

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

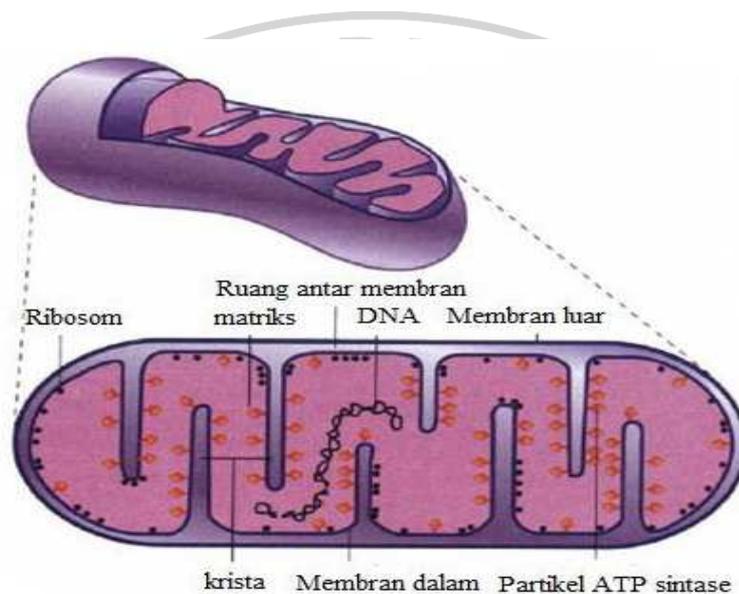
#### 2.1. Fungsi dan Struktur Mitokondria

Mitokondria merupakan organel yang terdapat di dalam sitoplasma. Mitokondria berfungsi sebagai organ respirasi dan pembangkit energi dengan menghasilkan adenosin trifosfat (ATP) yang akan digunakan untuk aktivitas seluruh sel-sel tubuh. Mitokondria ditemukan dalam jumlah banyak pada sel yang aktivitas metabolismenya tinggi yaitu sel-sel kontraktile seperti sperma pada bagian ekornya, sel otot jantung, dan sel yang aktif membelah seperti epitelium, akar rambut, dan epidermis kulit.

Mitokondria berasal dari kata Yunani *mito* yang berarti benang, dan *chondrion* yang berarti seperti granul (butiran-butiran), sehingga dapat diartikan sebagai organel dengan rangkaian butir-butir yang tersusun seperti benang (Santosa, *et al.*, 2005). Mitokondria memiliki dua sistem membran, membran luar dan membran dalam yang luas dan berlipat-lipat, sehingga mitokondria memiliki dua kompartemen, yaitu ruang antar membran dan matriks mitokondria yang diselubungi langsung oleh membran dalam. Lipatan-lipatan pada membran dalam disebut krista. Bagian-bagian mitokondria tersebut ditunjukkan pada Gambar 2.1.

Membran luar mitokondria mengandung protein transport yang disebut porin. Porin membentuk saluran yang ukurannya relatif lebih besar pada lapisan ganda lipid membran luar, sehingga membran luar dapat dianggap sebagai saringan yang memungkinkan masuknya ion maupun molekul kecil berukuran  $\pm 5$  kDa,

termasuk protein berukuran kecil. Protein yang terletak pada membran luar meliputi berbagai enzim yang terlibat dalam biosintesis lipid mitokondria dan enzim-enzim yang mengubah substrat lipid menjadi bentuk lain untuk selanjutnya dimetabolisme di matriks mitokondria.



**Gambar 2.1. Struktur Mitokondria.** Mitokondria merupakan organel berupa kantung yang diselaputi oleh dua membran, yaitu membran luar dan membran dalam (Santosa, *et al.*, 2005).

Ruang antar membran, ruang yang berada di antara membran luar dan membran dalam mitokondria, mengandung sekitar 6% dari total protein mitokondria dan beberapa enzim yang bekerja menggunakan ATP untuk proses fosforilasi nukleotida lain. Sebagian besar (sekitar 67%) protein mitokondria terdapat pada bagian matriks. Pada bagian ini pula terdapat enzim-enzim yang diperlukan untuk proses oksidasi piruvat, asam lemak dan siklus asam trikarboksilat.

## 2.2. Karakteristik DNA Mitokondria Manusia

Mitokondria memiliki DNA sendiri yang karakteristiknya berbeda dengan DNA inti. DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk sirkuler dengan panjang 16.569 pasang basa (pb). Genom mitokondria terdiri atas gen-gen pengkode rRNA 12S dan 16S, 22 tRNA, dan 13 polipeptida yang penting untuk proses enzimatik fosforilasi oksidatif, diantaranya, tujuh subunit untuk kompleks I (NADH dehidrogenase) yang terdiri dari ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 dan ND6, satu subunit untuk kompleks III (sitokrom b), tiga subunit untuk sitokrom oksidasi (COX1,II,III) serta dua subunit untuk ATP sintase (Ni Wayan, *et al.*, 2002). Selain daerah pengkode, mtDNA juga memiliki urutan nukleotida non pengkode yang disebut dengan daerah D-Loop. Secara skematik urutan gen-gen mtDNA manusia tersebut diperlihatkan pada gambar 2.2.

Terdapat tiga karakteristik mtDNA yang membedakannya dari DNA inti. Pertama, mtDNA mempunyai jumlah kopi yang tinggi, meskipun di dalam sel yang tidak mengandung inti. Jumlah kopi mtDNA per sel yaitu sekitar 1000-10.000 sehingga mtDNA dapat digunakan untuk analisis sampel dengan jumlah DNA yang sangat terbatas. Kedua, mtDNA manusia diturunkan secara maternal sehingga setiap individu pada satu garis keturunan ibu akan memiliki urutan nukleotida mtDNA yang identik. Karakteristik mtDNA ini sangat berguna untuk penyelidikan kasus orang hilang atau penentuan identitas seseorang dengan membandingkan mtDNA korban terhadap mtDNA saudaranya yang segaris keturunan ibu.

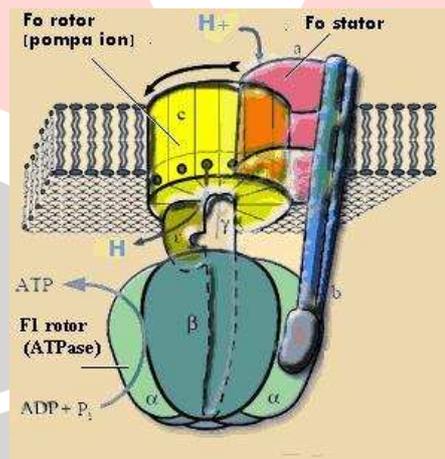


**Gambar 2.2. Organisasi Genom Mitokondria Manusia.** Genom mitokondria (mtDNA) terkemas lebih tertutup daripada genom inti, kecil dan kompak, serta tidak mempunyai intron (Windriyati, R., 2008 ).

Ketiga, mtDNA mempunyai laju polimorfisme yang tinggi dengan laju evolusinya sekitar 5-10 kali lebih cepat dari DNA inti. D-loop merupakan daerah yang mempunyai tingkat polimorfisme tertinggi dalam mtDNA. Oleh karena itu, dalam penentuan identitas seseorang atau studi forensik dapat dilakukan hanya dengan menggunakan daerah D-loop mtDNA saja (Hartati dan Maksum, 2004). Namun, dalam beberapa kasus tidak semua polimorfisme pada daerah ini dapat menunjukkan hubungan antar individu, sehingga perlu dilakukan analisis pada daerah polimorfik lain pada mtDNA yaitu ATPase 6 yang mampu menjadi penguat daya pisah antara individu.

### 2.3. Daerah ATPase 6 mtDNA Manusia

ATPase merupakan enzim yang penting untuk proses enzimatik fosforilasi oksidatif adenosin difosfat (ADP) menjadi adenosin trifosfat (ATP). Enzim ATPase terdiri dari dua bagian besar, yaitu bagian  $F_0$  dan bagian  $F_1$ . Oleh karena itu enzim ini sering juga dituliskan sebagai  $F_0F_1$ -ATPase. Fungsi katalitik ATPase sebagai enzim yang mengkatalisis baik sintesis maupun penguraian ATP di dalam mitokondria terdapat di bagian  $F_1$  (Hertadi, 2004). Pemodelan struktur ATPase ditunjukkan pada Gambar 2.3.



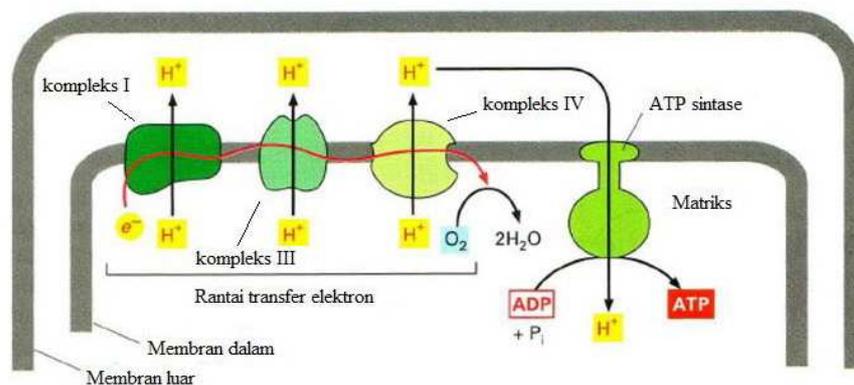
**Gambar 2.3. Model Struktur ATPase.** Setiap bagian besar ini tersusun oleh beberapa subunit, yang memerankan fungsi tertentu. Bagian yang memerankan sifat katalitik adalah bagian kepala dari  $F_1$  (Hertadi, 2004).

Pada bagian  $F_0$  terdapat subunit a yang berperan sebagai stator. Subunit a tersebut dikode oleh gen yang berasal dari genom mitokondria, yaitu ATPase 6. ATPase 6 terletak pada urutan 8527-9207 nukleotida mtDNA. ATPase 6, memiliki peran yang sangat besar bagi pernafasan sel dan sintesis ATP oleh mitokondria. Mutasi, atau replikasi yang tidak normal pada mitokondria dapat

menyebabkan terjadinya disfungsi mitokondria yang mampu menurunkan ekspresi dari ATPase 6 yang dapat menyebabkan penurunan kemampuan fosforilasi oksidatif pada mitokondria.

#### 2.4. Keterkaitan antara ATPase 6 dengan Konsumsi Oksigen dalam Tubuh

Sistem dalam mitokondria yang merangkaikan respirasi dengan produksi ATP sebagai suatu zat antara berenergi tinggi dikenal dengan fosforilasi oksidatif. Produksi ATP melibatkan suatu enzim yang dikenal dengan ATP sintase. Dalam enzim tersebut terdapat bagian yang dikode oleh mtDNA, yaitu ATPase 6 dan ATPase 8. Enzim ini bekerja dengan cara menggunakan energi dari gradien proton yang dihasilkan selama proses transfer elektron. Rangkaian proses transfer elektron ditunjukkan pada Gambar 2.4.

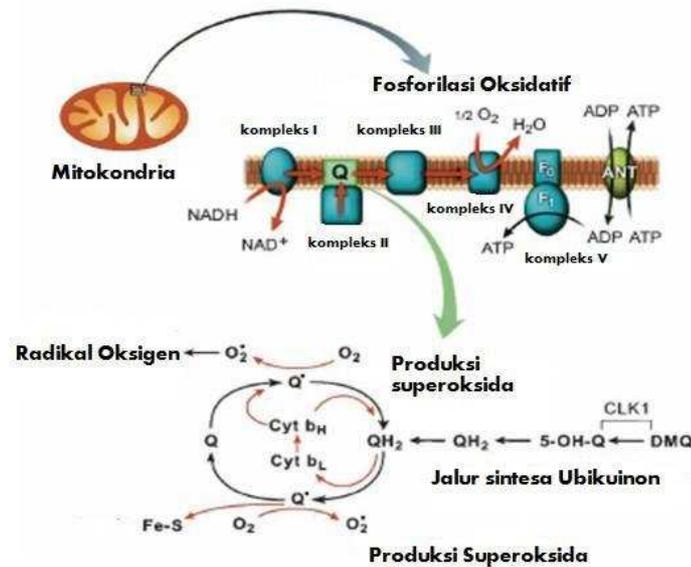


**Gambar 2.4. Rantai Transfer Elektron.** Selama proses transfer elektron, gugus prostetik enzim-enzim yang terlibat berubah-ubah antara keadaan tereduksi dan teroksidasi (Campbell, 2002).

Dalam proses transfer elektron, masing-masing kompleks menerima dan melepaskan elektron. Elektron tersebut pada akhirnya akan ditangkap oleh

oksigen molekuler yang kemudian bereaksi dengan sepasang ion hidrogen untuk membentuk molekul air. Selama proses transfer elektron tersebut, masing-masing kompleks memompa ion hidrogen (proton) dari matriks mitokondria ke dalam ruang antar membran. Dengan demikian terjadi perbedaan konsentrasi proton pada matriks dan ruang antar membran. Gradien proton tersebut dapat menggerakkan proton kembali melintasi membran menuruni gradiennya. Ketika ion hidrogen mengalir menuruni gradiennya, kompleks ATP sintase bekerja untuk memfosforilasi ADP menjadi ATP.

Oleh karena itu, sebagai akseptor elektron, berkurangnya konsumsi oksigen akan berpengaruh terhadap laju ATP sintase, dan juga berpengaruh terhadap level ROS. Rendahnya konsumsi oksigen mengakibatkan meningkatnya level reduksi dari sitokrom B sehingga akan terbentuk ubisemiquinon. Ubisemiquinon tersebut kemudian berinteraksi dengan  $O_2$  dan menghasilkan radikal oksigen (ROS). Tingginya produksi ROS dapat menyebabkan kekacauan sistem metabolik pada mitokondria. Radikal oksigen tersebut dapat menyebabkan terjadinya mutasi pada gen ATPase 6 sehingga menyebabkan mitokondria mengalami defisiensi produksi energi ATP. Pada Gambar 2.5 ditunjukkan proses pembentukan radikal oksigen.



**Gambar 2.5. Reaksi Pembentukan Radikal Oksigen.** Pembentukan radikal bebas terjadi ketika oksigen yang dibutuhkan untuk proses fosforilasi oksidatif tidak mencukupi (Aguilaniu, *et al.*, 2005).

## 2.5. Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis gel agarosa merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan antara lain agarosa. Gel agarosa berfungsi sebagai media pergerakan (*running*) DNA. Elektroforesis gel agarosa dapat dilakukan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20 kb. Set alat elektroforesis DNA dapat dilihat pada Gambar 2.6.

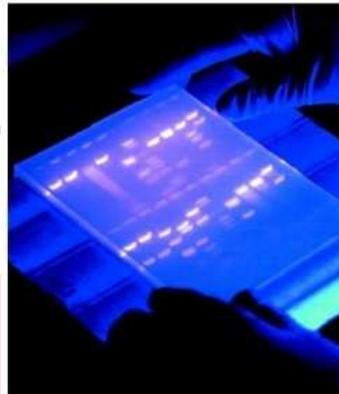


**Gambar 2.6. Elektroforesis Gel Agarosa.** DNA dimasukkan ke dalam sumur agarosa kemudian dilakukan running. DNA akan bergerak dari ujung gel agarosa yang bermuatan negatif ke arah ujung gel yang bermuatan positif. Pergerakan DNA ditentukan oleh ukuran berat molekulnya.

Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anoda). Makin besar ukuran molekulnya, makin lambat laju migrasinya. Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (DNA *marker*) yang telah diketahui ukurannya. Parameter yang dapat mempengaruhi laju migrasi DNA antara lain : ukuran molekul, konsentrasi agarosa, konformasi DNA, serta voltase yang digunakan.

Visualisasi DNA dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel agarosa dalam pembuatannya ditambahkan larutan etidium bromida (EtBr). EtBr dapat terkhelat di antara pasangan-pasangan basa DNA, yang jika disinari dengan radiasi ultraviolet akan memendarkan cahaya. Cara lain untuk melihat visualisasi DNA adalah gel direndam di dalam larutan etidium

bromida sebelum dipaparkan di atas sinar ultraviolet. Gambar 2.7 menunjukkan proses visualisasi DNA dibawah lampu UV.



**Gambar 2.7. Visualisasi DNA.** Agarosa hasil proses running dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 312 nm. Pada panjang gelombang tersebut DNA akan terlihat berpendar.

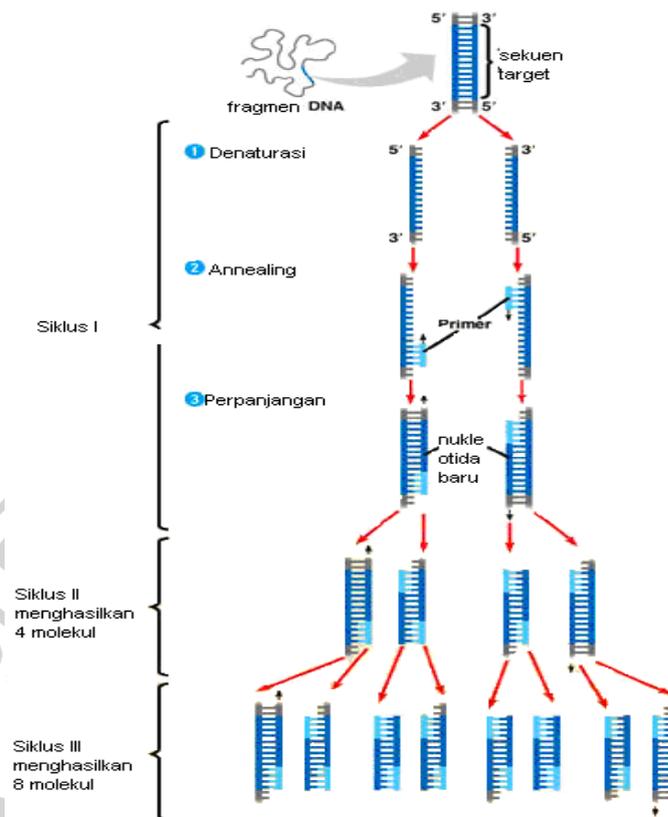
Cara tradisional lain yang biasanya dipakai untuk mengenal DNA adalah dengan pembuatan foto autoradiograf dari DNA yang di tandai dengan radioisotop  $^{32}\text{P}$ . Namun demikian, berbagai cara yang lebih menarik, seperti penggunaan zat kimia berpendar, atau dihubungkan dengan deteksi antibodi–antigen telah dikembangkan.

## 2.6. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR merupakan metode sederhana untuk amplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*. Metode ini dikembangkan pertama kali oleh Kary Mullis, *et al.*, pada tahun 1985 (Dubey, 2006). Metode ini memungkinkan untuk mensintesis fragmen DNA dalam jumlah banyak tanpa melalui kloning. Secara umum metode PCR

melibatkan beberapa komponen, diantaranya adalah templat DNA, primer, buffer PCR, DNA polimerase, dan campuran dNTP (Gumilar, dkk., 2008).

Pada prinsipnya metode PCR terdiri dari tiga tahap reaksi yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan polimerisasi (pemanjangan rantai). Skema proses PCR ditunjukkan pada Gambar 2.8. Denaturasi dilakukan pada suhu 90-95°C, sehingga terjadi pemisahan untai ganda DNA menjadi dua untai tunggal DNA yang menjadi cetakan (*template*) tempat penempelan primer dan tempat kerja DNA polimerase. Proses penempelan primer pada untai DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya, akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu penempelan. Secara umum suhu penempelan ( $T_m$ ) dihitung dengan rumus  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ C$  (Suryanto, 2003).



**Gambar 2.8. Skema Teknik PCR.** 1. Tahap denaturasi, templat DNA untai ganda terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal; 2. Tahap *annealing*, primer akan menempel pada templat di daerah yang spesifik; 3. Tahap perpanjangan, perpanjangan primer mengikuti urutan basa templatnya dengan bantuan enzim DNA polimerase (Sucipto, 2008).

Teknik PCR merupakan penemuan yang penting dalam pemanfaatan teknologi DNA khususnya teknologi DNA rekombinan atau rekayasa genetik. Aplikasi PCR sangat banyak dan menyebar ke berbagai arah sepanjang sampel yang dikerjakan berasal dari bahan atau komponen biologis misalnya manusia, hewan, tumbuhan dan mikroba termasuk virus. PCR dapat digunakan untuk tujuan memperbanyak segmen tertentu dari DNA (atau RNA) suatu bahan dengan menggunakan primer dari bahan lainnya. Teknik PCR telah mampu merevolusi berbagai aspek dalam

riset termasuk diagnosis defek genetik, kelainan metabolik, penyakit bawaan, hingga deteksi keberadaan virus penyebab AIDS pada sel manusia.

## 2.7. Sekuensing DNA

Sekuensing DNA adalah metode penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA. Terdapat dua metode yang dikembangkan untuk pengurutan DNA, yaitu metode pengakhiran rantai dideoksi oleh Sanger-Coulson, dan metode degradasi kimia oleh Maxam-Gilbert. Metode Maxam kurang populer dibandingkan metode Sanger karena memerlukan waktu yang lebih lama. Prinsip dasar penentuan urutan nukleotida DNA dengan metode terminasi dideoksi Sanger adalah terminasi basa spesifik pada saat dilakukan sintesis DNA secara *in vitro* dengan enzim DNA polimerase.

Dalam tekniknya, proses sekuensing ini hampir serupa dengan proses pada PCR, yaitu menggunakan siklus suhu yang berulang (30-40 siklus). Tetapi, pada proses ini ditambahkan suatu basa yang spesifik yang digunakan pada proses terminasi. Basa yang digunakan adalah dideoksinukleotida trifosfat (ddNTP) yang tidak memiliki gugus hidroksil pada karbon 3'-nya. Hilangnya gugus hidroksil ini menyebabkan DNA polimerase tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester dengan dNTP atau ddNTP berikutnya, sehingga terminasi terjadi pada perpanjangan rantai DNA setelah bergabung dengan ddNTP (Rossaria, 2008).