

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas hasil dari tahapan penelitian yang telah dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida daerah ATPase 6 mtDNA manusia populasi dataran rendah Cirebon. Urutan nukleotida yang diperoleh dibandingkan dengan urutan nukleotida pembanding yaitu rCRS (*revised Cambridge Reference Sequence*), sehingga akan terlihat variasi urutan nukleotida dari sampel. Mutasi yang terjadi pada setiap individu sampel dan hanya ditemukan pada populasi dataran rendah Cirebon dapat dijadikan sebagai mutasi spesifik bagi populasi tersebut.

#### 4.1 Data Sampel ATPase 6 mtDNA Manusia

Sampel ATPase 6 mtDNA diambil dan dikumpulkan dari 6 orang yang berasal dari populasi asli dataran rendah Indramayu dan Cirebon. Sampel berupa sel epitel dan rambut yang masih memiliki akar rambut dengan jumlah masing-masing 4 helai untuk setiap orang. Individu sampel dipastikan merupakan penduduk asli daerah dataran rendah yang sudah tinggal selama lebih dari 10 tahun. Karakteristik masing-masing sampel secara rinci ditunjukkan oleh Tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Data Individu Sampel mtDNA Manusia Populasi Dataran Rendah.**

Sampel yang dianalisis berjumlah enam sampel dan merupakan penduduk asli dataran rendah.

Kode	Jenis Kelamin	Umur (th)	Jenis Sampel	Daerah
DR-001	P	55	epitel	Indramayu
DR-002	L	19	epitel	Indramayu
DR-005	L	60	rambut	Indramayu
DR-014	P	45	rambut	Cirebon
DR-016	P	22	rambut	Cirebon
DR-018	P	30	rambut	Cirebon

Sampel rambut dipilih karena akar rambut memiliki aktifitas metabolisme yang tinggi dan diperkirakan memiliki jumlah mtDNA yang banyak dalam setiap sel, sehingga mtDNA yang diambil akan banyak walaupun dari akar rambut yang sedikit (Rossaria, 2008). Tetapi, ada beberapa sampel yang diambil berupa sel epitel mulut. Sampel yang telah diambil baik berupa sel epitel maupun rambut, dikumpulkan dan disimpan pada plastik obat steril dan diberi label. Sampel disimpan pada lemari pendingin dengan temperatur 4<sup>0</sup>C agar kondisi sampel tidak rusak oleh enzim-enzim yang dapat mendegradasi DNA karena pada suhu tersebut enzim menjadi tidak aktif.

#### 4.2 Hasil Preparasi Proses Lisis mtDNA Manusia Daerah ATPase 6

Hasil dari proses lisis berupa templat mtDNA yang merupakan mtDNA awal bagi proses selanjutnya. Jumlah mtDNA hasil lisis diperkirakan berjumlah sedikit sehingga harus diperbanyak dengan proses PCR. Templat mtDNA ini merupakan templat untuk reaksi PCR. Dari beberapa tahapan lisis, templat mtDNA ini merupakan supernatan dari campuran larutan komponen lisis yang

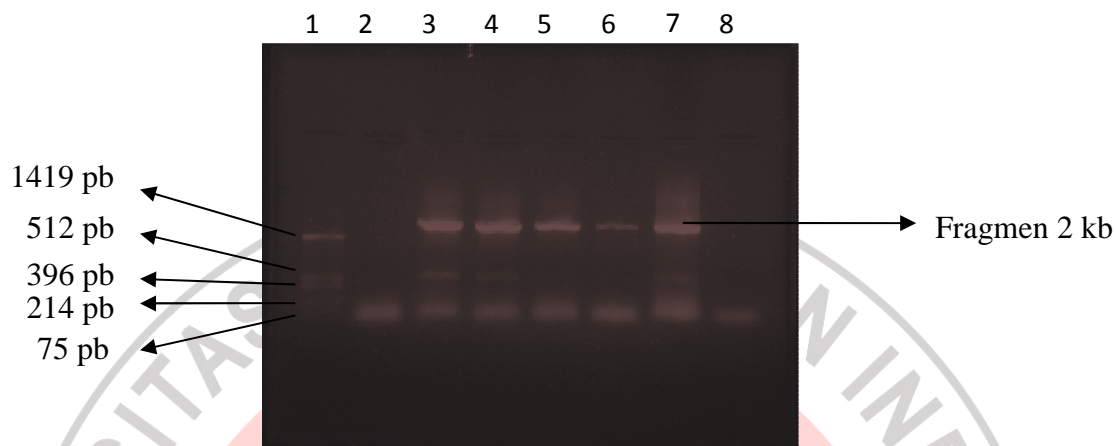
telah disentrifugasi. Komponen yang memiliki berat molekul besar dalam sel seperti organel, dinding sel, dan bagian lain akan mengendap sebagai debris sel sedangkan molekul mtDNA akan terdapat dalam bagian supernatan.

#### 4.3 Amplikon mtDNA Manusia Daerah ATPase 6

Amplikon mtDNA pada penelitian ini merupakan hasil amplifikasi dengan proses PCR, yang berukuran sekitar 2 kb menggunakan primer Efor dan Erev. Amplikon dari proses PCR divisualisasi dengan paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu dilakukan elektroforesis gel agarosa. Dengan metode ini maka dapat diketahui ukuran fragmen hasil PCR yang didapatkan. Penentuan ukuran pita mtDNA hasil PCR dilakukan dengan membandingkan pita hasil PCR dengan pita standar pUC19/*Hinf*I yang memiliki enam pita, masing-masing berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, 75 pb, dan 65 pb. Visualisasi dari salah satu amplikon dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Pada Gambar 4.1., sumur pertama memperlihatkan adanya pita *marker* yang terpisah sesuai dengan jumlah pasang basanya. Pita sampel terlihat pada posisi di atas pita pertama *marker* yang menunjukkan adanya suatu fragmen berukuran  $\pm 2$  kb. Pita-pita tersebut menunjukkan bahwa proses amplifikasi daerah ATPase berhasil dilakukan. Hal ini diperkuat dengan munculnya pita pada kontrol positif berukuran 2 kb dan tidak terdapatnya pita pada kontrol negatif. Munculnya pita pada kontrol positif PCR juga menunjukkan bahwa proses lisis berhasil, karena kontrol positif ini merupakan sampel yang pernah berhasil dilisis dan diamplifikasi sebelumnya. Pita kontrol negatif yang tidak muncul

menunjukkan bahwa mtDNA yang diamplifikasi adalah mtDNA yang diinginkan, bukan kontaminan.



**Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis Fragmen ATPase 6 Sampel mtDNA Manusia.** Sumur 1 adalah pUC19/*Hinf*I yang digunakan sebagai marker, sumur 2 adalah sampel yang tidak menunjukkan pita, sumur 3-6 adalah sampel mtDNA ATPase 6 populasi dataran rendah yang berlabel DR1, DR2, DR5, DR14. Sumur 7 adalah kontrol positif dan sumur 8 adalah kontrol negatif yang tidak memperlihatkan pita.

Pita-pita yang terdapat baik di bawah pita sampel, pita kontrol positif dan pada kontrol negatif bukanlah kontaminan, melainkan *smear* yang terjadi karena jumlah templat yang terlalu banyak pada proses re-PCR sampel dan merupakan sisa primer yang tidak dipakai oleh templat mtDNA. Re-PCR dilakukan karena pada proses PCR tidak didapatkan amplikon mtDNA. Pada proses PCR tidak didapatkan sejumlah DNA yang dapat divisualisasi sehingga dilakukan proses re-PCR.

#### **4.4 Urutan Nukleotida mtDNA Daerah ATPase 6 Populasi Dataran Rendah**

Hasil sekuensing berupa elektroforegram urutan nukleotida mtDNA sampel diperoleh dalam format file ab1, pdf, teks dokumen, dan phd.1. Salah satu elektroforegram individu sampel (DR-001) ditunjukkan pada Gambar 4.2, sedangkan elektroforegram keseluruhan sampel terdapat dalam lampiran.

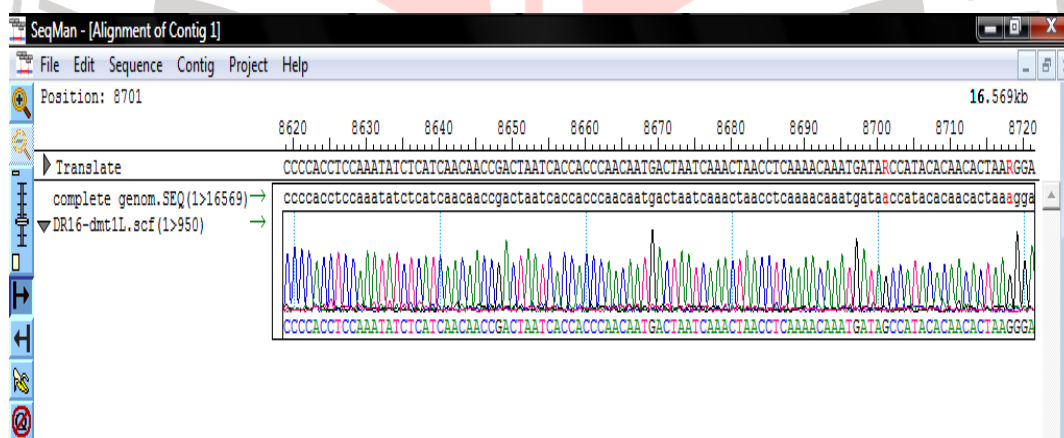
Pada elektroforegram ditunjukkan puncak-puncak dengan warna yang berbeda sesuai dengan jenis basa. Puncak berwarna hijau menunjukkan puncak basa adenin (A), puncak berwarna biru menunjukkan puncak basa sitosin (C), puncak berwarna merah menunjukkan puncak basa timin (T) dan puncak berwarna hitam menunjukkan puncak basa guanin (G). Selain keempat notasi diatas (A, C, T, G), terdapat juga notasi N yang berarti bahwa terdapat puncak yang tidak jelas yang disebabkan bertumpuknya beberapa puncak basa pada satu posisi atau terlalu rendahnya puncak yang dihasilkan dari nukleotida tersebut, sehingga tidak terbaca oleh mesin pada saat proses sekuensing. Notasi N dapat diperbaiki secara manual dengan mengamati puncak dan mengganti dengan notasi yang sesuai, dengan syarat puncak yang diamati dapat dibedakan secara jelas antara basa yang satu dengan basa yang lain (Lestari, 2008).





#### 4.5 Variasi mutasi mtDNA Daerah ATPase 6 Manusia Populasi Dataran Rendah

Variasi mutasi mtDNA daerah ATPase 6 yang khas dari populasi dataran rendah dapat diketahui dengan membandingkan urutan nukleotida mtDNA individu sampel terhadap urutan nukleotida standar (rCRS). Dengan menggunakan program Seqman versi 4 dari DNASTar, dapat diketahui perbedaan yang terjadi pada urutan nukleotida individu sampel. Perbedaan urutan nukleotida sampel dengan nukleotida standar menunjukkan adanya mutasi pada sampel. Contoh nukleotida yang mengalami mutasi ditunjukkan dengan huruf berwarna merah pada elektroforegram seperti terlihat pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3. Tampilan Program Seqman DNASTar Versi 4.** Huruf berwarna merah pada *complete genom* menunjukkan adanya mutasi substitusi transisi A→G pada sampel DR-016 di posisi 8701.

Berdasarkan gambar tersebut terlihat adanya mutasi substitusi transisi basa adenin menjadi guanin pada posisi 8701 (A8701G). Dengan cara yang sama seperti Gambar 4.4, dilakukan perbandingan urutan nukleotida setiap sampel terhadap

urutan nukleotida rCRS. Dari analisis tersebut dapat diketahui jenis, posisi, dan jumlah mutasi yang terjadi.

Hasil perbandingan seluruh urutan nukleotida sampel dari DR-001 hingga DR-018 terhadap urutan nukleotida rCRS menunjukkan adanya dua mutasi yang terjadi pada semua sampel. Salah satu contoh hasil perbandingan urutan nukleotida sampel DR-001 dengan standar rCRS dapat dilihat pada Gambar 4.4. Kedua mutasi tersebut antara lain, transisi basa A menjadi basa G pada posisi 8701 (A8701G) dan 8860 (A8860G). Pada sampel DR-016 terdapat satu mutasi substitusi transisi tambahan yaitu pada posisi 8718 (A8718G). Daftar mutasi seluruh sampel dapat dilihat secara lengkap pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Daftar Mutasi Sampel.** Jumlah mutasi terbanyak pada keenam individu sampel yang dianalisis adalah tiga mutasi sedangkan jumlah terkecil adalah dua mutasi

No	Kode Sampel						
	Posisi	DR 001	DR 002	DR 005	DR 014	DR 016	DR 018
1	8701	A→G	A→G	A→G	A→G	A→G	A→G
2	8718					A→G	
3	8860	A→G	A→G	A→G	A→G	A→G	A→G
	Jumlah Mutasi	2	2	2	2	3	2

Mutasi yang terjadi pada semua sampel adalah mutasi substitusi transisi. Mutasi substitusi transisi seringkali terjadi dan disebabkan karena keduanya merupakan nukleotida dengan basa nitrogen yang memiliki kemiripan struktur.



8527	ATGAACGAAA ATGAACGAAA	ATCTGTTCGC ATCTGTTCGC	TTCATTCATT TTCATTCATT	GCCCCACAA GCCCCACAA	rCRS DR-001
8567	TCCTAGGCCT TCCTAGGCCT	ACCCGCCGCA ACCCGCCGCA	GTA CTGATCA GTA CTGATCA	TTCTATTTC TTCTATTTC	rCRS DR-001
8607	CCCTCTATTG CCCTCTATTG	ATCCCCACCT ATCCCCACCT	CCAAATATCT CCAAATATCT	CATCAACAAC CATCAACAAC	rCRS DR-001
8647	CGACTAATCA CGACTAATCA	CCACCCAACA CCACCCAACA	ATGACTAATC ATGACTAATC	AAACTAACCT AAACTAACCT	rCRS DR-001
8687	CAAAACAAAT CAAAACAAAT	GATA <sup>A</sup> CCATA GATA <sup>G</sup> CCATA	CACAACACTA CACAACACTA	AAGGACGAAC AAGGACGAAC	rCRS DR-001
8727	CTGATCTCTT CTGATCTCTT	ATACTAGTAT ATACTAGTAT	CCTTAATCAT CCTTAATCAT	TTTTATTGCC TTTTATTGCC	rCRS DR-001
8767	ACAAC TAACC ACAAC TAACC	TCCTCGGACT TCCTCGGACT	CCTGCCTCAC CCTGCCTCAC	TCATTACAC TCATTACAC	CRS DR-001
8807	CAACCACCCA CAACCACCCA	ACTATCTATA ACTATCTATA	AACCTAGCCA AACCTAGCCA	GGCCATCCC GGCCATCCC	rCRS DR-001
8847	CTTATGAGCG CTTATGAGCG	GGC <sup>A</sup> CAGTGA GGC <sup>G</sup> CAGTGA	TTATAGGCTT TTATAGGCTT	TCGCTCTAAG TCGCTCTAAG	rCRS DR-001
8887	ATTAAAAATG ATTAAAAATG	CCCTAGCCCA CCCTAGCCCA	CTTCTTACCA CTTCTTACCA	CAAGGCACAC CAAGGCACAC	rCRS DR-001
8927	CTACACCCCT CTACACCCCT	TATCCCCATA TATCCCCATA	CTAGTTATTA CTAGTTATTA	TCGAAACCAT TCGAAACCAT	rCRS DR-001
8967	CAGCCTACTC CAGCCTACTC	ATTCAACCAA ATTCAACCAA	TAGCCCTGGC TAGCCCTGGC	CGTACGCCTA CGTACGCCTA	rCRS DR-001
9007	ACCGCTAACA ACCGCTAACA	T TACTGCAGG T TACTGCAGG	CCACCTACTC CCACCTACTC	ATGCACCTAA ATGCACCTAA	rCRS DR-001
9047	TTGGAAGCGC TTGGAAGCGC	CACCCTAGCA CACCCTAGCA	ATATCAACCA ATATCAACCA	TTAACCTTCC TTAACCTTCC	rCRS DR-001
9087	CTCTACACTT CTCTACACTT	ATCATCTTCA ATCATCTTCA	CAATTCTAAT CAATTCTAAT	TCTACTGACT TCTACTGACT	rCRS DR-001
9127	ATCCTAGAAA ATCCTAGAAA	TCGCTGTCGC TCGCTGTCGC	CTTAATCCAA CTTAATCCAA	GCCTACGTTT GCCTACGTTT	rCRS DR-001
9167	TCACACTTCT TCACACTTCT	AGTAAGCCTC AGTAAGCCTC	TACCTGCACG TACCTGCACG	ACAACACATA ACAACACATA	rCRS DR-001
9207	A A				rCRS DR-001

**Gambar 4.4. Perbandingan Urutan Nukleotida Sampel DR-001 dengan Standar rCRS.** Dua mutasi terhadap urutan rCRS ditunjukkan dengan warna merah.

Dari seluruh mutasi yang terjadi pada sampel, terdapat 3 variasi mutasi dan hanya dua variasi mutasi yang umum terdapat pada seluruh sampel, yaitu mutasi A8701G dan A8860G. Mutasi umum merupakan mutasi yang sering ditemukan pada setiap sampel. Namun mutasi umum ini tidak dapat dijadikan mutasi yang spesifik pada populasi dataran rendah Cirebon karena mutasi ini juga muncul pada populasi dataran tinggi Kuningan (Ariningtyas, komunikasi personal). Begitu juga mutasi A8718G tidak dapat dijadikan mutasi spesifik pada populasi dataran rendah karena mutasi tersebut hanya muncul pada satu sampel, dan tidak ditemukan pada kelima sampel lainnya.

Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa daerah ATPase 6 populasi dataran tinggi memiliki variasi mutasi lebih banyak dibandingkan variasi mutasi daerah ATPase 6 populasi dataran rendah. Pada sampel yang berasal dari dataran rendah hanya terdapat 3 variasi mutasi dari 6 sampel, sedangkan pada sampel yang berasal dari dataran tinggi terdapat 6 variasi mutasi dari 7 sampel (Ariningtyas, komunikasi personal). Hal tersebut sesuai dengan teori yang dikemukakan bahwa pada daerah dataran tinggi dimana jumlah oksigennya relatif sedikit akan memicu peningkatan level ROS. Keberadaan ROS dalam jumlah banyak dapat merusak mtDNA dan menyebabkan terjadinya mutasi.

#### **4.6 Perbandingan Mutasi Sampel dengan Data Mitomap**

Perbandingan data mutasi hasil penelitian dengan *database* mitomap dilakukan untuk mengetahui apakah mutasi yang terjadi pada sampel tersebut merupakan mutasi yang baru ditemukan atau telah dipublikasikan sebelumnya.

Dengan mencocokkan data mutasi sampel dengan data mitomap diketahui bahwa tiga mutasi yang terdapat pada sampel telah dilaporkan dan dipublikasikan dalam mitomap. Perbandingan mutasi sampel dengan *database* mitomap dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Mutasi A8860G ditemukan hampir di semua daerah ATPase 6 mtDNA manusia dengan frekuensi kemunculannya 100% ([www.argusbio.com](http://www.argusbio.com)). Dapat dikatakan bahwa mutasi A8860G merupakan mutasi khas daerah ATPase 6 karena frekuensi kemunculannya yang tinggi. Mutasi tersebut merubah urutan asam amino pada kodon 112 (ACA→AGA). Mutasi A8701G diketahui memiliki frekuensi kemunculan sebesar 72,5% (Murakami, *et al.*, 2006). Mutasi A8701G terjadi pada posisi pertama dari kodon 59 (ACC→GCC). Kedua mutasi di atas (A8860G dan A8701G) mengubah jenis asam amino treonin menjadi alanin. Perubahan tersebut diduga mengakibatkan berubahnya struktur dari gen ATPase 6 dikarenakan perbedaan struktur antara treonin dan alanin, treonin mengandung gugus samping yang bersifat polar sedangkan alanin mengandung gugus samping yang bersifat non polar.

Berbeda dengan mutasi sebelumnya, mutasi yang terjadi pada posisi 8718 A→G merupakan mutasi *silent*, artinya mutasi tersebut tidak merubah jenis asam amino. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, frekuensi munculnya mutasi ini sangat rendah, terlihat dari enam sampel yang dianalisis, mutasi A8718G hanya muncul pada satu sampel yaitu sampel DR-016.

Search for:

### MITOMAP: MtDNA Coding Region Sequence Polymorphisms

*Last edited Oct 12, 2009*

Some reported polymorphisms have now been shown to be due to errors or rare polymorphisms in the original Cambridge sequence. See [footnotes](#).

Nucleotide Position	Locus	Nucleotide Change	Amino Acid Change	References
8701	MT-ATP6	A-G	T-A	<a href="#">references</a>
8703	MT-ATP6	C-T	syn	<a href="#">references</a>
8705	MT-ATP6	T-C	M-T	<a href="#">references</a>
8707	MT-ATP6	C-T	H-Y	<a href="#">references</a>
8709	MT-ATP6	C-T	syn	<a href="#">references</a>
8711	MT-ATP6	A-G	N-S	<a href="#">references</a>
8718	MT-ATP6	A-G	syn	<a href="#">references</a>
8857	MT-ATP6	G-A	G-S	<a href="#">references</a>
8859	MT-ATP6	C-T	syn	<a href="#">references</a>
8860	MT-ATP6	A-A	rCRS rare pm	<a href="#">references</a>
8860	MT-ATP6	A-G	T-A(consensus)	<a href="#">references</a>
8865	MT-ATP6	G-A	syn	<a href="#">references</a>

**Gambar 4.5. Tampilan database Mitomap.** Ketiga mutasi yang terdapat pada sampel telah dipublikasikan oleh peneliti lain. Hal ini dapat diketahui dengan mencocokkan antara mutasi sampel dengan data mitomap. Huruf yang dicetak biru merupakan mutasi yang terjadi pada sampel. (<http://www.mitomap.org>, 2009).

Begitu juga pada sampel yang berasal dari dataran tinggi, dari 7 sampel yang dianalisis, hanya 1 sampel yang memiliki mutasi pada posisi 8718 (Ariningtyas, komunikasi personal).