

STUDI MUTASI TITIK A3243G DNA MITOKONDRIA PENYEBAB MATERNALLY INHERITED DIABETES AND DEAFNESS

Sriwidodo*, O Suprijana**, Toto Subroto**, Iman Permana Maksum**

* Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang 45363

** Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Sumedang 45363

ABSTRACT

Point mutation of mitochondrial DNA A3243G has been known as a cause of Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD). Potency of MIDD can be identified from patient phenotype of Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM). The objective of this study is acquiring information about MIDD on patient of NIDDM type and obtaining the simple method to detect the point mutation of mtDNA A3243G. 50 NIDDM patients were attained from RSCM Hospital, Jakarta. Information concerning family history with NIDDM and existences of deafness, medication, and other complication and manifestation were obtained through interview and questioner. Point mutation of A3243G was determined with the method of PCR Allele's Specific Amplification (PASA) Mismatch 2 bases and PCR-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP) with the HaeIII restriction enzyme. Detectable Potency MIDD was found by perceiving the patient phenotype and identifying the mutation of heteroplasmic A3243G utilizing the PASA method.

Key words: MIDD, A3243G, mtDNA, PASA, PCR-RFLP.

ABSTRAK

Mutasi titik DNA mitokondria A3243G t-RNA(leu) telah diketahui sebagai penyebab Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD). Potensi MIDD dapat diidentifikasi pada fenotip penderita diabetes melitus (DM) tipe 2. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan informasi ilmiah tentang MIDD pada penderita DM tipe 2 dan mendapatkan metode sederhana untuk mendeteksi mutasi titik DNA mitokondria A3243G t-RNA(leu). Diperoleh 50 penderita DM tipe 2 dari Rumah Sakit dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta. Informasi mengenai riwayat keluarga dengan DM dan adanya gangguan pendengaran, pengobatan, komplikasi dan manifestasi lainnya diperoleh melalui wawancara dan kuisisioner. Penentuan mutasi dilakukan dengan metode PCR Alele's Specific Amplification (PASA) mismatch 2 basa dan PCR-Restriction Length Polimorphism (PCR-RFLP) dengan enzim restriksi HaeIII. Hasil metode PASA yang diduga positif ditunjukkan dengan munculnya pita berukuran 200 pb baik pada tabung yang mengandung primer normal ataupun mismatch

Corresponding author : E-mail : sirwied@gmail.com

2 basa. Hasil metode PCR-RFLP menunjukkan kesulitan mengkarakterisasi pemotongan fragmen berukuran 294 pb. Potensi MIDD dapat ditemukan dengan mengamati fenotip penderita dan mengidentifikasi mutasi heteroplasmia A3243G menggunakan metode PASA, namun metode PCR-RFLP pada penelitian ini belum dapat mengidentifikasi karakterisasi mutasi heteroplasmia A3243G.

Kata kunci: MIDD, A3243G mtDNA, PASA, PCR-RFLP.

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan peningkatan kadar gula secara kronis di dalam darah akibat ketidakmampuan kelenjar pankreas mensekresi insulin atau tidak bekerjanya reseptor insulin. DM apabila tidak terdiagnosis atau tertangani secara baik, dapat menimbulkan komplikasi yang berat seperti gagal ginjal, stroke, kebutaan, hingga amputasi. Diperkirakan lebih dari 210 juta orang telah dilaporkan menderita penyakit ini di seluruh dunia. Secara garis besar DM dikelompokkan menjadi DM yang tergantung insulin (DM tipe 1) dan DM yang tidak tergantung insulin yang dikenal sebagai DM tipe 2 (1).

Mutasi pada posisi 3243 telah diteliti sebagai mutasi kausal pada diabetes turunan maternal dengan ketulian atau MIDD (2). Database MITOMAP 2004 menyebutkan penyakit *mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes* (MELAS) juga termasuk satu dari subkelompok klinik *mitochondrial encephalopathy* yang utama dan disebabkan oleh mutasi tunggal gen tRNA^{Leu} yang bertanggung jawab

untuk translasi UUR (R = A atau G) kodon leusin (tRNA^{Leu(UUR)}) (3).

Studi yang dilakukan terhadap sejumlah besar penderita MIDD di Perancis, menyebutkan bahwa fenotip diabetes pada sindrom ini agak berbeda dari apa yang telah diketahui mengenai diabetes selama ini (4). Hal ini mempunyai dampak klinis yang sangat penting bagi para klinisi, untuk menjadi lebih hati-hati terhadap sindrom tersebut. Pasien yang memiliki mutasi mtDNA A3243G cenderung nonobesitas, nonketoasidosis, menyerang usia dewasa, terutama jika muncul gangguan pendengaran, atau jika terdapat riwayat keluarga garis keturunan seibu yang diabetes dengan gangguan pendengaran (5).

Penelitian mengenai diabetes yang berkaitan dengan mutasi mitokondria masih perlu dilakukan hingga saat ini dengan alasan bahwa keterkaitan secara maternal, penderita diabetes dengan anggota keluarga yang masih sehat, memiliki kecenderungan risiko tinggi mendapatkan penyakit diabetes, dan akan sangat menguntungkan apabila dapat didiagnosis dan diintervensi secepat mungkin. Selain itu yang lebih penting adalah diagnosis dapat mem-

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

bantu para klinisi di dalam seleksi penatalaksanaan penyakit DM. Sebagai contoh, penderita MIDD memiliki kecenderungan mengalami peningkatan asam laktat, sehingga dihindari penggunaan antidiabetik oral golongan metformin. MIDD secara patofisiologis memiliki bentuk yang berbeda dengan diabetes melitus tipe 2 pada umumnya, karena resistensi insulin tidak terlihat sebagai faktor utama. Beberapa klinisi telah menyarankan terapi insulin sebagaimana seperti yang diberikan pada DM tipe 1 (5).

METODOLOGI

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: 1) Pengumpulan sampel darah; 2) Penyiapan Templat DNA mitokondria; 3) Disain primer dan optimalisasi suhu *annealing*; 4) Analisis mutasi A3243G menggunakan metode PASA-PCR; 5) Karakterisasi mutasi menggunakan elektroforesis gel agarosa; 6) Analisis data untuk mengambil kesimpulan.

Pada penelitian ini, primer yang digunakan untuk PASA menggunakan primer *mismatch* dua basa sebagai berikut:

- a. D1 (5'- AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC -3') posisi H (3423-3404);
- b. Dn (5'- GGG TTT GTT AAG ATG GCA GA-3') posisi L (3224-3423);
- c. Dmt (5'- GGG TTT GTT AAG ATG GCA TG -3') posisi L (3224-

3423).

Seluruh primer telah dirancang secara manual dan dicoba pada penelitian sebelumnya sedangkan verifikasi primer terhadap urutan mtDNA menggunakan piranti lunak bebas lisensi seperti "FastPCR ver. 3.9.22".

Penentuan Mutasi Titik A3243G

Metode PASA dilakukan dengan teknik PCR pada dua tabung. Tabung pertama menggunakan primer universal D₁ dan primer normal D_N sedangkan tabung kedua menggunakan primer universal D₁ 1 µL dan primer mutan D_N atau D_{Mt} 1 µL (masing-masing 20 pmol/µL). Campuran reaksi mengandung enzim *Taq* DNA polimerase 0,5 µL, buffer *taq* 5 µL, *Dntp* (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 1 µL, MgCl₂ 7,5 µL, ddH₂O steril 24 µL, dan templat mtDNA hasil lisis 10 µL. Proses PCR dilakukan dalam mesin PCR *Automatic Thermal Cycler* Eppendorf™ sebanyak 30 siklus. Tahap awal proses PCR adalah tahap denaturasi awal yang akan dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian masuk ke program siklus PCR dengan masing-masing siklus terdiri tiga tahap yaitu tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, tahap penempelan primer (*annealing*) pada suhu 57°C selama 30 detik, dan tahap perpanjangan primer (*extension*) pada suhu 72°C selama 50 detik. Akhir dari semua siklus dilakukan tambahan proses *extension* pada suhu 72°C selama 10 menit.

Hasil amplifikasi dari proses

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

PCR tersebut selanjutnya dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) menggunakan alat *Mini sub™ DNA electrophoresis cell*. Komposisi gel agarosa dapat dibuat dengan melarutkan agarosa dalam buffer TAE 1x (tris-asetat 0,04 M, EDTA 0,001 M pH 8,0). Larutan tersebut dipanaskan hingga agarosanya larut sempurna, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 50-60°C. Sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel yang memiliki sisir sebagai pembentuk sumur gel, ditambahkan 2 µL larutan etidium bromide 10µg/mL. Pada masing-masing sumur gel dimasukkan 10 µL sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan 2 µL *loading bufer* (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8,0; bromfenol biru 0,1% pH 8,0) (6). Proses elektroforesis ini dilakukan dalam dapar TAE 1x sebagai media penghantar arus pada tegangan 75 volt selama 30 menit. *Marker* atau penanda kontrol yang digunakan adalah 11bp. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan lampu UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimalisasi Suhu *Annealing* PCR

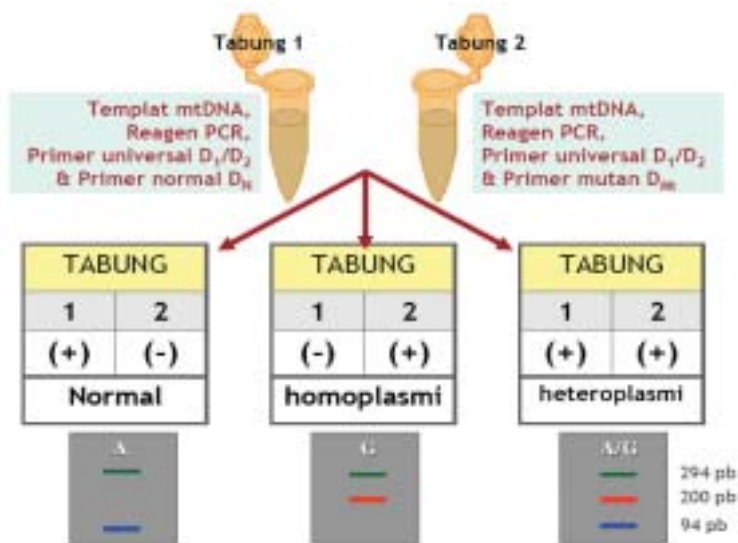
Penentuan suhu *annealing* yang optimal untuk pengerjaan PASA dilakukan menggunakan *software* bebas lisensi, dengan harapan diperoleh data *temperature melting* (T_m) masing-masing primer dan juga gabungan primer secara cepat dan akurat. Selanjutnya dengan program tersebut dapat diperoleh suhu *annealing* optimal teoretis yang menjadi

pendukung dalam pencarian suhu *annealing* menggunakan teknik PCR.

Suhu *annealing* pada pengerjaan PCR ditentukan dengan terlebih dahulu mencari masing-masing T_m primer maupun T_m kombinasi primer yang dapat diketahui menggunakan program *Fast PCR*, oligo analyzer maupun *oligo explorer*. Setelah memasukkan urutan mtDNA ke dalam program komputer, baik normal maupun mutan, diperoleh data T_m D1 adalah sekitar 60,3°C, Dn sekitar 53,0°C, dan Dmt sekitar 53,6°C. Kombinasi primer D1/Dn menghasilkan Suhu *annealing* sekitar 57,9-62,9°C sebagaimana dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan kombinasi D1/Dmt menghasilkan suhu *annealing* sekitar 58,1-63,1°C.

Setelah diketahui suhu *annealing* optimal PCR secara teoretis menggunakan program *Fast PCR*, dilakukan pula analisis primer menggunakan *oligo analyzer* untuk mengetahui kemungkinan terjadinya dimer maupun *self-annealing* berdasarkan tingkat energi yang dibutuhkannya. Analisis primer dibutuhkan untuk mengetahui kecenderungan penempelan satu primer dengan primer lain maupun dengan dirinya sendiri. Produk PCR yang sangat bergantung pada penempelan primer dengan urutan templat kemungkinan akan berkurang jumlahnya apabila terjadi reaksi antar sesama primer, disamping itu juga akan menghasilkan pita nonspesifik di bawah 100 pb yang dapat muncul pada saat karakterisasi gel elektroforesis.

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.



Gbr 1. Bagan karakterisasi fragmen PASA hasil pengerjaan PCR dengan dua tabung

Apabila pada tabung pertama terdapat dua pita ukuran 94 pb dan 294 pb, diduga primer D1/D2 dan D1/Dn bekerja normal pada alel normal. Apabila pada tabung satu negatif dan tabung dua diperoleh dua pita ukuran 200 pb dan 294 pb maka diduga primer D1/D2 dan D1/Dmt bekerja pada alel mutan dan sifatnya mutasi homoplasmic. Apabila pada tabung satu dan tabung dua terdapat tiga pita ukuran 94 pb, 200 pb dan 294 pb, maka diduga primer D1/D2, D1/Dn, dan D1/Dmt bekerja pada alel normal dan mutan, atau menunjukkan adanya mutasi heteroplasmic.

Beberapa parameter yang penting untuk mengetahui sifat primer yang digunakan adalah % GC, Tm masing-masing primer dan kemungkinan terjadinya *loop / self annealing*. *Oligo analyzer* menyediakan data primer yang dapat digunakan untuk mengetahui produk PCR hasil dari kombinasi primer D1/Dn maupun D1/Dmt.

Suhu *annealing* primer D1/D2 yang digunakan sebagai kontrol internal pada PASA telah ditetapkan pada penelitian sebelumnya, yaitu

sekitar 56°C, sehingga pada saat orientasi suhu optimal sedikit mengalami kesulitan dengan pencarian suhu optimal bagi seluruh primer. Seperti diketahui, bahwa dengan kombinasi primer D1/D2/Dn pada tabung satu dan D1/D2/Dmt pada tabung lainnya akan didapat hasil yang menunjukkan mutasi heteroplasmic dengan dua pita ukuran 294 pb yang dihasilkan oleh primer D1/D2 dan pita ukuran 200 pb yang dihasilkan oleh primer D1/Dn atau D1/Dmt.

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

Apabila sampel mengandung mutasi A → G pada titik 3243, maka baik tabung yang mengandung primer D1/Dn maupun D1/Dmt akan menghasilkan produk PCR dengan pita berukuran 200 pb, ini dikarenakan mutasi yang bersifat heteroplasmia memiliki campuran templat mtDNA mutan yang lebih sedikit dibandingkan templat normal.

Metode PASA dianggap sebagai salah satu metode yang sangat sederhana namun sangat bergantung pada bekerja tidaknya prinsip *mismatch* basa ujung 3' primer yang menempel pada posisi mutasi yaitu A3243G. Secara teoretis, apabila ujung 3' primer tidak komplementer dengan basa G di posisi 3243, maka dapat dipastikan bahwa tidak akan terjadi perpanjangan, begitu pula sebaliknya.

Karakterisasi fragmen yang terbentuk pada PASA dengan menggunakan 2 tabung ini, akan menghasilkan perbedaan alel normal, mutasi homoplasmia, dan mutasi heteroplasmia seperti digambarkan pada Gambar 1.

Hasil Pengerjaan PASA dengan Primer Kontrol Internal D1/D2

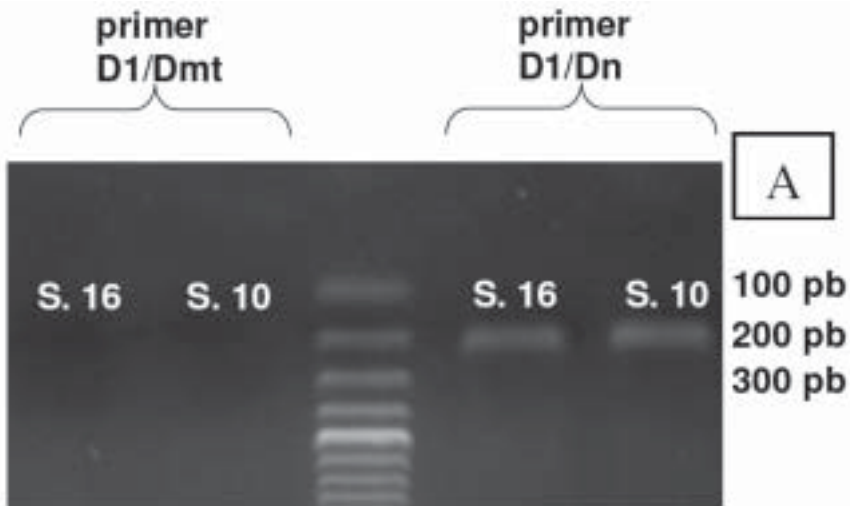
Kisaran suhu *annealing* primer D1/Dn maupun D1/Dmt pada suhu 56°C menjadi dasar orientasi PASA, dan dengan mengambil sampel secara acak, termasuk sampel pembandingan positif maupun sampel pembandingan negatif. Pada pengerjaan ini digunakan kontrol internal berupa

primer D1/D2 yang telah diketahui memiliki suhu *annealing* 56°C. Dari beberapa pengerjaan yang telah dilakukan, didapat pita yang menunjukkan bekerjanya primer D1/D2 pada tabung yang mengandung pasangan primer D1/D2/Dmt, namun tidak muncul pada tabung dengan primer Dn. Hal ini menunjukkan sulitnya kontrol internal primer D1/D2 digunakan pada PASA karena kemungkinan terjadi kompetisi primer pada suhu *annealing* yang tidak sesuai untuk semua primer, namun demikian munculnya pita dengan ukuran sekitar 294 pb pada beberapa pengerjaan menunjukkan bahwa isolasi templat mtDNA yang digunakan telah sesuai dengan yang diharapkan. Pada pengerjaan dengan sampel nomor 12 munculnya tiga pita pada kombinasi primer D1/Dmt/D2 pada sekitar 300 pb, 200 pb dan di bawah 100 pb relatif terhadap marker 100 bp *ladder*. Setelah menunjukkan hasil yang meyakinkan, pengerjaan selanjutnya tidak menyertakan primer kontrol internal D1/D2.

Hasil PASA dengan Suhu *Annealing* Berbeda

Pembuktian suhu *annealing* hasil perhitungan komputer dilakukan dengan melakukan pengerjaan PCR menggunakan kondisi suhu *annealing* antara 52-58°C dengan sampel yang telah diduga positif pada orientasi sebelumnya. Pada suhu *annealing* 52°C sampel yn sebagai pembandingan positif menunjukkan pita yang terang sekitar 200 pb pada

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.



Gbr 2. Contoh Karakterisasi elektroforegram hasil PASA dengan kondisi suhu annealing 57°C, menggunakan agarose gel 1% selama 25 menit.

(A) hasil negatif untuk sampel no. 16 dan sampel no. 10 dimana pada tabung dengan primer D1/Dn menunjukkan pita sekitar 200 pb dibandingkan dengan marker 100 bp *ladder* sedangkan tabung dengan primer D1/Dmt tidak memberikan pita sekitar 200 pb.

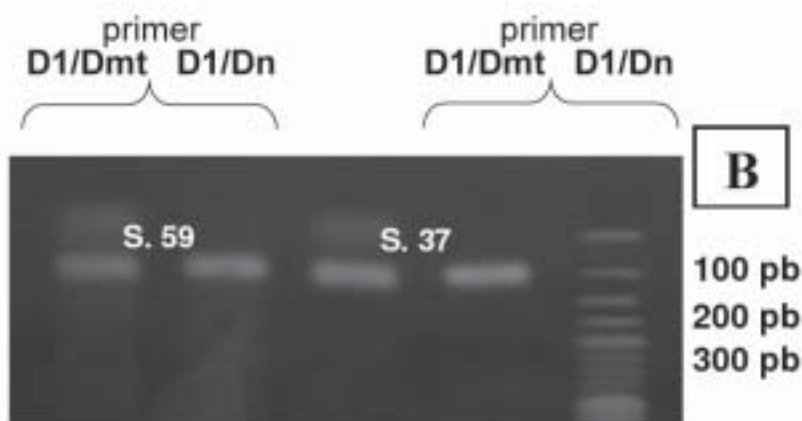
(B) hasil yang diduga positif ditunjukkan oleh sampel no. 59 dan sampel no. 37.

tabung dengan primer D1/Dn, dan juga tampak pita samar pada tabung dengan primer D1/Dmt. Hal ini menunjukkan bahwa sampel darah yang diduga positif pada penelitian sebelumnya menunjukkan hasil positif pada penelitian ini. Pada kondisi ini, sampel yang lain tidak menunjukkan pita pada tabung D1/Dmt.

Pada suhu 54,5°C tampak pita tipis pada 200 pb untuk sampel no. 37 dan no. 59 pada tabung dengan primer D1/Dn dan tidak ada pita sama sekali pada tabung dengan primer D1/Dmt. Hal ini menunjukkan suhu *annealing* belum memberikan reaksi PCR yang optimal.

Pada suhu 55°C, sampel no. 12 menunjukkan satu pita samar pada sekitar 200 pb relatif terhadap *marker* 100 bp *ladder* pada tabung dengan primer D1/Dmt, dan pita terang sekitar 200 pb pada tabung dengan primer D1/Dn. Apabila dibandingkan dengan suhu 52 dan 54,5°C terdapat perbedaan terangnya pita.

Pada suhu 55°C sampel no. 59 yang memiliki fenotip MIDD dibandingkan dengan sampel no. 86 yang tidak memiliki fenotip MIDD, dan sampel no. 59 menunjukkan pita yang sangat tipis sekitar 200 pb pada tabung dengan primer D1/Dmt, sedangkan sampel no. 86 praktis



tidak menunjukkan pita pada sekitar 200 pb.

Elektroforegram metode PASA pada suhu annealing 57°C untuk sampel no. 59 dan no. 37 menunjukkan pita terang pada posisi sekitar 200 pb yang diukur berdasarkan *marker* 100 bp *ladder*. Hasil PCR tabung yang menggunakan primer D1/Dn maupun tabung yang menggunakan D1/Dmt menunjukkan pita yang sejajar. Hal ini menunjukkan templat DNA mitokondria yang diidentifikasi secara heteroplasmis termutasi pada titik 3243.

Hasil PASA dengan suhu annealing 57°C untuk sampel no. 03, 12, 14, 37, 46, 66, 76, dan 86 menunjukkan pita terang pada posisi sekitar 200 pb menggunakan *marker* 200 pb yang sudah dikalibrasi sebelumnya dengan *marker* 100 bp *ladder*. Primer yang digunakan adalah hanya D1/Dmt setelah sebelumnya telah dilakukan validasi hasil positif untuk primer D1/Dn. Tampak pula bahwa sampel no. 10 tidak menunjukkan adanya

pita pada posisi sekitar 200 pb, sehingga dapat dipastikan negatif.

KESIMPULAN

- Pada penelitian ini ditemukan sepuluh penderita yang diduga positif mengandung mutasi A3243G mtDNA, dengan munculnya pita dengan ukuran 200pb pada tabung yang mengandung primer Dmt.
- Metode PASA efektif untuk mendeteksi mutasi titik penyebab MIDD, sehingga para klinisi dapat membedakan DM tipe ini dengan DM tipe 2, sehingga pengobatan pada individu tersebut dapat lebih rasional.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada seluruh pihak yang telah membantu hingga selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Malecki MT. 2005. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *J. diabres.* **68**(S1): 11-21.
2. Kirino Y, T Yasukawa, S Ohta, S Akira, K Ishihara, K Watanabe, T Suzuki. 2004. Codon-specific Translational Defect Caused by Wobble Modification Deficiency in Mutant tRN from Human Mitochondrial Disease. *PNAS.* **101**(42): 15070-15075.
3. Shanske S, J Pancrudo, and P Kaufmann. 2004. Varying Loads of the Mitochondrial DNA A3243G Mutation in Different Tissues: Implications for Diagnosis. *Am. J. of Medical Genetics.* **130A**: 134-137.
4. Guillausseau PJ, P Massin, D Dubois-La Forgue, J Timsit, M Virally, H Gin. 2001. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med.* **134**: 721-8.
5. Fischel GN. 2001. Mitochondrial DNA Mutations and Diabetes: Another Step toward Individualized Medicine. *Ann Intern Med.* **134**: 777-779.
6. Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.