

nukleotida pada ujung 3' –OH selama proses pemanjangan kopi untai DNA dan mensintesis pasangan basa yang tepat pada komplementernya (Hughes., 1998).

Untuk memulai proses mengkopi rantai DNA, DNA taq polimerase membutuhkan urutan nukleotida yang sudah tersusun berupa primer oligonukleotida dengan 20-30 nukleotida yang telah tersusun (Stryer, 1995). DNA taq polimerase membutuhkan primer dengan ujung 3' –OH bebas agar nukleotida lain dapat tersambung membentuk polimer dengan arah 5'-3'. Namun primer ini harus memiliki kombinasi yang merupakan pasangan komplementer dari sekuen DNA *template* yang ingin dikopi (Powledge, 1998). Kemudian karena DNA terdiri dari dua untai tunggal yang saling berpasangan, maka perlu dua buah primer yang berbeda untuk memulai proses PCR (Hughes, 1998).

Selama PCR, DNA akan dikopi dan jumlah yang didapat tergantung atas jumlah siklus amplifikasi. Hasil amplifikasi adalah 2^n dengan n adalah jumlah siklus (Hughes, 1998). Jika dilakukan sebanyak 30 siklus, maka akan diperoleh kopi sebanyak $2^{30} = 1.073.741.824$ kopi DNA.

Untuk mengetahui hasil proses PCR, dilakukan visualisasi menggunakan metode elektroforesis. Metode ini dapat digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran dan muatannya karena untuk memisahkannya digunakan arus listrik yang terhubung dengan elektrode positif dan elektrode negatif pada ujung-ujungnya (Sambrook et al., 1989).

Prinsip kerja elektroforesis seperti kromatografi dimana terdapat fasa diam dan fasa gerak. Fasa gerak pada elektroforesis adalah arus listrik yang diberikan melalui elektrode ke dalam larutan buffer dan fasa diam yang digunakan pada penelitian ini adalah gel agarose yang dapat diatur kepekatannya (Guttman et al., 1998).

Agarose memiliki pori-pori yang relatif besar bila berkonsentrasi rendah untuk dapat dilewati fragmen DNA serta mempunyai kekuatan mekanis pada matriksnya dan inert secara biologis. Matriks agarose memberikan halangan ruang bagi fragmen DNA yang berbeda pada tiap panjang fragmen yang berbeda sehingga terjadi proses pemisahan berdasarkan panjang fragmen. Mekanisme pemisahan yang telah diperkenalkan adalah model Ogston dan *reptation*. Dimana pada model Ogston, fragmen DNA melewati dalam bentuk menggumpal atau

seperti partikel padat. Sedang pada model *reptation*, fragmen DNA dapat berubah bentuk agar dapat melewati partikel gel (Guttman et al., 1998).

Karena DNA bersifat negatif, maka DNA akan bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif. Pada bab II di atas, telah dijelaskan bahwa DNA dengan molekul besar bergerak lebih lambat dari pada yang lebih kecil karena hambatan ruang yang dimilikinya (Guttman et al., 1998). Hal ini dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi ada atau tidaknya delesi 9pb pada sampel DNA di posisi 8271-8281.

Untuk mendeteksi adanya delesi 9pb, ditandai dengan panjang molekul sepanjang 90pb, sebaliknya bila tidak mengalami delesi 9pb maka panjang molekul adalah 99pb. Dari populasi sampel penelitian ini didapat 17 sampel mengalami delesi 9pb dan 18 sampel tidak mengalami delesi 9pb (normal).

Seperti dijelaskan pada bab I bahwa variasi DNA terutama DNA mitokondria (mtDNA), dapat digunakan untuk menelusuri etnik dan asal suatu populasi manusia (Horai et al, 1987; Harihara et al, 1988). Dari variasi mtDNA dapat dikorelasikan dengan asal etnik dan geografik dari setiap individu. Seperti dijelaskan Cann et al (1987), manusia pertama berasal dari Afrika. Variasi ini dapat diamati RFLP-nya dengan *HpaI* pada bangsa Afrika, Asia dan Eropa-Amerika (Wallace et al. 1999).

Phylogenetic semua bangsa Asia terdiri dari dua haplogroup besar dengan polimorfik 10394+*DdeI* dan 10397+*AluI*. Haplogroup makro yang dinyatakan dengan adanya kedua polimorfik di atas disebut haplogroup makro M. Kedua polimorfik ini pada bangsa Asia mempunyai hubungan dan secara tidak langsung mutasi 10397+*AluI* timbul pada mutasi mtDNA 10394+*DdeI* bersamaan dengan migrasi penduduk dari Afrika menuju Asia (Wallace et al. 1999).

Dari dua cabang besar *phylogenetic* mtDNA Asia terdapat karakteristik yang mirip diwariskan pada bangsa Asia dan Amerika. Haplogroup A, B, C, dan D ternyata berasal dari mtDNA leluhur bangsa Amerika. Keempat haplogroup ini merupakan variasi mtDNA bangsa Asia. Haplogroup A, C, dan D banyak ditemukan pada penduduk Tibet, Korea, Siberia, dan China suku Han. Namun haplogroup B memiliki arah penyebaran yang berbeda, ditemukan pada Asia tengah dan selatan, dan banyak pada populasi Asia Tenggara hingga kepulauan Pasifik (Stoneking et al., 1990; Ballinger et al., 1992), penduduk asli Amerika

(*Torroni et al. 1992*), Polinesia, dan dijadikan sebagai marker yang spesifik untuk bangsa Asia (*Wrischnik et al., 1987; Stoneking dan Wilson 1989; Shields et al., 1992*).

Haplotipe B terletak pada daerah yang tidak menyandi (D-Loop dan antara COII-tRNA^{Lys}) (*Passarino et al. 1993; Soodyall et al. 1996*) yaitu varian mtDNA 16517+*HaeIII* dan delesi mtDNA 9pb. Varian mtDNA 16517+*HaeIII* terletak pada daerah D-Loop yaitu daerah dimana awal proses replikasi dan transkripsi terjadi (*Shoffner et al., 1995*).

Sedangkan delesi 9pb mtDNA terletak pada urutan nukleotida 8271-8281, yang terletak antara gen COII dan gen tRNA^{Lys} (*Wallace et al. 1999; Passarino et al. 1993; Soodyall et al. 1996*). Gen yang mengkode COII, berada pada posisi 7586-8262. COII dan COI, yang dikode oleh gen pada posisi 5904-7444, mengandung atom-atom tembaga, heme a, dan heme a₃ yang menjadi pusat reduksi-oksidasi untuk transfer elektron. Sedang sekuens gen yang mengkode tRNA untuk produksi asam amino Lysin berada pada posisi 8295-8364 (*Shoffner et al., 1995*).

Delesi 9pb merupakan salah satu parameter untuk menunjukkan kekerabatan dengan suku Asia. Adanya delesi 9pb mtDNA yang terjadi menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang dekat dengan suku Asia. Pada penelitian-penelitian sebelumnya dikatakan bahwa delesi 9pb mtDNA adalah marker untuk bangsa Asia (*Wallace et al. 1999*).

Selain untuk mengetahui asal-usul manusia, delesi 9pb mtDNA ditemukan pada penyakit myopati dari anggota gerak. Pada penelitian yang dilakukan Hirata dkk., 1999, pada tujuh pasien penderita myopati ditemukan mutasi A8291G dan delesi 9pb mtDNA. Pada biopsi spesimen diperkirakan aktifitas sitokrom c oksidase menurun terhadap sitrat sintase pada lima dari tujuh pasien. Pada penelitian yang dilakukan oleh Aikhionbare dkk., 2004, terhadap pasien tumor usus besar ditemukan hubungan mutasi mtDNA dengan pertumbuhan tumor usus besar. Dari hasil analisis ditemukan 38 variasi pada mtDNA dan salah satunya adalah delesi 9pb.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan yaitu deteksi delesi 9pb pada posisi sekuens ke 8271 – 8281 menggunakan sekuens primer L8211 – H8310, maka dapat ditarik kesimpulan:

Pada populasi penelitian ini diperoleh delesi 9pb sebanyak 48,57%. Adanya delesi 9pb mtDNA yang terjadi menunjukkan adanya hubungan kekerabatan yang dekat dengan suku Asia.

7.2 Saran

Delesi 9pb mtDNA dapat digunakan untuk menentukan asal-usul (kekerabatan) manusia dan memprediksi diagnosa suatu penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

- Aikhionbare FO, Khan M, Carey D, Okoli J, dan Go R, World Wide Web page, 2004. Is cumulative frequency of mitochondrial DNA variants a biomarker for colorectal tumor progression?, diambil: 14 Juli 2005 dari <http://molecular-cancer.com/content/3/1/30>.
- Anonim, World Wide Web page. What causes DNA mutations?, University of Utah, Genetic Science Learning Center. online; 2002, diambil: 19 Februari 2004 dari URL: <http://glsc.genetics.utah.edu>.
- Anonim, World Wide Web page. Agarose Gel Electrophoresis of DNA. online; 2000, diambil: 2 Juni 2005 dari URL: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>.
- Anonim, World Wide Web page. Principle of the PCR, University of Ghent, Faculty of Science, Department of Biology. online; 1999, diambil: 17 Februari 2004 dari URL: <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MMHL, Coulson JD, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sangger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R dan Young IG, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290; 457-465.
- Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A, Gan YY, Hodge JA, Hassan K, Chen KH, Wallace DC, 1992. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetic* 130; 139-152.
- Brown MD dan Wallace DC, 1993 Commentary : Genetic approaches to mitochondrial DNA disease of oxidative phosphorylation. In Lash L.H. and Jones D.P., eds. *Methods in toxicology mitochondrial dysfunction*; Academic Press. Inc., California; Vol 2.; 426-427.
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC, 1987. Mitochondrial DNA and human evolution; *Nature*; 325:31-36.
- Gitelman, CI, World Wide Web page, 1997. Elsevier trends journals technical tips online, diambil: 11 Mei 2002 dari <http://tto.biomednet.com>.
- Guttman, A. dan Schwartz, HE, 1998. Separative of DNA; In: Camilleri, E (Eds), *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice Second Edition*, New York: USA.

Harihara S, Saitou N, Hirai M, Gojobori T, Park KS, Misawa S, Ellopola SB, 1988. Mitochondrial DNA Polymorphism Among Five Asian Populations; *Am J Hum Genet*; 43: 143-143.

Hirata K, Nakagawa M, Higuchi I, Hashimoto K, Hanada K, Takahashi K, Niiyama T, Izumi K, Sakoda S, Yamada H, Osame M, 1999. Adult onset limb-girdle type mitochondrial myopathy with a mitochondrial DNA np8291 A-to-G substitution (Abstract); *J Hum Genet* 44(3); 210-4.

Horai S, Gojobori T, Matsunaga E, 1987. Evolutionary implications of mitochondrial DNA polymorphism in human populations; *Hum Genet*; 74; 177-181.

Hughes, MR, World Wide Web page, 1998. Making A Lot Out of A Little: the Polymerase Chain Reaction, diambil: 27 Juni 2005 dari <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01maellis/pcr.html>.

Linnance AW, Ozawa T, Marzuki S and Tanaka M, 1989. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases; *Lancet*; 1; 642-645.

Marchington DR, Hartshorne GM, Barlow D and Poulton J, 1997. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck; *Am J Hum Genet* 60; 408-416.

Ozawa T, Tanaka M, Suzuki H dan Nishikimi M, 1987. Structure and junction of mitochondria: their organization and disorders; *Brain Develop.* 9; 76-81.

Passarino G, Semino O, Modiano G dan Santachara-Benerecetti, 1993. COII/tRNA^{Lys} intergenic 9bp deletion and other mtDNA markers clearly reveal that the Tharus (Southern Nepal) have oriental affinities; *Am J Hum Genet*; 53; 609-618.

Podzorski, RP, Kukuruga, DL, Long, MP, 1997. Introduction to Molecular Methodology. Editors: Noel R. Rose, Everly Conway de Macario, James D. Fold, H. Clifford Lane, Robert M. Nakamura. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5th edn. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 77-107.

Powledge, TM, 1998. The polymerase chain reaction: breakthroughs in bioscience, diakses: 1 Februari 1998 dari <http://www.faseb.org/opar/bloodsupply/pcr.html>.

Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T, 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Shields GF, Hecker K, Voevoda MI, Reed JK, 1992. Absence of the Asian-specific region V mitochondrial marker in native Beringians, *Am J Hum Genet* 50: 758-765.
- Shoffner JM, Wallace DC, 1995. Oxidative phosphorylation diseases; In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, and Valle D (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Ed. 7, USA: McGraw-Hill, Inc.
- Soodyal H, Vigilant L, Hill AV, Stoneking M, dan Jenkins T, 1996. mtDNA control – region sequence variation suggests multiple independent origins of an “Asian-specific” 9-bp deletion in sub-Saharan Africans; *Am J Hum Genet*; 58; 595-608.
- Spector, DL, Goldman, RD, Leinwand, LA, 1998. *Cells a laboratory manual*, volume 3: subcellular localization of genes and their products, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stoneking M, Jorde LB, Bhatia K, dan Wilson AC, 1990. Geographic variation in human mitochondrial DNA from Papua New Guinea, *Genetics* 124: 717-733.
- Stoneking M dan Wilson AC, 1989. Mitochondrial DNA; In: Hill A dan Serjeantson S (Eds.). *The colonization of the Pacific: a genetic trail*. Oxford: Oxford University Press.
- Stryer, L, 1995. *Biochemistry*, 4th edn. New York: W.H. Freeman and Company.
- Sudjarwo, 2001. *Peran mitokondria pada fungsi spermatozoa*; Disertasi, Surabaya; Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Sudoyo H, Marzuki S, Trounce I and Byrne E, 1990. Antimitochondrial autoantibodies of primary biliary cirrhosis as a novel probe in the study of the 2-oxo acid dehydrogenases in patients with mitochondrial myopathy; *J Neurol Sci*; 98; 185-193.
- Torrioni A, Schuur TG, Yang CC, Szathmary EJE, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations, *Genetics* 130: 153-162.
- Toland, AE, 2001. DNA mutations, diakses: 8 Juli 2005 dari http://www.genetichealth.com/G101_Changes_in_DNA.shtml.
- Wallace DC, 1992. Mitochondrial genetics a paradigm for aging and degenerative diseases; *Science*; 2556; 628-632.

Lampiran 1

Prosedur pengambilan sampel dan isolasi DNA

pengambilan sampel

Sampel adalah darah yang diambil dari pembuluh vena manusia normal. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada 20 manusia dari etnis Jawa.

Isolasi DNA

Masukkan darah sebanyak 65-100 μ l kedalam tabung mikrosentrifuse 1,5ml mengandung 20 μ l EDTA 10mM. Kocok segera untuk mencegah pembekuan. Simpan dalam suhu dingin (lemari pendingin) sampai akan diproses lebih lanjut. Masukkan 200 μ l buffer lisis (0.32M sukrosa, 10mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂; pH 7,6) kesetiap tabung dan vortex. Sentrifuse selama 25 detik pada 14000rpm untuk mengendapkan sel-sel yang mengandung DNA. Buang supernatan dan ulangi langkah penambahan buffer lisis, sentrifuse, dan pembuangan supernatan sampai tidak ada hemoglobin yang tertinggal (hilangnya warna merah). Tambahkan 5ml buffer proteinase K (20mM Tris-HCl, 4mM Na₂EDTA, 100mM NaCl; pH 4,4) dan 500 μ L SDS 10% kedalam pelet, vortex selama 30-60 detik. Kemudian tambahkan larutan proteinase K (20mg/ml). Inkubasikan di atas *waterbath* pada suhu 55°C selama 1-2 jam. Panaskan sampel pada 97°C selama 10 menit untuk menginaktivasi proteinase K. Biarkan pada suhu ruangan atau dinginkan di atas es selama 2-3 menit. Tambahkan 4ml NaCl 5,3M. Vortex selama 15 detik. Sentrifuse pada 4500rpm selama 15-20 menit dalam keadaan dingin. Pindahkan supernatan ke tabung lain dan tambahkan isopropanol dingin (yang telah disimpan pada suhu -20°C). Balik-balikkan tube 5-6 kali dengan perlahan untuk mengendapkan DNA (salting out). Pindahkan DNA ke tabung sentrifuse mikro. Cuci dengan etanol 70%. Biarkan DNA mengering pada 37°C. Larutkan kembali dengan 300-400 μ l Tris-EDTA pH 8,0. Biarkan DNA semalam agar melarut pada suhu ruangan. DNA dapat disimpan selama satu tahun dalam keadaan dingin (lemari pendingin).

Lampiran 2
Data populasi Sampel

Sampel	Positif	Negatif
A 49	V	
K 245	V	
K 125	V	
K 293		V
K 90		V
K 105	V	
K 118		V
K 113		V
K 267		V
K 272		V
K 273		V
K 173		V
K 112	V	
K 156	V	
K 248		V
K 249		V
K 261	V	
K 256		V
K 266	V	
K 275	V	
K 257	V	
K 287	V	
K 283		V
K 288		V
K 284		V
K 280		V
A 36	V	
K 302	V	
K 305	V	
K 289		V
K 250		V
K 265		V
K 251	V	
K 243	V	
KA 260	V	
Jumlah	17	18

Lampiran 3
Perhitungan prevalensi delesi 9pb mtDNA

$$P = \frac{\text{Jumlah delesi 9pb mtDNA}}{35 \text{ (Jumlah sampel)}} \times 100\%$$

Keterangan: P : Prevalensi delesi 9pb mtDNA

$$P = \frac{17}{35} \times 100\% = 48,57\%$$

Lampiran 4

Surat keterangan sampel

Nomor : - Surabaya, 12 Agustus 2004
Lampiran : -
Perihal : Permohonan Peminjaman Sampel
Isolasi DNA Pasien Diabetes Surabaya

Kepada Yth.
Prof. Sangkot Marzuki, dr MSc DSc PhD
Direktur Lembaga Biologi Molekuler Eijkman
Jl. Diponegoro 69
Jakarta 10430

Dengan hormat,

Sehubungan dengan adanya rencana penelitian genetika yang akan dilakukan di Pusat Diabetes dan Nutrisi RSU Dr. Soetomo Surabaya, Divisi Endokrin Metabolik-Imu Penyakit Dalam RSU Dr. Soetomo Surabaya, dan Dr. Drs. Sujarwo, maka bersama ini kami mohon kesediaannya untuk meminjamkan sampel DNA pasien diabetes RSU Dr. Soetomo Surabaya yang tersimpan di Lembaga Eijkman sejumlah ± 450 buah.

Sampel tersebut akan segera kami kembalikan ke Lembaga Eijkman setelah penelitian selesai dilakukan atau setiap saat jika diperlukan untuk diteliti oleh Lembaga Eijkman.

Mohon sampel-sampel tersebut disampaikan kepada Dr. Drs. Sujarwo yang akan mengambil sampel dengan membawa surat permohonan ini.

Atas kebijaksanaan dan ketegasannya, kami sampaikan banyak terima kasih.

Mengetahui,
Kepala Divisi Endokrin Metabolik RSU Dr. Soetomo

Prof. Dr. Dr. Hendromartono, SpPD-KEMD

Hormat kami,

Dr. dr. Agung Pranoto, MSc, SpPD-KEMD

Tembusan:
Ketua Pusat Diabetes dan Nutrisi RSU Dr. Soetomo Surabaya

Perihal : Permohonan peminjaman sampel
DNA pasien NIDDM Surabaya

Kepada Yth. :
Prof. Sangkot Marzuki, dr., MSc., Ph.D., DSc.
Herawati Sudoyo, dr., Ph.D.
Lembaga Biologi Molekul Eijkman
Jl. Diponegoro 69
JAKARTA 10430

Dengan hormat,

Sebelumnya saya mohon maaf tidak dapat menghadap sendiri karena tugas semester pendek di Fakultas Farmasi Unair. Prof. Sangkot/dr. Hera S, dalam rangka kerjasama dengan Pusat Endokrin Ilmu Penyakit Dalam RSUD. Dr. Soetomo mohon diperkenankan untuk meminjam sampel DNA pasien NIDDM Surabaya (Seperti Surat dari Pusat Endokrin Ilmu Penyakit Dalam RSUD. Dr. Soetomo Surabaya). Untuk itu mohon sampel tersebut disampaikan pada Mahasiswa saya yang membawa surat ini : Bhakti Maulana Asnar dan Herlina Ikawati Abdullah.

Demikian permohonan saya, dan atas kerjasamanya disampaikan banyak terima kasih.

Surabaya, 16 Agustus 2004.

Hormat saya,


Sudjarwo