

## IDENTIFIKASI MUTASI HETEROPLASMI A3243G DNA MITOKONDRIA DAN STUDI PEWARISAN MATERNAL PADA PASIEN DIABETES MELITUS TIPE 2

Iman P. Maksum<sup>1)</sup>, Sriwidodo<sup>2)</sup>, O. Suprijana<sup>1)</sup>, G. Natadisastra<sup>3)</sup>, S. Nuswantara<sup>4)</sup> & A.S. Noer<sup>5)</sup>

<sup>1\*)</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran

<sup>2)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

<sup>3)</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

<sup>4)</sup>*Sandia Biotech Diagnostic Centre* Rumah Sakit Santosa

<sup>5)</sup>Divisi Biokimia Institut Teknologi Bandung

E-mail: [ip\\_maksum@unpad.ac.id](mailto:ip_maksum@unpad.ac.id)

### ABSTRAK

Mutasi A3243G DNA mitokondria (mtDNA) adalah mutasi substitusi basa A ke G pada posisi 3243 gen *tRNA<sup>Leu</sup>*. Salah satu fenotipe klinis yang disebabkan mutasi A3243G mtDNA adalah MIDD (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness*) yang merupakan salah satu bentuk diabetes melitus (DM) tipe 2. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi mutasi heteroplasmia A3243G manusia Indonesia pada pasien DM tipe 2 dan mempelajari pewarisan maternal mutasi A3243G hingga tiga generasi dengan memanfaatkan metode PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism*), PASA (*PCR-Amplification of Specific Allele*) dan PCR-SSCP (*PCR-Single Strand Conformation Polymorphism*). mtDNA diperoleh dari hasil lisis sampel darah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mutasi A3243G teridentifikasi pada 2 dari 101 pasien DM tipe 2. Mutasi heteroplasmia A3243G dapat ditunjukkan dari hasil PCR-RFLP dan PASA. Hasil RFLP menunjukkan adanya tiga fragmen, masing-masing yaitu fragmen utuh 294, 182 dan 112 pb sebagai hasil restriksi enzim *ApaI*. Hasil PASA menunjukkan adanya dua fragmen dengan ukuran 200 pb pada alel normal dan mutan. Mutasi A3243G yang teridentifikasi mempunyai tingkat heteroplasmia yang rendah karena tidak dapat teridentifikasi dengan *direct sequencing* dan PCR-SSCP (akrilamid:bis-akrilamid 49:1%). Pewarisan maternal mutasi heteroplasmia A3243G dapat teridentifikasi dengan PASA.

Kata kunci : Mutasi A3243G, mutasi heteroplasmia, PCR-RFLP, PASA, PCR-SSCP, MIDD, *direct sequencing*.

### IDENTIFICATION OF THE A3243G HETEROPLASMY MUTATION AND STUDY OF MATERNAL INHERITANCE IN THE TYPE-2 DIABETES MELLITUS PATIENTS

### ABSTRACT

A3243G mutation in mitochondrial DNA (mtDNA) is a mutation of A to G in 3243 position *tRNA<sup>Leu</sup>* gene. MIDD (*Maternal Inherited Diabetes and Deafness*), a form of type-2 diabetes mellitus (type-2 DM), is one of clinical phenotype which caused by A3243G mutation. *The aim of this research is to identify the A3243G heteroplasmia mutation in the type-2 DM patients and to study the maternal inheritance of the A3243G mutation until three generation by using PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragments Length Polymorphism), PASA (PCR-Amplification Specific Allele), and PCR-SSCP (PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism) methods. mtDNA were obtained from lysis of blood samples. The results of research showed that the A3243G were identified in 2 of 101 of the type-2 DM patients. The heteroplasmia mutation could be identified from the results of PCR-RFLP and PASA. The results of RFLP showed that there were three electrophoretic bands, they were a full 294, a 182 and a 112 bp fragments, respectively as the restricted products of *ApaI* enzyme. The results of PASA showed the fragments of 200 bp in normal primer and mutant alleles. The results of the A3243G mutation has low-heteroplasmic mutation because it couldn't be identified by *direct sequencing* and PCR-SSCP (acrilamide:bis-acrilamide 49:1%). The maternal inheritance of this mutation could be identified by PASA.*

Key words : A3243G mutation, heteroplasmia mutation, PCR-RFLP, PASA, PCR-SSCP, *direct sequencing*, MIDD

### PENDAHULUAN

Prevalensi diabetes melitus (DM) setiap tahun semakin tinggi baik di dunia maupun di Indonesia. Pasien DM di Jakarta pada tahun 2001 telah mencapai 12,8%, padahal pada tahun 1982 baru

sekitar 1,7%. WHO melaporkan pada tahun 2010 diperkirakan dari 178 juta penduduk yang berumur di atas 20 tahun, pasien DM akan mencapai 8,2 juta orang, yang tentunya menjadi beban biaya kesehatan secara nasional, dan laporan WHO juga menyebutkan satu dari dua pasien DM belum

terdiagnosis secara definitif (Anonim, 2002). Prevalensi diabetes di Indonesia berkisar antara 1,4 sampai dengan 1,6% kecuali di dua tempat yaitu di Pekajangan 2,3% dan di Manado 6% (Suyono, 1996).

Suatu studi menyatakan bahwa tingkat kecenderungan untuk DM tipe 2 ini berkisar antara 90% atau lebih. DM tipe 2 merupakan suatu penyakit heterogen yang disebabkan baik oleh faktor genetik dan juga faktor lingkungan. Pendekatan pada beberapa kandidat gen penyebab DM tipe 2 ini telah mengidentifikasi beberapa gen untuk meregulasi sinyal dan sekresi insulin. Selain itu pula, perbedaan rasial ternyata mempengaruhi tingkat prevalensi dari DM tipe 2 ini dan tingkat prevalensi pada populasi di Asia serta Indian-Amerika ternyata cukup tinggi. Salah satu bentuk DM tipe 2 adalah disebabkan adanya disfungsi sekresi insulin, karena adanya penghambatan dalam produksi ATP yang diperlukan dalam sekresi insulin. Disfungsi tersebut berkaitan dengan adanya mutasi pada gen *tRNA<sup>Leu</sup>* DNA mitokondria (mtDNA) dengan *fenotipe Maternally Inherited Diabetes and Deafness* (MIDD) dan mutasi pada ekson 8 gen glukokinase DNA inti (nDNA) dengan fenotip *Maturity Onset Diabetes of The Youth* (MODY 2) (So *et al.*, 2000; Maassen *et al.*, 2004).

Mutasi A menjadi G pada posisi 3243 mtDNA telah diteliti sebagai mutasi kausal pada diabetes turunan maternal dengan ketulian dan pada optalmoplegia eksternal MIDD (Kirino *et al.*, 2004). Mutasi tersebut menyebabkan struktur *tRNA<sup>Leu</sup>* mengalami dimerisasi pada D-stem loop karena ada urutan GGGCCC. Dimerisasi tersebut menghambat aktivitas Leusil-tRNA sintetase sampai 10 kali lipat, yang terjadi pada tahapan aktivasi tRNA dengan asam amino leusin dalam biosintesis protein respirasi sehingga dapat menghambat produksi ATP. Studi yang dilakukan terhadap sejumlah besar pasien MIDD di Perancis, menyebutkan bahwa fenotip diabetes pada sindrom ini agak berbeda dari fenotipe-fenotipe lainnya. Namun demikian obat metformin untuk pasien DM tipe 2 fenotipe MIDD dan MODY 2 dapat menyebabkan *lactate acidosis* dengan gejala sakit otot dan lemas serta berkurangnya berat badan sehingga terapi insulin lebih tepat untuk fenotipe ini (Guillausseau *et al.*, 2001). Hal ini sangat penting bagi dokter untuk menjadi lebih hati-hati terhadap sindrom tersebut terutama jika pada rekaman medis memiliki karakteristik non obesitas, non ketoasidosis, menyerang pada usia dewasa, sering muncul gangguan pendengaran, atau memiliki riwayat diabetes secara maternal (Fischel, 2001).

Studi klinis pada pasien yang memiliki kelainan

mitokondria akibat mutasi A3243G telah dilakukan di beberapa negara. Di antaranya, di Taiwan telah ditemukan mutasi A3243G menyebabkan subtipe DM 0,15% populasi pasien DM (Liou, 2001). Di Polandia telah ditemukan mutasi A3243G pada pasien DM, meskipun bukan sebagai penyebab yang sering terjadi (Malecki *et al.*, 2001). Di Jepang mutasi ini ditemukan pada 2,9% pasien DM (Ohkubo *et al.*, 2001). Peneliti Cina yang telah meneliti 10 pasien MELAS menemukan seluruhnya teridentifikasi memiliki mutasi A3243G (Zhaoxia *et al.*, 2002). Di Inggris telah diteliti 2 dari 268 pasien DM usia muda memiliki mutasi A3243G (Owen *et al.*, 2003). Di Korea sebanyak 22,3% pasien yang memiliki penyakit pada mitokondria ditemukan mutasi A3243G ini (Chae *et al.*, 2004). Di Kroasia telah ditemukan 10% pasien yang didiagnosis secara klinis mengidap DM tipe 2 memiliki mutasi A3243G (Kleiner *et al.*, 2004). Di Spanyol telah ditemukan 18% penderita pada anak-anak memiliki tiga mutasi heteroplasmik termasuk A3243G (Uusima *et al.*, 2004). Penelitian mengenai diabetes yang berkaitan dengan mutasi mtDNA masih dilakukan hingga saat ini dengan alasan bahwa keterkaitan secara maternal penderita diabetes dengan anggota keluarga yang masih sehat memiliki kecenderungan resiko tinggi untuk diwariskan sehingga sangat menguntungkan apabila dilakukan diagnosis dini (Fischel, 2001).

Di Indonesia sendiri, telah dilakukan pula penelitian serupa untuk mengetahui lebih jauh mutasi mitokondria A3243G pada penderita DM. Suatu penelitian yang telah mencapai jumlah 1.500 sampel penderita DM yang berasal dari Jakarta, Jogjakarta, dan Surabaya, belum menemukan adanya mutasi A3243G (Anonim, 2003), lain halnya dengan penelitian yang dilakukan institute Eijkman, menemukan penderita DM memiliki varian mutasi di mtDNA (Marzuki, 2000).

Karakteristik mutasi fenotip ini adalah heteroplasmik, yang mana jumlah DNA mutan di dalam darah masih relatif rendah. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode yang tepat, akurat dan relatif lebih murah sehingga dapat digunakan untuk keperluan analisis. Beberapa penelitian yang telah dilakukan baik di Indonesia maupun di negara lain melaporkan kesulitan mendeteksi mutasi heteroplasmik mtDNA frekuensi rendah (5-10%) dan biasanya lebih rendah lagi pada jaringan darah perifer (kurang dari 0,1%), sehingga sulit untuk menentukan secara pasti apakah jaringan yang diteliti tidak memiliki mutasi yang dimaksud atau akibat keterbatasan metode analisis yang digunakan. *Load of mutation* pada jaringan berbeda menunjukkan adanya perbedaan tingkat mutasi sebagaimana dipublikasikan pada

penelitian sebelumnya. Sel pada jaringan yang diserang memiliki tingkat heteroplasm paling tinggi (Shanske *et al.*, 2004; Zhaoxia *et al.*, 2002; Narbonne *et al.*, 2001).

Berdasarkan latar belakang yang sudah dijelaskan di atas, maka penentuan potensi dan pewarisan MIDD pada pasien DM tipe 2 untuk populasi orang Indonesia diperlukan. Penelitian lebih lanjut dilaksanakan untuk mencari metode lebih sensitif dan sederhana untuk mendeteksi tingkat heteroplasm rendah pada sampel darah yang dapat digunakan mutlak pemeriksaan rutin laboratorium klinik dan untuk deteksi dini.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari darah 101 pasien DM tipe 2 manusia Indonesia. Sebagai kontrol digunakan sampel darah manusia normal. Selanjutnya sampel tiga generasi segaris ibu diambil dari darah sampel yang positif mutasi A3243G mtDNA pada tahapan sebelumnya, yaitu sebagai generasi I, anak perempuannya (generasi II) dan cucu perempuannya (generasi III) segaris ibu.

### Isolasi dan Amplifikasi mtDNA

Sel limfosit diperoleh dengan cara mencuci 200 L sampel darah dengan 1000 L bufer TE (tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA mM pH 8,0), disentrifuge pada 12.000 g selama 1 menit. Pencucian dilakukan berulang sampai diperoleh pelet putih. Pelet putih ditambahkan dengan bufer lisis yang terdiri atas tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 1 mM pH 8,0; proteinase K 0,04 mg/ml dan tween-20 0,5%. Campuran reaksi diinkubasi pada 56°C selama 1 jam dan dilanjutkan pada 95°C selama 5 menit dalam inkubator. Setelah inkubasi campuran reaksi disentrifuge pada 20.000 g selama 3 menit kemudian diambil supernatannya untuk reaksi PCR.

### Amplifikasi fragmen 294 pb gen *tRNA<sup>Leu</sup>* mtDNA

Amplifikasi gen *tRNA<sup>Leu</sup>* dengan PCR menggunakan primer D1 5'-AAC GTT GGG GCC TTT GCG TA-3' dan D2 5'-AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC-3'. Campuran reaksi mengandung enzim *Taq* DNAPolymerase 1 unit, templat mtDNA hasil lisis, primer D1 dan D2 masing-masing 1 M, bufer PCR 10x (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; NaCl 50 mM; Triton X-100 0,1%), dNTP 200 M, MgCl<sub>2</sub> 2 M dan ddH<sub>2</sub>O steril. Proses PCR sebanyak 30 siklus: denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, tahap denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 56°C selama 30 detik, dan

*extension* pada 72°C selama 50 detik, *extension* akhir pada 72°C selama 10 menit. Pemurnian hasil PCR dilakukan dengan metode presipitasi etanol. Analisis mutasi A3243G mtDNA dengan metode RFLP menggunakan enzim *ApaI*. Produk PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis agarosa 1% (b/v).

### Analisis RFLP

Templat mtDNA 294 pb dimurnikan dengan presipitasi etanol kemudian direaksikan dengan enzim *ApaI* (7.5 unit) dalam bufer L 10X dan diinkubasi pada 37°C selama semalam. Hasil karakterisasi dengan *ApaI* dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2% (b/v).

### Analisis PASA

Analisis Mutasi A3243G mtDNA dengan metode PASA menggunakan primer universal D1 5'-AAC GTT GGG GCC TTT GCG TA-3', primer normal D<sub>N</sub> 5'-GGG TTT GTT AAG ATG GCA GA-3', dan primer mutan D<sub>Mt</sub> 5'-GGG TTT GTT AAG ATG GCA GG-3'. Kondisi PCR : tahap denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, kemudian masuk ke program siklus PCR sebanyak 30 siklus dengan tahap denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 56°C selama 30 detik, dan *extension* pada 72°C selama 50 detik, proses *extension* akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2%.

### Analisis SSCP

Templat mtDNA 294 pb ditambah 20 µL *formamide dye mix* lalu dididihkan selama 3 menit dan dimasukkan ke es dengan cepat. Sebanyak 2 µL sampel dimasukkan pada lubang sumur gel poliakrilamid (akrilamid:bis-akrilamid 49:1%). Elektroforesis dilakukan pada 6-7 V/cm (~250V (dan 15 mA) untuk gel 40X40 cm) selama 14 jam. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan metode *silver staining*.

### Direct Sequencing

Sebagai pembuktian tiga generasi segaris ibu dilakukan konfirmasi urutan nukleotida dari sampel pasien DM tipe 2 yang mempunyai mutasi A3243G mtDNA dengan anak cucunya untuk menentukan tingkat homologi di daerah Hipervariabel I D-loop mtDNA. Daerah D-loop mtDNA tiga generasi segaris ibu diamplifikasi dengan primer M1 5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3 dan M2 5 GAT TTC ACG GAG GAT GGTG-3 kemudian dimurnikan dan dianalisis urutan nukleotidanya dengan *direct sequencing*. Selain itu *direct sequencing* dilakukan untuk

*konfirmasi hasil PCR-RFLP, PASA, maupun SSCP.*

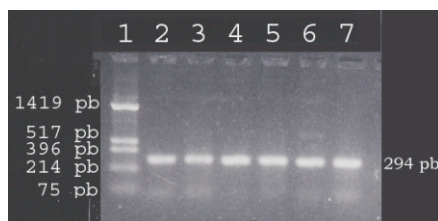
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemilihan dan Pengambilan Sampel Sel Darah dan Sel Epitel

Sampel yang diambil sebagai templat mtDNA adalah sel darah dari 101 subjek penderita diabetes melitus tipe 2 di Rumah Sakit Cimbuleuit, Rumah Sakit Pindad, Laboratorium Klinik Prodia, dan Laboratorium Klinik Pramita, Bandung. Pemilihan sel darah sebagai sampel dikarenakan sel ini mempunyai jumlah organel mitokondria yang cukup banyak selain sel-sel yang lain seperti sel epitel, sel akar otot, sel ekor sperma dan sel akar rambut (Thorpe, 1984). Alasan lainnya adalah karena sampel darah relatif mudah untuk diambil dan telah digunakan sebagai sampel pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ohkubo *et al.* (2001), Lee *et al.* (1997), dan Malecki *et al.* (2001) untuk menganalisis mutasi A3243G mtDNA yang berhubungan dengan DM di Jepang, Korea, dan Polandia. Sampel diambil secara acak dari pasien yang positif terkena DM tipe 2 dengan rentang usia 25 tahun ke atas.

### Amplifikasi Templat mtDNA secara *In vitro* dengan PCR

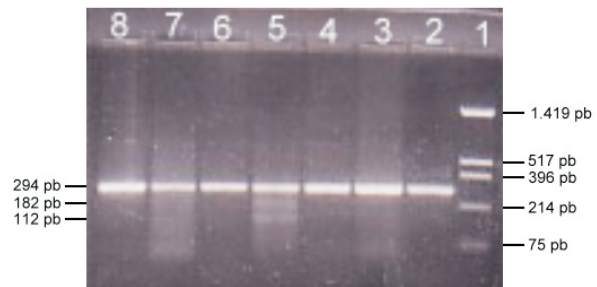
Templat mt DNA hasil lisis selanjutnya diamplifikasi untuk mendapatkan gen *tRNA<sup>Leu</sup>* secara *invitro* dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan sepasang primer D1 dan D2 dengan urutan nukleotida merujuk pada penelitian Zhang *et al.* (2002). Primer D2 terdiri atas 20 nukleotida yang berperan sebagai *forward primer* akan menempel pada posisi 3130-3149 pada *light strand* templat mtDNA dan primer D1 yang juga terdiri atas 20 nukleotida berperan sebagai *reverse primer* menempel pada *heavy strand* templat mtDNA pada posisi 3423-3404 sehingga akan didapatkan 294 pasang basa seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Fragmen hasil PCR. Fragmen 294 pb gen *tRNA<sup>Leu</sup>* mtDNA yang diamplifikasi dengan menggunakan primer D<sub>1</sub> dan D<sub>2</sub> ditunjukkan pada lajur 2,3,4,5,6 dan 7. Penampakan hasil analisis dengan cara elektroforesis gel agarosa 1,5%, sebagai standar ukuran DNA digunakan pUC19/*Hinf*I (pada lajur 1) yang menghasilkan 5 fragmen dengan ukuran masing-masing 1419, 517, 397, 214, dan 75 pb.

### Karakterisasi dengan RFLP menggunakan enzim restriksi *Apa*I

Dari 101 sampel yang dianalisis hanya dua sampel yang mempunyai mutasi A3243G. Hal ini ditunjukkan oleh adanya tiga pita hasil karakterisasi elektroforesis gel agarosa, dua pita hasil pemotongan enzim restriksi *Apa*I yaitu 182 dan 112 pb serta satu pita utuh 294 pb (dapat ditunjukkan pada Gambar 2). Hasil penelitian menandakan bahwa mutasi tersebut bersifat heteroplasm, yang artinya dalam sel terdapat campuran antara mtDNA yang termutasi dan normal.



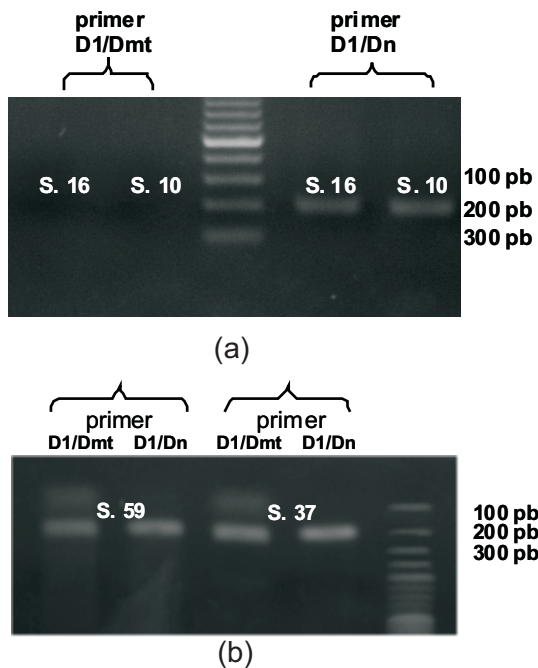
Gambar 2. Fragmen hasil PCR-RFLP. Karakterisasi sampel hasil PCR-RFLP (lajur 2-8) dengan elektroforesis gel agarosa 2% (b/v) menggunakan penanda kontrol pUC/*Hinf*I (lajur 1). Sampel pada lajur 5 menunjukkan adanya tiga pita yaitu fragmen utuh 294, 182 dan 112 pb di bawahnya yang diperkirakan merupakan hasil pemotongan enzim restriksi *Apa*I.

Penelitian ini dilanjutkan dengan studi pewarisan mutasi pada generasi berikutnya sampai tiga generasi segaris ibu, tetapi metode PCR-RFLP tidak dapat mengidentifikasinya. Hal ini disebabkan jumlah mutan pada generasi selanjutnya masih relatif sedikit (kurang dari 0,1%) sehingga yang dominan teramplifikasi dengan PCR adalah mtDNA normal. Pada PCR-RFLP masih menggunakan sepasang primer non spesifik/universal yang dapat mengamplifikasi gen normal maupun mutan sehingga kemungkinan besar yang mudah teramplifikasi adalah mtDNA dominan yaitu mtDNA normal.

### Analisis PASA

Seperti halnya yang dihasilkan pada metode PCR-RFLP, hasil analisis metode PASA menunjukkan hanya ada dua sampel dari 101 sampel yang mempunyai mutasi A3243G (dapat ditunjukkan pada Gambar 3b). Mutasi heteroplasm dapat ditunjukkan pada metode PASA ini yaitu dengan teramplifikasinya dua fragmen dengan ukuran 200 pb dari sepasang primer D1/Dmt untuk mutan dan sepasang primer D1/Dn untuk normal. Hal yang sama ditunjukkan juga pada studi pewarisan mutasi pada generasi

berikutnya, menunjukkan PASA dapat mendeteksi mutasi heteroplasmia ini sampai tiga generasi segaris keturunan ibu.



Gambar 3. Karakterisasi elektroforegram hasil PASA. (a) menunjukkan contoh sampel yang tidak mempunyai mutasi A3243G, sedangkan (b) dua sampel yang mempunyai mutasi tersebut. Dengan kondisi suhu *annealing* 56°C, menggunakan agarosa gel 1%. Amplifikasi primer D1/Dn dan D1/Dmt menunjukkan pita sekitar 200 pb dibandingkan dengan marker 100 bp ladder.

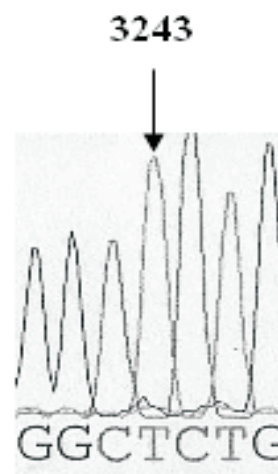
Tingkat heteroplasmia pada generasi selanjutnya jauh lebih rendah tetapi metode PASA dapat mendeteksinya. Hal ini disebabkan karena adanya penggunaan primer spesifik yang secara selektif mengamplifikasi alel mutan sehingga dapat disimpulkan bahwa PASA dapat mendeteksi mutasi pada frekuensi rendah (dalam jaringan darah perifer) dan tepat digunakan untuk mengatasi keterbatasan metode analisis lainnya serta untuk deteksi dini. Selain lebih sensitif, metode PASA ini mempunyai kelebihan lainnya yaitu lebih murah dan aman.

Berbeda dengan metode PCR-RFLP dan PASA, metode PCR-SSCP tidak dapat mendeteksi mutasi A3243G dengan elektroforesis gel poliakrilamid (akrilamid:bis-akrilamid 49:1%) (data tidak ditunjukkan). Tidak terdeteksinya mutasi ini dapat disebabkan beberapa faktor. Salah satunya adalah perbandingan akrilamid dan bis-akrilamid yang digunakan yaitu 49:1%. Zhang et al. (2002) yang telah berhasil melakukan analisis PCR-SSCP melakukannya dengan perbandingan akrilamid:bisakrilamid 29:1%. Perbandingan akrilamid:bisakrilamid menentukan derajat ikatan silang dari polimer yang terbentuk. Secara umum, semakin tinggi konsentrasi bis-akrilamid maka

semakin tinggi derajat ikatan silangnya dan semakin baik pemisahan (Shi & Jackowski, 1998). Perbandingan akrilamid:bis-akrilamid 49:1% memiliki derajat ikatan silang yang cukup rendah sehingga akhirnya tidak dapat memisahkan DNA untai tunggal. Selain itu, ukuran fragmen DNA yang dianalisis juga mempengaruhi hasil dari PCR-SSCP. Semakin panjang fragmen maka semakin banyak konformasi untai tunggal yang terbentuk sehingga pemisahan pun menjadi tidak optimal. Pada penelitian ini ukuran fragmen DNA yang dianalisis adalah 294 pb. Untuk hasil optimal sebaiknya digunakan ukuran fragmen 150-200 pb. SSCP dapat mendeteksi polimorfisme hingga 100% untuk ukuran fragmen hingga sekitar 200 pb. Semakin panjang ukuran fragmen maka akan semakin menurun kemampuan deteksi dari PCR-SSCP. Untuk meningkatkan sensitivitas PCR-SSCP, dapat digunakan variasi matriks gel. Beberapa matriks alternatif adalah gel poliakrilamid konsentrasi tinggi atau menggunakan matriks gel baru yang disebut gel MDE (Mutation Detection Enhancement) yang akan meningkatkan pergeseran mobilitas dan resolusi.

### Direct Sequencing

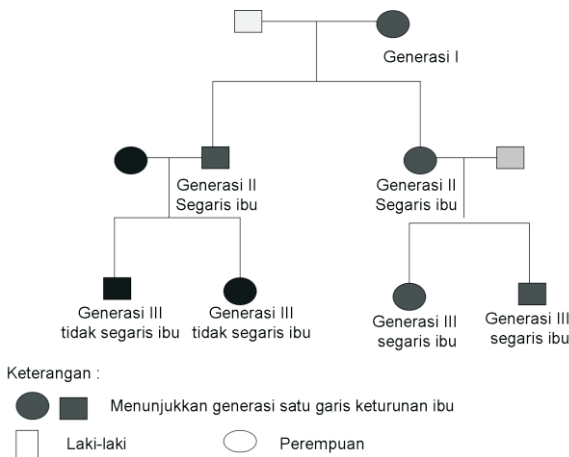
Metode direct sequencing digunakan untuk konfirmasi hasil analisis mutasi dengan PCR-RFLP dan PASA. Adanya mutasi heteroplasmia dapat terlihat dari adanya dua puncak yang merupakan nukleotida yang termutasi dan nukleotida yang masih normal. Tingginya puncak menunjukkan nukleotida mana yang paling dominan pada templat DNA yang digunakan. Tetapi hasil penelitian (Gambar 4) menunjukkan hanya puncak T (sebagai komplemen nukleotida A) yang masih dominannya sebagai nukleotida normal. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi heteroplasmia ini masih rendah.



Gambar 4. Hasil *direct sequencing*. Puncak nukleotida T pada urutan basa 3243 hasil sekuensing menunjukkan tidak teridentifikasinya mutasi heteroplasmia A3243G gen *tRNA<sup>Leu</sup>* mtDNA.

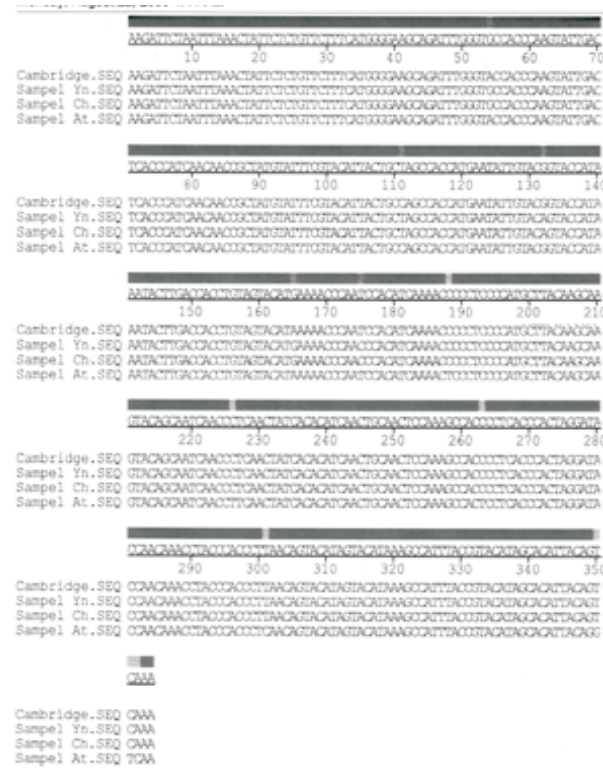
**Analisis Homologi Daerah D-loop mtDNA**

Analisis homologi dilakukan pada salah satu pasien yang positif mutasi A3243G dengan PCR-RFLP dan PASA dan keturunannya berdasarkan segaris keturunan ibu. Silsilah keluarganya dapat ditunjukkan pada Gambar 5. Analisis homologi D-loop mtDNA (daerah hipervariabel I) dilakukan pada keluarga tersebut sebagai pembuktian keturunan berdasarkan segaris ibu.



Gambar 5. Silsilah keluarga sampel. Sampel penelitian diambil dari generasi I dan keturunannya diambil dari generasi II dan cucu perempuannya sebagai generasi III.

Maksun dan Noer (2002) menemukan bahwa 387 pb urutan nukleotida daerah D-Loop mtDNA dari tujuh generasi segaris keturunan ibu mempunyai tingkat homologi 100% dan tidak menunjukkan tingkat homologi 100% dengan individu lain yang tidak segaris keturunan ibu walaupun masih mempunyai hubungan keluarga. Berdasarkan pada penelitian tersebut maka analisis homologi cukup dilakukan antara generasi I langsung dengan generasi III, karena jika urutan nukleotida daerah D-loop mtDNA sampel generasi I dengan generasi III segaris ibu homolog 100%, maka dengan generasi II pun akan homolog 100%. Sebagai konfirmasi dilakukan analisis homologi daerah D-loop mtDNA antara sampel generasi I dengan sampel generasi III tidak segaris ibu. Selanjutnya semuanya dibandingkan dengan urutan *Cambridge* sebagai urutan standar menggunakan program *Megalign DNASTAR* (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil analisis homologi sampel Yn, Ch dan At dengan urutan nukleotida Anderson (*Cambridge*) sebagai standar. Analisis homologi dilakukan dengan menggunakan program *Megalign DNASTAR*. Tanda hitam menandakan homologi 100%, tanda putih menunjukkan varian.

Hasil analisis homologi urutan nukleotida daerah D-loop mtDNA sampel generasi I dan generasi III segaris ibu menunjukkan tingkat homologi 100% sedangkan tingkat homologi daerah D-loop mtDNA antara sampel generasi I dan generasi III tidak segaris ibu adalah 96,6%. Jumlah sampel perlu ditambah untuk analisis mutasi A3243G ini pada daerah lain di Indonesia, terutama di kota-kota dengan tingkat prevalensi DM tipe 2 yang tinggi (Manado) dan multi etnis (Jakarta) agar dapat dicari tingkat prevalensi yang tepat untuk mutasi A3243G ini di Indonesia. Selanjutnya, untuk mempermudah menentukan kemungkinan adanya mutasi A3243G pada pasien DM tipe 2 maka perlu dipersempit berdasarkan gambaran klinis yang sesuai, seperti ditandai oleh diabetes non obesitas, tidak mengalami ketoasidosis, riwayat pewarisan maternal dan adanya gangguan pada indera pendengaran (ketulian).

**SIMPULAN**

Kesimpulan dengan metode PCR-RFLP (menggunakan enzim restriksi *ApaI*) dan PASA dapat mendeteksi adanya mutasi heteroplasmia A3243G pada 2 dari 101 pasien diabetes melitus tipe 2 di Indonesia. Dalam studi pewarisan maternal

mutasi A3243G pada tiga generasi segaris keturunan ibu hanya dapat dideteksi oleh metode PASA yang menunjukkan metode ini lebih sensitif dibandingkan dengan metode-metode lainnya. Mutasi A3243G yang teridentifikasi mempunyai tingkat heteroplasm karena tidak dapat teridentifikasi dengan *direct sequencing dan SSCP*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Pembinaan dan Pengabdian pada Masyarakat Departemen Pendidikan Nasional dalam Proyek Hibah Bersaing. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen DIKTI, Pimpinan Universitas Padjadjaran, Ketua Lembaga Penelitian Unpad, Dekan FMIPA Unpad, Ketua Jurusan Kimia serta Kepala Laboratorium dan seluruh staf Laboratorium Kimia Bahan Alam Jurusan Kimia FMIPA Unpad yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2002. Konsensus Pengelolaan Diabetes Melitus tipe 2 di Indonesia, Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI).
- Anonim, 2003. Mutasi DNA Mitokondria Penyebab Diabetes Melitus. Melalui <<http://www.gklinis.com/>>, [10/11/2003].
- Chae, J., Hwang, H., Lim, C., Cheong, H., Hwang, Y., & Kim, K. 2004. Clinical Features of A3243G Mitochondrial tRNA Mutation, *Brain & Dev.*, **26**: 459-462.
- Fischel-Ghodsian, N. 2001. Mitochondrial DNA Mutations and Diabetes: Another Step toward Individualized Medicine. *Ann Intern Med.*, **134**: 777-779.
- Guillausseau, P. J., Massin, P., Dubois-LaFogues, D., Timsit, J., Virally, M., & Gin, H. 2001. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med.*, **134**:721-728.
- Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K., & Suzuki, T. 2004. Codon-specific Translational Defect Caused by a Wobble Modification Deficiency in Mutant tRNA form Human Mitochondrial Disease, *PNAS*. **101-42**:15070-15075.
- Kleiner, I. M., Medvidovic, E. P., Renar, I. P., Metelko, Z., Kusec, R., Gabrilovac, J., & Boranic, M. 2004. A Pilot Study of Mitochondrial DNA Point Mutation A3243G in A Sampel of Croatian Patients Having Type-2 Diabetes Melitus Associated with Maternal Heritance. *Acta Diabetol*, **41**:179-184.
- Lee, H. C., Song, Y. D., Li, H., Park, J. O., Suh, H. C., Lee, E., Lim, S., Kim, K., & Huh, K. 1997. Mitochondrial gene transfer ribonucleic acid (tRNA)<sup>Leu(UUR)</sup> 3243 and tRNA<sup>Lys</sup> 8344 mutations and diabetes mellitus in Korea. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **82** (2): 372-374.
- Liou, C. W., Huang, C., & Wei, Y. H. 2001. Molecular Analysis of Diabetes Mellitus-Associated A3243G Mitochondrial DNA Mutation in Taiwan Cases. *Diab. Res. and Clin. Practice*, **54** Suppl. 2, S39-S43.
- Maassen, J. A., t'Hart, L. M., van, Essen, E., Heine, R. J., Nijpels, G., Roshan, S., Tafrechi, J., Raap, A. K., Janssen, G. M. C. & Lemkes, H. P. J. 2004. Mitochondrial Diabetes: Molecular Mechanisms and Clinical Presentation, *Diabetes*, **52**: S103-S109.
- Maksum, I. P. & Noer, A. S. 2002. Tiga mutasi substitusi spesifik D-Loop DNA mitokondria pada satu keluarga besar segaris keturunan ibu. *Jurnal Biosains*, **7**.
- Malecki, M., Klupa, T., Wanic, K., Frey, J., Cyganek, K., & Sieradski, J. 2001. Search for Mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup> Mutation in Polish Patient with Type-2 Diabetes Melitus, *Med Sci Monit.*, **7**(2): 246-250.
- Marzuki, S. 2000. Genetic Diversity and Human Diseases, Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta.
- Narbonne, H., Lostanien, D., Desnuelle, C., Vialetters., Saunieres, A., & Plucklinger, V. 2001. Searching for A3243G Mitochondrial DNA Mutation in Buccal Mucosa in Order to Improve the Screening of Patient with Mitochondrial Diabetes. *E. J. Endocrinology*, **145**: 541-542.
- Ohkubo, K., Yamano, A., Nagashima, M., Mori, Y., Anzai, K., Akehi, Y., Nomiya, R., Asano, T., Urae, A., & Ono, J. 2001. Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin. Chem.*, **47**: 1641-1648.
- Owen, K., Sride, A., Ellard, S., & Hattersley, A. T. 2003. Etiological Investigation of Diabetes in Young Adults Presenting with Apparent Type 2 Diabetes, *Diabetes Care*. **26**(7): 2088-2093.

Shanske, S., Pancrudo, J., & Kaufmann, P. 2004. Varying Loads of the Mitochondrial DNA A3243G Mutation in Different Tissues: Implications for Diagnosis. *Am. J. of Medical Genetics*. **130A**:134-137.

Shi, Q. & Jackowski. 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach*. Third Edition. Oxford University Press. Oxford.