

IMAN PERMANA MAKSUM

# PATOGENETIKA, INVESTIGASI & TERAPI PENYAKIT MITOKONDRIA



# PATOGENETIKA, INVESTIGASI & TERAPI PENYAKIT MITOKONDRIA

oleh:

Iman Permana Maksum

©2018

Editor: Auliya Millatina Fajwah

Desainer Sampul: Dindin Rasdi

Layouter: Afandi

Diterbitkan oleh

**BITREAD Publishing**

PT Lontar Digital Asia

Surel: [info@bitread.co.id](mailto:info@bitread.co.id)

Facebook: BitreadID

Twitter: BITREAD\_ID

Android Digital Books: BitRead

[www.bitread.co.id](http://www.bitread.co.id)

Anggota IKAPI

Cetakan pertama, Agustus 2018

ISBN: 978-602-5877-56-8

Hak Cipta dilindungi oleh Undang-Undang.  
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau  
seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# KATA PENGANTAR

**P**uji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. karena berkat rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan penyusunan buku ini. Buku ini ditulis berdasarkan hasil penelitian dan studi pustaka penulis mengenai “Patogenetika, Investigasi, dan Terapi Penyakit Mitokondria”, dengan harapan menjadi sumbangan ilmiah, khususnya bagi penelitian dan perkembangan ilmu pengetahuan di bidang biologi molekul. Tema ini penting untuk diangkat karena masih kurangnya informasi penyakit mitokondria di Indonesia, serta belum adanya manajemen investigasi penyakit mitokondria di rumah sakit. Padahal informasi ini sangat penting untuk penerapan diagnostik tingkat molekul sejak dini sehingga dapat dilakukan pencegahan dan cara pengobatan yang tepat. Buku ini merupakan revisi dari buku *PCR dalam Investigasi Penyakit Mitokondria* tahun 2017.

Penulisan buku ini didanai oleh Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2018, No. 1127/UN6.D/LT/2018. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi.

Pada kesempatan ini juga, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada seluruh pihak yang telah membantu penyelesaian buku ini, khususnya kepada Prof. Dr. O. Suprijana, M.Sc., Achmad Saifuddin Noer, Ph.D. (Alm.), Prof. Dr. Gantira

Natadisastra, dr., Sp.M., Dr. Eng. Sukma Nuswantara, M.Phil. Istriku, Susi Kusmawati, dan anakku, Zahra, Farris, dan Narendra sebagai motivator penulis selama menyelesaikan buku ini. Seluruh pasien bagian endokrinologi RSCM dan RS mata Cicendo yang telah bersedia menjadi subjek penelitian. Maryantoro Oemardi, dr., Sp.P.D-KEMD selaku koordinator penelitian Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI-RSCM, Diah dr., Sp.P.D-KEMD., dan Andrew dr., Sp.M., yang telah banyak membantu dalam dalam penelitian. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu penggerjaan penelitian dan penulisan buku ini. Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis, dibalas oleh Allah Swt.

Penulis menyadari bahwa penulisan buku ini masih belum sempurna, mengingat perkembangan informasi dan ilmu pengetahuan yang sangat pesat. Oleh karena itu, setiap informasi dan masukan mengenai buku ini akan sangat penulis hargai sebagai bahan perbaikan.

Bandung, Agustus 2018

Penulis

# DAFTAR ISI

iii	<b>Kata Pengantar</b>
1	<b>BAB I</b> ASPEK UMUM DAN FUNGSI MITOKONDRIA
13	<b>BAB II</b> KARAKTERISTIK GENOM MITOKONDRIA MANUSIA
23	<b>BAB III</b> PENYAKIT MITOKONDRIA DAN TAMPAKAN KLINIS
59	<b>BAB IV</b> PERANAN MUTASI DNA MITOKONDRIA PADA PENYAKIT MITOKONDRIA
67	<b>BAB V</b> PATOGENETIKA PENYAKIT MITOKONDRIA
81	<b>BAB VI</b> INVESTIGASI PENYAKIT MITOKONDRIA
109	<b>BAB VII</b> PERKEMBANGAN TERAPI PENYAKIT MITOKONDRIA
135	<b>DAFTAR PUSTAKA</b>
149	<b>GLOSARIUM</b>
160	<b>INDEKS</b>
163	<b>PROFIL PENULIS</b>
164	<b>TENTANG BITREAD</b>

Buku ini tidak diperjualbelikan.



Buku ini tidak diperjualbelikan.





# **BAB I**

## **ASPEK UMUM DAN FUNGSI MITOKONDRIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“

Mitokondria merupakan suatu organel sitoplasma tempat terjadinya proses respirasi (metabolisme aerobik) dalam sel eukariot.

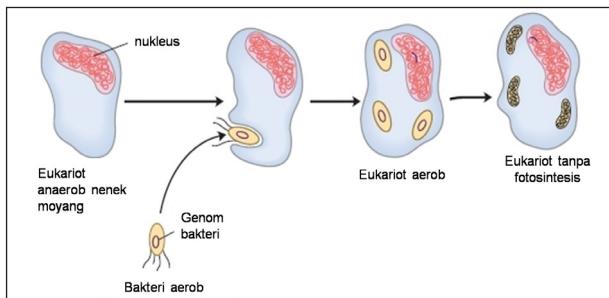
”

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# ASPEK UMUM MITOKONDRIA

**M**itokondria merupakan suatu organel sitoplasma tempat terjadinya proses respirasi (metabolisme aerobik) dalam sel eukariot.

Menurut hipotesis (Gambar 1.1), mitokondria berasal dari sel bakteri aerobik primitif yang masuk dan kemudian bersimbiosis dengan sel eukariot anaerobik primitif sekitar satu setengah miliar tahun yang lalu. Karena memiliki mitokondria, sel eukariot anaerobik tersebut berubah menjadi eukariot aerobik tanpa fotosintesis. Manusia dan hewan termasuk contoh organisme yang masuk ke kelompok ini. Selain itu, jika sianobakteri mengalami endosimbiosis ke beberapa eukariot aerobik, maka akan menjadi plastida atau kloroplas, sehingga akan membentuk eukariot fotosintetik, seperti alga hijau dan tanaman. Bakteri aerobik membawa genomnya ke eukariot anaerobik dan menjadi bagian genetik eukariot aerobik di luar DNA inti (kromosom), yaitu DNA mitokondria.



**Gambar 1.1.** Evolusi eukariot melalui endosimbiosis. Eukariot anaerobik mengalami endosimbiosis dengan bakteri yang memiliki kapasitas katabolisme aerobik (*purple bacteria*), yang selanjutnya mengalami perubahan menjadi mitokondria (Nelson & Cox, 2008).

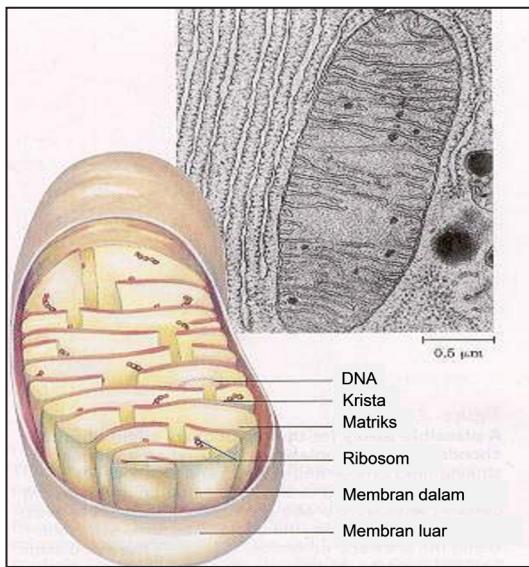
Ada beberapa bukti yang menjelaskan bahwa mitokondria mirip dengan bakteri, dan mendukung hipotesis di atas. Pertama,

mitokondria menyerupai bakteri dalam bentuk dan ukuran pada umumnya, yakni berbentuk elips dengan diameter  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  dan panjang  $\sim 1\mu\text{m}$ . Kedua, mitokondria mempunyai sistem genetik yang unik (berbeda dengan sistem genetik inti) yang berpartisipasi dalam sintesis beberapa protein yang dibutuhkannya. DNA mitokondria mirip dengan DNA sel prokariot (plasmid), yaitu bentuk sirkular dengan molekul rantai ganda. Sebagai tambahan, ribosom yang terdapat pada mitokondria, yaitu ribosom tipe 70S mirip dengan ribosom sel bakteri sedangkan ribosom yang terdapat pada sel eukariot adalah tipe 80S. Ketiga, untuk memperbanyak diri, mitokondria dapat membelah secara biner. Selain itu, proses respirasi yang berlangsung di dalam mitokondria sangat mirip dengan yang terjadi pada bakteri aerobik.

Mitokondria mempunyai fungsi utama, yaitu sebagai penghasil energi kimia dalam bentuk ATP (Adenosintrifosfat).

Sebagai organel penghasil energi, mitokondria banyak ditemukan pada sel-sel atau jaringan yang memiliki aktivitas metabolism tertinggi atau pada daerah yang memerlukan ATP dalam jumlah banyak, seperti pada bagian ekor sel sperma, sel epitel yang aktif membelah pada jaringan epidermis kulit, sel otot jantung, serta sel epitelium dan superfisial kortikal lensa mata. Banyaknya mitokondria per sel bergantung pada jenis organisme dan jenis sel atau jaringan. Pada sel hati tikus terdapat 1.000 mitokondria per sel, sedangkan pada sel telur katak terdapat  $10^7$  mitokondria per sel.

Struktur mitokondria terdiri atas empat sub bagian, yaitu membran luar, ruang antarmembran, membran dalam, dan matriks seperti ditunjukkan pada Gambar 1.2. Membran luar berfungsi untuk membatasi mitokondria dari sitoplasma sel, sedangkan membran dalam yang terdiri atas lipatan-lipatan ke dalam matriks (krista) yang berperan sebagai tempat terjadinya proses fosforilasi oksidatif. Ruang bagian dalam mitokondria berupa matriks semi-cair yang mengandung kurang dari 50% air. Pada matriks inilah ditemukannya beberapa salinan DNA, RNA, ribosom, perangkat sintesis protein, dan berbagai enzim yang berperan pada proses oksidasi asam lemak, piruvat, dan siklus asam sitrat.



**Gambar 1.2.** Struktur mitokondria (Cooper, 2000).

# FUNGSI MITOKONDRIA

## Fungsi Utama Mitokondria



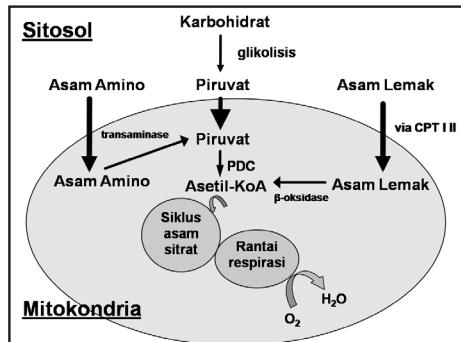
Mitokondria mempunyai fungsi utama sebagai penghasil energi kimia dalam bentuk ATP. Di dalam mitokondria terjadi oksidasi piruvat dari jalur glikolisis, beta oksidasi asam lemak dan badan keton, oksidasi asam amino, dan selanjutnya masuk ke siklus asam sitrat sebagai asetil-KoA. Energi dihasilkan melalui oksidasi (transfer elektron) dan gradien elektrokimia (Mathews & Van Holde, 2000).



Fungsi metabolisme penting lainnya pada mitokondria adalah terlibat dalam fungsi selular lain, seperti  $\text{Ca}^{2+}$  haemostatis, sintesis Fe/S, dan apoptosis (Lehtinen, 2001). Perubahan struktur dan fungsi mitokondria dapat menyebabkan atau berkaitan dengan faktor penuaan, seperti ditunjukkan pada **Bab III Gambar 3.3** (McFadden, 2005).

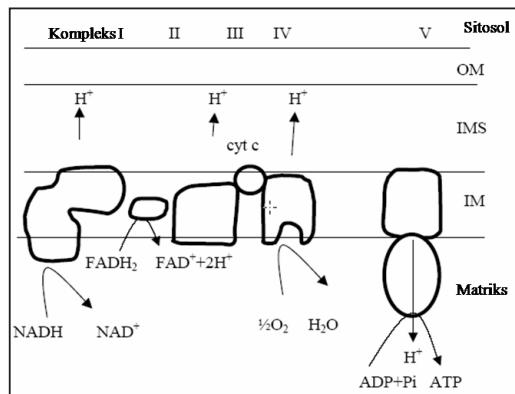
Fungsi mitokondria dapat dijelaskan pada Gambar 1.3. Molekul nutrien utama (protein, lemak, polisakarida) dipecah menjadi molekul kecil (*building block*) melalui proses pencernaan (*digestion*). *Building block* (asam amino, asam lemak, monosakarida) dikonversi menjadi asetil-KoA. Khusus pada karbohidrat harus melalui jalur glikolisis di sitosol untuk membentuk piruvat. Selanjutnya, piruvat mengalami translokasi ke mitokondria dan diubah menjadi asetil-KoA oleh kompleks enzim piruvat dehidrogenase. Gugus asetil dari asetil-KoA masuk ke dalam siklus asam sitrat dan dioksidasi menjadi  $\text{CO}_2$ ; atom hidrogen yang kaya energi ditransfer ke  $\text{NAD}^+$  dan  $\text{FAD}^+$  (menjadi  $\text{NADH}$  dan  $\text{FADH}_2$ ). Sejumlah energi (ATP) dilepas

ketika NADH dan  $\text{FADH}_2$  dioksidasi melalui sistem transfer elektron (rantai pernapasan/respirasi).



**Gambar 1.3.** Fungsi mitokondria (McFadden, 2005).

Protein yang terlibat di dalam respirasi sel dan sintesis ATP disebut kompleks protein respirasi, yang berada di dalam membran bagian dalam. Kompleks protein tersebut terdiri atas lima kompleks, yaitu Kompleks I (NADH-ubiquinon oksireduktase), Kompleks II (suksinat dehidrogenase), Kompleks III (sitokrom  $\text{bc}_1$ ), Kompleks IV (Sitokrom c oksidase), dan Kompleks V (ATP sintase). Adapun gambaran mekanisme kompleks protein respirasi dapat dilihat pada Gambar 1.4.



**Gambar 1.4.** Mekanisme kompleks protein (Lehtinen, 2001).

### Keterangan:

Kompleks I (NADH-ubiquinon oksireduktase)	Penerima elektron dari NADH yang memiliki 42 subunit (7 dikode oleh mtDNA)
Kompleks II (suksinat dehidrogenase)	Kompleks terkecil dan paling sederhana (dikode di DNA inti)
Kompleks III (sitokrom bc1)	Memiliki 11 subunit (hanya 1 yang dikode oleh mtDNA)
Kompleks IV (Sitokrom c oksidase)	Terminal akseptor elektron (3 dikode oleh mtDNA)
Kompleks V (ATP sintase)	Pompa proton dan sintesis ATP dari ADP dan fosfat anorganik (2 dikode oleh mtDNA).

## Fosforilasi Oksidatif: Reaksi Transfer Elektron dan Sintesis ATP

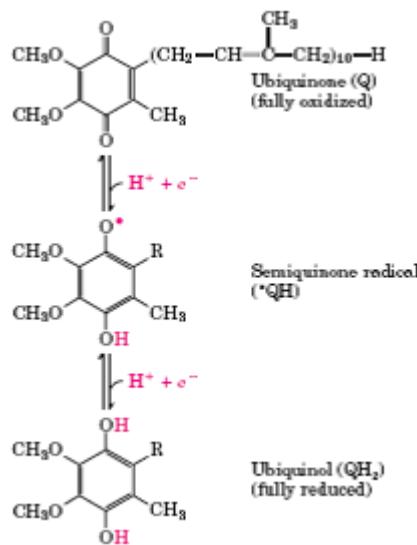
Fosforilasi oksidatif adalah puncak dari energi metabolisme dalam organisme aerobik. Semua langkah dalam degradasi oksidatif karbohidrat, lemak, dan asam amino datang bersama-sama dalam tahap akhir pada respirasi selular.

Pada eukariot, fosforilasi oksidatif terjadi di mitokondria yang melibatkan reduksi  $O_2$  menjadi  $H_2O$  dengan elektron yang disumbangkan dari NADH dan  $FADH_2$ .

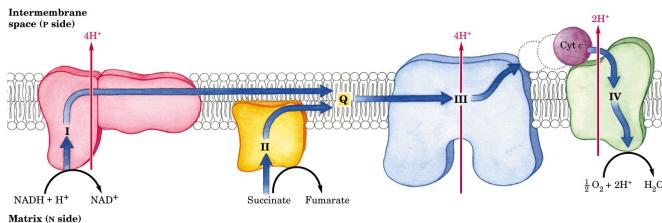
Fosforilasi oksidatif dimulai dengan masuknya elektron dalam rantai pernapasan. Sebagian besar elektron ini berasal dari jalur katabolik dehidrogenase melalui akseptor elektron universal, seperti nikotinamida nukleotida (NAD atau NADP) atau flavin nukleotida (FMN atau FAD). Selanjutnya, elektron akan ditransfer melalui serangkaian pembawa elektron yang terikat di membran

mitokondria. Proses tersebut disebut reaksi transfer elektron. Pada umumnya, pembawa elektron ini merupakan protein integral dengan gugus prostetik yang dapat menerima dan memberikan satu atau dua elektron. Tiga tipe transfer elektron yang terjadi di dalam fosforilasi oksidatif adalah (1) transfer elektron secara langsung, sebagai reduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ ; (2) transfer atom hidrogen ( $\text{H}^+ + \text{e}^-$ ); dan (3) transfer ion hidrida ( $:\text{H}^-$ ).

Selain NAD dan flavoproteins, tiga tipe lain fungsi molekul pembawa elektron dalam rantai respirasi: kuion hidrofobik (ubikuinon) dan dua tipe protein yang mengandung besi (sitokrom dan protein besi sulfur). Ubikuinon (disebut juga coenzyme Q, atau Q) merupakan benzokuinon yang larut dalam lipid dengan rantai samping isoprenoid yang panjang (Gambar 1.5).



**Gambar 1.5.** Ubikuinon (Q, atau koenzim Q), reduksi sempurna ubikuinon memerlukan dua electron dan dua proton, dan terjadi dalam dua tahap melalui intermediet radikal semikuinon (Nelson & Cox, 2008).

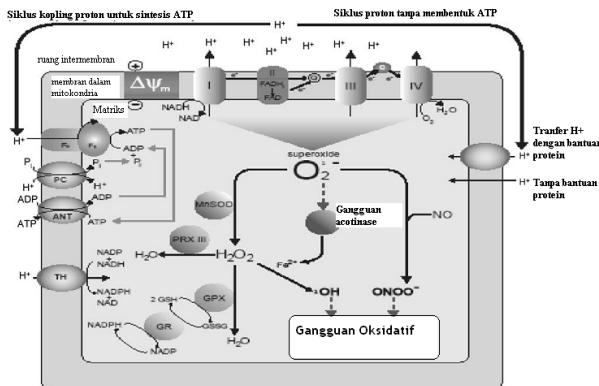


Gambar 1.6. Reaksi transfer elektron (Nelson & Cox, 2008).

## Peranan Mitokondria dalam Stres Oksidatif dan Apoptosis

Stres oksidatif adalah kondisi cekaman oksidatif disebabkan terganggunya keseimbangan prooksidan (spesi oksigen reaktif) dengan antioksidan.

Peranan mitokondria dalam stres oksidatif dapat ditunjukkan pada Gambar 1.7. Rantai respirasi mitokondria mentransfer elektron dari pembawa elektron (*electron carrier*) NADH dan FADH<sub>2</sub> menuju oksigen. Hal ini menyebabkan terjadinya pompa proton keluar dari membran dalam mitokondria untuk menciptakan gradien potensial elektrokimia proton ( $\Delta\mu H^+$ ) negatif di dalam.  $\Delta\mu H^+$  digunakan untuk memulai sintesis ATP oleh melalui sintesis F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP *synthase*. Pertukaran ATP dengan ADP melewati membran dalam dikatalisis oleh *adenine nucleotide transporter* (ANT) dan pergerakan fosfat anorganik (Pi) dikatalisis oleh *phosphate carrier* (PC). Terdapat juga jalur masuknya proton secara bebas tanpa pembentukan ATP.

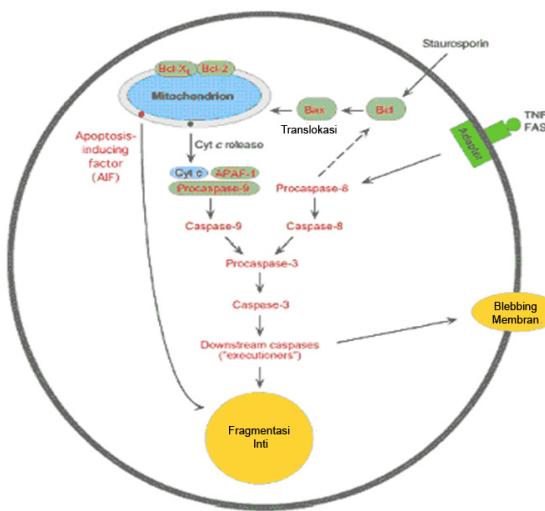


**Gambar 1.7.** Peranan mitokondria dalam gangguan oksidatif (Green *et al.*, 2004).

Rantai respirasi juga memproduksi superokside ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) yang dapat bereaksi dengan besi-sulfur, seperti *aconitase*, dan menghasilkan ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Superokside tersebut juga dapat bereaksi dengan oksida nitrat (NO) membentuk peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Keberadaan ion  $\text{Fe}^{2+}$  dan hidrogen peroksid menyebabkan terbentuknya radikal hidroksi yang sangat reaktif ( $\bullet\text{OH}$ ). Radikal peroksinitrit dan hidroksi tersebut dapat menyebabkan gangguan oksidatif. Pada kondisi normal,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat didegradasi oleh enzim *glutathione peroxidase* (GPX) dan *peroxidiredoxin III* (PRX III). *Glutathione* (GSH) dibentuk dari *glutathione disulfide* (GSSG) oleh kerja enzim *glutathione reductase* (GR), dan NADPH yang disuplai oleh *transhydrogenase* (TH) (Green *et al.*, 2004).

Proses apoptosis adalah proses kematian sel yang terprogram dengan dicirikan oleh adanya pelepasan sitokrom c (Cyt c) dari mitokondria ke sitoplasma (Gambar 1.8). Selanjutnya, pelepasan tersebut akan menginduksi aktivasi sistem kaskade

kaspase (proapoptosis), seperti kaspase 6 dan kaspase 3 sehingga menyebabkan fragmentasi inti dan blebbing membran (Garido *et al.*, 2006).



**Gambar 1.8.** Peranan mitokondria dalam proses apoptosis (Garido *et al.*, 2006).



# **BAB II**

## **KARAKTERISTIK**

## **GENOM**

## **MITOKONDRIA**

## **MANUSIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

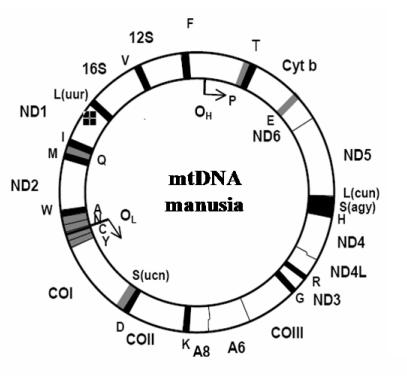
“

Mitokondria mempunyai genom mitokondria (DNA mitokondria), yaitu sistem genetik yang berbeda dengan sistem genetik inti dan berpartisipasi dalam sintesis beberapa polipeptida yang dibutuhkan dalam kompleks enzim respirasi. Genom mitokondria manusia adalah suatu genom ekstrakromosom yang memiliki dampak penting pada kesehatan manusia dan penyakit (Olsson, 2001).

”

Mitokondria mempunyai genom mitokondria (DNA mitokondria), yaitu sistem genetik yang berbeda dengan sistem genetik inti dan berpartisipasi dalam sintesis beberapa polipeptida yang dibutuhkan dalam kompleks enzim respirasi. Genom mitokondria manusia adalah suatu genom ekstrakromosom yang memiliki dampak penting pada kesehatan manusia dan penyakit (Olsson, 2001).

DNA mitokondria (mtDNA) manusia adalah suatu molekul sirkular tertutup dan berukuran kecil, yaitu sebesar 16.569 pasang basa (pb) dan menjadi genom manusia pertama yang secara lengkap dipetakan urutannya pada tahun 1981 (Anderson *et al.*, 1981). mtDNA sangat kompak, mengandung sedikit daerah nonkode, dan hanya 1 kb daerah *D-loop*, serta sering memiliki gen yang bertumpuk. Peta genom pada mtDNA dapat dilihat pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1.** Genom mitokondria manusia. Rantai bagian luar adalah rantai H (*Heavy chain*) dan rantai bagian dalam adalah rantai L (*Light chain*) (Anderson, *et al.*, 1981). Gen dikode oleh mtDNA yaitu ND, NADH dehidrogenase; CO, sitokrom oksidase; (A) ATP sintetase; (cyt b) sitokrom b, ditambah dua rRNA, 12S dan 16S dikode oleh mtDNA. tRNA

yang menyebar sepanjang genom. tRNA adalah (F) fenilalanin; (V) valin; (L) leusin; (I) isoleusin; (M) metionin; (W) triptofan; (A) alanin; (N) aspargin; (C) sistein; (Y) tirosin; (S) serin; (D) asam aspartat; (K) lisin; (G) glisin; (R) arginin; (H) histidin; (E) asam glutamat; (T) tirosin dan (P) prolin. Pita *light* dikode tRNA ditunjukkan abu-abu. Juga ND6 dikode oleh pita *light*. OH adalah replikasi origin pita *heavy*, OL adalah origin *light* replikasi (Lehtinen, 2001).

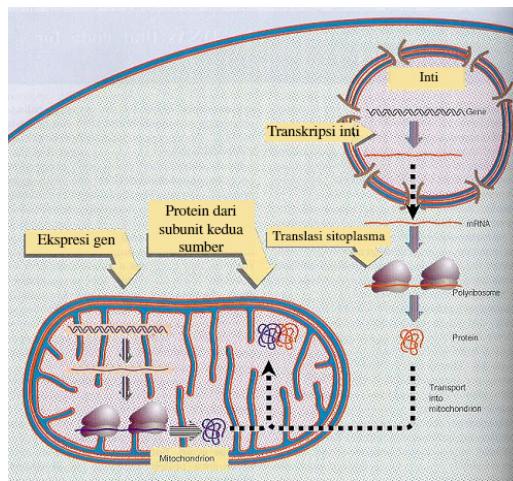
Genom mitokondria hanya berjumlah 1% dari jumlah total kandungan asam nukleat di seluruh tubuh manusia (Chinnery *et al.*, 1999). Berdasarkan fungsi genetiknya, DNA mitokondria memiliki 37 gen pengkode dengan rincian 22 gen pengkode tRNA (satu gen tRNA untuk masing-masing asam amino dan dua tRNA ekstra: tRNA<sup>Leu</sup> dan tRNA<sup>Ser</sup>), dua gen pengkode rRNA untuk sintesis protein (12 rRNA dan 16 rRNA), dan 13 gen pengkode protein dari total 78 subunit enzim yang penting dalam rantai respirasi, yaitu tujuh subunit kompleks I NADH dehidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6), satu subunit kompleks III sitokrom b (cyt b), tiga subunit kompleks IV sitokrom oksidase (COI, COII, COIII), dan dua subunit kompleks V ATP sintase (ATP6 dan ATP8) (Singhal *et al.*, 2000). Selain itu, terdapat daerah nonkode berbentuk pita triplet *loop*, yang dihasilkan dari tambahan sintesis satu DNA mitokondria dan mengandung daerah promotor berupa replikasi origin untuk replikasi pita *heavy* (H) dan *light* (L), mengandung bagian untuk mengawali replikasi *leading strand*.

DNA mitokondria yang berbentuk sirkular ini, mempunyai rantai ganda, yaitu rantai H (*heavy strand*) yang kaya akan basa G dan rantai L (*light strand*) yang kaya akan basa C. Gen-gen mtDNA terdistribusi pada rantai H dan L. Pada rantai H terdiri

atas dua gen rRNA (12S dan 16S rRNA), sebanyak 14 tRNA (fenilalanin, valin, leusin (UUR), isoleusin, metionin, triptofan, asam aspartat, lisin, glisin, arginin, histidin, serin (AGY), leusin (CUN), dan treonin), enam subunit kompleks I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, dan ND5), satu subunit kompleks III (Cyt b), tiga subunit kompleks IV (COI, COII, COIII) dan dua subunit kompleks V (ATP6 dan ATP8). Pada rantai L terdapat delapan gen tRNA (glutamin, alanin, asparagin, sistein, tirosin, serin (UCN), asam glutamat, dan prolin), dan satu subunit kompleks I (ND6) (Lewin, 1997).

Ekspresi dan replikasi mtDNA terjadi dengan adanya bantuan DNA inti. Alasannya, ada beberapa alat sintesis protein tidak dapat diproduksi dalam mitokondria, tetapi diproduksi di inti, yaitu di antaranya protein ribosom, RNA polimerase, DNA polimerase, serta amino asil-tRNA sintase. Selain itu, proses respirasi memerlukan 78 polipeptida kompleks enzim respirasi, sedangkan yang dikode oleh mtDNA hanya 13 subunit kompleks enzim sehingga sisanya dikode oleh DNA inti. Adapun gambaran mengenai hubungan fungsional antara mtDNA dengan DNA inti dapat ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Lewin, 1997).

Transkripsi dan translasi mtDNA pada daerah promoter diatur oleh inti dan memiliki tiga promotor H1: pita H; menghasilkan transkripsi simetris yang lengkap *H-strand* mtDNA; L:L-strand menghasilkan transkripsi simetris *L-strand* mtDNA; H2: sintesis dua rRNA yang bekerja dengan faktor mTERF. Promotor berlokasi di *D-loop* dan dimulai pada mitokondria RNA polimerase ditambah faktor spesifik (mtTFA). Transkripsi relatif besar dan dihasilkan oleh H1 dan *L-strand*, masing-masing dibagi ke dalam dua individu gen.



**Gambar 2.2.** Hubungan fungsional antara mtDNA dengan DNA inti (Lewin, 1997).

DNA mitokondria mempunyai sistem genetik yang berbeda dengan DNA inti.

DNA mitokondria memiliki sifat-sifat spesifik (Anderson *et al.*, 1981), yaitu sebagai berikut.

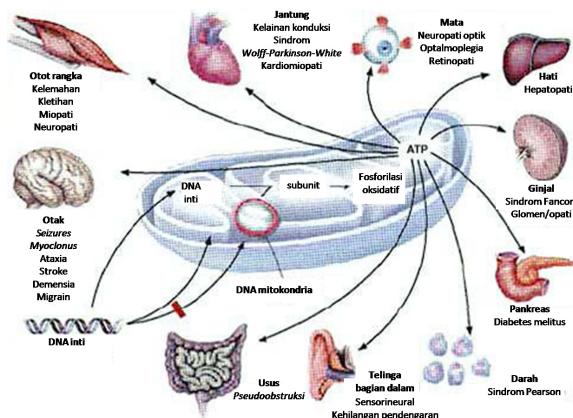
1. Memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi, yang ditunjukkan dengan tingginya laju mutasi tinggi bila dibandingkan dengan laju mutasi pada DNA inti.
2. Pola pewarisannya spesifik melalui garis keturunan ibu (*maternally inherited*) tanpa disertai dengan adanya rekombinasi mtDNA ayah.
3. Memiliki sistem kode genetik yang berbeda dengan sistem kode genetik standar di dalam proses translasi kodon menjadi asam amino (Lewin, 1997).

Replikasi mtDNA berjalan cepat, rentan terhadap kesalahan baca dan laju mutasi antara 10 hingga 100 kali dibanding DNA inti. Mitokondria lemah pada mekanisme perbaikan DNA yang mencukupi (Milligan *et al.*, 1993; Celeste *et al.*, 2003). Hal tersebut menyebabkan mtDNA lebih rentan terhadap gangguan dari luar seperti radikal bebas (Pieczenik & Neustadt, 2007). Akibatnya, matriks mitokondria kaya akan mutagen yang dihasilkan selama proses transfer elektron dan fosforilasi oksidatif, tetapi mtDNA tidak dilindungi oleh histon, dan mtDNA tidak memiliki sistem perbaikan (*repair*) dalam proses replikasinya. DNA polimerase  $\gamma$  tidak mempunyai aktivitas *proofreading* sehingga kesalahan replikasi tidak dapat diperbaiki, akibatnya laju mutasi mtDNA jauh lebih tinggi dibandingkan dengan laju mutasi pada DNA inti. Selain itu, DNA mitokondria tidak memiliki intron, ruang antargen relatif sempit hanya berjarak 1 atau 2 basa, urutan kodon memiliki perbedaan *start*, *stop* dan arginin, triptofan, isoleusin dan gen mitokondria relatif lebih sedikit pada kodon terminasi. Di balik kerumitan genom mitokondria, ukurannya yang kecil membuat mtDNA mudah untuk diamati untuk keperluan analisis genetik (Chinnery *et al.*, 1999).

Walaupun mtDNA hanya sekitar 1% dari keseluruhan DNA inti manusia, tetapi mtDNA ini mengkode 13 polipeptida yang penting bagi metabolisme aerob sehingga adanya kerusakan pada mitokondria akan memberikan pengaruh yang sangat besar terhadap timbulnya penyakit pada manusia (Chinnery *et al.*, 1999). Kelainan atau disfungsi mitokondria dapat menyebabkan “penyakit mitokondria” karena berkaitan dengan atau disebabkan oleh adanya mutasi, baik di genom mitokondria maupun inti. Secara normal terjadi sebagai konsekuensi langsung terhadap

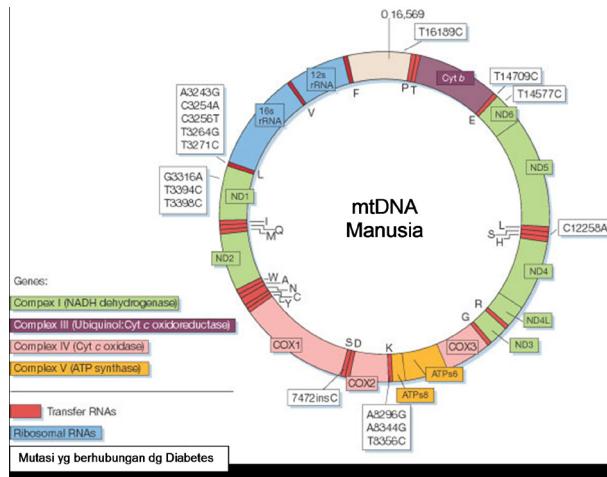
aktivitas oksidasi fosforilasi/OXPHOS, tetapi bisa saja mutasi di DNA inti dapat menyebabkan efek tidak langsung. Sebagai contoh, pemeliharaan mtDNA yang berpengaruh utama pada impor protein. Efek fungsi mitokondria dapat bersifat sekunder dan kadang-kadang sulit menggambarkan perbedaan yang nyata. Contohnya, pada kasus mutasi inti yang menyebabkan penataan ulang mtDNA. Gejala yang disebabkan oleh mutasi inti dilaporkan persis dengan yang disebabkan kerusakan mtDNA (Lehtinen, 2001). Interaksi antara gen DNA inti dengan gen mitokondria dalam fosforilasi oksidatif dapat ditunjukkan pada Gambar 2.3.

Sejak pengetahuan urutan lengkap mengenai mtDNA manusia diketahui, sejumlah mutasi telah dapat digambarkan, salah satunya adalah mutasi titik (*point mutation*). Mutasi mtDNA secara khas berkaitan dengan penyakit yang memengaruhi sistem fosforilasi oksidatif (Taylor & Turnbull, 2005). Bagan mtDNA dan penyakit berkaitan dengan mutasi yang telah ditemukan dapat ditunjukkan pada Gambar 2.4.



**Gambar 2.3.** Interaksi antara gen DNA inti dengan gen mitokondria dalam fosforilasi oksidatif. Fungsi dari kompleks fosforilasi oksidatif dapat terganggu oleh

adanya kerusakan dalam subunit yang dikode oleh DNA mitokondria dan DNA inti atau oleh kerusakan dalam komunikasi intergenomik antara dua tipe DNA. Hasilnya adalah defisit dalam produksi ATP yang memiliki efek merusak pada sejumlah sistem organ, menyebabkan penyakit seperti yang ditunjukkan pada gambar (Johns, 1995).



**Gambar 2.4.** Bagan DNA mitokondria dan penyakit berkaitan dengan mutasi yang telah ditemukan (Olsson, 2001).

Mutasi mtDNA menyebabkan kelainan fungsi terutama di otak, otot, hati, penglihatan atau pendengaran, selain itu mutasi mtDNA juga dapat dikaitkan dengan ketidaknormalan sel, seperti pada kanker, diabetes melitus, infertilitas, dan kematian sel abnormal.

Mutasi ini sering menyebabkan keparahan dalam penyakit yang bersifat multisistem. Tampilan tipikal lainnya adalah suatu gejala beragam yang disebabkan oleh mutasi yang sama pada individu berbeda, meskipun fenotipe sama dapat disebabkan

individu berbeda juga oleh mutasi berbeda. Jenis-jenis mutasi mtDNA meliputi *rearrangements*, seperti CPEO (*chronic progressive external ophthalmoplegia*) dan KSS (*Kearns-Sayre syndrome*), dan *point mutations* yang terdiri atas *missense mutations (coding region)*, seperti LHON (*Leber's hereditary optic neuropathy*) dan MELAS (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*), gen *transfer RNA*, seperti MIDD (*maternally inherited diabetes and deafness*), MELAS, *cardiomyopathy*, CPEO, *myopathy*, dan *gastrointestinal dysmotility*, serta gen *ribosomal RNA*, seperti *non-syndromic/aminoglycoside induced deafness* (Chinnery et al., 1999; Lynn et al., 1998 ; Alan et al., 2002; Rossignol et al., 2003; dan Finsterer, 2007).

DNA mitokondria sangat bervariasi dan terdapat mitokondria dengan istilah normal homoplasmi yang berarti seluruh kopi mtDNA bersifat identik, termasuk pada daerah pengode, dan heteroplasmi berarti sel tunggal mengandung populasi mtDNA berbeda yang terjadi dengan beberapa mutasi mtDNA. Akibat keberadaan multipel mitokondria di dalam satu sel, maka masing-masing mengandung berbagai kopi mtDNA. Perbedaan tersebut menghasilkan variasi jaringan pascamitosis, biasanya mengandung kadar mutasi mtDNA tertinggi seperti sel otak, sel otot tulang, otot jantung, serta jaringan endokrin. Persentase mutasi terhadap mtDNA normal di dalam mtDNA dapat bervariasi tergantung jaringan di dalam individu tertentu dan dapat berubah setiap waktu.



# **BAB III**

## **PENYAKIT**

## **MITOKONDRIA**

## **DAN TAMPAKAN**

## **KLINIS**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“

Kelainan mitokondria terjadi karena adanya perubahan struktur dan fungsi mitokondria yang dapat menyebabkan penyakit mitokondria.

”

Buku ini tidak diperjualbelikan.

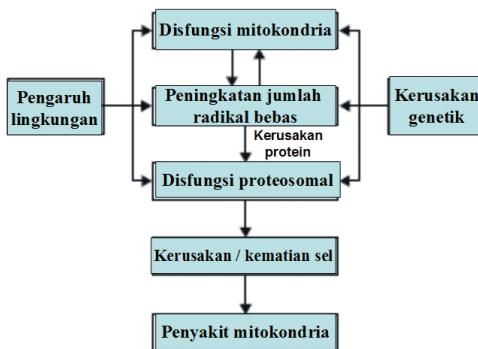
# Penyakit Mitokondria

Kelainan mitokondria terjadi karena adanya perubahan struktur dan fungsi mitokondria yang dapat menyebabkan penyakit mitokondria. Penurunan fungsi mitokondria dapat disebabkan adanya penurunan fungsi kompleks enzim respirasi yang dapat menghambat reaksi respirasi (OXPHOS) dalam pembentukan ATP (Taylor & Turnbull, 2005) atau disebabkan oleh adanya penyerangan radikal bebas ROS (*reactive oxygen species*) pada berbagai jaringan (Wei & Lee, 2003).

Penyakit mitokondria pertama kali ditemukan oleh Luft *et al.* pada tahun 1962, yaitu ketika ditemukan wanita berusia 35 tahun yang mengalami eutiroid yang diikuti dengan miopati, keringat berlebih, panas tinggi, polidipsia dengan poliuria, dan kecepatan metabolisme dasarnya mencapai 180% dari kecepatan metabolisme normal (Pieczenik & Neustadt, 2007).

Pengaruh lingkungan dan kerusakan genetik dapat meningkatkan jumlah radikal bebas di organel mitokondria.

Peningkatan jumlah radikal bebas tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan protein (disfungsi proteosomal) yang berakibat pada penurunan fungsi mitokondria. Disfungsi mitokondria dapat mempercepat kematian sel, yang akhirnya terjadi penyakit mitokondria.

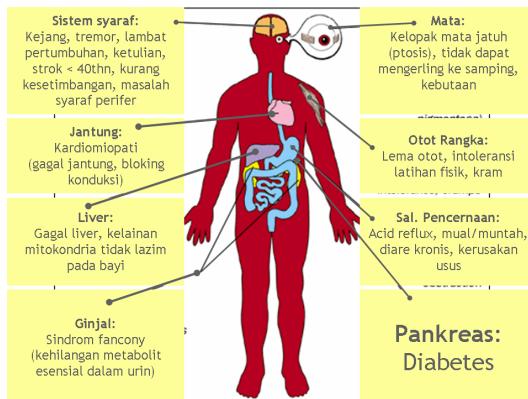


**Gambar 3.1.** Hubungan potensial antara lingkungan (faktor eksternal) dengan faktor genetik (faktor internal) dalam penyakit mitokondria (Schapira, 2006).

Berdasarkan penelitian epidemiologi yang dilakukan oleh Chinnery dan Turnbull (2001), kelainan mitokondria ternyata lebih banyak ditemukan daripada yang diperkirakan sebelumnya. Prevalensinya diperkirakan mencapai 1:8.500 sehingga dapat mewakili suatu kelompok kelainan yang cukup signifikan dalam kelainan-kelainan metabolismik. Lebih dari lima puluh juta orang di Amerika menderita penyakit tersebut, dengan setiap tahunnya lebih dari empat ribu dari empat juta kelahiran. Penyakit mitokondria dapat menyebabkan kematian sampai 50% dari penderita. Secara umum, 6-17 orang per 100.000 orang di Amerika memiliki kelainan DNA mitokondria (Singhal *et al.*, 2000).

Penurunan fungsi mitokondria dapat terjadi di berbagai jaringan, seperti pada sistem neuromuskular, contoh: ketulian, miopati, demensia, ataksia, *seizuru*; pada sel  $\beta$  pankreas menyebabkan diabetes melitus (Maksum, 2010; Maassen *et al.*, 2004); pada jantung menyebabkan *hypertrophic cardiomyopathy*; pada gastrointestinal menyebabkan *dysphagia* (Chinnery *et al.*,

1999); pada lensa mata menyebabkan pembentukan katarak (*opacity of the lens*) (Maksum, 2010; Suzuki *et al.*, 2004; Nomiyama *et al.*, 2002; dan Vinson, 2006); serta pada jaringan lainnya. Bagan organ dan penyakit yang berkaitan dengan kelainan mitokondria diperlihatkan pada Gambar 3.2.



**Gambar 3.2.** Bagan organ dan penyakit yang berkaitan dengan mitokondria (Hesterlee, 2001).

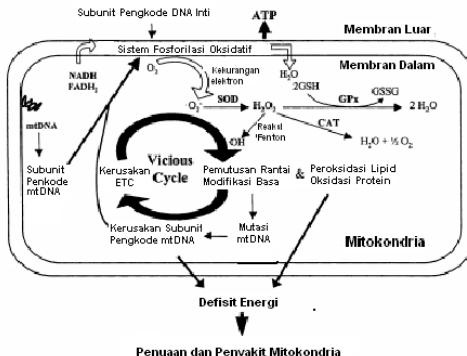
Secara klinis, penyakit mitokondria muncul akibat proses fosforilasi yang tidak normal (Chinnery, 2003), terutama terjadi pada saraf, otot, dan organ lain yang membutuhkan energi besar dan cepat.

Gangguan tersebut menimbulkan gangguan suplai energi, timbunan produk toksik sekunder seperti radikal bebas dan asidosis laktat, atau kombinasi dari kedua keadaan tersebut. Bila komponen kunci rantai respirasi dalam mitokondria hilang atau rusak, maka akan terjadi proses yang saling berkelanjutan.

Peristiwa tersebut dapat terjadi dalam dua tahap, yaitu (a) tidak terbentuk elektron, sehingga ATP tidak terbentuk secara

efisien dan sel kehilangan energi untuk melakukan fungsi normal, dan (b) semua dari tahap sesudahnya menjadi terhenti, selanjutnya sering menimbulkan zat kimia yang tidak normal yang akan memproduksi bahan toksik. Produk tersebut adalah radikal bebas dan metabolit yang berlebihan seperti asam laktat, yang dalam jumlah besar akan membahayakan (Santosa dkk., 2005).

Mitokondria memakai lebih dari 90% asupan oksigen dalam suatu sel. Dalam kondisi fisiologi di bawah normal, sekitar 1-5% oksigen yang dipakai diubah ke dalam spesi oksigen reaktif (ROS), seperti anion superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil (Wei & Lee, 2003), sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 3.3. ROS dan oksigen radikal tersebut biasanya akan ditangkap oleh sistem pertahanan antioksidan, di antaranya enzim superoksida dismutase (SOD), glutation peroksidase (GPx), dan katalase (CAT) bersamaan dengan molekul-molekul antioksidan lain, seperti vitamin C dan vitamin E. Jika jumlah ROS dan radikal oksigen lebih besar daripada jumlah antioksidannya, maka akan menyebabkan kerusakan oksidatif (pemutusan rantai dan modifikasi basa) dan mutasi terhadap mtDNA yang diserangnya, setidaknya pada membran dalam mitokondria. mtDNA yang mengalami kerusakan oksidatif atau mutasi akan ditranskripsi dan ditranslasi menjadi produk subunit protein yang tidak normal, yang kemudian akan saling bergabung membentuk rantai *transport* elektron (ETC) yang tidak normal pula. Proses ETC yang tidak normal, tidak hanya menyebabkan berkurangnya sintesis ATP, tetapi juga menghasilkan lebih banyak ROS yang akan meningkatkan kerusakan oksidatif pada biomolekul lainnya di dalam mitokondria. Sebagai hasilnya, penuaan dan penyakit mitokondria akan termanifestasi pada jaringan yang terserang oleh ROS tersebut pada pasien penyakit mitokondria.



**Gambar 3.3.** Skema ilustrasi siklus radikal bebas dalam mitokondria pada penyakit mitokondria. Penuaan berhubungan dengan akumulatif dari kerusakan oksidatif dan mutasi pada mtDNA, yang akan menyebabkan penurunan secara progresif fungsi bioenergetika sel jaringan pada proses penuaan tersebut. Penuaan dan penyakit mitokondria akan termanifestasi pada jaringan yang terserang oleh ROS tersebut pada pasien penyakit mitokondria (Wei & Lee, 2003).

Mutasi mtDNA diketahui berperan penting dalam penyakit manusia. Mutasi mtDNA meliputi mutasi titik (substitusi), delesi, dan insersi. Mutasi substitusi satu basa banyak ditemukan terutama pada daerah *D-loop*. Lebih dari 100 mutasi titik menjadi penyebab munculnya beberapa penyakit manusia. Mutasi ini terjadi pada gen pengode protein, tRNA, dan rRNA. Ekspresi klinis dari mutasi substitusi sangat banyak, antara lain MELAS (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*), MERRF (*myoclonic epilepsy and ragged red fibres*), NARP (*neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa*), MILS (*maternally inherited Leigh syndrome*), dan LHON (*Leber's hereditary optic neuropathy*). Selain itu, mutasi titik mtDNA mengakibatkan terjadinya *oligosymptomatic syndromes*, termasuk diabetes melitus, *cardiomyopathy*, dan *myoglobinuria*. Mutasi titik mtDNA juga

ditemukan berhubungan dengan penyakit Parkinson meskipun jarang. Mutasi titik mtDNA pada tRNA isoleusin menyebabkan penyakit hipertensi yang diturunkan secara maternal dan *hypercholesterolaemia* (Wilson *et al.*, 2004).

Delesi mtDNA adalah mutasi pertama yang dipaparkan dan dihubungkan dengan penyakit mitokondria (Holt *et al.*, 1988). Ukuran delesinya bermacam-macam, dari basa tunggal sampai beberapa kilobasa dan dapat terjadi di bagian mana pun dari suatu molekul. Delesi yang paling umum terjadi berukuran 5 kilobasa, dan berentang antara gen sitokrom b dan subunit II sitokrom oksidase, karenanya mencakup gen-gen pengode protein dan tRNA. Makro delesi berskala besar seperti ini dihubungkan dengan fenotipe tertentu termasuk CPEO (*chronic progressive external ophthalmoplegia*), sindrom Kearns-Sayre, dan sindrom Pearson. Delesi mtDNA dapat berupa delesi tunggal atau banyak, atau delesi *multiple* dengan berbagai ukuran. Delesi mtDNA berupa heteroplasmi, proporsi molekul yang terdelesi beragam pada setiap jaringan, dan tingkat heteroplasminya dapat berubah seiring dengan waktu (Schapira, 2006).

Beberapa penyakit diakibatkan oleh mutasi gen inti yang mengode protein-protein mitokondria, termasuk mutasi gen yang mengode protein yang terlibat dalam siklus Krebs,  $\beta$ -oksidasi, dan siklus urea. Mutasi gen inti yang terlibat dalam replikasi mtDNA atau protein rantai pernapasan dapat menyebabkan fenotipe yang identik dengan mutasi mtDNA primer. Mutasi-mutasi gen pada DNA inti dapat menginduksi terjadinya delesi *multiple* mtDNA (Schapira, 2006).

Mutasi pada gen *adenine nucleotide translocator-1* (*ANT-1*) menyebabkan *adult onset autosomal dominant* CPEO dengan *ragged red fibres* dan delesi mtDNA *multiple* pada otot rangka. Protein ANT-1 merupakan isoform spesifik untuk otot, hati, dan otak, dan mengatur *pool* nukleotida adenin di dalam mitokondria (Kaukonen *et al.*, 2000).

*Twinkle* adalah protein DNA helikase heksomerik 5'→3' yang berperan dalam pembukaan garpu replikasi mtDNA. *Twinkle* dikode oleh gen *C10orf2* dan banyak diekspresikan di otot rangka. Mutasi dari gen ini di antaranya dapat menyebabkan penyakit PEO (*progressive external ophtalmoplegia*) dan SANDO (*sensory ataxia, neuropathy, dysarthria, and ophtalmoplegia*) (Hudson *et al.*, 2005). Dalam beberapa kasus PEO, serangannya lambat (usia >50 tahun) dan dihubungkan dengan *myopathy, cardiomyopathy, axonal neuropathy*, diabetes, ketulian, dan osteoporosis (Kiechl *et al.*, 2004).

MtDNA polimerase  $\gamma$  (POLG) merupakan molekul heterodimer yang terdiri dari subunit alpha berukuran 140 kDa dan subunit beta berukuran 41 kDa, terletak di dalam membran dalam mitokondria dan berperan dalam replikasi mtDNA. Subunit alpha bersifat katalitik dan mengandung aktivitas eksonuklease dan polimerase, subunit beta berperan dalam pengikatan DNA dan sintesis DNA. Mutasi POLG menyebabkan beberapa fenotipe klinis termasuk PEO, sindrom Alpers, dan *Parkinosim* (Filosto *et al.*, 2003).

Dalam bab ini penulis ingin memaparkan lima tampakan klinis yang sering dijumpai pada penyakit mitokondria, yaitu MELAS, MERRF, LHON, NARP, dan MIDD.

# **MELAS (*Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes*)**

MELAS adalah salah satu dari kelompok penyakit *mitochondrial encephalomyopathy*.

Gejala yang umum terlihat dari MELAS adalah muntah yang berulang-ulang, *seizure* (kejang), *encephalopathy*, sakit kepala migren, *stroke-like episodes* yang sering kambuh, akumulasi asam laktat dalam darah (*lactic acidosis*), dan mengalami kelemahan otot pada satu sisi tubuh (*hemiparesis*). Gejala visual dapat meliputi gangguan penglihatan atau kebutaan pada satu sisi penglihatan (*hemianopsia*) atau kebutaan disebabkan luka pada daerah otak yang berhubungan dengan penglihatan (*cortical blindness*) (Hirano *et al.*, 1994).

Pewarisan MELAS adalah melalui pewarisan secara maternal. MELAS dapat menyerang manusia pada usia yang berbeda-beda, pada rentang umur 4 hingga 40 tahun atau lebih. Namun, kebanyakan pasien dengan sindrom MELAS menunjukkan gejala sebelum umurnya 20 tahun (Olsson, 2001). MELAS dicirikan oleh *stroke like episodes* dengan serangan tiba-tiba dan *encephalopathy* progresif yang mengarah pada demensia. Pasien dengan ekspresi penuh seringkali meninggal sebelum umur 20 tahun. Hilangnya pendengaran adalah gejala serangan yang umum. Pasien MELAS mengalami pertumbuhan yang terhambat (*short stature*) yang

disebabkan oleh disfungsi endrokin, infertilitas, *excercise intolerance*, dan mungkin juga disertai dengan diabetes melitus. Biopsi otot pada penderita MELAS seringkali terlihat *red ragged fiber* (jaringan otot abnormal ketika dilihat pada mikroskop) (Bell, 2004).

Penyebab MELAS secara tepat belum dipahami secara sempurna. Sekarang ini, setidaknya 24 mutasi patogenis dihubungkan dengan fenotipe MELAS. Tujuh di antaranya terletak pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*, dan sembilan, di antaranya terletak pada gen tRNA lainnya, yaitu *tRNA<sup>Lys</sup>*, *tRNA<sup>Phe</sup>*, *tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>*, *tRNA<sup>Val</sup>*, *tRNA<sup>Gln</sup>*, dan *tRNA<sup>His</sup>*. Delapan mutasi terletak di gen pengode polipeptida, yaitu gen *COX III*, *ND1*, *ND5*, dan *ND6*. Di antara mutasi-mutasi ini, mutasi yang paling banyak menyebabkan MELAS adalah pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* yang mencakup 90% dari seluruh kasus MELAS, terutama mutasi titik A3243G *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* sebanyak 80%, dan mutasi titik T3271C *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* sebanyak 10% (Takahiro & Fumihiko, 2005).

Secara umum, mutasi pada gen pengode protein dapat memengaruhi sintesis protein sedangkan mutasi pada tRNA atau pada gen tRNA dapat memengaruhi sintesis protein mitokondria secara keseluruhan, karenanya, reduksi dalam sintesis protein mitokondria akibat dari mutasi gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* mungkin merupakan mekanisme dasar munculnya MELAS (Takahiro & Fumihiko, 2005).

## **MERRF (*Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibres*)**

MERRF adalah penyakit multisistem yang dikarakterisasi oleh *myoclonus* sebagai gejala awal, diikuti dengan epilepsi, lemah, ataksia, dan demensia, dan *ragged red fibres* yang teramati pada biopsi otot.

Tampakan klinis lainnya termasuk gangguan pendengaran, terhambatnya pertumbuhan, *optic atrophy*, dan *cardiomyopathy* disertai dengan sindrom Wolff-Parkinson-White (WPW) (Chinnery *et al.*, 1997).

Penyakit ini disebabkan oleh terjadinya mutasi pada gen *tRNA<sup>Lys</sup>* (*MTTK1*) DNA mitokondria. Sebanyak 80% dari seluruh kasus MERRF diakibatkan oleh transisi A ke G pada posisi nukleotida 8344 pada gen *tRNA<sup>Lys</sup>*. Dua mutasi lainnya pada gen yang sama, yaitu T8356C dan G8363A mencakup 20% sisanya. Kadar asam laktat dalam darah bervariasi untuk pasien-pasien yang menderita MERRF, dan tidak adanya aktivitas sitokrom oksidase (Chinnery *et al.*, 1997).

MERRF diwariskan secara maternal dan mutasi ini biasanya dapat dideteksi dari leukosit darah, meskipun DNA termutasi jumlahnya beragam pada jaringan yang berbeda karena mutasi ini merupakan mutasi heteroplasmi. Namun, bila uji darah menunjukkan hasil negatif, biopsi otot sebaiknya dilakukan untuk memastikan penderita MERRF (Chinnery *et al.*, 1997).

## LHON (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*)

LHON dianggap sebagai penyakit yang paling umum yang disebabkan mutasi mtDNA. Secara klinis LHON dikarakterisasi oleh gangguan pusat penglihatan bilateral akut atau subakut yang disebabkan oleh kerusakan sel ganglia retina dan aksonnya.

Pasien yang menderita LHON kebanyakan pria, dan serangannya terjadi pada usia 23 tahun. Sebanyak 95% dari seluruh kasus LHON disebabkan tiga mutasi mtDNA, yaitu G11778A, G3460A, dan T14484C yang terletak pada gen *MTND4*, *MTND1*, dan *MTND6*. Mutasi G11778A paling banyak ditemukan, muncul pada 56% kasus, mutasi G3460A sebanyak 31%, dan T14484C sebanyak 6% (Man *et al.*, 1993).

Mutasi G11778A merubah arginin menjadi histidin pada posisi 340 pada gen *MTND4* dari NADH: ubikuinon oksidoreduktase (kompleks I) mitokondria dan menghilangkan sisi pengenalan enzim restriksi *Sfa*NI (Holt *et al.*, 1989).

## NARP (*Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa*)

NARP merupakan suatu sindrom klinis yang heterogen namun seringkali dikarakterisasi oleh kombinasi *sensory-motor neuropathy*, *cerebellar ataxia*, dan rabun ayam.

NARP biasanya muncul pada awal usia dewasa. Tampakan klinisnya meliputi kombinasi dari gejala berikut ini: *early salt and pepper retinopathy*, retinitis pigmentosa, pupil yang lembam, *nystagmus*, kebutaan, kelemahan otot proksimal, lambatnya perkembangan, *corticospinal tract atrophy*, *sensory neuropathy*, demensia, gangguan pendengaran, *sensory neuropathy*. Saat jumlah mtDNA yang termutasinya sangat tinggi, akan disertai dengan penyakit Leigh (Santorelli & Tessa, 2004).

Sindrom NARP diturunkan secara maternal dan disebabkan beberapa mutasi titik DNA mitokondria, yaitu T3308C pada gen *MTND1*, T8851C, T8993G, T8993C, dan T9176C yang semuanya terletak pada gen *MTATP6*.

Namun, mutasi transversi T ke G pada posisi nukleotida 8993 merupakan mutasi yang paling banyak menyebabkan sindrom NARP. Mutasi ini menghasilkan perubahan asam amino dari leusin menjadi arginin pada posisi 156 (L156R) dan mengakibatkan kerusakan pada sintesis ATP mitokondria, mengurangi energi sel dan menyebabkan kematian sel, terutama pada jaringan yang sangat bergantung pada metabolisme fosforilasi oksidatif, seperti otak dan retina (Santorelli & Tessa, 2004).

## **CPEO (*Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*)**

Penyakit ini mempunyai ciri-ciri sebagai berikut: *ophthalmoplegia*, *ptosis*, dan *myopathy* tungkai. Sebanyak 50% dari pasien CPEO mengalami delesi besar tunggal pada DNA mitokondrianya.

Penyakit ini juga dapat disebabkan beberapa mutasi titik mtDNA yang terletak pada beberapa gen tRNA di antaranya adalah, A3243G pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*, A3251G pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*, C3256T pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*, C3256T pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*, T4274C pada gen *tRNA<sup>Ille</sup>*, T4285C pada gen *tRNA<sup>Ille</sup>*, G4298A pada gen *tRNA<sup>Ille</sup>*, A5692G pada gen *tRNA<sup>Asn</sup>*, G5703A pada gen *tRNA<sup>Asn</sup>*, T12311C pada gen *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>*, dan G12315A pada gen *tRNA<sup>Leu(CUN)</sup>*. Biopsi otot biasanya menunjukkan adanya *ragged red fibres* (DiMauro & Schon, 1990).

## **MIDD (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness*)**

MIDD merupakan salah satu subtipe dari diabetes melitus dan dikarakterisasi oleh gejala yang timbul di atas usia 25 tahun, pewarisan secara maternal, dan terganggunya fungsi indera pendengaran (ketulian).

Tingkat prevalensi mutasi ini berkisar sekitar 1-3% pada populasi Asia (So *et al.*, 2000). Studi yang dilakukan terhadap sejumlah besar penderita MIDD di Prancis, menyebutkan bahwa fenotipe diabetes pada sindrom ini agak berbeda dari apa yang telah diketahui mengenai diabetes selama ini (Guillausseau *et al.*, 2001). Hal ini mempunyai dampak klinis yang sangat penting bagi dokter untuk menjadi lebih hati-hati terhadap sindrom tersebut. Penyakit ini adalah akibat dari mutasi titik pada gen RNA transfer untuk Leusin pada mitokondria, pada posisi 3243 dengan perubahan basa A menjadi G. Penyakit ini pertama kali dikarakterisasi oleh van den Ouwendijk dan kawan-kawannya pada tahun 1992 dalam sebuah keluarga dengan 9 saudara kandung terkena penyakit ini. Fenotipenya dapat menyerupai diabetes tipe 1 maupun tipe 2. 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 (Fischel, 2001).

Khususnya dalam sel  $\beta$  pankreas, mitokondria bertanggung jawab dalam sekresi insulin yang diinduksi glukosa karena eksositosis granula sekretori dipacu oleh perubahan dalam konsentrasi ATP dan ADP intraseluler dan kemudian kenaikan rasio ATP/ADP adalah hasil fosforilasi oksidatif dalam mitokondria disebabkan metabolisme glukosa.

Mutasi pada gen mitokondria dapat mengakibatkan kerusakan dalam produksi ATP sehingga mengganggu sekresi insulin yang diinduksi glukosa (Ohkubo *et al.*, 2001 dan Maassen *et al.*, 2004).

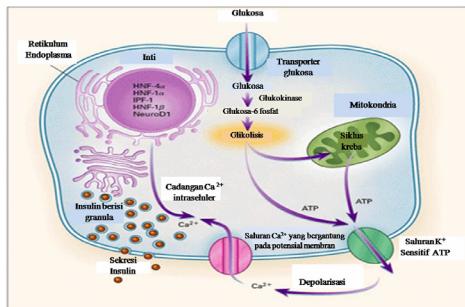
Pada MIDD, perkembangan gradual dari disfungsi sel  $\beta$  pankreas akibat penuaan adalah mekanisme utama dibandingkan resistensi insulin dalam perkembangan intoleransi glukosa. Mekanisme molekul di mana mutasi A3243G memengaruhi sekresi insulin melibatkan suatu atenuasi tingkat ADP/ATP sitosolik mengakibatkan *resetting* sensor glukosa dalam sel  $\beta$  pankreas, seperti pada *maturity-onset diabetes of the young* (MODY)-2 dengan mutasi pada gen *glukokinase*. Tidak seperti MODY-2, yang merupakan bentuk diabetes nonprogresif, diabetes mitokondrial menunjukkan deteriorasi yang bergantung usia dari fungsi pankreas mengindikasikan keterlibatan proses-proses tambahan. Lebih lanjut, terdapat suatu dugaan bahwa semua mutasi mtDNA yang memengaruhi sintesis ATP dapat mengakibatkan diabetes. Hal ini bertentangan dengan observasi klinis. Asal dari deteriorasi yang bergantung usia dari fungsi pankreas pada *carrier* mutasi A3243G dan kontribusi ATP dan faktor yang berasal dari mitokondria lain seperti spesi oksigen reaktif (ROS) terhadap perkembangan diabetes.

MIDD disebabkan oleh mutasi titik A3243G pada gen *tRNA<sup>Leu</sup>* mitokondria.

Mutasi ini terjadi di dalam sisi pengikatan DNA untuk faktor protein yang memulai terminasi transkripsi pada batas antara gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* dan *rRNA 16S*. Mutasi ini tidak hanya berpengaruh pada sintesis tRNA-Leusin (UUR), tapi juga pada pengikatan faktor terminasi transkripsi, karenanya menyebabkan kerusakan dalam sintesis protein mitokondria (Kadowaki *et al.*, 1994).

Terjadinya penurunan fungsi sekresi insulin disebabkan oleh penurunan ATP yang diperlukan di dalam penutupan *channel K<sup>+</sup>* yang sensitif ATP. Penghambatan penutupan tersebut menyebabkan tidak terjadinya depolarisasi Ca<sup>2+</sup> dari ekstraselular melalui *channel Ca<sup>2+</sup>* yang bergantung pada *voltage*, sedangkan Ca<sup>2+</sup> ekstraselular bersama dengan Ca<sup>2+</sup> intraselular akan menstimulasi sekresi insulin dari granul sel  $\beta$  pankreas (Gambar 3.4).

Berdasarkan studi pustaka seperti Rossignol *et al.* (2003), Alan *et al.* (2002), Lynn *et al.* (1998), dan Suzuki *et al.*, 2004 melaporkan bahwa potensi penyakit mitokondria terjadi pada penderita DM tipe 2 maternal yang mengalami penurunan fungsi neuromuskular, seperti ketulian, miopati, *cerebellar ataxia* polidipsia, dan *leg paresthesia*, serta ada yang disertai dengan pembentukan katarak (Lynn *et al.*, 1998 dan Suzuki *et al.*, 2004). Hal ini yang memungkinkan adanya hubungan antara mutasi mtDNA dengan DM tipe 2 maternal dan katarak sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut.



**Gambar 3.4.** Disfungsi sekresi insulin pada sel  $\beta$  pankreas. Diabetes yang disebabkan oleh terhambatnya produksi ATP yang diperlukan dalam sekresi insulin. ATP diperlukan untuk  $ATP$ -sensitive  $K^+$  channel yang menyebabkan depolarisasi  $Ca^{2+}$  dari ekstraselular. Depolarisasi menstimulasi sekresi insulin melalui  $voltage$ -dependent  $Ca^{2+}$  channel (Fajans *et al.*, 2001).

Tingkat kekerapan penderita diabetes melitus yang memiliki kelainan mitokondria telah dilakukan di beberapa negara, di antaranya 0,15% di Taiwan (Liou, 2001), 2,9% di Jepang (Okhubo *et al.*, 2001), 2 dari 268 penderita di Inggris telah diteliti diabetes melitus usia muda memiliki potensi kelainan mitokondria (Owen *et al.*, 2003), 10% di Kroasia (Kleiner *et al.*, 2004). Di Indonesia sendiri, telah dilakukan pula penelitian serupa untuk mengetahui lebih jauh kelainan mitokondria pada penderita diabetes melitus. Suatu penelitian yang telah mencapai jumlah 1.500 sampel penderita diabetes melitus yang berasal dari Jakarta, Yogyakarta, dan Surabaya, belum menemukan adanya potensi penyakit mitokondria (Anonim, 2003), lain halnya dengan penelitian yang dilakukan *Institute Eijkman*, menemukan penderita diabetes melitus memiliki varian mutasi di mtDNA (Marzuki, 2000).

Penelitian yang dilakukan di Jawa Barat pada 101 penderita diabetes melitus menunjukkan ada dua penderita memiliki potensi MIDD (Maksum dkk., 2004).

## Tampakan Klinis Penyakit mtDNA

Gambaran klinis penyakit mitokondria yang umum adalah kelemahan, miopati proksimal, intoleran terhadap latihan, cepat lelah, kram otot, masalah gastrointestinal, ptosis, paralisis otot mata (optalmoplegia eksternal), degenerasi retina (retinitis pigmentosa) dengan penurunan kemampuan melihat, kejang, ataksia (kehilangan keseimbangan dan koordinasi), dan keterlambatan belajar. Kadang terdapat abnormalitas biokimia dan kelainan pada otot rangka, tetapi miopati mungkin tidak tampak secara klinis (Santosa dkk., 2005).

Penyakit mitokondria biasanya ditemukan sebagai penyakit multisistem seperti MIDD, MELAS, MERRF, dan sebagainya (Finsterer, 2007).

Penyakit multisistem lainnya ditemukan pada penderita diabetes melitus, katarak, ketulian dan ataksia (Lynn *et al.*, 1998), serta pada penderita diabetes melitus, katarak, polidipsia dan *leg paresthesia* (Suzuki *et al.*, 2004 dan Nomiyama *et al.*, 2002).

Pasien penderita penyakit mitokondria dibagi menjadi tiga kategori utama. Pada kategori pertama, suatu sindrom klinis relatif dapat langsung dikenali bahwa sindrom tersebut mengalami disfungsi mitokondria. Biasanya, pada pasien MELAS terjangkit melalui otot normal dan hal-hal lain yang berhubungan, tetapi

pertumbuhannya lambat, mengalami ketulian bilateral di masa kecil atau pada saat remaja, dan biasanya diikuti dengan diabetes, *seizures* (kejang), *stroke-like episodes*, dan *encephalopathy* pada dekade ketiga atau keempat hidupnya (Hirano *et al.*, 1992). Tidak semua pasien MELAS mengalami pola ini, terkadang hanya muncul diabetes dan tuli (Gerbitz *et al.*, 1995), dan bisa saja tanpa gejala *cardiomyopathy* (Vilarinho *et al.*, 1997).

Contoh lainnya adalah pasien LHON kebanyakan pria dan biasanya muncul pada dekade kedua atau ketiga hidupnya dengan kerusakan penglihatan akut atau sub-akut, yang mungkin dapat membaik sampai pada tingkat tertentu di bulan-bulan berikutnya (Nikoskelainen, 1994). Walaupun tampakan ini umum, tetapi harus ditekankan bahwa penyakit-penyakit mitokondria memiliki fenotipe yang beragam. Oleh karena itu, tampakan awal MELAS bisa saja *stroke-like episodes* pada usia akhir paruh baya (Hanna *et al.*, 1997; Kimata *et al.*, 1998) atau LHON bisa saja muncul pada dekade ketujuh kehidupan atau mungkin dapat berupa serangan yang tidak khas yang munculnya tidak diketahui (Howell, 1997).

Pada penyakit mitokondria lainnya, *external ophthalmoplegia* merupakan tampakan umum penderita *encephalomyopathy* mitokondria (Chinnery *et al.*, 1997). Abnormalitas ini dapat muncul pada dekade kedua yang berhubungan dengan ataksia, ketulian bilateral, kerusakan *cardiac conduction* (hantaran kardiak), dan tingginya protein CSF (seperti pada sindrom Kearns-Sayre). Lebih sering lagi muncul pada isolasi dengan *ptosis* dan *proximal myopathy* sedang (Morases *et al.*, 1989). Dua penyakit lainnya, yaitu NARP yang tampakannya adalah *neuropathy* dengan ataksia dan *pigmentary retinopathy* (Holt *et al.*, 1990), dan MERRF yang

tampakannya adalah *myoclonic epilepsy* dengan ataksia dan *myopathy* (Shoffner *et al.*, 1990).

Kategori kedua penyakit mitokondria adalah terjadinya sekumpulan tampakan klinis yang dugaannya kuat sebagai penyakit mitokondria, tetapi tidak termasuk kepada salah satu kategori sindrom spesifik (Tabel 3.1). Dengan demikian, *sensorineural bilateral, ophtalmoplegia* dengan *ptosis* yang pertumbuhannya lambat, atau memiliki latar belakang migren dan diabetes merupakan tiga tampakan klinis yang mengarah pada etiologi mitokondria. Pemeriksaan neurologi yang sangat teliti diperlukan untuk pasien yang diduga menderita penyakit mitokondria. Kombinasi dari salah satu tampakan klinis di atas dengan bukti klinis *myopathy* dan tanda utama neurologi menempatkan kerusakan mitokondria pada urutan pertama dari beragam diagnosis lainnya. Namun, penyakit mitokondria dapat terlihat seperti penyakit neurologi turunan lainnya, dan pasien yang memiliki kerusakan mtDNA seringkali menjalankan sejumlah tes genetika autosomal sebelum didapatkan diagnosis yang benar. Misalnya, penyakit mitokondria dapat muncul sebagai suatu sindrom *spinocerebellar* (Howell *et al.*, 1996), maka pasien yang negatif terhadap tes SCA (*spinocerebellar ataxia*, penyakit yang sudah diketahui) harus dipertimbangkan memiliki disfungsi mitokondria (khususnya apabila mereka memiliki *ophtalmoplegia* dan apabila tidak ditemukan transimisi paternal). *Focal dystonia* (Bruyn *et al.*, 1992; Shoffner *et al.*, 1995) yang disertai dengan *optic atrophy* biasanya tertukar dengan penyakit Huntington pada stadium awal. Sindrom Usher (*pigmentary retinopathy* disertai ketulian) memiliki tampakan klinis yang sama dengan penyakit mitokondria (Mansergh *et al.*, 1999), dan pasien yang

memiliki kerusakan mtDNA diikuti dengan munculnya *motor and sensori neuropathy* sama dengan penyakit *Charcot Marie-Tooth* (Howell *et al.*, 1996). Daftar dari kesalahan diagnosis ini memang tidak sepenuhnya terjadi, tetapi hal tersebut setidaknya dapat menggambarkan situasi yang dialami oleh para klinisi (Chinnery *et al.*, 1999).

Kategori terakhir merupakan yang paling sulit untuk dijelaskan. Para klinisi menemukan peningkatan jumlah pasien yang menunjukkan tanda dan gejala yang tidak dapat dijelaskan yang secara mengejutkan ternyata memiliki penyakit mitokondria (Tabel 3.1). Sebagai salah satu contoh, kerusakan mtDNA merupakan penyebab *stroke* pada usia masih sangat muda dengan jumlah yang cukup signifikan (Henderson *et al.*, 1997). Lebih jauh lagi, banyak penyakit mitokondria yang tidak menunjukkan gejala neurologis, dengan tampakan seperti *hypertrophic cardiomyopathy* (Vilarinho *et al.*, 1997) dan penyakit renal tubular (Damian *et al.*, 1995). Telah juga banyak ditemukan abnormalitas endokrin, *hyperparathyroidism* (Morten *et al.*, 1993), *adrenal insufficiency* (Bruno *et al.*, 1998), dan diabetes (Gerbitz *et al.*, 1995).

Terdapat fakta bahwa di antara 0,5 dan 1% penyakit diabetes disebabkan mutasi mtDNA (Maassen & Kadowaki, 1996), tetapi prevalensinya dianggap tidak ada karena jumlah total dari mutasi mtDNA yang dapat menyebabkan diabetes ini tidak diketahui. Abnormalitas *gastrointestinal* juga umum ditemukan pada penderita penyakit mitokondria, walaupun jarang disebutkan (Chinnery *et al.*, 1997). Biasanya muntah-muntah berulang didiagnosis sebagai *anorexia nervosa* dan *gastrectomy* sebelum etiologi mitokondria ditemukan (Chinnery *et al.*, 1998). *Mitochondrial dysphagia*

dapat mengakibatkan gastrostomi sebelum umur dua puluhan (Chinnery *et al.*, 1997), diaere, dan sembelit. Belum jelas apakah tampakan ini dihasilkan dari *visceral myopathy* atau *myantric plexus neuropathy*.

Kumpulan gambaran klinis penyakit mitokondria yang disertai dengan mutasi yang menyebabkan penyakit tersebut dapat ditunjukkan pada Tabel 3.1. Dalam Tabel 3.1 memudahkan untuk dapat memahami keterkaitan mutasi, baik pada mtDNA maupun DNA inti, dengan beberapa gambaran klinis penyakit mitokondria.

**Tabel 3.1** Hubungan gambaran klinis penyakit mitokondria dan mutasi DNA (Chinnery, 2003).

Mutasi DNA	Kelompok Mutasi	Tipe Mutasi	Penyakit Mitokondria (Gambaran klinis)	Mutasi Spesifik
Mutasi Primer DNA Mitokondria	Re-arrangement (penataulangan)	Delesi tunggal	CPEO	MIM 165130
			Sindrom Kearns-Sayre	MIM 165.100
			Sindrom Pearson	-
			Diabetes dan Ketulian	-
		Delesi multiple	Encephalo-pathy	-
			Recurrent myoglobin-Uria	-
			SANDO	-
	Mutasi titik	Mutasi missense	LHON(MIM 535000)	G11778A ND5
				G3460A ND1
				T14484CND6
			Optic atrophy dan dystonia	A11696G ND4
				G14459A ND6
				T14596A ND6
			MELAS	T9957C COX III
				G13515A ND5

Mutasi DNA	Kelompok Mutasi	Tipe Mutasi	Penyakit Mitokondria (Gambaran klinis)	Mutasi Spesifik	
			Encephalo-myopathy dan myopathy	G9952A COX III	
			NARP/ <i>Leigh disease/ striatal necrosis</i>	T3308C ND1	
				T8851C ATPase6	
				T8993G/C ATPase6	
				T9176C ATPase6	
		Gen tRNA	MELAS (MIM 251910)	G1642A tRNA <sup>Val</sup>	
				A3243G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				A3252G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				A3260G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				T3271C tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				T3291C tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				A5814G tRNA <sup>Cys</sup>	
			MERRF (MIM 254775)	A8344G tRNA <sup>Lys</sup>	
		MERRF/ MELAS overlap		T8356C tRNA <sup>Lys</sup>	
				G8363A tRNA <sup>Lys</sup>	
		Diabetes dan ketulian	T7521C tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	T7521C tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	
				T8356C tRNA <sup>Lys</sup>	
			Cardiomyo-pathy	A3243G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				T12258A tRNA <sup>Ser(AGY)</sup>	
				A3243g tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	
				A3254g tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	

Mutasi DNA	Kelompok Mutasi	Tipe Mutasi	Penyakit Mitokondria (Gambaran klinis)	Mutasi Spesifik
				A3260G tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> C3303T tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> A4269G tRNA <sup>Ile</sup> A4295G tRNA <sup>Ile</sup> A4300G tRNA <sup>Ile</sup> C4320T tRNA <sup>Ile</sup> G8363A tRNA <sup>Lys</sup> T9977C tRNA <sup>Gly</sup>
			CPEO	A3243G tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> A3251G tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> C3256T tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> T4274C tRNA <sup>Ile</sup> T4285C tRNA <sup>Ile</sup> G4298A tRNA <sup>Ile</sup> A5692G tRNA <sub>Asn</sub> G5703A tRNA <sub>Asn</sub> T12311C tRNA <sub>Leu(CUN)</sub> G12315A tRNA <sub>Leu(CUN)</sub>
			Myopathy	A606G tRNA <sup>Phe</sup> A3243G tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> T3250C tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> A3302G tRNA <sub>Leu(UUR)</sub> T4409C tRNA <sub>Met</sub> G5521A tRNA <sub>Trp</sub>

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Mutasi DNA	Kelompok Mutasi	Tipe Mutasi	Penyakit Mitokondria (Gambaran klinis)	Mutasi Spesifik
				A8344G tRNA <sup>Lys</sup>
				A12330G tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>
				C15990T tRNA <sup>Pro</sup>
			<i>Myopathy</i> dan diabetes	A14709G tRNA <sup>Glu</sup>
			<i>Encephalo-myopathy</i>	G1606A tRNA <sup>Val</sup>
				T10010C tRNA <sup>Glu</sup>
				G15915A tRNA <sup>Trp</sup>
			<i>Dementia</i> dan <i>chorea</i>	G5549A tRNA <sup>Trp</sup>
			<i>Gastro-intestinal dysmotility</i>	A3243G tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>
				G8313A tRNA <sup>Lys</sup>
			<i>Sindrom Leigh</i>	G1644T tRNA <sup>Val</sup>
		Gen rRNA	<i>Non-syndromic deafness</i>	A7455G tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>
			<i>Acquired sideroblastic anaemia</i>	G12301A tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>
			<i>Non-syndromic/ aminoglyco-side induced deafness</i>	G1555A 12S rRNA
	Mutasi gen inti	Kerusakan gen inti yang secara tidak langsung memengaruhi fungsi mitokondria melalui mtDNA	<i>Autosomal dominant CPEO dengan mtDNA multiple</i>	10q23.3-q24.3
				3p14.1-21.2
			<i>Mitochondri-al neurogastro-intestinal encephalo-myopathy (thymidine phosphoryla-se eficiency)</i>	Gen timidin fosforila-se 22q13.32-qter
		Kerusakan gen inti dari rantai pernapasan mitokondria	<i>Multisystem disease (complex I deficiency)</i>	Subunit AQDQ pada kromosom5

Mutasi DNA	Kelompok Mutasi	Tipe Mutasi	Penyakit Mitokondria (Gambaran klinis)	Mutasi Spesifik
			Sindrom Leigh ( <i>complex I deficiency</i> )	Subunit NDUFS8
			<i>Optic atrophy</i> dan <i>ataxia</i> ( <i>complex II deficiency</i> )	Subunit Fp dari SDH pada kromo-som3
			Sindrom Leigh ( <i>complex II deficiency</i> )	Gen SURF I 9q1
			Benign infantile myopathy with COX deficiency	
			Fatal infantile myopathy with COX deficiency	

Mutasi titik DNA mitokondria merupakan penyebab yang paling banyak ditemukan dalam penyakit mitokondria, termasuk MELAS, MERRE, LHON, NARP, KSS, CPEO, MIDD, dan sindrom Leigh.

Tampakan klinis penyakit mitokondria yang berkaitan dengan penurunan sistem organ ditunjukkan pada Tabel 3.2.

**Tabel 3.2** Tampakan klinis penyakit mitokondria pada sistem organ (Henderson *et al.*, 1997).

Sistem Organ	Tampakan Klinis
<i>Neuromuscular</i>	<i>Ekternal ophtalmoplegia</i> dan <i>ptosis</i> <i>Sensorineural deafness</i> (ketulian) Miopati Migren <i>Seizures/myoclonus</i> <i>Encephalomyopathy</i> Demensia

Sistem Organ	Tampakan Klinis
	Ataksia <i>Stroke-like episodes</i> <i>Parkinsonism/dystonia</i> <i>Spastic paraparesis</i> <i>Peripheral neuropathy</i> <i>Rhabdomyolysis</i> <i>Optic atrophy</i> <i>Pigmentary retinopathy</i>
<i>Cardiac</i>	<i>Hypertrophyc cardiomyopathy</i> <i>Accessory pathways</i> <i>Heart block</i>
<i>Endocrine</i>	Diabetes melitus <i>Hypoparathyroidism</i> <i>Hypogonadism</i> Ketidaksuburan
<i>Gastrointestinal</i>	<i>Dysphagia</i> <i>Cyclical vomiting</i> (muntah-muntah) <i>Pseudo-obstruction</i>
<i>Renal</i>	<i>Aminoaciduria</i> Disfungsi renal tubular Tubulointerstitial disease <i>Toni-Fanconi-Debre syndrome</i> Sindrom Barrter
<i>Haemotological</i>	Anemia sideroblastik <i>Pancytopenia</i>
Pankreas dan Liver	Kegagalan eksokrin pankreas <i>Hepatocellular failure</i>
<i>Psychiatric</i>	Depresi Penyakit kejiwaan
<i>Dermatological</i>	<i>Lipomatosis</i>

Meskipun ketulian merupakan tampakan umum yang dijumpai pada penyakit mitokondria, melalui penelitian Estivill *et al.* (1997) terhadap 70 keluarga di Spanyol dengan riwayat ketulian dan ditemukan adanya mutasi titik homoplasmi pada nukleotida ke 1.555 sebanyak 27%, mutasi ini dihubungkan dengan cacat bawaan, serangan ketulian, dan penetrasinya ditunjang dengan keberadaan aminoglikosida. Identifikasi mutasi ini memungkinkan dilakukannya pencegahan, atau setidaknya penundaan untuk subjek yang rentan serangan ketulian melalui pencegahan keberadaan aminoglikosida dan hal ini menjadi sangat penting terutama di negara yang menggunakan *streptomycin* dalam pengobatan TBC (Gardner *et al.*, 1997).

Tampakan klinis yang berhubungan dengan disfungsi mtDNA sangat banyak dan sangat sulit untuk mengatasi masalah genetika klinis ini secara umum. Terkadang latar belakang keluarga sangat menunjang identifikasi, namun seringkali juga kasusnya tidak berhubungan. Sebagai contoh adalah latar belakang aborsi spontan dan kematian neonatal biasa dijumpai pada penyakit mitokondria, namun seringkali pewarisan mitokondria dibingungkan dengan pewarisan dominan, resesif, atau pewarisan yang berhubungan dengan jenis kelamin (Mansergh *et al.*, 1999). Tinjauan terhadap latar belakang keluarga terkadang mempersulit bila terjadi tampakan relatif yang tidak spesifik dari beberapa penyakit mitokondria karena begitu banyaknya keluarga yang anggota keluarganya memiliki riwayat diabetes, *stroke*, penyakit jantung,

dan migren. Dan dari sudut pandang praktis, sangat penting untuk mempertimbangkan etiologi mitokondria dalam kasus penyakit multisistem apa pun, khususnya bila melibatkan sistem pusat saraf (Chinnery *et al.*, 1999).

Menurut *review* yang dilakukan Chinnery *et al.* (1999) tampakan jelas penyakit mitokondria lebih umum ditemukan pada orang dewasa dibandingkan pada anak-anak yang mungkin menunjukkan tampakan yang berbeda. Pada periode neonatal, penyakit mitokondria dapat muncul sebagai *metabolic encephalopathy* dengan kegagalan pada hati dan jantung, sebagaimana *lactic acidosis* (Munnich *et al.*, 1996). Kebanyakan dari bayi ini mengalami kematian, tetapi sangat penting membuat diagnosis yang akurat karena tampakan ini hampir sama dengan defisiensi *pyruvate dehydrogenase complex* (PDC) *X-linked*, atau penyakit metabolismik yang potensial untuk diobati seperti defisiensi *boitnidase*. Oleh karena itu, diagnosis yang lebih akurat dari etiologi mitokondria harus menyediakan konseling genetik dan diagnosis prenatal (Brown *et al.*, 1994).

Anak dengan usia lebih tua yang mengalami gejala *encephalopathy* (kejang dan koma), tanda-tanda *prominent brain stem* (pergerakan mata yang aneh dan *ataxia*), dan *extrapyramidal disease* (*dystonia* dan *corhea*) diperkirakan adalah mengalami *Leigh syndrome* (juga disebut *subacute necrotising encephalopathy*). Anak-anak ini seringkali memiliki *neuroimaging* yang khas pada

CT, dengan hipodensitis di dalam *basal ganglia* (Jackson *et al.*, 1996).

*Leigh syndrome* dapat diakibatkan kerusakan gen inti, biasanya autosom resesif, tetapi terkadang juga disebabkan defisiensi *X linked PDC* atau kerusakan mtDNA (suatu mutasi titik pada gen *ATPase6* mitokondria) (Dimauro *et al.*, 1996). Anak yang memiliki penyakit mitokondria dapat juga muncul dengan anemia *sideroblastik*, *panytopenia*, dan kegagalan pankreas eksokrin (sindrom Pearson) (Rotig *et al.*, 1990). Terakhir, anak dengan kerusakan mitokondria dapat muncul dengan tampakan yang tidak spesifik seperti tidak berkembang baik dan pertumbuhannya lambat. Seringkali sulit memutuskan kapan harus memeriksa pasien ini diperiksa lebih intensif dan karena investigasi yang paling memuaskan bersifat invasif, penyebab lainnya yang dapat diobati harus dikesampingkan sebelum memulai serangkaian pemeriksaan untuk penyakit mitokondria.

Tampakan klinis di atas seringkali mengalami *overlap* (penumpukan), artinya beberapa penyakit yang berbeda dapat menunjukkan beberapa tampakan klinis yang sama.

**Tabel 3.3** Tampakan-tampakan klinis yang mengalami *overlap* dari sindrom-sindrom mutasi DNA mitokondria (Chinnery *et al.*, 1999).

Tampakan klinis	MELAS	MERRF	NARP	CPEO	LHON
Ophtalmoplegia	+/ -	-	-	+	-
Degenerasi retina	-	-	-	+	-

Tampakan klinis	MELAS	MERRF	NARP	CPEO	LHON
Retinitis pigmentosa	-	-	+	-	-
<i>Optic atrophy</i>	-	-	-	-	+
Heart block	-	-	-	+	-
Myoclonus	-	+	+	-	-
Ataksia	-	+	+	+	-
<i>Weakness</i> (kelemahan)	+	+	+	+	-
<i>Seizures</i> (kejang)	+	+	+	-	-
Demensia	+	+	+	+	-
Short stature	+	+	-	+	-
M u n t a h - m u n t a h berkala	+	-	-	-	-
Cortical blindness	+	-	-	-	-
H e m i p a r e s i s , hemianopia	+	-	-	-	-
Sensorineural hearing loss	+	+	+	+	-
Neuropathy	+/-	+/-	+	+/-	-
Spongy degeneration	+	+	-	+	-
Lactic acidosis	+	+	+/-	+	-
Protein CSF > 100 mg/ ml	-	-	-	+	-
Ragged red fibres	+	+	-	+	-
Riwayat keluarga positif	+	+	+	-	

Tampakan klinis yang mengalami *overlap* ini seringkali membingungkan dan berpotensi besar untuk terjadinya kesalahan diagnosis. Karena itu, diperlukan serangkaian pemeriksaan secara

menyeluruh terhadap pasien penderita penyakit mitokondria untuk mendapatkan diagnosis yang tepat (Chinnery *et al.*, 1999).

## Hubungan Penyakit Mitokondria dengan Stres Oksidatif

Mitokondria memproduksi ROS dalam bentuk oksigen singlet ( ${}^1\text{O}_2$ ) melalui transfer energi atau menghasilkan produk reduksi yang tidak sempurna yaitu anion radikal superoksida ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) melalui transfer elektron pada proses fosforilasi oksidatif (Mohora *et al.*, 2007).

Superoksid  $\bullet\text{O}_2^-$  telah terbukti secara *in vitro*, melalui penelitian yang dilakukan oleh Vasquez-Vivar *et al.* (2000), dapat bereaksi dengan besi pada kompleks besi-sulfur yang menempati sisi aktif *acotinase*, enzim dalam siklus asam trikarboksilat. Reaksi tersebut menghasilkan ion  $\text{Fe}^{2+}$ . Ion  $\text{Fe}^{2+}$  selanjutnya akan bereaksi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  menghasilkan radikal hidroksi ( $\bullet\text{OH}$ ) yang lebih reaktif dibandingkan dengan ion  $\bullet\text{O}_2^-$  (Pieczenik & Neustadt, 2007). Reaksi tersebut dikenal sebagai reaksi Fenton (Taniyama & Griendling, 2003). Selain itu, dihasilkan juga nitrat oksida (NO) yang dibentuk oleh enzim *mitochondrial nitric oxide synthase* (mtNOS) yang bebas berdifusi dari sitosol menuju mitokondria. NO bereaksi dengan radikal  $\bullet\text{O}_2^-$  membentuk radikal *peroxinitrite* ( $\bullet\text{ONOO}^-$ ) (Green *et al.*, 2004). Dua radikal ini ( $\bullet\text{OH}$  dan  $\bullet\text{ONOO}^-$ ) bersama dapat menyebabkan gangguan pada mitokondria dan komponen sel lainnya.

“ROS dalam jumlah tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada protein, lipid, dan DNA (Melov, 2000).”

Dalam sel terdapat sistem produksi antioksidan untuk menyeimbangkan ROS. Jika antioksidan tidak dapat diproduksi secara cukup, maka akan terjadi ketidakseimbangan reaksi reduksi-oksidasi dalam sel, dan menyebabkan stres oksidatif. ROS berperan dalam rusaknya jalur ekspresi gen dalam sel (Dröge, 2002). Ringkasan dari proses stres oksidatif dapat dilihat pada Bab II.

Pada penderita diabetes sering mengalami stres oksidatif (Halliwell & Gutteridge dalam Widowati, 2008). Komplikasi diabetes berkaitan dengan stres oksidatif khususnya pembentukan radikal bebas superokksida (Oberley dalam Widowati, 2008). Sumber stres oksidatif pada diabetes di antaranya perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan, di antaranya GSH (Halliwell & Gutteridge dalam Widowati, 2008).

Hiperglikemia akan memperburuk dan memperparah pembentukan ROS melalui beberapa mekanisme. ROS akan meningkatkan pembentukan ekspresi *tumour necrosis factor-α* (TNF-α) dan memperparah stres oksidatif. Stres oksidatif pada

penderita diabetes akan meningkatkan pembentukan ROS di dalam mitokondria yang akan mengakibatkan berbagai kerusakan oksidatif berupa komplikasi diabetes dan akan memperparah kondisi penderita diabetes, untuk itu perlu menormalkan kadar ROS di mitokondria untuk mencegah kerusakan oksidatif (Tiwari dalam Widowati, 2008).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# **BAB IV**

## **PERANAN MUTASI DNA MITOKONDRIA PADA PENYAKIT MITOKONDRIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“

Mutasi titik atau substitusi merupakan mutasi mtDNA yang paling banyak ditemukan pada berbagai gambaran klinis penyakit mitokondria.

”

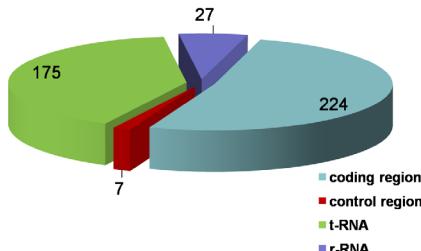
Buku ini tidak diperjualbelikan.

Peranan mutasi mtDNA pada penyakit mitokondria sangat penting untuk dipelajari, seperti yang tercantum pada **Bab III, Tabel 3.1**, yaitu mutasi primer DNA mitokondria. Mutasi titik atau substitusi merupakan mutasi mtDNA yang paling banyak ditemukan pada berbagai gambaran klinis penyakit mitokondria.

Untuk dapat melihat perkembangan penemuan mutasi mtDNA pada penyakit mitokondria, kita dapat menggunakan data base mitomap.

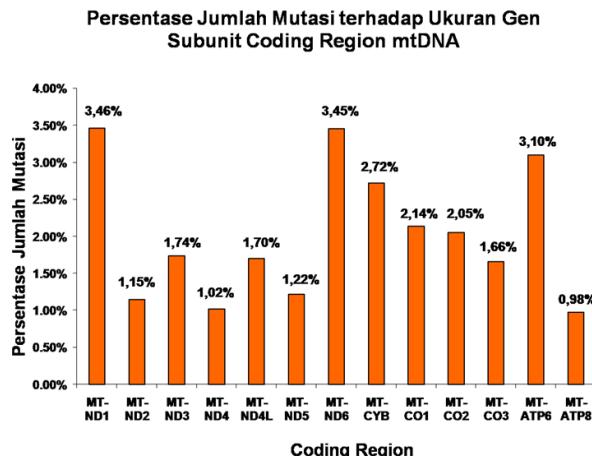
Berdasarkan data mitomapp pada bulan Maret 2010, melaporkan bahwa ada 433 mutasi pada mtDNA yang meliputi 224 mutasi pada daerah pengode (*coding region*) 13 polipeptida kompleks respiration, 175 mutasi pada tRNA, 27 mutasi pada rRNA, dan tujuh mutasi pada daerah pengontrol (*non coding region*) (Gambar 4.1). Hal ini menunjukkan bahwa mayoritas mutasi ditemukan pada daerah pengode untuk subunit-subunit kompleks I, III, IV, dan V (lihat **Bab II**), pada gen tRNA untuk beberapa asam amino yang diperlukan dalam biosintesis 13 polipeptida yang dikode oleh mtDNA serta pada gen rRNA yang memungkinkan akan mempengaruhi proses translasi 13 polipeptida tersebut. Bagaimana peranan mutasi mtDNA terhadap penyakit mitokondria, secara detail akan dijelaskan pada **Bab V** berkaitan dengan patogenetika penyakit mitokondria. Patogenetika tersebut akan menjelaskan bagaimana hubungan peningkatan jumlah mutasi terhadap produk transkripsi (mRNA, tRNA, dan rRNA) yang selanjutnya akan memengaruhi struktur dan stabilitas subunit-subunit *wildtype* kompleks respiration yang dikode oleh mtDNA. Perubahan struktur dan stabilitas akan mempengaruhi aktivitas kompleks enzim

respirasi sehingga mempengaruhi sintesis ATP yang diperlukan oleh sel tertentu (fenotipe).



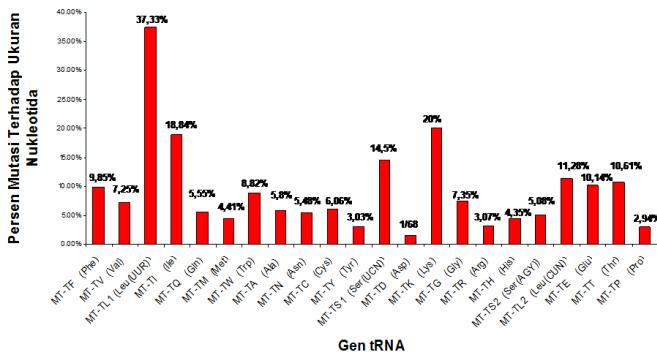
**Gambar 4.1.** Peta jumlah mutasi pada penyakit mitokondria (Mitomap, 2010).

Potensi ditemukannya suatu mutasi pada suatu gen atau daerah tertentu dapat dihitung dengan cara menentukan persentase jumlah mutasi terhadap ukuran gen, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2 dan 4.3. Mutasi yang ditemukan pada daerah pengode 13 subunit, gen *ND1* dan *ND6* untuk kompleks I serta gen *ATP6* untuk kompleks V mempunyai persentase jumlah mutasi di atas 3%. Persentase potensi mutasi terhadap ukuran gen tRNA lebih besar dari pada terhadap ukuran daerah pengode subunit. Di antara 22 gen tRNA, gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* merupakan gen yang mempunyai potensi terbesar ditemukannya mutasi, yaitu sebesar 37,33%.



**Gambar 4.2.** Persentase jumlah mutasi terhadap ukuran gen subunit pada daerah pengode (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).

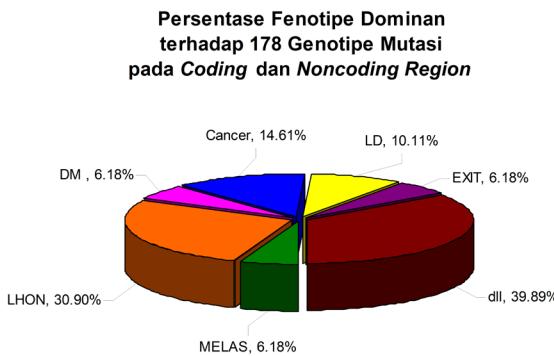
**Percentase Potensi Mutasi terhadap Ukuran Gen tRNA**



**Gambar 4.3.** Persentase jumlah mutasi terhadap ukuran gen tRNA (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).

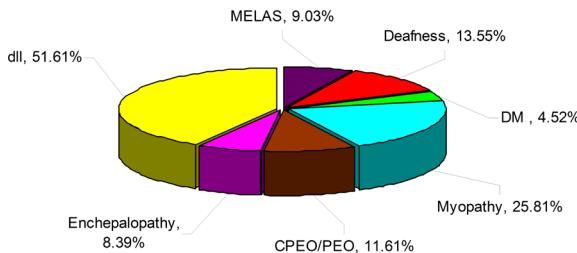
Peranan mutasi mtDNA terhadap penyakit mitokondria pada **Bab IV** ini, akan dibahas dari perhitungan persentase fenotipe (gambaran klinis) dominan sebagai subjek ditemukannya mutasi mtDNA. Hal ini dapat ditunjukkan pada Gambar 4.4 dan 4.5. Fenotipe utama yang ditemukan pada daerah pengode subunit dan pengatur adalah LHON, kanker, Leigh *disease* (LD), MELAS dan diabetes melitus, sedangkan yang ditemukan pada gen tRNA dan rRNA adalah *myopathy*, ketulian (*deafness*), CPEO/PEO, MELAS, encephalopathy, dan diabetes melitus. Yang menarik MELAS dan diabetes mellitus ditemukan pada kedua kelompok gen tersebut.

Gambar 4.4 merupakan gambaran persentase fenotipe dominan pada daerah pengode subunit dan pengatur, menunjukkan bahwa LHON sebagai fenotipe paling dominan yaitu sebesar 30,9% dibandingkan dengan fenotipe-fenotipe lainnya. Gambar 4.5 menunjukkan *myopathy* merupakan fenotipe paling dominan yang ditemukan pada kelompok tRNA dan rRNA, yaitu sebesar 25,81%.



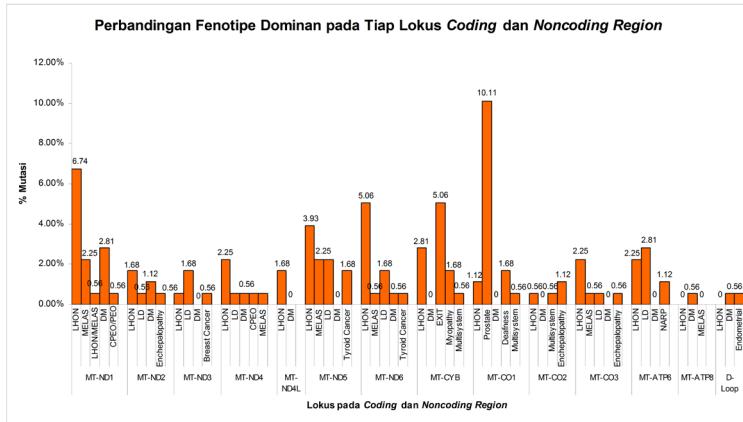
**Gambar 4.4.** Persentase gambaran klinis dominan terhadap genotipe mutasi pada daerah pengode dan pengontrol. (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).

### Persentase Fenotipe Dominan terhadap 155 Genotipe Mutasi pada t-RNA dan r-RNA

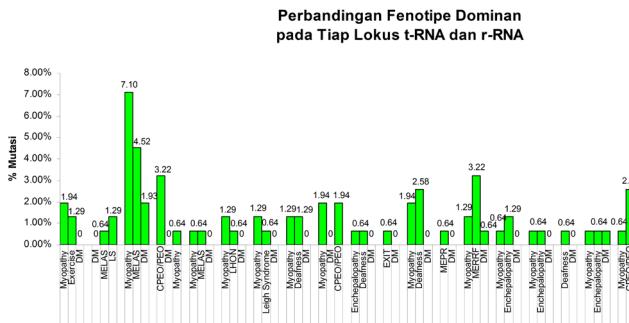


**Gambar 4.5.** Persentase gambaran klinis dominan terhadap genotipe mutasi pada gen tRNA dan rRNA (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).

Perbandingan gambaran klinis dominan pada tiap lokus pada daerah pengode dan pengontrol (Gambar 4.6) menunjukkan bahwa *CO1* dengan fenotipe kanker prostat memiliki persentase tertinggi sebesar 10,11%. Selanjutnya, adalah *ND1* dengan fenotipe LHON dengan persentase 6,74%. Sedangkan perbandingan gambaran klinis dominan pada tiap lokus pada gen *tRNA* dan *rRNA* adalah pada *tRNA<sup>Leu</sup>* dengan fenotipe *myopathy* sebesar 7,10%, yang kedua adalah *12S rRNA* dengan fenotipe ketulian (*deafness*) sebesar 6,45% (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).



**Gambar 4.6.** Perbandingan gambaran klinis dominan pada tiap lokus pada daerah pengode dan pengontrol (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).



**Gambar 4.7.** Perbandingan gambaran klinis dominan pada tiap lokus tRNA dan rRNA (Mitomap, 2010; Maksum *et al.*, 2015).

# **BAB V**

## **PATOGENETIKA PENYAKIT MITOKONDRIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“

Pasien yang mengalami kerusakan mtDNA patogen biasanya memiliki campuran molekul normal dan yang termutasi di dalam sel yang sama (heteroplasmi) (Lightowers *et al.*, 1997).

”

## Proporsi mtDNA Termutasi (*Mutation Load*)

Pasien yang mengalami kerusakan mtDNA patogen biasanya memiliki campuran molekul normal dan yang termutasi di dalam sel yang sama (heteroplasmi) (Lightowers *et al.*, 1997). Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa pada tingkat seluler, proporsi mtDNA termutasi (*mutation load*) menentukan ekspresi fenotipnya karena muatannya harus melebihi tingkat ambang batas kritis sebelum sel mengalami kerusakan biokimia rantai pernapasan (biasanya >85% mtDNA yang termutasi) (Larsson *et al.*, 1995). Tingkat heteroplasmi tidak hanya berbeda antar manusia saja, tapi juga berbeda di dalam manusia itu sendiri. Kompleksitas ini memberi penjelasan tentang bermacam-macam penyakit mitokondria, tetapi juga menyebabkan pemeriksaan penderita penyakit mtDNA jadi lebih sulit (Chinnery, *et al.*, 1999).



Ambang batas mtDNA termutasi ini bervariasi antar jaringan, antarsistem organ, dan antar individu, bergantung pada kebutuhan suatu jaringan atau sistem organ terhadap kebutuhan metabolisme oksidatif.



Jaringan yang membutuhkan metabolisme energi oksidatif tinggi, seperti otak dan otot, memiliki ambang batas yang relatif lebih rendah dan lebih rapuh terhadap mutasi mtDNA sehingga ambang batasnya lebih mudah terlampaui. Akibatnya, berpotensi menyebabkan munculnya penyakit mitokondria. Oleh karena itu, kebanyakan penyakit mitokondria adalah *encephalomyopathy* yang terutama memengaruhi otak dan otot (Chinnery *et al.*, 1999).

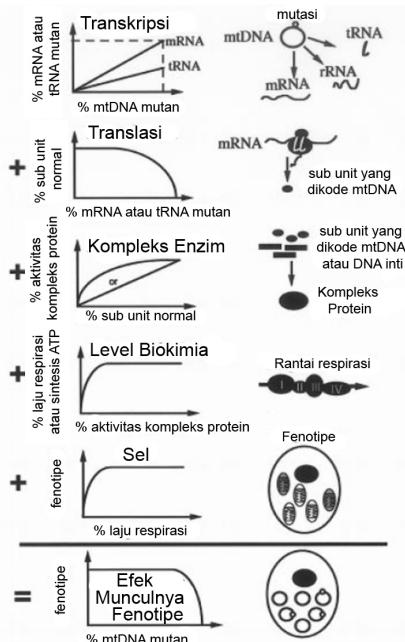
Variabilitas ambang batas dan perbedaan proporsi mtDNA termutasi (*mutation load*) di dalam subjek, menyebabkan variabilitas fenotipe yang merupakan ciri khas kelainan gen tRNA mitokondria. Bila mutasi lebih banyak terdapat dalam salah satu jaringan atau organ maka jaringan atau organ itulah yang akan mengalami kerusakan sehingga menjadi sebuah penyakit, atau bisa saja mutasi itu banyak terdapat pada dua organ atau lebih sehingga fenotipe yang muncul merupakan kombinasi dari organ yang mengalami kerusakan tersebut, seperti pada diabetes yang disertai dengan ketulian (Hammans *et al.*, 1993).

Mutasi titik A3243G misalnya, mutasi ini menjadi penyebab beberapa penyakit mitokondria, di antaranya MELAS, MIDD, *cardiomyopathy*, dan masih banyak lagi. Pada pasien MELAS proporsi mtDNA termutasi lebih banyak terdapat pada otak dan otot, namun pada MIDD *mutation load* lebih banyak pada pankreas dan telinga, sedangkan pada *cardiomyopathy* lebih banyak terdapat pada jantung.

Kerusakan gen inti merupakan penyebab utama penyakit mitokondria, mencakup 30% kasus pada orang dewasa dan bahkan pada kasus anak-anak jumlahnya lebih tinggi. Pada mayoritas pasien, kerusakan gen inti berpengaruh terhadap penyakit mitokondria karena keterlibatan pola rantai respirasi, atau distribusi kerusakan mitokondria pada serat otot tunggal (Chinnery *et al.*, 1999).

Gambar 5.1 menjelaskan tentang hubungan secara kuantitatif pada enam tingkatan ekspresi yang berbeda yang disebabkan mutasi mtDNA: transkripsi, translasi, aktivitas enzim, laju respirasi, aktivitas sel, dan manifestasi klinis (fenotipe). Persentase

mutasi mtDNA akan memengaruhi persentase mutan mRNA, tRNA, dan rRNA. Persentase mutan mRNA atau tRNA akan menyebabkan penurunan jumlah sub unit normal yang dikode mtDNA. Penurunan jumlah sub unit normal akan menyebabkan penurunan persentase aktivitas kompleks protein respirasi sehingga akan menurunkan laju respirasi atau menghambat sintesis ATP. Terganggunya laju respirasi dan sintesis ATP menyebabkan munculnya tampakan klinis (fenotipe), sehingga akhirnya hubungan jumlah mtDNA yang termutasi terhadap munculnya fenotipe tertentu pada penyakit mitokondria dapat ditentukan.



**Gambar 5.1.** Hubungan kuantitatif munculnya fenotipe yang disebabkan oleh mutasi mtDNA (Rossignol *et al.*, 2003).

## Patogenetik Penyakit Mitokondria



Salah satu mutasi mitokondria yang sering ditemukan adalah mutasi substitusi A3243G pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>*.



Mutasi tersebut dapat berkaitan dengan atau menyebabkan MELAS, diabetes melitus dan ketulian atau katarak, *cardiomyopathy*, CPEO, *myopathy*, *gastrointestinal dysmotility*, MERRF, overlap MELAS/MERRF, *Leigh syndrome*, CPEO, atau KSS (Chinnery *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2004; Kirino *et al.*, 2004; Finsterer, 2007). Oleh karena itu, patogenetik penyakit mitokondria yang akan dibahas dalam buku ini adalah berkaitan dengan patogenesis mutasi A3243G.

### Struktur dan Fungsi Fisiologis *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* serta Keadaan Fisiologis Gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* Akibat Mutasi A3243G

Setelah menjalani transkripsi, tRNAs mengalami proses modifikasi pascatranskripsi yang penting, seperti proses lipatan menjadi bentuk *cloverleaf*, metilasi, dan aminoasilasi (Helm *et al.*, 1998).

Gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* merupakan gen yang paling banyak mengalami mutasi yang berhubungan dengan penyakit, khususnya penyakit mitokondria. Sekitar 28 dari 142 mutasi yang berhubungan dengan penyakit mitokondria terjadi pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* (MITOMAP, 2008).

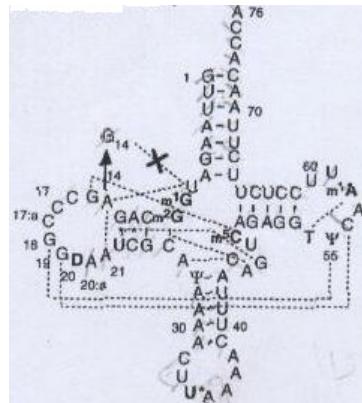
Mutasi yang paling sering terjadi yaitu transisi A ke G pada posisi nukleotida 3243, yang memengaruhi kestabilan struktur, metilasi, aminoasilasi, dan pengenalan kodon gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* tersebut (Finsterer, 2007).

## Kestabilan Struktur

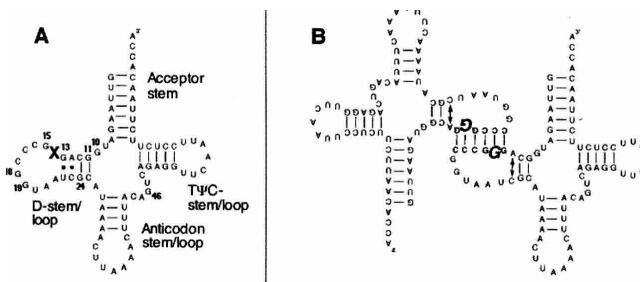
Mula-mula mutasi A3243G ini mengganggu interaksi tersier antara nukleotida pada posisi A14 dan U8, sebuah ikatan yang menstabilkan bentuk tersier *L-shaped* tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Akibatnya, transkripsi tRNA hanya terbentuk sebagian menjadi struktur *L-shaped* dengan sebuah cabang akseptor dan juga sebuah cabang antikodon yang terkulai. tRNA mutan dapat beradaptasi dengan enzim sintase, tetapi menghasilkan proses tRNA yang tidak sesuai dan pematangan enzim yang akan berpengaruh dalam variasi pada jalur biokimia, seperti defisiensi proses pra-tRNA, kesalahan modifikasi basa pascatranskripsi, termasuk proses pada ujung 5', defisiensi aminoasilasi, dan kesalahan translasi.

Terdapat juga indikasi bahwa mutasi A3243g menginduksi sebuah perubahan yang besar pada struktur tRNA kuarter, yang disebabkan pembentukan kompleks dimer pada sebuah urutan heksa-nukleotida palindromik dalam *D-stem/loop* (Wittenhagen & Kelley, 2002).

Pembentukan dimer dan kerusakan pada ikatan A14/U8 akan menyebabkan peningkatan signifikan laju atenuasi aminoasilasi pada mutan A3243g (Roy *et al.*, 2005).



**Gambar 5.2.** Interaksi tersier antara nukleotida A14-U8-A21. Posisi nukleotida A14 pada tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> adalah posisi nukleotida 3243 pada mtDNA. Adanya mutasi A3243g mengakibatkan interaksi tersier A14-U8-A21 terganggu (Helm *et al.*, 1998).



**Gambar 5.3.** Struktur sekunder tRNA<sup>Leu</sup> dari gen tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mtDNA manusia.

- A. Struktur dari gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* mtDNA manusia.  
Tanda "X" menunjukan lokasi mutasi A3243g (A14G).

- B. Skema dari kompleks dimer yang terbentuk oleh adanya mutasi A3243g pada gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* mtDNA manusia. Basa yang mengalami mutasi ditunjukkan dengan huruf tebal (Wittenhagen & Kelley, 2002).

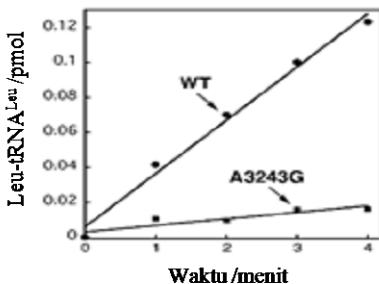
Penelitian Roy *et al.* (2005) mengenai dimer tRNA ini dalam berbagai kondisi fisiologis seperti keterkaitan dimer dengan konsentrasi ion magnesium dan suhu, menunjukkan bahwa dimer akibat mutasi ini dipengaruhi oleh suhu, di mana dimer menjadi lebih efektif pada kondisi suhu fisiologis (37 °C). Pembentukan kompleks dari tRNA mutan juga dipengaruhi oleh jumlah ion magnesium dan terjadi pada konsentrasi yang terdapat dalam intraselular.

Efek delesi dari mutasi ini dalam tingkat molekular ditemukan dapat berkontribusi terhadap gangguan fungsi tingkat selular dan mengakibatkan penurunan dalam modifikasi tRNA, aminoasilasi tRNA (grafik ditunjukkan pada Gambar 5.4), dan otomatis pada proses sintesis protein (protein prematur).

## Aminoasilasi

Mutasi A3243G meningkatkan reduksi pada leusil-tRNA sintase dan juga menyebabkan penurunan yang signifikan terhadap kapasitas dari aminoasilasi tRNA tersebut (Sohm *et al.*, 2003).

Selain itu, mutasi A3243g juga dapat menghambat aminoasilasi dari gen *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* yang bersifat normal (*wild type*) (Hao, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Kelley & Wittenhagen pada tahun 2002 juga menunjukkan pengaruh mutasi A3243g terhadap laju aminoasilasi tRNA *Leu(UUR)*.

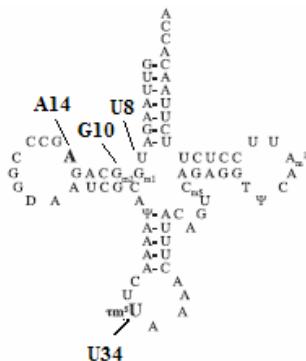


**Gambar 5.4.** Pengaruh adanya mutasi A3243g terhadap proses aminoasilasi. Uji aminoasilasi ini dilakukan pada pH 7 dan 37 °C. Dari grafik dapat dilihat bahwa aminoasilasi tRNA normal lima kali lebih besar dibandingkan dengan tRNA mutan A3243G (Wittenhagen & Kelley, 2002).

## Metilasi

Mutasi A3243g dapat memengaruhi proses metilasi pada posisi nukleotida G10.

Nukleotida A pada posisi 3243 berperan penting pada proses pengenalan terhadap metiltransferase sehingga jika proses tersebut tidak terjadi maka metilasi pun tidak akan terjadi. Metilasi pada posisi nukleotida ini sangat penting karena jika gugus metil tunggal tersebut tidak ada, maka akan memengaruhi sifat pengikatan tRNA terhadap elemen lainnya yang berperan dalam mesin sintesis protein mitokondria (Helm *et al.*, 1998). Hal ini menyebabkan kecacatan fungsi dari enzim-enzim pengkode mitokondria, seperti leusil-tRNA-sintase dan protein faktor elongasi (Wilichowski, 1998).

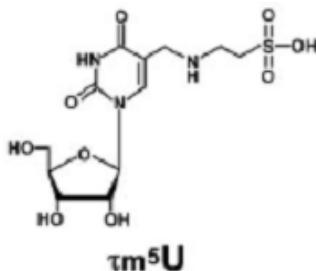


**Gambar 5.5.** Posisi nukleotida G10 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (G<sub>m2</sub>). Metilasi nukleotida G10 tersebut berperan pada sifat pengikatan tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> pada elemen lain dalam mesin sintesis protein mitokondria (Helm *et al.*, 1998).

## Pengenalan Kodon

Mutasi A3243g menghambat modifikasi taurin normal pada 5-metiltaurinouridin ( $\text{tm}^5\text{U}$ ) pada posisi pertama (*wobble position*) dari antikodon. Modifikasi uridin adalah penempelan gugus metiltaurin terhadap uridin (U34) pada posisi C5.

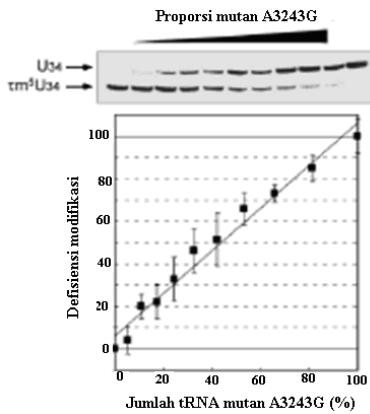
Mutasi A3243g (A $\rightarrow$ G posisi A14) menyebabkan terganggunya interaksi tersier tRNA antara U8-A14-A21 sehingga modifikasi uridin pun terganggu. Sedangkan, modifikasi uridin pada posisi *wobble* dibutuhkan untuk pengenalan kodon secara tepat dan efisien, kekurangan modifikasi taurin menghasilkan defisiensi translasi, khususnya defisiensi pengodean UUG, terminasi dari elongasi polipeptida, pembentukan protein prematur, penurunan laju sintesis protein, penurunan aktivitas enzim, dan kecacatan yang fatal pada proses respirasi (Suzuki *et al.*, 2004; Kirino *et al.*, 2005; Yasukawa *et al.*, 2005).



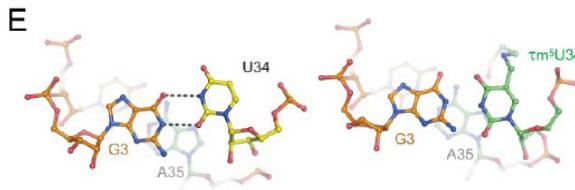
**Gambar 5.6.** Struktur 5-metiltaurouridin ( $\text{tm}^5\text{U}$ ) (Kurata, 2008).

Semakin banyak jumlah mutan A3243g menyebabkan jumlah uridin termodifikasi pun akan semakin berkurang, seperti ditunjukkan pada Gambar 5.7.

Modifikasi uridin ini berpengaruh terhadap proses interaksi antara antikodon AUU dengan kodon UUG. Modifikasi uridin ini mengakibatkan interaksi antara U pada antikodon dan G pada kodon semakin kuat bila dibandingkan dengan interaksi U yang tidak termodifikasi (Kurata 2008).



**Gambar 5.7.** Pengaruh mutasi A3243g terhadap defisiensi modifikasi uridin. Dari grafik dapat dilihat bahwa semakin banyak jumlah mutan A3243g akan menyebabkan defisiensi modifikasi uridin akan semakin banyak (Kirino *et al.*, 2005).



**Gambar 5.8.** Perbandingan interaksi yang terjadi antara  $\text{tm}^5\text{U}$ -G (kanan) dan U-G (kiri). Interaksi yang terjadi antara  $\text{tm}^5\text{U}$ -G lebih stabil dibandingkan intraksi U-G (Kurata, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Kirino *et al.* pada tahun 2005 menunjukkan adanya pengaruh mutasi A3243g terhadap defisiensi modifikasi uridin di posisi *wobble* pada penderita MELAS. Defisiensi modifikasi uridin di posisi wobble ini akan mereduksi translasi kodon UUG tetapi tidak akan berpengaruh pada translasi kodon UUA. Ketidaknormalan proses translasi kodon UUG tersebut memegang peranan penting dalam patogenesis MELAS. Penyebabnya, berkurangnya kodon UUG akan berpengaruh pada gen yang kaya akan Leu(UUG) seperti *ND6* kemudian akan menyebabkan defisiensi kompleks I pada rantai respirasi sehingga proses respirasi pun tidak berjalan normal.

**Tabel 5.1** Jumlah kodon Leusin pada mtDNA yang mengode 13 gen protein. (Kirino *et al.*, 2004).

Gen	$\Sigma$ Asam Amino	$\Sigma$ Kodon CUN	$\Sigma$ kodon UUA	$\Sigma$ Kodon UUG	% Kodon UUG dari Seluruh Leusin/%	%Kodon UUG dari Total Asam Amino/%
<i>ND1</i>	318	57	5	1	1.6	0.3
<i>ND2</i>	347	55	8	1	1.6	0.3
<i>ND3</i>	115	18	10	1	3.4	0.9
<i>ND4</i>	459	87	8	1	1.0	0.2
<i>ND4L</i>	98	22	1	0	0.0	0.0
<i>ND5</i>	603	95	7	2	1.9	0.3

Gen	$\Sigma$ Asam Amino	$\Sigma$ Kodon CUN	$\Sigma$ kodon UUA	$\Sigma$ Kodon UUG	% Kodon UUG dari Seluruh Leusin/%	%Kodon UUG dari Total Asam Amino/%
<b><i>ND6</i></b>	174	3	8	8	<b>42.1</b>	<b>4.6</b>
<i>CYT B</i>	378	55	7	2	3.1	0.5
<i>COX I</i>	513	55	7	0	0.0	0.0
<i>COX II</i>	227	28	4	1	3.0	0.4
<i>COX III</i>	260	31	3	0	0.0	0.0
<i>ATPAse6</i>	226	39	4	1	2.3	0.4
<i>ATPAse8</i>	68	8	1	1	10.0	1.5

Catatan: Cetak tebal menunjukkan gen yang mengkode leusin terbesar.

## Dampak dari Mutasi A3243G

Secara umum, mutasi A3243G ini menyebabkan laju glikolisis tinggi, meningkatkan produksi laktat, mengurangi oksidasi glukosa, mengganggu respons NADH, menurunkan potensial membran mitokondria, mengurangi produksi ATP, mengacaukan penanganan kalsium sel dengan meningkatkan jumlah kalsium sitosoliknya, meningkatkan jumlah ROS (*reactive oxygen species*) di dalam sel, mengurangi sekresi insulin, penuaan dini, dan deregulasi gen yang terlibat dalam metabolisme gugus amino dan urea genesis (Finsterer, 2007).



# **BAB VI**

## **INVESTIGASI PENYAKIT MITOKONDRIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“ Investigasi terbagi ke dalam dua kelompok utama: (1) investigasi umum yang digunakan untuk mengumpulkan bukti-bukti pola dan sifat berbagai organ yang terlibat dalam penyakit mitokondria; (2) investigasi spesifik untuk mencari bukti genetik biokimia/molekul dari abnormalitas mitokondria. ”

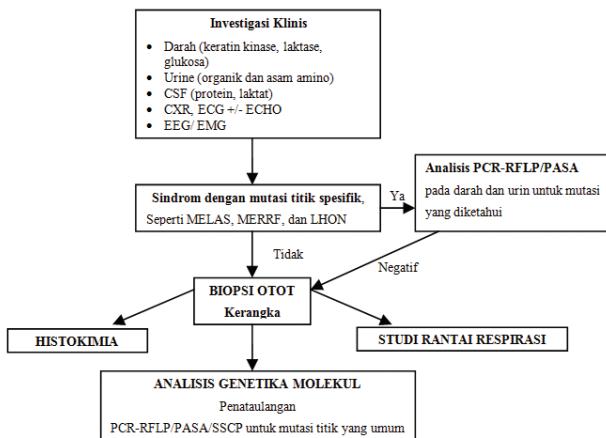
Buku ini tidak diperjualbelikan.

# Pemeriksaan Pasien yang Diduga Memiliki Penyakit DNA Mitokondria

Pengobatan terhadap penyakit mitokondria baru diperkenalkan, namun spesialisasi klinis yang penting ini perlu untuk terus mengalami pengembangan.

Uji biokimia dan genetika molekul dapat menunjang kepastian diagnosis klinis. Akan tidak tepat bila analisis mtDNA dilakukan sebagai diagnostik awal karena fenotipe yang sama dapat diakibatkan oleh berbagai macam mutasi yang berbeda.

Sebagai contoh, setidaknya ada 11 mutasi patogenis berbeda telah diidentifikasi pada gen *tRNA<sup>Leu</sup>* mitokondria, beberapa di antaranya menyebabkan MELAS. Karenanya penting untuk mengikuti langkah pemeriksaan terstruktur yang ditunjang oleh latar belakang keluarga dan temuan dari pemeriksaan klinis, seperti dapat dilihat pada Gambar 6.1. Investigasinya terbagi ke dalam dua kelompok utama: (1) investigasi umum yang digunakan untuk mengumpulkan bukti-bukti pola dan sifat berbagai organ yang terlibat dalam penyakit mitokondria; (2) investigasi spesifik untuk mencari bukti genetik biokimia/molekul dari abnormalitas mitokondria.



**Gambar 6.1.** Tahapan investigasi penyakit DNA mitokondria (Chinnery *et al.*, 1997).

## Investigasi Klinis Umum

Biasanya, penyakit mitokondria baru mulai dipertimbangkan setelah berbagai diagnosis penyakit lainnya tidak tepat digunakan.

Oleh karena itu, para pasien biasanya telah melakukan beberapa tes diagnostik sebelum akhirnya menjalani uji penyakit mtDNA. Sangat penting untuk memeriksa fungsi jantung (*cardiac*) melalui ECG dan *echocardiography*, serta untuk menjalani uji toleransi *oral glucose* akibat tingginya prevalensi komplikasi jantung dan diabetes pada pasien penderita penyakit mitokondria. Berdasarkan penelitian Jackson *et al.* (1995), pasien yang mengalami kerusakan rantai pernapasan mitokondria terkadang mengalami peningkatan kadar laktat dalam darah, tetapi perlu diingat bahwa terdapat

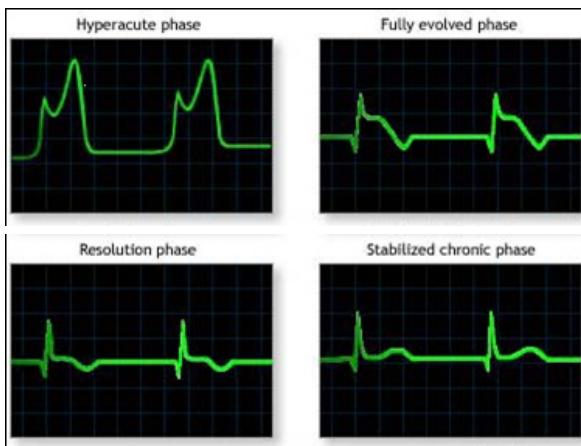
sejumlah hal lain yang dapat menyebabkan peningkatan kadar laktat dalam darah. Selain itu, banyak pasien yang mengalami kerusakan mitokondria akut memiliki kadar laktat yang normal dalam darahnya (khususnya pada usia dewasa). Oleh karena itu, uji ini tidak spesifik ataupun sensitif untuk penyakit mitokondria, tetapi penting untuk dilakukan.

Kenaikan laktat CSF adalah uji yang lebih spesifik untuk penyakit mitokondria dengan terlibatnya saraf pusat, meskipun banyak juga penyakit neurologis lainnya yang bukan penyakit mitokondria mengalami kenaikan laktat CSF (*lactic acidosis*) (misalnya *seizures*, migren, dan *thromboembolic stroke*). Serum kreatin kinase bisa saja meningkat, tetapi sering juga normal (Jackson *et al.*, 1995), sekalipun pasien memiliki *proximal myopathy*. Kadar organik dan asam amino dalam urin dapat abnormal pada pasien yang mengalami disfungsi mitokondria (Shoffner *et al.*, 1995). Setiap pasien dengan gejala *seizures* (kejang) atau penurunan kognitif seharusnya menjalani tes EEG (*electroencephalogram*) yang dapat menunjukkan aktivitas *seizures* atau *slow waves suggestive* dari *encephalopathy* sub-akut. CT-scan otak juga seharusnya dilakukan untuk dapat menunjukkan *calcified basal ganglia* (Gambar 6.2) atau hipodensitas bilateral dan *atrophy*, yang merupakan indikator diagnosis yang penting bagi penyakit mitokondria (Van der Knaap *et al.*, 1996). Pada pasien yang menunjukkan tanda tertentu pada batang otak (*brain stem signs*) dan *stroke-like episodes* sebaiknya dilakukan tes MRI (*Magnetic Resonance Imaging*). Abnormalitasnya seringkali tidak spesifik (*cerebral* dan *cerebellar atrophy*) (Wray *et al.*, 1995), tetapi dapat mengindikasikan kerusakan mtDNA (Matthews *et al.*, 1991).



**Gambar 6.2.** CT-Scan yang menunjukkan klasifikasi ganglia basal bilateral pada pasien yang mengalami mutasi A3243G pada penderita MELAS (Van der Knaap, 1996).

Pasien penyakit mitokondria sering memiliki *neuropathy* subklinis, bahkan dengan bukti klinis otot, *electromyogram* (EMG) mungkin normal. Setiap pasien yang diduga memiliki penyakit mitokondria harus diukur kadar glukosa puasanya dan dilakukan uji toleran glukosa. Mereka juga sebaiknya melakukan tes ECG. Jika ada gejala dan tanda keterlibatan *cardiac*, *echocardiogram* harus dilakukan.



**Gambar 6.3** Gelombang pada ECG setelah serangan *myocardial* pada pasien *cardiomyopathy*. *Hyperacute phase* dimulai sesaat setelah serangan jantung. *Fully*

*evolved phase* dimulai beberapa jam sampai beberapa hari setelah serangan jantung. *Resolution phase* muncul beberapa minggu setelah serangan jantung. *Stabilized chronic phase* merupakan fase terakhir dan biasanya mengalami perubahan patologis permanen dibandingkan dengan ECG normal.

## Investigasi Spesifik: Histokimia, Biokimia, dan Genetika Molekul

Setelah bukti-bukti klinis organ yang terlibat dalam penyakit mitokondria didapatkan, langkah selanjutnya adalah memeriksa apakah pasien tersebut menderita penyakit yang termasuk ke dalam salah satu sindrom spesifik yang disebabkan oleh mutasi titik mtDNA dengan dilakukannya analisis mutasi titik mtDNA yang sudah diketahui.

Analisisnya dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode PCR seperti PCR-RFLP dan PASA. Untuk beberapa penyakit mitokondria, diagnosis akurat dapat dilakukan dengan *screen* genetika molekul sederhana. Misalnya, 95% pasien LHON memiliki salah satu dari 3 mutasi titik mtDNA, yaitu A11778G (Wallace *et al.*, 1988), A3460G (Howell *et al.*, 1991), dan T14484C pada rantai ringan (L) mtDNA (de Vries *et al.*, 1996). Pasien-pasien ini memiliki kadar mutasi yang tinggi dalam darah sehingga sangat tepat memakai darah untuk analisis genetika molekul dengan analisis PCR-RFLP. Pada penderita MERRF tingkat mutasi titik mtDNA pada gen *tRNA<sup>Lys</sup>* posisi 8344 sangat tinggi, diagnosisnya dapat dilakukan dengan pemeriksaan sampel darah (Hammans *et al.*, 1993). Sebaliknya, pasien MELAS dengan mutasi A3243G seringkali memiliki tingkat mtDNA termutasi rendah pada darah. Akibatnya, 1

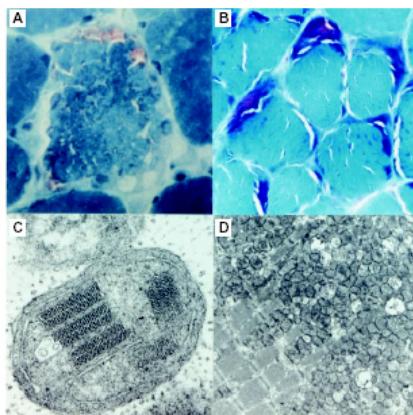
dari 20 pasien MELAS tidak dapat terdeteksi oleh pendekatan PCR-RFLP konvensional (Chinnery *et al.*, 1997). Untuk kasus seperti ini dapat dilakukan analisis dengan metode PASA (PCR *Amplification of Specific Alleles*) yang dapat mengidentifikasi mutasi heteroplasmi yang tingkat heteroplasminya rendah. Delesi mtDNA yang menyebabkan CPEO dan sindrom *Kearns-Sayre* biasanya tidak dapat terdeteksi pada darah. Oleh sebab itu, hasil dari tahapan genetika mtDNA sederhana tersebut harus diinterpretasikan dengan lebih hati-hati.

Bila dugaannya cukup kuat bahwa pasien tersebut memiliki penyakit mitokondria, setelah menjalankan tes darah, maka pasien yang hasilnya negatif pada darah harus diperiksa lebih lanjut. Pemeriksaan ini biasanya melibatkan biopsi otot rangka. Prosedur ini terlihat sangat efektif, khususnya bila gejala-gejala dan tandatandanya kecil. Bagaimanapun, *needle biopsy* (biopsi jarum) tidak berbahaya dan dapat dilakukan dengan bius lokal. Prosedurnya memakan waktu 45 menit dan tanpa efek samping yang berbahaya.

Analisis otot menjadi dasar pemeriksaan pasien yang diduga menderita penyakit mitokondria. Analisis histokimia mungkin menunjukkan akumulasi *subsarcolemmal* mitokondria (disebut juga RRFs/*ragged red fibres*).

Namun, RRF ini merupakan temuan yang relatif non-spesifik, karena juga terlihat pada berbagai macam penyakit otot (Hirano *et al.*, 1996) dan juga pada otot yang diambil dari atlet yang sehat. Serupa dengan hal tersebut, mikroskopik elektron mungkin menunjukkan abnormalitas mitokondria dengan inklusi parakristalin, namun hal ini juga relatif non-spesifik (Morgan & Hughes, 1994).

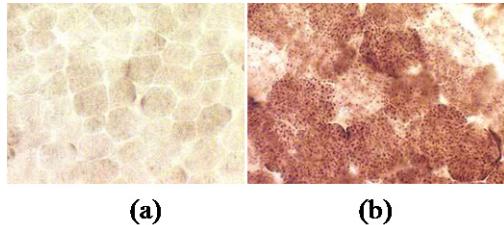
Sebaliknya, histokimia otot mungkin menunjukkan serat yang kekurangan sitokrom c oksidase (COX, kompleks IV) yang mengindikasikan disfungsi mitokondria. Pengujian rantai pernapasan mungkin juga menunjukkan terjadinya kerusakan (Johnson & Barron, 1996). Salah satu dari abnormalitas ini juga memastikan apakah seseorang menderita penyakit mitokondria, dan pola abnormalitasnya memberi petunjuk penting untuk analisis tambahan.



**Gambar 6.4** Miopati mitokondria pada manusia dan tikus. (A) dan (C) adalah sampel otot rangka dari pasien dengan MERRF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibres*) yang disebabkan mutasi pada gen pengode *tRNA<sup>Lys</sup>* mitokondria. (B) dan (D) adalah sampel otot tikus dengan miopati mitokondria dan *hypertrophic cardiomyopathy* yang dihasilkan dari inaktivasi gen pengode isoform otot hati dari *adenine nucleotide translocator* (ANT1). Gambar menunjukkan serat tunggal (A) atau beberapa serat (B) yang diwarnai dengan *Gomori modified trichrome* untuk menunjukkan *ragged red muscle fibres*. Mikrograf elektron menunjukkan (C) mitokondria abnormal dengan susunan parakristalin dari RRF manusia dan (D) proliferasi abnormal dari mitokondria dan degenerasi elemen kontraktil pada RRF tikus (Wallace, 1988).

Rantai pernapasan mitokondria memiliki komposisi yang tidak biasa, di mana 13 polipeptida esensial disintesis dari gen di dalam mitokondria itu sendiri, tetapi mayoritas polipeptida lainnya disintesis di dalam sitosol dari transkripsi gen inti. Kompleks-kompleks I, III, IV, dan ATP sintase (kompleks V) mengandung subunit mitokondria dan inti, tapi kompleks II murni dari inti. Hal ini berarti pasien yang murni mengalami kerusakan kompleks II pasti mengalami kerusakan gen inti (Taylor *et al.*, 1996), tetapi pasien yang mengalami kerusakan tunggal yang memengaruhi kompleks I, III atau IV, mungkin memiliki kerusakan pada gen inti atau gen mitokondria. Orang dewasa dengan penyakit mitokondria seringkali mempunyai kerusakan berlipat pada kompleks rantai pernapasan. Penemuan ini menyarankan kerusakan yang lebih global dalam biogenesis mitokondria, yang mana seringkali merupakan hasil dari mutasi yang melibatkan gen transfer RNA mitokondria. Bukti lebih jauh dari kerusakan tRNA mtDNA dapat dilihat dari bukti histokimia. Karena tingkat mtDNA mutan bervariasi dari sel ke sel, seringkali memungkinkan untuk melihat pola dari aktivitas dalam otot rangka, dengan beberapa serat negatif untuk COX, kompleks IV pada pasien ini.

*Southern blotting* dari genom DNA, yang diekstrak dari otot rangka, dengan sejumlah enzim restriksi dapat mengidentifikasi delesi atau duplikasi mtDNA. Mutasi titik yang umum dijumpai harus diuji dengan PCR-RFLP atau PASA diikuti dengan *direct sequencing* genom mitokondria. Bila penyusunan ulang heteroplasmi atau mutasi titik patogen yang telah diketahui teridentifikasi, biasanya diagnosis genetika molekul relatif dapat langsung dilakukan. 150 pasien yang diinvestigasi pada penelitian Chinnery *et al.* (1999) memiliki kemungkinan penyakit mitokondria dalam 10 tahun terakhir, hasil positif terdapat pada 46% dari kasus-kasus tersebut.



(a)

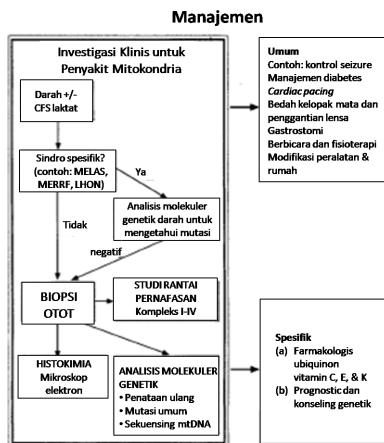
(b)

Gambar 6.5. Mikroskopik elektron. (a) COX deficient fibres dan (b) COX normal.

Data selengkapnya mengenai rangkuman kegiatan investigasi dan manajemen penyakit mitokondria dapat ditunjukkan pada Gambar 6.6. Gambar tersebut menjelaskan bagaimana hubungan investigasi sistemik dengan gambaran klinisnya (Gambar 6.6 (a)) yang selanjutnya bagaimana manajemen investigasi klinis dilakukan, baik secara umum maupun secara spesifik (farmakologis, *prognostic*, dan genetik (Gambar 6.6 (b)).

Gambaran Klinis		Investigasi Sistemik
	<i>Encephalopathy/stroke-like</i> episodes, seizures, myoclonus, ataxia, dementia, migraine	→ ECG CT/MRI Kolektoran lumbar
	Optaloplegia eksternal, retinopati pigmentosa, atropi optik, katarak	→ Grafik Hess Fotografi retina Perimetri
	Ketulan sensorineural	→ Audiometri BSERA
	Mopati Neuropati	→ Elektromiografi dan studi konduski saraf
	Hipoparatiroid Hipotiroid	→ Uji fungsi tiroid Level hormon paratiroid dengan biomikina tulang
	Kardiomioti Kekelainan konduski Kerusakan pernafasan <i>Sleep apnoea</i>	→ ECG/24 jam monitoring Echokardiogram X-ray dada Studi tidur
	Diabetes melitus Kegagalan pankreas eksokrin	→ Puasa glukosa, HbA1c Uji toleran glukosa Studi pankreas eksokrin
	<i>Disphagia</i> Dismotilitas Malabsorpsi Gagal hati	→ Uji fungsi hati Endoskopi Studi barium Uji asam lemak pernafasan
	Kecacatan tubular ginjal Sindrom Toni-Fanconi-Debre	→ Urea dan elektrolit Ultrasound ginjal <i>Clearance creatinine</i> Urea organik dan asam lemak
	Infertilitas	→ Analisa LSH/FSH, Estrogen & Progesteron, Estosteron, & semen

Gambar 6.6. (a) Tampakan klinis dan investigasi sistemik penyakit mitokondria (Chinnery & Turnbull, 1997).



**Gambar 6.6.** (b) Tampakan Klinis, Investigasi dan Penanganan Penyakit Mitokondria (Chinnery & Turnbull, 1997).

## Penggunaan PCR untuk Deteksi Mutasi DNA Mitokondria

PCR dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi DNA mitokondria dalam pelaksanaan manajemen investigasi penyakit mitokondria.

(Gambar 6.1)

Penggunaan PCR tersebut dapat dikelompokkan ke dalam dua kelompok penggunaan, yaitu untuk mendeteksi mutasi yang sudah diketahui dan menentukan mutasi baru (*novel mutation*).

### Deteksi Mutan yang Sudah Diketahui

Mutasi mtDNA yang sudah diketahui dapat dideteksi dengan metode PCR yang dikombinasikan dengan *single strand conformation polymorphism* (SSCP), *restriction fragment length polymorphism*

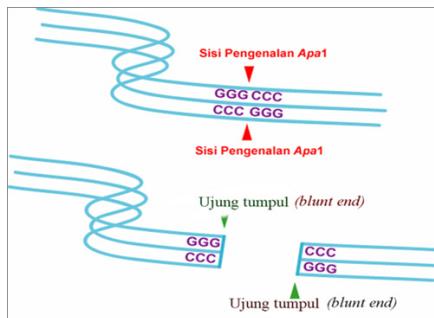
(RFLP), gel elektroforesis dengan gradien temperatur, atau menggunakan metode gelelektroforesis dengan gradien denaturasi. Metode yang lebih sensitif lagi dengan menggunakan kombinasi PCR spesifik alel (PASA) dan *peptide nucleic acid-directed PCR clamping*. Metode yang paling sering digunakan dalam mencari DNA yang termutasi dengan limit deteksi terendah dan akurasi tertinggi adalah SSCP (Finsterer, 2007). Menggunakan PASA yang hanya mengamplifikasi mtDNA mutan dan menghalangi amplifikasi mtDNA normal dapat digunakan mendeteksi mutasi dengan konsentrasi rendah seperti di dalam darah (Finsterer, 2007). Tingkat mutasi dapat dilihat menggunakan *real time amplification refractory mutation system qPCR*, dengan *TaqMan probe*, metode hibridisasi spesifik alel menggunakan oligonukleotida radioaktif, atau dengan *pyrosequencing*.

Pada buku ini akan dibahas beberapa penggunaan metode PCR untuk analisis mutasi yang berkaitan dengan fenotipe MIDD dan katarak, seperti mutasi A3243G yang merupakan beberapa hasil penelitian penulis.

## Analisis PCR-RFLP

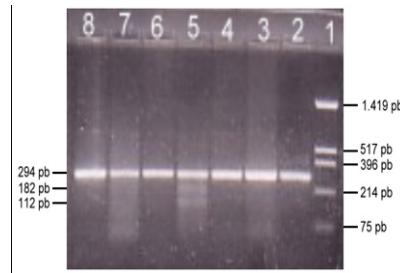
Untuk mengidentifikasi adanya mutasi A3243G mtDNA dengan metode PCR-RFLP dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *Apal* dari bakteri *Acetobacter pasteurianus sub* yang mempunyai sisi pengenalan nukleotida GGGCCC.

Hasil pemotongan *Apal* berupa ujung tumpul (*blunt end*), artinya enzim ini akan memotong enam urutan nukleotida untai ganda dan sisi pengenalannya tepat di tengah.



Gambar 6.7. Sisi pengenalan enzim Rrestriksi *ApaI*.

Templat mtDNA 294 pasang basa (pb) dimurnikan dengan presipitasi etanol kemudian direaksikan dengan enzim *ApaI* pada 37 °C selama semalam. Hasil karakterisasi dengan *ApaI* dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2% (b/v) dengan penandaan EtBr. Hasil karakterisasi elektroforesis gel agarosa lajur 5 menunjukkan adanya tiga pita, dua pita hasil pemotongan enzim restriksi *ApaI*, yaitu 182 dan 112 pb, dan satu pita utuh 294 pb, pemotongan ini menunjukkan adanya mutasi A3243G (Gambar 6.8).



Gambar 6.8. Elektroforegram hasil PCR-RFLP. Karakterisasi hasil PCR-RFLP tujuh sampel (lajur 2-8) dengan elektroforesis gel agarosa 2%(b/v) menggunakan penanda kontrol pUC/*Hinf*I (lajur 1). Sampel pada lajur 5 yaitu sampel positif menunjukkan adanya tiga pita yaitu fragmen utuh 294 pb, berikut dua pita 182 pb dan 112 pb yang diperkirakan merupakan hasil pemotongan enzim restriksi *ApaI* (Maksum, 2004).

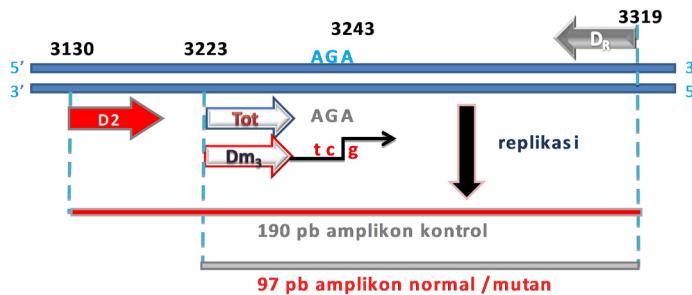
Urata *et al.* (2001) menyatakan bahwa identifikasi mutasi A3243G dengan metode PCR-RFLP menggunakan enzim *Apal* dan penandaan etidium bromida hanya dapat mendeteksi level heteroplasmi 5-10% sedangkan diabetes melitus yang disebabkan mutasi A3243G mtDNA memiliki level heteroplasmi 1-2% sehingga terkadang mutasi ini tidak terdeteksi dengan RFLP.

## Analisis Mutasi mtDNA dengan Metode PASA

PASA merupakan teknik analisis mutasi yang sangat sederhana dibandingkan dengan teknik analisis mutasi lain seperti PCR-RFLP dan PCR-SSCP.

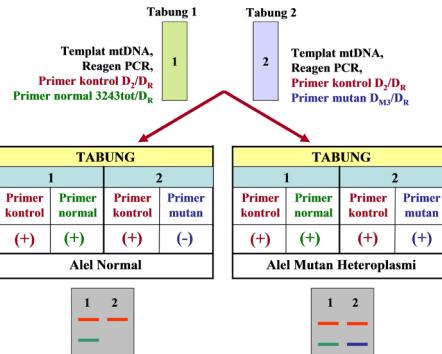
Faktor yang sangat memengaruhi hasil analisis yang baik dalam metode PASA adalah desain primer dan optimalisasi reaksi PCR. PASA merupakan reaksi PCR dengan menggunakan primer universal dan primer yang spesifik untuk alel normal dan mutan.

Hasil penelitian penulis menunjukkan bahwa PASA-*mismatch* tiga basa adalah PASA yang paling optimal, yaitu menggunakan suatu primer spesifik mutan dan normal pada tiga basa di ujung 3'. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.9, digunakan dua primer *forward* normal atau mutan yang dipasangkan dengan primer *reverse* universal sehingga menghasilkan fragmen ukuran 97 pb. Sistem PCR dikontrol oleh satu primer *forward* universal yang digunakan pada tabung alel mutan dan normal melalui sistem PCR multipleks. Setelah berpasangan dengan primer *reverse* universal akan menghasilkan fragmen 190 pb. Kontrol PCR universal digunakan untuk melihat bahwa hasil PCR yang tidak mempunyai mutasi bukan merupakan hasil *false* negatif. Hal ini disebabkan karena primer  $D_2/D_R$  merupakan fragmen universal yang bekerja pada alel normal maupun mutan.



**Gambar 6.9.** Disain PASA-*mismatch* tiga basa secara multipleks untuk analisis mutasi A3243G.

Bagaimana sistem pengujian adanya mutasi A3243G dengan sistem PASA ditunjukkan pada Gambar 6.10. Alel normal dan mutan dipisahkan di dalam dua tabung yang berbeda, alel normal terdapat pada tabung 1, sedangkan alel mutan pada tabung 2. Jika pada hasil karakterisasi dengan elektroforesis agarosa, pada tabung 1 menghasilkan dua fragmen (190 dan 97 pb) dan pada tabung 2 hanya 1 fragmen (190 pb), hal ini dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut merupakan alel normal. Namun, apabila pada tabung 2 muncul dua fragmen (190 dan 97 pb), maka dapat disimpulkan sampel tersebut mengandung mutasi A3243G secara heteroplasmi (lihat Bab V).



**Gambar 6.10.** Sistem pengujian mutasi A3243G dengan PASA-*mismatch* tiga basa melalui sistem multipleks.

## Analisis Mutasi mtDNA dengan Metode PCR-SSCP

Analisis SSCP adalah teknik yang digunakan untuk mendeteksi mutasi yang tidak diketahui (*unknown mutation*).

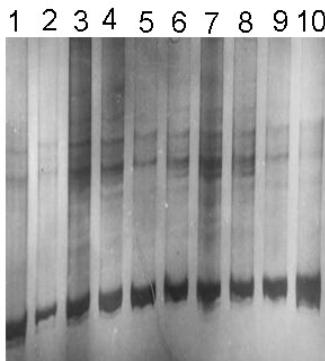
Mutasi A3243G mtDNA merupakan mutasi yang telah diketahui posisinya sehingga metode SSCP dilakukan hanya sebagai konfirmasi. Analisis PCR-SSCP dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamid, yaitu akrialmid dan bis-akrilamid dengan perbandingan tertentu. Konsentrasi bis-akrilamid digunakan untuk menentukan derajat ikatan silang dari polimer akrilamid yang terbentuk. Semakin tinggi konsentrasi akrilamid maka semakin tinggi derajat ikatan silang dari gel poliakrilamid dan secara umum semakin baik pemisahan.

Pada metode SSCP, mutasi dideteksi dengan munculnya pita tambahan dibandingkan kontrol normal yang berasal dari konformasi yang berbeda dari DNA untai tunggal akibat adanya mutasi. Deteksi konformer-konformer ini dapat dilakukan dengan metode autoradiografi atau metode nonisotopik, seperti *silver staining*, *ethidium bromide-staining*, kemilunesens atau fluoresens.

Penggunaan radioaktif untuk penandaan produk PCR atau hasil elektroforesis fragmen DNA memiliki sejumlah kerugian, yaitu harganya yang mahal, bahaya, waktu yang lama, dan kerugian pada lingkungan. Untuk alasan ini, mulai digunakan metode penandaan nonradioaktif seperti *silver staining* untuk deteksi polimorfisme dan analisis SSCP. Biayanya 10 kali lebih rendah dibanding menggunakan radioisotop. Namun, prosesnya membutuhkan tenaga yang intensif dan keahlian yang sangat tinggi.

Dalam metode PCR-SSCP, deret DNA target diamplifikasi dengan PCR, didenaturasi, dan dipisahkan dalam bentuk untai tunggal dalam gel poliakrilamid nondenaturasi (Orita *et al.*, 1989). Variasi deret DNA seringkali menghasilkan pergeseran mobilitas elektroforetik dibandingkan dengan tipe asli sehingga mutasi dapat dideteksi dengan munculnya pita baru dalam elektroforegram yang diperoleh.

Contoh hasil karakterisasi PCR-SSCP ditunjukkan pada Gambar 6.11 menunjukkan terdapat satu pita tambahan pada lajur 6, 7, dan 8 yang menandakan teridentifikasinya polimorfisme untuk mutasi A3243G.



**Gambar 6.11.** Elektroforegram Hasil PCR-SSCP dari penelitian Maksum (2005). PCR-SSCP dilakukan pada gel poliakrilamid (29:1) dengan *silver staining*. Pita tambahan ditunjukkan pada jalur 6,7, dan 8. Lajur 1 merupakan kontrol normal sedangkan lajur 2-10 merupakan sampel.

## Investigasi Klinis

Hasil deteksi mutasi A3243g di atas harus didukung oleh investigasi klinis untuk mutasi A3243g adalah dengan menentukan kreatin kinase, laktat dan piruvat, uji stres laktat, pindai CT/MRI pada

serebral (otak besar), investigasi CSF, spektroskopi MR (*magnetic resonance*) pada serebrum (otak), otot rangka, atau miokardium, SPECT (*single photon emission computed tomography*) pada serebral, EEG, VEPs (*visually evoked potentials*), studi konduksi saraf, elektromiografi, stimulasi saraf berulang, biopsi otot, atau investigasi biokimia pada homogenat otot (Finsterer, 2007).

**Tabel 6.1** Hasil investigasi instrumental pada pasien yang memiliki mutasi A3243g (Finsterer, 2007).

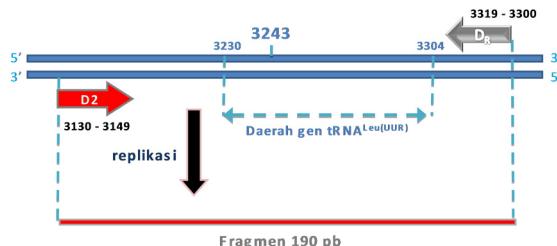
Investigasi/Material yang Diuji	Abnormalitas
Darah	kenaikan glukosa, hormon, dan laktat saat stres maupun rehat, kenaikan kreatin kinase
Cairan serebrospinal (CSF)	kenaikan protein, laktat
Elektroretinografi	respon abnormal
Elektroensefalografi	perlambatan fokal atau difus, aktivitas paroksismal
Potensi pembangkit visual	latensi berulang pada P100
Studi konduksi saraf	kecepatan konduksi saraf berkurang, neuropati aksonal
Elektromiografi	normal, abnormal nonspesifik, neurogenik atau miogenik
Biopsi otot	serat kemerahan, serat COX-negatif, serat SDH-positif
Biokimia	aktivitas kompleks rantai respirasi berkurang
CT/MRI pada serebral	atrofi difus, leukoplakia, pengapuran ganglia basal
SPECT pada serebral	defisit perfusi asimetri
P-MRS	produksi ATP berkurang, kenaikan laktat serebral

Investigasi/Material yang Diuji	Abnormalitas
Otopsi otak	reaktivitas dari kompleks rantai respirasi berkurang, mitokondria abnormal
Ekokardiografi	penebalan miokardia, kerusakan ventrikel kiri

## Analisis Mutan Baru (*Novel Mutation*) DNA Mitokondria *Direct Sequencing* di Sekitar Gen Mutasi yang Sudah Diketahui

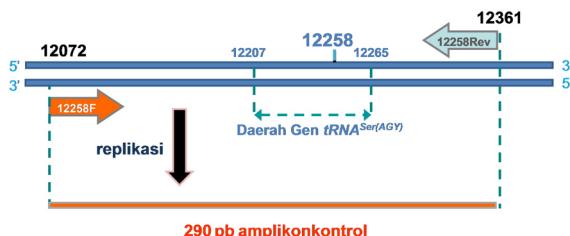
PCR dilakukan untuk membuat templat *Direct sequencing* yang akan digunakan untuk analisis varian mtDNA yang memungkinkan ditemukan mutasi atau varian yang belum dilaporkan.

Langkah awal biasanya dilakukan di sekitar gen sebagai tempat terjadinya mutasi. Misalnya, mutasi A3243g terjadi di gen *tRNA*<sup>Leu(UUR)</sup> sedangkan C12258a di gen *tRNA*<sup>Ser(AGY)</sup>. Untuk penentuan urutan nukleotida tersebut digunakan templat hasil amplifikasi fragmen 190 pb gen *tRNA*<sup>Leu(UUR)</sup> mtDNA dengan primer *forward* D<sub>2</sub> dan untuk pembacaan urutan digunakan satu primer *forward* D<sub>2</sub> (Gambar 6.12). Sedangkan untuk analisis gen *tRNA*<sup>Ser(AGY)</sup> digunakan templat hasil amplifikasi fragmen 290 pb dengan primer 12258<sub>F</sub>/12258<sub>Rev</sub> dan untuk pembacaan urutan digunakan satu primer *forward* 12258<sub>F</sub> (Gambar 6.13).



**Gambar 6.12.** Desain Primer untuk *Direct Sequencing* Gen  $tRNA^{Leu(UUR)}$  mtDNA.

Konsentrasi masing-masing primer adalah 10 pmol, enzim *Taq DNA Polymerase* 0,5 unit, campuran dNTP 200  $\mu$ M yang terdiri atas dATP, dGTP, dTTP, dan dCTP, *buffer PCR* 10 $\times$  tanpa  $MgCl_2$  2,5  $\mu$ L, dan larutan  $MgCl_2$  2,5 mM. 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 1 menit, *annealing* pada 55 °C selama 1 menit, dan *polimerisasi* pada 72 °C selama 1 menit, proses *polimerisasi* akhir pada 72 °C selama 4 menit. Produk PCR dikarakterisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% (b/v). Hasil PCR dianalisis urutan nukleotidanya dengan metode *direct sequencing*.



**Gambar 6.13.** Desain Primer untuk *Direct Sequencing* gen  $tRNA^{Ser(AGY)}$  mtDNA.

## Direct Sequencing Genom Mitokondria



*Direct sequencing* dilakukan untuk menentukan varian genom mitokondria yang memungkinkan ditemukan mutasi atau varian yang belum dilaporkan secara total pada genom mitokondria.

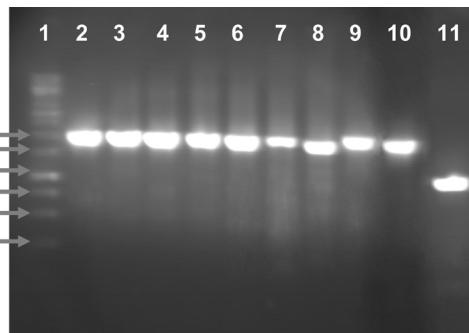


PCR dilakukan dengan membuat beberapa fragmen yang membagi genom mitokondria. Data pasangan primer untuk amplifikasi fragmen genom mitokondria dapat ditunjukkan pada Tabel 6.2. Optimasi amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode PCR untuk mengamplifikasi sepuluh fragmen mtDNA (A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan M). Optimasi PCR dilakukan melalui variasi suhu *annealing* dan konsentrasi MgCl<sub>2</sub>. Hasil karakterisasi PCR dengan elektroforesis agarosa 1% dapat ditunjukkan pada Gambar 6.14.

**Tabel 6.2** Data Pasangan Primer untuk Amplifikasi Fragmen-Fragmen Genom Mitokondria

Fragmen	Primer <i>forward</i>		Primer <i>reverse</i>		Ukuran fragmen (pb)
	Nama	Posisi (5'→3')	Nama	Posisi (5'→3')	
A	Afor	458-479	Arev	2491-2473	2034
B	Bfor	2324-2341	Brev	4252-4234	1929
C	Cfor	4189 - 4215	Crev	6225-6208	2052
D	Dfor	6046-6055	Drev	8095-8076	2050
E	Efor	7925-7944	Erev	9916-9899	1992
F	Ffor	9752-9770	Frev	11774-11757	2023
G	Gfor	11624 - 11644	Grev	13639 - 13616	2016

Fragmen	Primer <i>forward</i>		Primer <i>reverse</i>		Ukuran fragmen (pb)
	Nama	Posisi (5'→3')	Nama	Posisi (5'→3')	
H	Hfor	13551-13568	Hrev	15434 15417	- 1884
I	Ifor	15311-15328	Irev	824-807	2066
M	MH	15978-15997	HV2R	429-409	982



**Gambar 6.14** Hasil karakterisasi PCR 10 fragmen genom mitokondria dengan elektroforesis agarosa 1%. Lajur 1: Marker 1Kb ladder, Lajur 2: Fragmen A (2034 pb), Lajur 3: Fragmen C (2052 pb), Lajur 4: Fragmen D (2050 pb), Lajur 5 : Fragmen E (1992 pb), Lajur 6: Fragmen F (2023 pb), Lajur 7: Fragmen G (2016 pb), Lajur 8: Fragmen H (1884 pb), Lajur 9: Fragmen I (2066 pb), Lajur 10: Fragmen B (1929 pb), Lajur 11: Fragmen M1-HV2R (1021 pb).

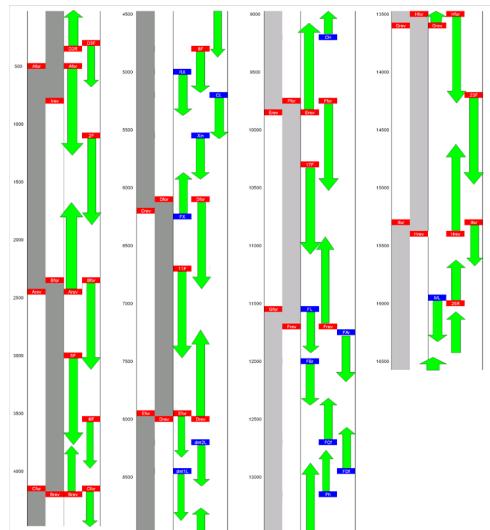
Penentuan urutan nukleotida digunakan primer PCR dari Tabel 6.2 dan beberapa internal primer, seperti ditunjukkan pada Tabel 6.3. Peta primer untuk fragmen amplifikasi, primer amplifikasi dan *sequencing*, serta fragmen dan arah *sequencing* dapat ditunjukkan pada Gambar 6.15.

**Tabel 6.3.** Data Primer-primer *Forward, Reverse,*  
dan Internal untuk *Sequencing*

Primer	Posisi (5'→3')	Urutan Oligonukleotida	Referensi
Afor	458-479	CCT CCC ACT CCC ATA CTA CTA A	Maksum, dkk., 2008
Bfor	2324-2341	TTC TCC TCC GCA TAA GCC	
Cfor	4189 - 4215	CCA CTC ACC CTA GCA TT	
Dfor	6046-6055	GGC AAC CTT CTA GGT AAC GA	
Efor	7925-7944	GGC GGA CTA ATC TTC AAC TC	
Ffor	9752-9770	CGA GTC TCC CTT CAC CAT T	
Gfor	11624-11644	TCT TCA ATC AGC CAC ATA GCC	
Hfor	13551-13568	CGC CTG AGC CCT ATC TAT	
Ifor	15311-15328	ATT GCA GCC CTA GCA ACA	
Arev	2491-2473	GGG GTA AGA TTT GCC GAG T	
Brev	4252-4234	GGG GAA TGC TGG AGA TTG T	
Drev	8095-8076	TAA GCC TAA TGT GGG GAC AG	

Primer	Posisi (5'→3')	Urutan Oligonukleotida	Referensi
Erev	9916-9899	GCT TCG AAG CCA AAG TGA	
Frev	11774-11757	TGT GAG TGC GTT CGT AGT	
Grev	13639-13616	GTT GAC CTG TTA GGG TGA GAA G	
Hrev	15434-15417	GGG CGT CTT TGA TTG TGT	
Irev	824-807	ATC ACT GCT GTT TCC CGT	
11Fg	6730-6749	CTA TGA TAT CAA TTG GCT TC	
2F	1138-1156	GAA CAC TAC GAG CCA CAG C	Taylor <i>et al.</i> , 2001
5F	2995-3013	GGA TCA GGA CAT CCC GAT G	
6F	3536-3553	TAG CTC TCA CCA TCG CTC	
8F	4832-4849	CAC CCC TCT GAC ATC CGG	
23F	14227-14246	CCC ATA ATC ATA CAA AGC CC	
17F	10394-10414	CTG AAC CGA ATT GGT ATA TAG	
25R	16067-16048	GTC AAT ACT TGG GTG GTA CC	

Primer	Posisi (5'→3')	Urutan Oligonukleotida	Referensi
FX	6384-6363	CCC CTA AGA TAG AGG AGA CAC C	Noer dkk., 1994
Xin	5530-5550	CAG ACC AAG AGC CTT CAA AGC	
RX	5042-5061	AGC AGT TCT ACC GTA CAA CC	
CH	9247-9221	CTG GGT TTT ACT ATA TGA TAG GCA TGT	
Far	11762-11779	GAA CGC ACT CAC AGT CGC	
FBr	12048-12065	TCA CAC GAG AAA ACA CCC	
ML	16420-16401	TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG	
MH	15978-15997	CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT	
dmt2L	8251-8270	GCC CGT ATT TAC CCT ATA GC	Meissner <i>et al.</i> , 1999
HV2F	8-29	GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C	Wilson <i>et al.</i> , 1995
HV2R	429-409	CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC	



**Gambar 6.15.** Peta Primer-primer (*Map of Primers*)



= Fragmen amplifikasi



= Primer amplifikasi dan *sequencing* (Taylor *et al.*, 2001)



= Primer *sequencing* (sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Meissner *et al.*, 1999; Noer dkk., 1994; Wilson *et al*, 1995).



= Fragmen dan arah *sequencing*

## Analisis Hasil *Direct Sequencing*

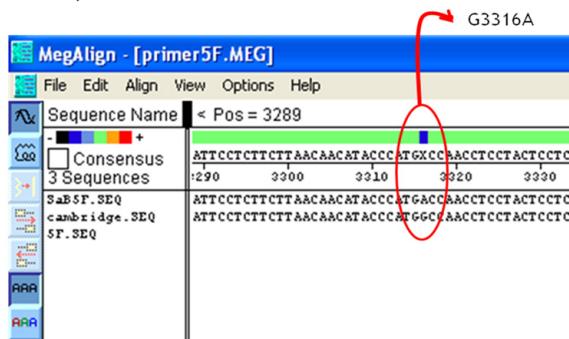


Analisis hasil *direct sequencing* dilakukan dengan *software DNASTAR*, pada program *EditSeq* dan *MegAlign*.



*EditSeq* digunakan untuk memasukkan data sekuen sehingga diketahui jumlah urutan nukleotida yang terbaca. Semua data yang akan diolah dengan *DNAStar* disimpan dalam bentuk *seq file*. Data dalam bentuk *seq file* kemudian dijajarkan pada program *MegAlign* untuk menentukan kemiripan antarsekuen.

Analisis homologi dilakukan dengan membandingkan urutan nukleotida sampel hasil *direct sequencing* dengan urutan standar *Cambridge* pada program *MegAlign* ini dengan memilih menu *Clustal method* sehingga akan terlihat perbedaan warna antara basa nukleotida yang homolog dan yang tidak homolog. Salah satu contoh analisis, yaitu pada salah satu pasien katarak yang memiliki mutasi baru G3316a pada daerah amplifikasi fragmen B (Gambar 6.16).



**Gambar 6.16.** Hasil analisis *Megalign* yang menunjukkan adanya mutasi G3316a pada fragmen (Maksum, 2009).

# **BAB VII**

## **PERKEMBANGAN TERAPI PENYAKIT MITOKONDRIA**

Buku ini tidak diperjualbelikan.

“ Walaupun penderita penyakit mitokondria tidak dapat disembuhkan, penanganan optimal dapat memberikan pengaruh besar pada tingkat abnormalitas dan kematian prematur. ”

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# Penanganan Pasien Penderita Penyakit Mitokondria

Walaupun penderita penyakit mitokondria tidak dapat disembuhkan, penanganan optimal dapat memberikan pengaruh besar pada tingkat abnormalitas dan kematian prematur. Secara umum, penanganan penyakit mitokondria dibagi ke dalam tiga bagian: (1) konseling, (2) terapi pendukung, dan (3) terapi farmakologis, serta harus dikembangkan suatu strategi penyembuhan baru untuk memberi harapan pada masa yang akan datang.

## Prognosis

Variabilitas klinis dan genetik merupakan kekhasan dari penyakit mitokondria. Contohnya, walaupun mutasi MELAS A3243g ditemukan asimptom, tetapi dapat mengakibatkan fenotipe ringan, seperti *sensorineural deafness* dan diabetes, atau dapat juga mengakibatkan *encephalopathy* akut dengan kematian pada usia muda. Tingkat mtDNA mutan dapat ditentukan bila kerusakan genetik terlihat pada tingkat sel sehingga terlihat hubungan antara *mutation load* dan penyakit klinis. Penelitian yang dilakukan terhadap lebih dari 150 pasien yang mempunyai mutasi A3243g (MELAS) dan A8344g (MERRF), memperlihatkan bahwa jumlah mtDNA mutan di otot kerangka berhubungan erat dengan tampakan neurologis yang berhubungan dengan masing-masing mutasi (Chinnery *et al.*, 1997) dan sebaliknya, tampakan klinisnya tidak berhubungan dengan tingkat mtDNA mutan dalam darah. Pada pasien ini terlihat bahwa tingginya tingkat mtDNA mutan ditemukan pada jaringan pascamitosis (*non-dividing*) seperti

otot dan neuron, sedangkan tingkat mtDNA yang lebih rendah ditemukan dalam jaringan-jaring yang *highly divided* seperti darah (yang secara klinis tidak terpengaruh).

Pada MELAS dan MERRF tingkatan mtDNA mutan dalam otot pasien dapat memberi petunjuk yang baik untuk prognosis

Bagaimanapun juga, anjuran prognostik harus diberikan dengan hati-hati karena tingkat mtDNA mutan di otot dapat meningkat (Weber *et al.*, 1997) atau berkurang (Kawakami *et al.*, 1994) sejalan dengan waktu.

## Tes *Presymptomatic*

Chinnery *et al.* (1997) telah menganalisis sejumlah anak-anak yang mengalami mutasi mtDNA dan sejumlah kerabat dewasa yang tidak mengalami penyakit ini meminta saran untuk prognosis. Hal ini kemudian menjadi sulit karena potensi berubahnya *mutation load* sejalan dengan waktu. Data yang tersedia (mutasi A3243g dan A8344g) memperlihatkan bahwa tingkat mutasi mtDNA di otot dapat memberi petunjuk untuk masa yang akan datang. Informasi ini harus digunakan dengan sangat hati-hati karena gen inti dan faktor lingkungan dapat memengaruhi ekspresi dari kerusakan mtDNA (Howell *et al.*, 1997).

## Pewarisan

Walaupun delesi mtDNA tidak ditransmisikan (Zeviani *et al.*, 1999), duplikasi mtDNA dapat diturunkan dari ibu ke anak

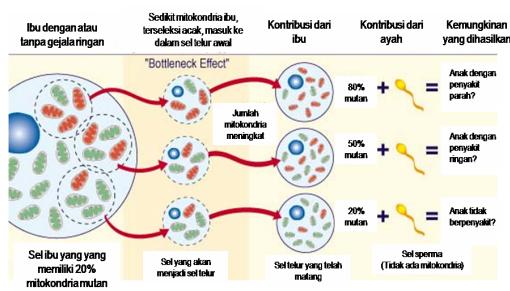
(Ballinger *et al.*, 1994). Duplikasinya sendiri tidak patogenis (Manfredi *et al.*, 1997), tetapi dapat *predispose* pada pembentukan delesi (Poulton *et al.*, 1993). Harus ditekankan bahwa duplikasi mtDNA jarang terjadi, tetapi wanita yang memiliki duplikasi mtDNA kemungkinan memiliki anak yang terjangkit yang memiliki delesi mtDNA patogenis.

Mutasi titik mtDNA juga diwariskan menurut garis ibu.

Untuk mutasi homoplasmi yang berhubungan dengan LHON, analisis lanjutan pada anak-anak menunjukkan risiko kebutaan pada kerabat maternal (Macmillan *et al.*, 1997). Bagaimanapun juga, untuk mutasi titik mtDNA heteroplasmi seperti yang mengakibatkan MELAS dan MERRF dapat menjadi lebih sulit. Untuk penyakit-penyakit ini, risiko kehamilan bergantung pada jumlah mtDNA mutan yang diturunkan pada *oocyte* juga pada segregasi genom mutan selama perkembangan. Rata-rata, salah satunya dapat menyebabkan ibu yang memiliki mtDNA mutan dalam jumlah tinggi menurunkan mtDNA mutan dalam jumlah tinggi pada anak. Bagaimanapun juga, analisis penurunan mutasi mtDNA heteroplasmi telah menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan sederhana, dan terdapat variabilitas yang tinggi dalam *mutation load* di antara anak.

Kontribusi besar pada variabilitas tinggi dalam penurunan mtDNA adalah proses restriksi/amplifikasi (beberapa penulis menyebutnya efek "bottleneck") yang terjadi selama oogenesis (Lightowlers *et al.*, 1997).

Walaupun akhir-akhir ini terdapat pemahaman mengenai efek "bottleneck", tetapi hasil model matematisnya sepertinya tidak berguna banyak dalam pengujian klinis. Pada awalnya, ukuran teoretis "bottleneck" dihitung dari tingkat mtDNA mutan dalam darah pada ibu dan anak, tetapi tingkat mtDNA mutan dapat berubah seiring berjalannya waktu, dan karenanya tidak dapat ditentukan tingkat mtDNA mutan yang terdapat dalam *oocyte*. Variasi pada jumlah mtDNA pada darah dapat memberikan impresi dari "bottleneck" yang sangat ketat. Kedua, model "bottleneck" memperkirakan bahwa *range* dari *possible outcomes* dari kehamilan adalah besar. Untuk wanita mana pun, dia diperkirakan akan mempunyai anak yang memiliki jumlah mtDNA mutan yang sangat tinggi atau sangat rendah.



Gambar 7.1. The "bottleneck" effect.

Tanpa membuat asumsi terhadap mekanisme, Chinnery *et al.* (1997) meneliti sekelompok besar ibu yang memiliki mutasi A3243g MELAS dan A8344g MERRF. Ditemukan bahwa jumlah mtDNA mutan yang tinggi pada darah memengaruhi peningkatan frekuensi terjadinya mutasi itu pada anak, namun pola pewarisan kedua mutasi tersebut berbeda. Meski tidak baik menggunakan data ini untuk konseling genetik, hasilnya jelas mengindikasikan bahwa jumlah mtDNA maternal penting dalam menentukan frekuensi anak yang terjangkit secara klinis.

# Diagnosis Prenatal

Kerumitan segregasi mtDNA menyebabkan kesulitan diagnosis prenatal.

Misalnya, jumlah mtDNA mutan pada *chorionic villus sample* (CVS) bisa saja berbeda dari jumlah mtDNA mutan pada fetus. Pada kasus terisolasi, jumlah mtDNA mutan terdistribusi seragam kepada fetus, yang menunjukkan bahwa CVS dapat memberikan informasi berguna. Bagaimanapun juga, kita hanya tahu sedikit mengenai bagaimana jumlah mtDNA mutan dapat berubah selama pertumbuhan, dan akan membutuhkan waktu sebelum diketahui apakah *mutation load* pada CVS memberikan informasi yang berguna secara klinis.

Sejumlah mutasi titik mtDNA penting, mtDNA mutan dapat dideteksi setidaknya pada beberapa jaringan di hampir setiap anak yang ibunya memiliki mutasi patogenik, dan CVS tampaknya positif untuk semua kehamilan wanita yang mengalami mutasi mtDNA. Saat ini, belum diketahui implikasi jangka panjang dari pengukuran CVA heteroplasmi, dan tidak baik untuk konsultasi/konseling genetik hanya atas dasar hal ini.

# Terapi Farmakologis

Buku ini tidak diperjualbelikan.

Saat ini, kita belum memiliki penanganan yang efektif untuk penyakit mtDNA.

Beragam vitamin dan kofaktor telah digunakan, dan bermacam tingkat keberhasilan telah dilaporkan pada kasus-kasus individual. Percobaan-percobaan klinis kecil yang telah dilakukan tidak menunjukkan efek klinis yang konsisten. Namun, karena obat seperti ubiqinon ( $\text{CoQ}_{10}$ ) relatif tanpa efek samping, penggunaan untuk kasus individu cukup rasional. Menurut pengalaman kami, banyak pasien melaporkan kemajuan ringan, tetapi hal ini tidak *sustained*, menunjukkan komponen *placebo* terhadap responsnya.

## Strategi Terapi Baru

Percobaan sebelumnya terhadap obat atau terapi metabolik untuk penyakit mitokondria ternyata tidak memuaskan. Percobaan pada tingkat sedang menunjukkan peningkatan *excercise tolerance* dan metabolisme otot, dan hal ini ditunjukkan pada pasien dengan penyakit mtDNA, dan penelitian labotatorium baru-baru ini memperkirakan bahwa sangat mungkin akan ada kemajuan di masa yang akan datang. Penelitian *in vitro* ini menunjukkan bahwa urutan asam nukleat peptida tertentu dapat menghambat replikasi mtDNA mutan. Molekul antigenomik novel ini dapat dilakukan pada mitokondria manusia dalam kultur, dan mungkin potensial dapat membetulkan kerusakan genetik mitokondria *in vivo*, seperti yang dilakukan oleh Taylor *et al.* (1997), menggunakan *Peptide Nucleic Acid* (PNA) yang komplemen dengan DNA

mitokondria mutan. Walaupun secara spesifik terbukti secara *in vitro* antigenom PNA ini menghambat replikasi mutan tidak dengan templat DNA mitokondria normal, tetapi belum diketahui keampuhannya secara *in vivo*.

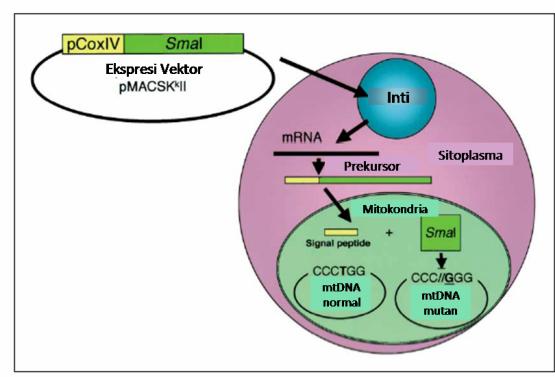
Kedua, sel satelit otot adalah prekursor *quiescent* dari otot kerangka dewasa dan mengandung mtDNA mutan yang rendah. Induksi dari nekrosis sel otot fokal menginduksi proliferasi sel satelit. Dalam dua pasien dengan miopati mitokondria, *subsequent* proliferasi sel satelit mengarah pada repopulasi sebagian kecil otot kerangka dengan otot dewasa yang mengandung mtDNA mutan dalam jumlah rendah dan dengan fungsi mitokondria normal (Clark *et al.*, 1997).

Taivassalo *et al.* (1999) melaporkan bahwa dalam jangka waktu yang pendek, olahraga menyebabkan kenaikan rasio DNA normal dibandingkan DNA mutan di otot. Hasil ini bergantung pada sel satelit non-mutan, yang dapat distimulasi untuk masuk kembali ke dalam siklus sel dan bergabung dengan *myofibers* atau serat otot dalam menghasilkan respons untuk pertumbuhan atau perbaikan otot.

Andrews *et al.* (1999) mencoba mengaplikasikan *bupivacain* untuk regenerasi otot sebagai perawatan pasien yang mengalami delesi DNA mitokondria, tetapi hasil pengamatannya tidak menunjukkan adanya perbaikan pada pasien. Oleh karena itu, meningkatkan pemahaman tentang pewarisan DNA mitokondria dan motif mutasi yang terjadi, serta teknik baru untuk modifikasi DNA mitokondria tampak sangat menjanjikan untuk konseling terapi genetik yang lebih akurat dan efektif di masa depan (Tanaka *et al.*, 2002).

Memasukkan enzim restriksi ke dalam mitokondria merupakan strategi baru untuk terapi gen untuk bentuk penyakit-penyakit mitokondria tertentu (Tanaka *et al.*, 2002).

Untuk tujuan tersebut, diekspresikan gen fusi *SmaI* yang diisolasi dari *Serratia marcescens* ke dalam target mitokondria yang membawa gen mutan (Gambar 7.3). Tujuan utamanya adalah mengaplikasikan *SmaI* untuk terapi gen penyakit tersebut. Alasannya, DNA mitokondria mutan berada bersamaan dengan DNA mitokondria normal (*wild type*) yang disebut dengan heteroplasmi. Selain itu, hanya DNA mitokondria mutan yang secara selektif dikenali oleh enzim restriksi. Di sini didemonstrasikan bahwa target mitokondria mutan secara spesifik dieliminasi oleh enzim *SmaI*.



**Gambar 7.2.** Skema strategi untuk terapi gen penyakit NARP yang disebabkan oleh mutasi T8993 di DNA mitokondria (Tanaka *et al.*, 2002).

Di dalam buku ini akan dibahas salah satu contoh terapi gen pada penyakit mitokondria, yaitu memasukkan enzim restriksi

*SmaI* untuk memperbaiki mutasi T8993g pada pasien NARP (*Neuropathy, Ataxia, & Retinitis Pigmentosa*). Enzim restriksi endonuklease *SmaI* telah digunakan untuk diagnosis penyakit lemah saraf otot (*ataxia*) dan *Leigh's disease*, yang disebabkan oleh adanya mutasi pada mitokondria yang menyebabkan berubahnya asam amino leusin menjadi arginin pada kodon 156. Hal ini menyebabkan terhalangnya aktivitas translokasi proton dari subunit  $F_0F_1$ -ATPase. Tujuan utama penelitian ini adalah mengaplikasikan *SmaI* untuk terapi gen penyakit tersebut. Alasannya, DNA mitokondria mutan berada bersamaan dengan DNA mitokondria normal (*wild type*) yang disebut dengan heteroplasmi. Selain itu, hanya DNA mitokondria mutan yang secara selektif dikenali oleh enzim restriksi. Untuk tujuan tersebut, pada penelitian ini secara sekilas dijelaskan diekspresikan gen fusi *SmaI* ke dalam target mitokondria yang membawa gen mutan. Disini didemonstrasikan bahwa target mitokondria mutan secara spesifik dieliminasi oleh enzim *SmaI*. Eliminasi ini diikuti oleh proses repopulasi oleh DNA mitokondria normal (*wild type*), yang kemudian menunjukkan adanya perbaikan pada tingkat ATP normal intraselular maupun perbaikan pada potensial membran normal mitokondria. Lebih jauh lagi, elektroporasi secara *in vivo* dari plasmid yang mengekspresikan target mitokondria *EcoRI* menunjukkan penurunan aktivitas sitokrom c oksidase pada otot rangka hamster, tetapi tidak menyebabkan perubahan degeneratif pada inti.

Dalam penelitian digunakan metode dengan mengambil fibroblas kulit dari pasien penderita *Leigh's disease* yang membawa mutasi T8993g. Enukleasi fibroblas dan penggabungan sel yang telah di-enukleasi (sitoplas) dengan sel osteosarcoma  $\rho^0$  manusia

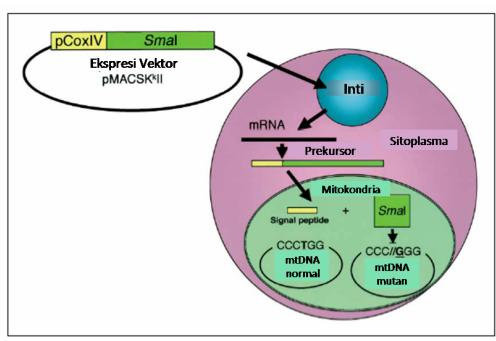
(ρ°206) seperti dijelaskan dalam King & Attardi (1996). Sel hasil penggabungan kemudian dimasukkan ke dalam medium Eagle's yang telah dimodifikasi mengandung 10% fetal bovine serum (mengandung glukosa tinggi sekitar 4,5 g/ml, piruvat 0,11 mg/ml dan uridine 0,1 mg/ml), di mana pada medium ini sel-sel yang tidak memiliki fungsi respirasi tidak dapat tumbuh. Akhirnya, didapatkan dua jenis sel : NARP3-1 dengan tingkat rasio mutan yang tinggi (98%) dan NARP3-2 dengan rasio mutan rendah (60%). Jalur sel 143B osteosarcoma manusia yang membawa DNA mitokondria normal digunakan sebagai kontrol.

cDNA yang mengode urutan awal sitokrom c oksidase subunit IV (pCoxIV) dari *Saccharomyces cerevisiae* diamplifikasi dari plasmid pAK1, yang didapatkan dari Prof. Toshiya Endo (Universitas Nagoya), dengan menggunakan primer-primer: EcoRI-pCoxIV-U (5'-gga tcc GCA TAC AAA TAG ATA ACA A-3') dan ApaI-XhoI-pCoxIV-L (5'-ggg ccc ctc gag GAG ATC TAG AGC TAC ACA AA-3').

Gen untuk *SmaI* diamplifikasi dengan PCR dari total DNA yang diisolasi dari *Serratia marcescens* dengan menggunakan primer-primer : ApaI-XhoI-SmaI-U (5'-ggg ccc ctc gag CAA GCA GGG ATG ACC AAC TC-3') dan BamHI-SmaI-L (5'-gga tcc ATT GGG CCC GAG GCG GCG GTA GAA TAA AA-3'). Gen untuk *EcoRI* didapat dari Prof. Ichizo Kobayashi (Universitas Tokyo) dan diamplifikasi dengan menggunakan primer-primer ApaI-XhoI-EcoRI-U (5'-ggg ccc ctc gag CAT CTA ATA AAA AAC AGT CA-3') dan Bam-HI-EcoRI-L (5'-gga tcc ATT GGG CCC GCT TAG ATG TAA GCT GTT CA-3'). Gen fusi diampifikasi dengan PCR lalu disubkloning ke dalam plasmid pCR2.1-TOPO

(Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) ataupun pBluescript SK- (Stratagene, Heidelberg, Germany).

Gen fusi hasil kombinasi kemudian dimasukkan ke dalam sisi *Eco*RI-BamHI pada vektor ekspresi mamalia pMACSK<sup>k</sup>II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), di mana gen yang disisipi diekspresikan bersamaan dengan molekul MHC kelas I pada tikus, H-2K<sup>k</sup>, untuk seleksi sel-sel yang telah ter-transfeksi. Gen-gen fusi berikut kemudian dibuat: pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-*Sma*I dan pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-*Eco*RI.



**Gambar 7.3.** Skema strategi untuk terapi gen penyakit NARP yang disebabkan oleh mutasi T8993 di DNA mitokondria (Tanaka *et al.*, 2002).

Sel-sel dikultur dalam piringan diameter 10 cm mengandung 12 mL medium kultur pada 37°C di bawah atmosfer 5% CO<sub>2</sub> dan 95% udara. Ketika sel-sel telah terpengaruh 90–95%, sel kemudian dicuci dua kali dengan PBS (Phosphate Buffered Saline), lalu digunakan untuk transfeksi. Sel-sel (sekitar 6x10<sup>6</sup>) ditransfeksi pada 37°C selama 24 atau 48 jam dengan 30 µg/cawan plasmid dilarutkan dalam 3 ml medium opti-MEM I reduced-serum. Dengan penambahan 30 µl Lipofectamine® 2000 reagent (Life Technologies, Rockville, Md., USA). Setelah 24-48 jam inkubasi, sel-sel yang tertransfeksi

dipindahkan dari cawan dengan metode tripsinisasi, lalu dipilih dengan menggunakan *magnetic microbeads* (80  $\mu$ l per 10-cm cawan) diselubungi dengan monoklonal antibodi yang berlawanan dengan molekul H-2K<sup>k</sup> tikus dengan menggunakan kolom *MS magnetic* dan *magnetic cell sorter* (MiniMACS separation unit, Miltenyi Biotec). Dalam beberapa penelitian, hasil sel-sel yang terseleksi sekitar 10% dalam siklus tunggal transfeksi dan seleksi. Sel-sel yang terseleksi dikultur selama 2-3 hari lalu digunakan untuk siklus transfeksi dan seleksi berikutnya

DNA total (2  $\mu$ g) yang diekstrak dari sel dipotong dengan enzim restriksi endonuklease. Fragmen hasil restriksi dipisahkan dalam gel agarosa 1%, ditransfer ke membran nion dan dihibridisasi dengan penanda *fluorescein-dUTP-labeled* DNA mitokondria. Membran dicuci, dan fragmen-fragmennya dideteksi dengan *Gene Images Random-Prime Labelling and Detection System* (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) berdasarkan petunjuk manufaktur. Chemiluminescence fragmen-fragmen dianalisis dengan *bioimaging analyzer* (Fujix LAS 1000, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan).

Dalam penelitian ATP diekstrak dari sel dan kemudian diukur dengan menggunakan ATP biofluorescence assay kit (HS II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) dengan luminometer (Lumat LB9501, Berthold, Bad Wildbad, Germany).

Potensial membran mitokondria diukur dengan menggunakan metode *flow cytometry* dengan *FACS-Calibur flow cytometer* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Calif., USA). Sel kultur ditumbuhkan dalam cawan kultur 60 mm kemudian diinkubasi dengan pewarna lipofilik kationik

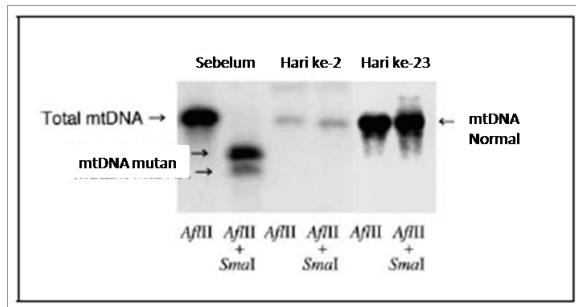
MitoTracker Orange CMTMRos pada konsentrasi 100 nM (Molecular Probes, Eugene, Oreg., USA) selama 30 menit pada 37°C, atmosfer 5% CO<sub>2</sub>. Jumlah fluorochrome yang tergabung ke dalam sel-sel bergantung pada potensial transmembran mitokondrianya. Setelah pewarnaan, sel-sel dicuci, dikumpulkan dengan tripsinisasi, lalu diukur dengan *flow cytometry*.

Plasmid ekspresi pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-EcoRI (15 µg) bersamaan dengan reporter plasmid pCAGGS-LacZ (15 µg) diinjeksikan ke otot anterior tibialis dari hamster berumur 3,5 minggu di bawah pengaruh anestesi biasa. Tekanan listrik (60 V, 0.02–0.04 A; jarak elektrode 6 mm; 6 kali) diberikan dengan menggunakan elektrode CUY645 hammerhead (3 x 5 mm) dan generator listrik (CUY21, BEX, Tokyo, Japan). Jaringan otot dihilangkan 1 bulan setelah elektroporasi dan dibekukan (8 µm). Potongan-potongan jaringan kemudian diuji warna untuk β-galaktosidase atau sitokrom c oksidase.

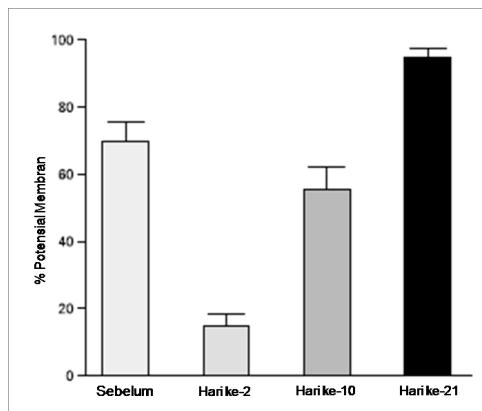
Dari hasil penerapan jalur sel NARP3-1 dengan transfer sitoplasma mitokondria dari fibroblas pasien penderita *Leigh's disease* ke dalam jalur sel ρ<sup>0</sup> 206 osteosarcoma yang kekurangan DNA mitokondria. Sel NARP3-1 memiliki persentase mutan DNA mitokondria yang tinggi (sekitar 98%). Kandungan ATP sel NARP3-1 sekitar 70% dari DNA mitokondria normal. Potensial membran mitokondria sel NARP3-1 didapatkan lebih kecil (69%) dibandingkan sel 143B (normal). Potensial membran yang lebih kecil ini sesuai dengan fakta bahwa ATP yang disuplai dari glikolisis tidak dapat digunakan untuk menghasilkan potensial membran mitokondria karena adanya halangan saluran proton oleh adanya perubahan asam amino leusin menjadi arginin pada kodon 156 di subunit F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase.

Untuk memasukkan *SmaI* ke dalam mitokondria, gen *SmaI* digabungkan dengan urutan yang mengode sinyal peptida sitokrom c oksidase subunit IV (pCoxIV) kemudian gen fusi ini disisipkan ke vektor ekspresi mamalia (pMACSK<sup>k</sup>II), seperti dalam Gambar 7.3. Ketika ditransfeksikan sel NARP3-1 dengan plasmid yang mengandung gen fusi (pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-*SmaI*), DNA mitokondria mutan dieliminasi, dan hanya sedikit jumlah DNA normal yang terdeteksi (Gambar 7.4, hari ke-2). Oleh karena jumlah total DNA pada setiap lajur di Gambar 7.4 sama, sinyal yang dihasilkan dari *Southern Blot* di masing-masing sampel menunjukkan kandungan DNA mitokondria di sel individual. Pada tahap ini, sel NARP3-1 yang telah tertransfeksi serupa dengan sel-sel ρ<sup>0</sup>206, memiliki potensial membran mitokondria yang rendah (Gambar 7.5) yang berhubungan dengan adanya defisiensi DNA normal. Ketika sel NARP3-2 yang memiliki persentase mutan DNA mitokondria yang lebih rendah (sekitar 60%) ditransfeksikan, potensial membran naik tanpa adanya penurunan berarti seperti pada sel NARP3-1 setelah transfeksi (data tidak diperlihatkan).

Untuk menguji apakah terjadi repopulasi oleh DNA mitokondria normal, penelitian dilanjutkan dengan kultur sel NARP3-1 hasil transfeksi selama 3 minggu. Seperti diperlihatkan dalam Gambar 7.4, DNA mitokondria normal terpropagasi (terlihat pada hari ke 23). Repopulasi ini juga berhubungan dengan terjadinya normalisasi potensial membran mitokondria (Gambar 7.5) serta normalisasi kandungan ATP selular (Gambar 7.6). Ketika plasmid kontrol pMACSK<sup>k</sup>II tanpa sisipan digunakan untuk transfeksi, tidak ada perubahan yang signifikan pada rasio DNA mutan terhadap DNA normalnya, dari tingkat ATP dan potensial membran yang diamati.

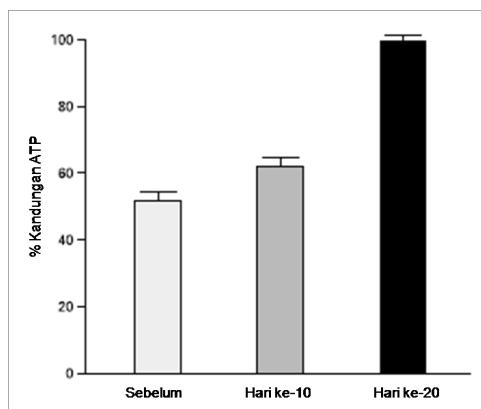


**Gambar 7.4.** Eliminasi DNA mitokondria mutan dan repopulasi oleh DNA normal setelah masuknya *SmaI* ke dalam mitokondria. Sel NARP3-1 ditransfeksi dengan plasmid pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-*SmaI* dan sel-sel yang ter-transfeksi diseleksi dengan sistem MACSelect. Lima siklus transfeksi dan seleksi diulang. DNA total yang diekstrak dari sel, setelah 2 hari dan 23 hari masuknya *SmaI*. Sampel DNA (2  $\mu$ g) yang didigesti baik oleh *AfIII* sendiri maupun oleh *AfIII* and *SmaI* kemudian dianalisis dengan *Southern Blot*. DNA mitokondria normal (16569 pb) dilinearisasi dengan enzim restriksi *AfIII*, dimana DNA mutan dengan mutasi T8993G dipotong oleh *SmaI* menjadi dua fragmen (7586 pb dan 8983 pb) (Tanaka *et al.*, 2002).



**Gambar 7.5.** Normalisasi potensial membran mitokondria setelah eliminasi DNA mutan dan repopulasi

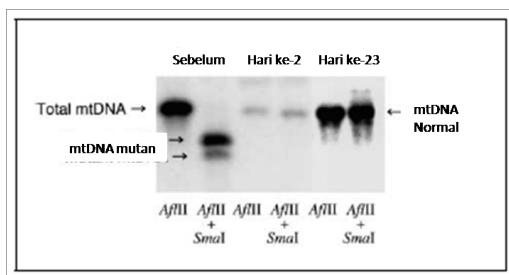
DNA normal. Potensial membran diukur dengan metode *flow cytometry* menggunakan MitoTracker Orange CMTMROS. Intensitas fluorosensi sel ( $10^4$  sel) ditentukan. Potensial membran sel NARP3-1 yang tertransfeksi ditunjukkan dengan persentase terhadap kontrol sel 143B (intensitas fluorosensi dari 110-138 unit acak). Rata-rata dari 3 penentuan yang berbeda ditunjukkan beserta standar deviasinya (Tanaka *et al.*, 2002).



**Gambar 7.6.** Normalisasi kandungan ATP setelah eliminasi DNA mutan. Sel NARP3-1 dikultur selama 3 minggu setelah sebelumnya ditransfeksi dan seleksi sebanyak 5 siklus. Kandungan ATP per miligram protein seluler total diukur terlebih dahulu sebelum transfeksi, pada hari ke-10 dan ke-20 setelah seleksi. Kandungan ATP sel tertransfeksi ditunjukkan dengan persentase terhadap kontrol sel 143B (rata-rata 84 nmol/mg protein). Rata-rata dari 3 penentuan berbeda ditunjukkan beserta standar deviasinya (Tanaka *et al.*, 2002).

Untuk menguji efek enzim restriksi endonuklease yang lainnya, baik pada DNA inti maupun DNA mitokondria, dimasukkan *EcoRI* ke dalam mitokondria. Setelah siklus pertama transfeksi dan seleksi, sel yang terseleksi (Gambar 7.7, +) menempel pada kolom *microbeads magnetic* yang diselubungi

dengan monoklonal antibodi yang melawan molekul H-2K<sup>k</sup> di permukaan selnya, terjadi penurunan jumlah DNA mitokondria dibandingkan dengan sel yang tidak terseleksi (Gambar 7.7, -), yang tidak ditangkap kolom. Setelah siklus transfeksi dan seleksi kedua, baik sel yang tertangkap (+) dan tidak (-) kehabisan DNA mitokondria (Gambar 7.7). Hal ini menunjukkan sebagian besar sel NARP3-2 berubah menjadi keadaan  $\rho^0$  setelah transfeksi kedua. Yang menarik, pada penelitian tidak terdeteksi adanya fragmen DNA mitokondria intermediet yang terpotong oleh *EcoRI* setelah siklus awal transfeksi dan seleksi, tetapi terjadi penurunan jumlah DNA mitokondria (Gambar 7.7, +). Hasil ini menunjukkan bahwa penghancuran DNA mitokondria yang dipotong merupakan proses *all or none*. Walaupun sebagian fragmen-fragmen DNA mitokondria yang terpotong mungkin saja diperbaiki dengan dugaan adanya ligase mitokondria, tetapi sebenarnya telah dihancurkan oleh eksonuklease intramitokondria. DNA mitokondria yang terpotong sepertinya hilang dengan cepat dari sel sebagai bagian dari proses fisiologis yang mempertahankan DNA normal melawan berbagai macam bahaya oksidasi terhadap genom mitokondria.

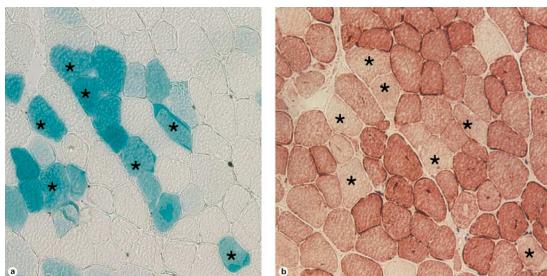


**Gambar 7.7.** Penentuan DNA mitokondria total dengan target mitokondria *EcoRI*. Sel NARP3-2 dua kali ditransfeksi dengan pMACSK<sup>k</sup>II/ pCoxIV*EcoRI* (pada hari ke-1 untuk siklus 1 dan hari ke-3 untuk siklus 2), dan dua kali diseleksi dengan sistem MACSelect (hari

ke-2 untuk siklus 1 dan hari ke-4 untuk siklus 2). DNA total (2  $\mu$ g) diekstraksi dari sel dihancurkan dengan enzim restriksi *Afl*II, dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa lalu dianalisis dengan *Southern Blot* untuk DNA mitokondria. Tanda (-) dan (+) menunjukkan sel yang tidak tertransfeksi dimana akan melewati kolom magnetik dan sel yang terseleksi terikat pada kolom yang diselubungi anti-H-2K<sup>k</sup> monoklonal antibodi. Setelah transfeksi pertama, jumlah DNA mitokondria yang terikat ke kolom (lajur + pada seleksi pertama) lebih sedikit dibandingkan dengan yang lolos dari kolom (lajur - pada seleksi pertama). Setelah transfeksi kedua, baik sel yang lolos kolom (lajur -) maupun yang terikat di kolom (lajur +) hanya mengandung sedikit sekali DNA mitokondria (\*) (Tanaka *et al.*, 2002).

Dari penelitian tidak terdeteksi adanya apoptosis, seperti pada penampakan badan apoptosis atau pembentukan *DNA ladders*. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim restriksi yang dimasukkan ke dalam mitokondria dengan aman dipisahkan di matriks mitokondria tanpa mengganggu DNA inti, setidaknya pada kondisi kultur sel yang dilakukan dalam penelitian ini. Untuk membuktikan apakah ekspresi dengan enzim restriksi ini aman secara *in vivo* untuk terapi, digunakan dua jenis plasmid, yang satu mengekspresikan  $\beta$ -galaktosidase dan yang lainnya mengekspresikan *Eco*RI target mitokondria, dimasukkan ke dalam otot rangka hamster dengan metode elektroporasi *in vivo*. Satu bulan setelah injeksi tunggal dan elektroporasi *in vivo*, sebagian besar serat otot dengan adanya aktivitas  $\beta$ -galaktosidase (Gambar 7.8a) menunjukkan bahwa gen *LacZ* diekspresi bersamaan dengan pCoxIV $\beta$ Ec $\beta$ RI, menunjukkan adanya penurunan aktivitas sitokrom c oksidase (Gambar 7.8b). Elektroporasi *in vivo* plasmid DNA untuk target mitokondria dengan menggunakan *Sma* I

dan *EcoRI* ke dalam otot rangka hamster tidak menyebabkan perubahan degeneratif pada inti.



**Gambar 7.8.** Penurunan aktivitas sitokrom c oksidase setelah elektroporasi *in vivo* plasmid yang mengekspresikan *EcoRI*. Plasmid pMACSK<sup>k</sup>II-pCoxIV-*EcoRI* dan pCAGGS-LacZ digunakan untuk mentransfeksi secara bersamaan otot tibialis anterior dari hamster berumur 3,5 minggu dengan elektroporasi *in vivo*. Jaringan otot dihilangkan 1 bulan setelah elektroporasi, dan dibekukan (8  $\mu$ m). Potongan-potongan jaringan diuji warna untuk penentuan  $\beta$ -galaktosidase (a) atau aktivitas sitokrom c oksidase (b). Tanda \* menunjukkan serat otot yang positif  $\beta$ -galaktosidase dengan penurunan aktivitas sitokrom c oksidase (Tanaka *et al.*, 2002).

Dari hasil penelitian ini, DNA mitokondria mutan T8993g berhasil dieliminasi dari kultur sel menggunakan strategi baru dengan enzim restriksi *SmaI* yang dimasukkan ke dalam mitokondria (Gambar 7.3). Karena mutasi T8993g hanya memengaruhi aktivitas translokasi proton dari  $F_0F_1$ -ATPase, sel NARP3-1 menunjukkan tidak adanya perubahan pada rantai pernapasan yang secara langsung berkontribusi terhadap potensial membran. Pada kasus sel NARP3-1, potensial membran mitokondria menurun (Gambar 7.5), berhubungan dengan terjadinya eliminasi akut mutan DNA mitokondria karena proses transfeksi (Gambar 7.4). Setelah terjadi repopulasi oleh

DNA normal, baik potensial membran (Gambar 7.5) maupun kandungan ATP seluler (Gambar 7.6) mengalami normalisasi setara dengan sel normalnya.

Untuk mengeliminasi mutan DNA mitokondria, diperlukan 5 siklus transfeksi dan seleksi untuk *SmaI* (Gambar 7.4), tetapi hanya dibutuhkan 1 atau 2 siklus saja untuk *EcoRI* (Gambar 7.7). Setelah transfeksi pertama dengan *EcoRI*, kandungan DNA mitokondria pada sel-sel yang terseleksi hanya menurun sedikit. Setelah siklus kedua, DNA mitokondria hilang, baik pada fraksi yang lewat maupun pada fraksi yang terseleksi. DNA mitokondria pada sel transfeksi pertama dihancurkan oleh *EcoRI* selama kultur sebelum terjadi siklus kedua. *EcoRI* memotong DNA mitokondria manusia pada 3 sisi, sedangkan *SmaI* hanya pada 1 sisi saja. Perbedaan jumlah sisi pengenalan ini dapat mempengaruhi efisiensi eliminasi DNA mitokondria oleh kedua enzim tersebut.

Efek plasmid *EcoRI* yang dimasukkan dengan elektroporasi *in vivo* lebih halus dalam otot rangka hamster (Gambar 7.8) dibandingkan dengan di sel NARP3-1. Setelah 1 bulan, terdeteksi hanya sedikit penurunan aktivitas sitokrom c oksidase pada serat otot hamster yang tertransfeksi. Di sini juga diuji aktivitas sitokrom c oksidase secara histokimia, karena 3 subunitnya (CO1, CO2 and CO3) dikode oleh DNA mitokondria. Pada analisis sebelumnya, tidak dideteksi adanya penurunan aktivitas sitokrom c oksidase 2 minggu setelah elektroporasi serat otot. Penurunan aktivitas sitokrom c oksidase yang lambat ini mungkin dapat disebabkan oleh penghancuran sintesis kompleks enzim yang lambat didalam sel otot *nondividing*.

Penampakan yang cepat dari disfungsi mitokondria pada sel kultur setelah ekspresi endonuklease dapat dijelaskan dengan pergantian cepat enzim-enzim mitokondria yang berhubungan dengan proliferasi seluler.

Baik pada sel kultur maupun pada otot rangka hamster didapatkan bahwa endonuklease eksogen yang dimasukkan ke dalam mitokondria tidak menghasilkan efek racun terhadap DNA inti. Fenomena ini sejalan dengan fakta bahwa mitokondria endogen eksonuklease atau protease baik di matriks maupun di ruangan intermembran tidak akan menyerang DNA inti atau protein-protein seluler kecuali mungkin dalam beberapa kondisi patologis. Oleh karena genom ekstraseluler, seperti DNA mitokondria dan DNA kloroplas memiliki ukuran tertentu, sehingga dapat ditentukan enzim restriksi yang akan digunakan untuk memotong genom mutan. Teknik ini juga dapat diaplikasikan pada mutan baru yang resisten terhadap enzim restriksi.

Hasil-hasil yang didapat dari penelitian ini mengindikasikan bahwa penggunaan enzim restriksi ke dalam mitokondria yang secara spesifik mengenali DNA mitokondria mutan menghasilkan strategi baru untuk terapi gen penyakit mitokondria. Keuntungan dari strategi ini adalah bahwa ekspresi enzim restriksi yang "tak abadi" ini cocok untuk eliminasi DNA mitokondria mutan. Sekali terjadi eliminasi DNA mutan, DNA normal menjadi populasi yang dominan dalam sel, menghasilkan perubahan dari genom mutan ke genom normal.

Untuk mengobati kerusakan subunit 6  $F_0F_1$ -ATPase dengan terapi gen dibutuhkan ekspresi yang "abadi". Sebaliknya, ekspresi enzim restriksi endonuklease dapat "tidak abadi". Setelah eliminasi DNA mitokondria mutan, subunit 6 normal akan disuplai dari DNA mitokondria normal. Dengan demikian, diharapkan ekspresi *SmaI* dapat dikontrol dengan sistem *on/off* yang tepat untuk memastikan bahwa metode ini aman untuk terapi gen.



## Terapi Mutan A3243g

Secara umum tidak ada terapi yang khusus untuk mutan A3243g.

Tetapi, seorang pasien yang memiliki mutasi A3243g dapat memperoleh manfaat dari fisioterapi, konsumsi vitamin, koenzim, terapi simptomatik untuk beberapa abnormalitas yang telah disebutkan sebelumnya, atau dilakukan operasi pembedahan. Karena manifestasi klinis yang ditimbulkan terjadi sangat kompleks, maka perlu dilakukan suatu sistem perawatan yang terpadu dan multidisiplin, yang di dalamnya melibatkan seorang perawat dan ahli terapis fisik yang memiliki kemampuan sebaik ahli medis neurologi, oftalmologi, ahli penyakit dalam, dermatologi, psikiatri, dan anestesiologi yang tentunya sudah profesional. Selain itu, para pasien yang memiliki mutasi A3243g dianjurkan untuk menghindari obat-obatan tertentu yang sifat kerja obat tersebut akan mengganggu aktivitas rantai respirasi, seperti *valproic acid*, *barbiturates*, *biguanides*, *tetracyclines*, *chloramphenicol*, *zidovudin*, beberapa obat bius lokal, dan *phenothiazines* (Finsterer, 2007).

Derivat kuinon telah sering digunakan dalam pengobatan penyakit mitokondria. Efek yang ditunjukkan dari masing-masing derivat kuinon tersebut bergantung pada rantai sampingnya, yang akan mengatur interaksi derivat senyawa tersebut dengan rantai respirasi. Efek yang baik juga telah ditunjukkan oleh *coenzime Q10* dan varian rantai pendek *idebenone* pada penderita ataksia Friedreich's dan defisiensi koenzim Q. *Idebenone* juga

memberikan efek yang baik pada pasien kardiomiopati. Beberapa studi menyebutkan bahwa  $\text{L}$ -arginin, yaitu sebuah prekursor oksida nitrat, dapat meningkatkan fungsi endotelial pada pasien MELAS.  $\text{L}$ -arginin juga berguna bagi penderita SLEs. Selain itu, beberapa studi menunjukkan bahwa humanin, yaitu sebuah peptida endogen yang bekerja menekan terjadinya apoptosis juga meningkatkan jumlah ATP dalam sel tanpa menginduksi terjadinya replikasi mtDNA (Finsterer, 2007).

Asam dikloroasetat (DCA), sebuah bahan yang berpotensi untuk menurunkan produksi laktat, telah terbukti dapat menurunkan manifestasi pada mutan A3243g. Pada suatu kelompok yang terdiri atas empat pasien mutasi A3243g, DCA dapat mengobati sakit kepala, sakit daerah perut, dan SLEs. Namun, DCA tidak memberikan efek pada *short stature, deafness, gangguan mental, atau abnormalitas elektrofisiologis*. Pada seorang pasien, DCA tidak memberikan efek positif pada fungsi kompleks rantai respiration, padahal seharusnya fungsi tersebut dapat diperbaiki oleh DCA. Selain itu, DCA memberikan efek samping seperti disfungsi liver, hipokalsemia, dan polineuropati. Dosis pemakaian DCA yaitu sebanyak 25 mg/kg/hari dapat menyebabkan efek toksin pada saraf periferal sehingga menyebabkan polineuropati pada orang dewasa. Oleh karena itu, sebaiknya dosis DCA yang diberikan pada orang dewasa tidak sebanyak dosis yang diberikan pada anak-anak dan remaja. Sejauh ini DCA tidak dianjurkan untuk pengobatan mutan A3243g (Finsterer, 2007).

Mengenai manajemen anestesi bagi mutan A3243g, sebaiknya diberikan bersamaan dengan pemakaian relaksan



otot non-depolarisasi. Seringkali manifestasi klinis mutan A3243g akan bertambah parah setelah dilakukan anestesi general. *Methoxyflurane* sebaiknya dihindari untuk pemakaian anestesi karena akan menyebabkan toksitas pada nefro karena pembentukan *methoxy-difluoro-acetic-acid* dan DCA (Finsterer, 2007).

Buku ini tidak diperjualbelikan.

# DAFTAR PUSTAKA

- Alan, T. W., Choo-Kang, Lynn, S., Geoffrey, A. T., Mark, E. D., Sarcpreet, S. S., Teressa, M. W., Patrick, F. C., Douglass, M. T., & Mark, W. 2002. Defining the importance of mitochondrial gene defects in maternally inherited diabetes by sequencing the entire mitochondrial genome. *Brief Genetics Report. Diabetes*, 51: 2317-2320.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., & Drouin, J. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-65.
- Anonim. 2003. Mutasi DNA mitokondria penyebab diabetes melitus. melalui <<http://www.gklinis.com/>>, [10/11/2003].
- Bell, A. J. 2004. *MELAS Syndrome: Overview and case study*. Department of EEG and Clinical Neurophysiology. Seattle.
- Brown, G. K., Otero, L. J., LeGris, M., & Brown, R. M. 1994. Pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Med Genet*. 31: 875-9.
- Bruno, C., Minetti, C., & Tang, Y. 1998. Primary adrenal insufficiency in a child with mitochondrial DNA deletion. *J Inherit Metab Dis*. 21: 155-161.
- Bruyn, G. W., Bots, G. T., Went, L. N., & Klinkhamer, P. J. 1992. Hereditary spastic Dystonia with Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Neuropathological findings. *J Neurol Sci*. 113: 55-61.
- Celeste, A., Diflippantonio, S., & Diflippantonio, M.J. 2003. H2AX Haploinsufficiency Modifies Genomic Stability and tumor susceptibility. *Cell*. 114(3): 371-383.
- Chinnery, P.F. 2003. Mitochondrial disorder overview. Department of Neurology University of Newcastle. Newcastle.
- Chinnery, P. F., Howell, N., Andrews, R. M., & Turnbull, D. M. 1999. Clinical mitochondrial genetics. *Q. J. Med Genet*. 36: 425-436.

- Chinnery, P. F., Howell, N., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. 1998. MELAS and MERRF: The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain*. 121: 1889-994.
- Chinnery, P. F., Howell, N., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. 1997. Molecular pathology of MELAS and MERRF: the Relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain*. 120: 1713-21.
- Chinnery, P. F. & Turnbull, D. M. 1998. Vomitting, anorexia and mitochondrial DNA disease. *Lancet*. 351:448.
- Chinnery, P. F. & Turnbull, D. M. 1997. Mitochondrial medicine. *Q. J. Med.* 90: 657-66
- Chinnery, P. F. & Turnbull, D. M. 1997. The clinical features, investigation and management of patients with mitochondrial DNA defects. *J Neurosurg Psychiatry*. 63: 559-63.
- Damian, M. S., Seibel, P., & Reichmann, H. 1995. Clinical spectrum of the MELAS mutation in a large pedigree. *Acta Neurol Scand*. 92: 409-15.
- De Vries L., Elenko, E., Hubler, L., Jones T.L & Farquhar M.G.1996. *GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G alpha i subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A. (26):15203-8
- DiMauro, S. & Schon, E. A. 1990. Mitochondrialencephalomyopathies. *Neurological Clinics*. 8: 483-506.
- Dr'ge, W. 2002. Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82: 47-95.
- Fajans, S. S., Bell, G. I., & Polonsky, K. S. 2001. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of The Young. *N Engl Med J*. 345: 971-980.
- Finsterer, J. 2007. Genetic, pathogenetic, and phenotypic implication of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation. *Acta Neurol Scand*. 116: 1-14.

- Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C et al (2003) Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol.* 54:524–526.
- Gardner, J. C., Goliath, R., & Viljoen, D. 1997. Familial streptomycin ototoxicity in a South African family: a Mitochondrial disorder. *J Med Genet.* 34: 904-6.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig P.E., Didelot, C. & Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation.* 13: 1423–1433.
- Gerbitz, K. D., van den Ouwehand, J. M. W., Maasen, J. A., & Jaksch, M. 1995. Mitochondrial diabetes: a Review. *Biochem Biophys Acta.* 1271: 253-60.
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 53 (Suppl1): S110–S118.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. 1993. *An introduction to genetic analysis.* Fifth Edition. New York. W. H. Freeman and Company.
- Guillausseau, P. J., Massin, P., Dubois-LaForgue, D., Timsit, J., Virally, M., & Gin, H. 2001. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med.* 134: 721-8.
- Hammans, S. R., Sweeney, M.G., Hanna, M. G., Brockington, M., Morgan-Hughes, J. A., & Harding, A. E. 1995. The mitochondrial DNA transfer RNA<sup>Leu(UUR)</sup> A to G (3243) mutation, A clinical and genetic study. *Brain.* 118: 721-734.
- Hammans, S. R., Sweeny, M. G., & Brockington, M. 1993. The Mitochondrial DNA Transfer RNA (Lys)A→G (8344) mutation and the syndrome of Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain.* 116(pt3): 617-32.
- Hanna, M. G., Vaughan, J. R., & Silburn, P. A. 1997. Two unusual clinical presentations of the mitochondrial dna a3243g point mutation in adult neurological practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 62: 544-5.

- Hao, R., Yao, Y. N., Zeng, Y. G., Xu, M. G., & Wang, E. D. 2004. Reduction of mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> aminoacylation by some melas-associated mutations. *FEBS Left.* 578: 135-9.
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A., & Attardi, G. 1998. Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNALys and tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. *Nucleic Acids Res.* 27: 756-63.
- Henderson, G. V., Kittner, S. J., & Johns, D. R. 1997. An incidence study of stroke secondary to MELAS in the young. *Neurology.* 48: A403.
- Hesterlee, S. 2001. Mitochondrial disease in perspective symptoms, diagnosis and hope for the future. melalui [www.cla-dca.gcrc.ufl.edu/cla-dca/physinfo.html](http://www.cla-dca.gcrc.ufl.edu/cla-dca/physinfo.html), [14/12/2005].
- Hirano, M., Pavlakis, S. G. 1994. Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes (MELAS): current concepts. *J Child Neurol.* 9: 4-13.
- Hirano, M., Ricci, E., & Koenigsberger, M. R. 1992. MELAS: An original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscular Disorder.* 2: 125-35.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K., & Morgan-Hughes, J. A. 1990. A New mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 46: 428-33.
- Holt, I. J., Miller, D. H., & Harding, A. E. 1989. Genetic heterogeneity and mitochondrial dna heteroplasmy in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *J Med Genet.* 26: 739-743.
- Holt, I., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A 1988. Deletion of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331: 717-19.
- Howell, N. 1997. Leber's Hereditary Optic Neuropathy: How Do Mitochondrial DNA Mutations Cause Degeneration of the optic nerve? *J Bioenerg Biomembr.* 29: 165-73.
- Howell, N., Kubacka, I., Smith, R., Frerman, F., Parks, J. K., & Parker, W. D., Jr. 1996. Association of the mitochondrial 8344 MERRF

- mutation with maternally inherited spinocerebellar degeneration and leigh disease. *Neurology*. 46: 219-222.
- Hudson, G., Deschauer, M., Busse, K., Zierz, S., & Chinnery, P. F. 2005. Sensory ataxic neuropathy due to a novel C10Orf2 mutation with probable germline mosaicism. *Neurology*. 64: 371-373.
- Jackson, M. J., Schaefer, J. A., Johnson, M. A., Morris, A. A. M., Turnbull, D. M., & Bindoff, L. A. 1995. Presentation and clinical investigation of mitochondrial and respiratory chain disease. *Brain*. 118: 339-357.
- Johns, D. R. 1995. Mitochondrial DNA and disease. *The New England Journal of Medicine (NEJM)*. 334: 2656-2668.
- Johnson, C.C., Barron, E.J., Kauffman, E.G., Arthur, M.A., Fawcett, P.J., & Yasuda, M.K. 1996. Middle cretaceous reef collapse linked to ocean heat transport. *Geology*. 24(4), 376-380.
- Kadowaki, T., Kadowaki, H., Mori, Y., Tobe, S., Sakuta, R., Suzuki, Y., Tanabe Y., Sakura, H., Awata, T., Goto, Y., Hayakawa, T., Matsuoka, K., Kawamori, R., Kamada, T., Horai, S., Nonaka, I., Hagura, R., Akanuma, Y., & Yazaki, Y. 1994. A subtype of diabetes melitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 330: 962-968.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., & Tiranti, V. 2000. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA Maintenance. *Science*. 289: 782-785.
- Kiechl, S., Horvath, R., Luoma, P. 2004. Two Families with autosomal dominant progressive external ophtalmoplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 75: 1125-1128.
- Kimata, K. G., Gordan, L., Ajax, E. T., Davis, P. H., & Grabowski, T. 1998. A Case of late onset MELAS. *Arch Neurol*. 55: 722-5.
- 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 inheritance. *Acta Diabetol.* 41: 179-184.
- Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K., Ramakrishnan, V., & Suzuki, T. 2008. modified uridines with c5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U\_G Wobble pairing during decoding. *The Journal Of Biological Chemistry.* 283: 18801-18811.
- Larsson, N. G. & Clayton, D. A. 1995. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet.* 29: 151-78.
- Lehtinen, S. K. 2001. Genetic selection in human mitochondria. *Acta Universitatis Tamperensis*, Tampere, pp: 11-32.
- Lewin, B. 1997. *Gens VI*. Oxford University Press and Cell Press. New York.
- Lightowers, R. N., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., & Howell, N. 1997. mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy, and disease. *Trends Genet.* 13: 450-5.
- Liou, C. W., Huang, C., & Wei, Y. H. 2001. Molecular analysis of diabetes melitus-associated A3243G mitochondrial DNA mutation in Taiwan cases. *Diab. Res. and Clin. Practice* 54 Suppl. 2: S39-S43.
- Lynn, S., Wardell, T., Johnson, M.A., Chinnery, P.F., Daly, M.E., Walker, M., & Turnbull, D.M. 1998. Mithochondrial diabetes: investigation and identification of a novel mutation. *Brief Genetics Report. Diabetes.* 47: 1800-1804.
- 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.
- Maassen, J. & Kadowaki, T. 1996. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia.* 39: 375-82.

- Maksum, I.P. 2017. *PCR dalam Investigasi Penyakit Mitokondria*. Alqaprint Jatinangor, Cakrawala Baru Dunia Buku.
- Maksum, I. P., Oemardi, M., Sriwidodo, Sidik, A., Amalia, R., & Sasongko, H. 2007. Penggunaan metode PASA mismatch tiga basa untuk pencarian fenotipe MIDD pada pasien diabetes melitus tipe 2 di Indonesia, Seminar Nasional Ikatan Ilmu Faal Indonesia.
- Maksum, I. P., Sidik, A., Subroto, T., Prihartanto, B., & Subarnas, A. 2005. Analisis diabetes melitus tipe 2 menggunakan PASA dan SSCP dan studi pola pewarisananya, Laporan Penelitian.
- Maksum, I. P., Siti F. Alchumaira, Dian S. Kamara, Saadah D. Rachman, S. Komalaningsih. 2015. the relation of mitochondrial dna mutation with mitochondrial diseases in coding region, *Procedia Chemistry*. 17: 84 – 92.
- Maksum, I. P., Sriwidodo, S. Gaffar, K. Hassan, T. Subroto, S & Soemitro. 2017. *Teknik Biologi Molekular*. Alqaprint Jatinangor, Cakrawala Baru Dunia Buku.
- Maksum, I. P., Suprijana, O., Subroto, T., Prihartanto, B., & Subarnas, A. 2004. Penggunaan PCR-RFLP dan teknik dna rekombinan untuk analisis diabetes melitus tipe-2, Laporan Penelitian Hibah Bersaing XIII.
- Man, P. Y., Griffiths P. G., Brown, D. T., Howell, N., Turnbull, D. M., & Chinnery, P. F. 2003. The Epidemiology of Leber's Hereditary Optic Neuropathy in the North East of England. *Am J Human Genet.* 72: 333-39.
- Mansergh, F. C., Millington-Ward, S., & Kennan, A. 1999. Retinitis Pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a c12258A Mutation in the Mitochondrial MTTS2 Gene. *Am J Hum Genet.* 64: 971-85.
- Mathews, C. K. & Holde, K. E. 1999. *Biochemistry*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. New York.
- Matthews, P. M., Tampieri, D., & Berkovic, S. F. 1991. Magnetic resonance imaging shows spesific abnormalities int the MELAS syndrome. *Neurology*. 41: 1043-6.

- Marzuki S., Genetic diversity and human diseases. 2000. Eijkman Institute for Molecular Biology. Jakarta.
- McFadden, G. 2005. Poxvirus tropism. *Nature reviews. Microbiology.* 3(3), 201–13.
- Meissner, C., von Wurmb, N., Schimansky, B. & Oechmichen, M. 1999. Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle, *Forensic Science International.* 105: 115-124.
- Melov, S. 2000. Mitochondrial Oxidative Stress. physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann NY Acad Sci.* 908: 219–225.
- Milligan, J. R., Aguilera, J. A., & Ward J. F. 1993. variation of single-strand break yield with scavenger concentration for the SV40 Minichromosome Irradiated in Aqueous Solution. *Radiat Res.* 133 (2): 158–162.
- Mitomap. 2010. *Human Mitochondrial Genome Database* .<http://www.mitomap.org/>.
- Mohora, M., Greabu, M., Muscurel, C., Dață, C., & Totan, A. 2007. the sources and the targets of oxidative stress in the etiology of diabetic complication. *Romanian J. Biophys.* 17: 63-84.
- Morases, C. T., DiMauro, S., & Zeviani, M. 1989. mitochondrial dna deletions in progressive external ophtalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *New England Journal Medicine.* 320: 1293-9.
- Morten, K. J., Cooper, J. M., Brown, G. K., Lake, B. D., Pike, D., & Poulton, J. 1993. a new point mutation associated with mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2: 2081-7.
- Munnich, A., Rotig, A., & Chretien, D. 1996. Clinical presentations of mtitochondrial dissorders in childhood. *J Inherit Metab Dis.* 19: 521-7.
- Nelson, D. & Cox, M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry (4th ed.).* 6th ed. USA: University of Wisconsin Press.

- Nikoskelainen, E. K. 1994. Clinical picture of LHON. *Clin Neurosci.* 2: 115-20.
- Noer, A.S., Martasih, F., Mulyani, S., Muktiningsih, & Wirahadikusumah, M. 1994. analisis varian urutan nukleotida d - loop mtDNA manusia dari berbagai daerah di indonesia (The analysis of human mtDNA D-loop nucleotide sequence in several regions in Indonesia), *Prosiding Seminar Bersama UKM - ITB I.*
- Nomiyama, T., Tanaka, Y., Hattori, N., Nishimaki, K., Nagasaka, K., Kawamori, R., & Ohta, S. 2002. Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA extracted from peripheral blood cells in diabetic patients. *Diabetologia.* 45: 1577-1583.
- Ohkubo, K., Yamano, A., Nagashima, M., Mori, Y., Anzai, K., Akehi, Y., Nomiyama, R., Asano, T., Urae, A., & Ono, J. 2001. mitochondrial gene mutations in the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> Region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin. Chem.* 47: 1641-1648.
- Olsson, C. 2001. Quantitative analysis of disease associated mutations and sequence variants. *Acta Universitatis Upsaliensis.* Pp: 4-22.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphismd of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 2766-2770.
- 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.
- Pieczenik, S. & Neustadt, R., J. 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology.* 83: 84-92.
- Rotig, A., Cormier, V., Blanche, S., Bonnefont, J. P., & Ledeist, F. 1990. Pearson's marrow pancreas syndrome. A Multiyistem Mitochondrial Disorder of Infancy. *J Clin Ivest.* 86: 1601-8.

- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J., & Letellier, T. 2003. Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* 370: 751-762.
- Roy, M. D., Wittenhagen, L. M., & Kelley S. O. 2005. Structural probing of a pathogenic tRNA dimer. *RNA*. 11: 254-260.
- Santosa, Soenarto, & Hadi, S. 2005. *Pengenalan Miopati Mitokondria*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Santorelli, F. M. & Tessa, A. 2004. Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa (NARP) syndrome. *Orphanet Ensiklopedia*.
- Schapira, A. H. V. 2006. Mitochondrial disease. *Lancet*. 368: 70-82.
- Shoffner, J. M., Brown, M. D., & Stugard, C. 1995. Leber's Hereditary Optic Neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation. *Ann Neurol*. 38: 163-9.
- Shoffner, J. M., Voljavec, A. S., Dixon, J., Kaufman, A., Wallace, D. C., & Mitch, W. E. 1995. Renal amino acid transport in adults with oxidative phosphorylation diseases. *Kidney Int*. 47: 1101-7.
- Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A. M., Seibel, P., Ballinger, S. W., & Wallace, D. C. 1990. Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibre Disease (MERRF) is associated with mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*. 61: 931-7.
- Singhal, N., Gupta, B. S., Saigal, R., Makkar, J., & Mathur R. 2000. Mitochondrial diseases: an overview of genetics, pathogenesis, clinicals, features and an approach to diagnosis and treatments. *Journal of Postgraduate Medicine*. 43: 224-230.
- So, W. Y., Ng, M. C. Y., Lee, S. C., Sanke, T., Lee, H. K., & Chan, J. C. N. 2000. Genetic of type 2 Diabetes Mellitus. *HKMJ*. 6: 69-75.
- Sohm, B., Frugier, M., Brule, H., Olszak, K., Przykorska, A., & Florentz, C. 2003. Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J Mol Biol*. 328: 995-1010.
- Suzuki, Y., Nishimaki, K., Taniyama, M., Muramatsu, T., Atsumi, Y., Matsuoka, K., & Ohta, S. 2004. Acute metabolic cataract as a first manifestation of diabetes mellitus in A 12-year-old girl. *Diabetologia*. 47: 3.

- Takahiro, I & Fumihiko, S. 2005. Pathogenesis of stroke-like episodes in MELAS: analysis neurovascular cellular mechanisms.
- Taniyama, Y. & Griendling, K. K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 42: 1075–1081.
- Taylor, R. & Turnbull, D. 2005. Mitochondrial DNA transcription: regulating the power supply. *Cell*. 130(2): 211-213.
- Taylor, R. W., Taylor, G. A., Durham, S. E., & Turnbull, D. M. 2001. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Research*. 29(15): e74.
- Taylor, R. W., Birch-Machin, M. A., & Schaefer, J. 1996. Deficiency of complex II of the mitochondrial respiratory chain in late-onset optic atrophy and ataxia. *Ann Neurol*. 39: 224-32.
- Van der Knaap, M. S., Jakobs, C., & Valk, J. 1996. magnetic resonance imaging in lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis*. 19: 535-47.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., & Kennedy, M. C. 2000. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An Electron Spin Resonance Investigation. *J. Biol. Chem.* 275(19): 14064–14069.
- Vilarinho, L., Santorelli, F. M., Rosas, M. J., Tavares, C., Melo-Pires, M., & DiMauro, S. 1997. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet*. 34: 607-9.
- Vinson, J. 1991. Mitochondrial disease in perspective symptoms. Diagnosis And Hope For The Future.
- Wallace, D. C., Zheng, X., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Hodge, J. A., Kelley, R. I., Epstein, C. M., & Hopkins, L.C. 1988. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*. 66: 601–610.
- Wei, Y. H. & Lee, H. C. 2003. edited by Spiegel H. E, Nowacki G, Hsiao K. J. Mitochondrial DNA mutations and oxidative stress

- in mitochondrial diseases, *Advances in Clinical Chemistry*. 37: 84-128.
- White-Cooper, H., Schäfer, M. a, Alphey, L.S., & Fuller, M.T. 1998. Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*. 125(1): 125-134.
- Widowati, W. 2008. Potensi antioksidan sebagai antidiabetes. *Jurnal Kedokteran Maranatha*. 7(2): 193-202.
- Wilson, F. H., Hariri, A., & Farhi, A. 2004. A Cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science*. 306: 1190-94.
- Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Polanskey, D., Replogle, J., & Budowle, B. 1995. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine*. 108(2): 68- 74.
- Wittenhagen, L. M. & Kelley, S. O. 2002. Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat. Struct. Biol.* 9: 586-590
- Wray, S. H., Provenzale, J. M., Johns, D. R., & Thulborn, K. R. 1995. MR of the brain in mitochondrial myopathy. *Am J Neuroradiol.* B16: 1167-73.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S., & Watanabe, K. 2005. Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs<sup>Leu(UUR)</sup> with patogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J Biol Chem.* 275: 4251-7.

# GLOSARIUM

- **Antioksidan** : zat antioksidasi, zat sintetik atau alami yang ditambahkan makanan, karet, cat atau minyak nabati untuk mencegah terjadinya oksidasi.
- **Antikodon** : Triplet nukleotida dalam RNA pemindah (*transfer RNA*), merupakan komplemen kodon dalam RNA pemberita (*messenger RNA*) yang menspesifikasi asam amino tertentu.
- **Apoptosis** : proses aktif (program) kematian sel, ditandai pembelahan DNA kromosom, kondensasi kromatin, dan fragmentasi nukleus dan sel itu sendiri.
- **Asidosis laktat** : keadaan patologis akibat penimbunan atau akumulasi asam laktat.
- **Ataksia** : Gerakan yang tidak teratur. A. cerebelar (*cerebellar ataxia*) merupakan gangguan koordinasi gerakan akibat lesi serebelum (otak kecil) atau traktus-traktus serebelari. A. sensorik merupakan gerakan tidak teratur pada orang yang tidak mengetahui sikap anggota badan karena kerusakan pada traktus grasilis dan kuneatus. Ataksia terjadi pula otot mengalami paresis (lumpuh ringan).
- **ATP** : *adenosine-5'- triphosphate*, nukleotida yang berperan sebagai energi kimia.
- **Autosomal** : salah satu kromosom biasa yang tersebar rata dalam sel-sel kelamin.
- **Biologi molekul** : ilmu yang mempelajari tentang perkembangan teknik molekul di dalam sel.

- **Biopsi** : pengambilan jaringan dari pasien hidup untuk pemeriksaan patologik guna menentukan diagnosis.
- **Blebbing** : peristiwa rusaknya sitoskeleton sel dan membuat membran menjadi menonjol keluar.
- **CPEO** : *chronic progressive external ophthalmoplegia*, : penyakit sindrom klinik yang terjadi pada anak-anak atau dewasa, yang ditandai oleh gangguan fungsi otot ekstraokuler secara progresif tanpa gangguan pupil.
- **Deafness** : tuli, kurang pendengaran.
- **Demensia** : kemunduran inteligensi.
- **Denaturasi** : disosiasi atau pemutusan untai komplementer asam nukleat dua untai secara kimia atau termal, atau disebut juga *melting*.
- **Diabetes melitus** : kencing manis, penyakit yang disebabkan keadaan kekurangan insulin dengan akibat glukosa tidak dapat diolah oleh badan sehingga kadar glukosa dalam darah meninggi dan dikeluarkan dalam urin.
- **DM tipe 2** : diabetes melitus yang disebabkan adanya penurunan sekresi insulin dan resistensi insulin dan biasanya tidak bergantung pada insulin di dalam terapinya.
- **Diagnosis prenatal** : penentuan jenis penyakit yang diderita pasien pada masa prakelahiran.
- **Disartria** : gangguan pengucapan, melafal kata.
- **DNA** : *deoxyribonucleic acid*, polinukleotida yang umumnya terdiri atas dua untai antiparalel dan berfungsi sebagai senyawa pembawa sifat genetik.
- **DNA fingerprinting** : metode yang menghasilkan pola fragmen restriksi polimorfik yang berbeda antara genom suatu individu atau pola pita hibridisasi dalam Shouthern blot yang dapat digunakan untuk identifikasi seseorang dalam tujuan forensik atau legalitas.

- **DNA kloroplas** : sistem genetik pada organel kloroplas pada tanaman yang berperan menyediakan protein dalam sistem fotosintesis.
- **DNA kromosom** : sistem genetik yang terdapat di dalam inti sel.
- **DNA mitokondria** : sistem genetik pada organel mitokondria yang berbeda dengan sistem genetik inti dan berpartisipasi dalam sintesis beberapa polipeptida yang dibutuhkan dalam kompleks enzim respirasi.
- **DNA mitokondria (mtDNA) manusia** : suatu molekul sirkular tertutup dan berukuran kecil, yaitu sebesar 16.569 pb dan menjadi genom manusia pertama yang secara lengkap dipetakan urutannya oleh Anderson *et al.*
- **Dysphagia** : kesulitan menelan.
- **Ensefalopati** : gangguan otak yang tak jelas sebabnya.
- **Epilepsi** : serangan berulang gangguan fungsi otak dengan gejala-gejala penurunan kesadaran, gangguan motoris, gangguan sensoris dan mental, dapat disertai atau tidak disertai kejang.
- **Fenotipe** : karakteristik sel atau organisme yang dapat teramati.
- **Fisiologi** : ilmu faal yang mempelajari fungsi sel, jaringan dan alat organisme hidup.
- **Fisiologis** : mengenai fungsi tubuh.
- **Fosforilasi oksidatif** : reaksi transfer fosfat dalam sintesis ATP melalui reaksi oksidasi substrat dengan oksigen pada matriks mitokondria.
- **Gastrointestinal** : gastro merupakan bentuk awalan dari gaster yang berarti lambung dan intestinal berkaitan dengan intestinum atau usus, bagian saluran pencernaan antara lambung dan dubur.

- **Gen** : urutan nukleotida yang mengode protein, seperti ekson.
- **Genetika** : ilmu yang mempelajari faktor atau sifat-sifat keturunan.
- **Genom** : gabungan komponen heridas (bersifat turun-temurun) dari suatu organisme, mengandung satu set kromosom organisme tertentu.
- **Genom mitokondria manusia** : suatu genom ekstrakromosom berpartisipasi dalam sintesis beberapa polipeptida yang dibutuhkan dalam kompleks enzim respirasi dan yang memiliki dampak penting pada kesehatan manusia dan penyakit.
- **Genotipe** : Kumpulan alel yang ada dalam suatu individu.
- **Haemostatis** : keadaan kesetimbangan (*steady states*) yang dinamis, seperti kadar gula darah yang harus dipertahankan sebesar 5 mM.
- **Haploid** : sel (gamet) yang hanya mempunyai satu kopi setiap kromosom.
- **Haplotype** : konstitusi genetik dari suatu individu dengan respek terhadap satu atau lebih bagian dari pasangan gen alelik.
- **Heteroplasmi** : varian DNA mitokondria pada sel tunggal.
- **Heterozigot** : suatu sel atau organisme yang mempunyai dua alel yang berbeda pada suatu lokus di dalam kromosom homologous.
- **Homologi** : Kemiripan (*similarity*) urutan nukleotida antara dua molekul DNA yang berbeda.
- **Homoplasmi** : suatu sel atau organisme mempunyai semua kopi DNA mitokondria yang identik.
- **Homozigot** : suatu sel atau organisme mempunyai alel yang sama pada suatu lokus di dalam kromosom homologous.

- **Histon** : protein oktamer yang bermuatan positif dan berinteraksi elektrosatik dengan muatan negatif dari DNA sehingga membentuk nukleosom di dalam suatu kromosom.
- **Histokimia** : ilmu yang mempelajari kimia sel dan jaringan.
- **Hipertrofia** : pembesaran suatu alat yang disebabkan bertambah besarnya ukuran sel-selnya.
- **Insulin** : hormon yang dihasilkan oleh sel beta pulau Langerhans pankreas dan berfungsi mengatur metabolisme karbohidrat.
- **Intron** : DNA yang tidak mengode dan memisahkan antara ekson-ekson (DNA yang mengode) dalam suatu gen.
- **in vitro** : di luar sel.
- **Kardiomiopati** : kardio bentuk awalan yang berarti jantung, penyakit otot jantung yang tidak diketahui sebabnya.
- **Katarak** : kekeruhan lensa, simpainya atau seluruhnya.
- **Kodon** : rangkaian tiga basa nitrogen yang menentukan kode asam-asam amino pada sintesis protein, terdapat pada mRNA.
- **Kodon awal** : *start codon*, triplet nukleotida yang mengode asam amino metionin sebagai awal dari sintesis protein.
- **Kodon terminasi** : *stop codon*, triplet nukleotida yang tidak mengode asam amino tetapi sebagai akhir dari sintesis protein.
- **Kompleks enzim respirasi** : suatu kompleks protein I, II, III, IV dan V yang terlibat dalam transfer elektron dan sintesis ATP dalam suatu rantai pernapasan atau respirasi.
- **Kilo basa (kb)** : 1000 pasang basa DNA atau RNA.
- **KSS** : *Kearns-Sayre syndrome*, dikarakterisasi oleh CPEO.
- **LHON** : *Leber's hereditary optic atrophy/neuropathy*, gangguan pusat penglihatan bilateral akut atau subakut yang disebabkan oleh kerusakan sel ganglia retina dan aksonnya.

- **Leg paresthesia** : gangguan rasa kulit berupa kesemutan.
- **Lensa** : alat dalam bola mata yang terletak di belakang iris, terdiri dari zat tembus cahaya, berbentuk seperti cakram, dan dapat menebal menipis dalam proses akomodasi.
- **Lokus** : posisi dalam kromosom di mana gen atau bagian yang termutasi berada.
- **Maternal** : berkaitan dengan ibu.
- **MELAS** : *mitochondrial encephalopathy, lactacidosis, and stroke-like episode*, salah satu dari kelompok penyakit *mitochondrial encephalomyopathy*. Gejala yang umum terlihat adalah muntah yang berulang-ulang, *seizure* (kejang), *encephalopathy*, sakit kepala migren, *stroke-like epiaodes* yang sering kambuh, akumulasi asam laktat dalam darah (*lactic acidosis*), dan mengalami kelemahan otot pada satu sisi tubuh (*hemiparesis*).
- **MERRF** : *myoclonic epilepsy and ragged red fibres*, penyakit multisistem yang dikarakterisasi oleh *myoclonus* sebagai gejala awal, diikuti dengan epilepsi lemah, *ataxia*, dan *dementia*, dan *ragged red fibres* yang teramati pada biopsi otot.
- **Metabolisme** : reaksi biokimia melalui sederetan reaksi enzimatik.
- **Metabolit** : produk metabolisme.
- **MIDD** : *maternally inherited diabetes and deafness*, salah satu subtipe dari diabetes melitus dan dikarakterisasi oleh gejala yang timbul di atas usia 25 tahun, pewarisan secara maternal, dan terganggunya fungsi indra pendengaran (ketulian).
- **Myoglobinuria** : kadar mioglobin di dalam urin.
- **Mioklonus** : kejang dan melemasnya otot berulang-ulang.
- **Miopati** : penyakit otot yang tidak diketahui sebabnya.
- **MILS** : *maternally inherited Leigh syndrome*, kumpulan gejala meliputi *seizure* (kejang), *fatigue* (sakit otot), kurang refleks,

kesulitan makan dan menelan, kesulitan bernapas, dan lemah fungsi motorik dan pewarisannya melalui garis ibu.

- **Mitokondria** : organel sel berbentuk granul dan filamen dalam sitoplasma yang berfungsi sebagai tempat sintesis energi (ATP).
- **Mutagen** : zat yang menimbulkan perubahan (mutasi) genetik.
- **Mutasi** : perubahan suatu gen yang menghasilkan produk protein yang relatif berbeda dari spesies aslinya.
- **Mutasi delesi** : terjadi kehilangan beberapa basa yang dapat menyebabkan pergeseran kode genetik.
- **Mutasi titik** : perubahan basa tunggal yang dapat menyebabkan perubahan asam amino tunggal dari suatu protein, mutasi ini hanya menyebabkan perubahan kecil dalam urutan DNA pada suatu lokus.
- **Mutation load** : proporsi DNA termutasi untuk menentukan ekspresi fenotipenya.
- **NARP** : *neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa*, sindrom klinis yang heterogen, tetapi seringkali dikarakterisasi oleh kombinasi *sensory-motor neuropathy, cerebellar ataxia*, dan rabun ayam.
- **Neuromuskular** : saraf dan otot.
- **Neuropati** : penyakit saraf perifer yang tak jelas sebab atau patogenesisisnya.
- **Nukleotida** : suatu molekul yang mengandung basa purin dan pirimidin, fosfat dan gula ribosa.
- **Oligosymptomatic syndromes** : kumpulan mengenai gejala defisien atau gangguan.
- **Optalmoplegia** : paralisis (lumpuh) otot-otot penggerak mata.

- **Optic atrophy**: hilangnya akson nervus optikus dan digantikan oleh jaringan glia.
- **Organel** : kompartemen sel, umumnya banyak ditemukan pada sel eukariot seperti mitokondria.
- **Pasang basa (pb)** : suatu pasangan komplementer nukleotida dengan ikatan hidrogen dari suatu untai ganda DNA atau RNA dupleks.
- **Pascatranskripsi** : setelah proses transkripsi.
- **PCR** : *Polymerase Chain reaction*, metode amplifikasi DNA secara enzimatik dengan cara memperpanjang primer melalui proses denaturasi, *annealing* dan perpanjangan secara berulang.
- **Pascamitosis** : sesudah pembelahan sel tidak langsung.
- **Patogenis** : sifat dapat menimbulkan penyakit.
- **Patogenetik** : kemampuan untuk menimbulkan perubahan patologis atau menimbulkan penyakit.
- **Penyakit mitokondria** : suatu fenotipe penurunan fungsi dan struktur mitokondria yang berkaitan dengan atau disebabkan adanya mutasi, baik di genom mitokondria maupun inti.
- **PEO** : *progressive external ophthalmoplegia*, lihat CPEO.
- **Polidipsia** : keadaan patologis sering minum karena haus terus-menerus, terdapat dalam diabetes melitus.
- **Polimorfisme** : variasi di dalam urutan DNA sebagai akibat dari mutasi pada daerah *non coding* atau pada daerah pengode (*coding*), tetapi tidak memengaruhi protein yang dikodenya.
- **Poliuria** : banyak kencing.
- **Presymptomatic** : sebelum gejala.
- **Prognosis** : peramalan lampah penyakit.
- **Proofreading** : kemampuan enzim polimerase untuk mengoreksi nukleotida yang salah selama sintesis untai yang komplemen dengan templatnya.

- **Prokariot** : sel mikroorganisme yang tidak mempunyai membran inti (*nucleus*).
- **Protein** : makromolekul yang tersusun atas asam amino melalui ikatan peptida, ikatan disulfida, dan ikatan nonkovalen dan memiliki fungsi biologis yang khas.
- **Protein prematur** : protein yang terbentuk dengan kehilangan beberapa asam amino secara signifikan.
- **Ptosis** : kelopak mata yang lelai (terkulai) patologis.
- **Radikal bebas ROS (reactive oxygen species)** : b e n t u k oksigen singlet ( ${}^1\text{O}_2$ ) melalui transfer energi atau menghasilkan produk reduksi yang tidak sempurna yaitu anion radikal superoksid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) melalui transfer elektron pada proses fosforilasi oksidatif, selanjutnya anion superoksid akan membentuk hidrogen peroksida dan radikal hidroksil.
- **RNA** : asam ribonukleat, molekul untai tunggal yang terdiri atas ribonukleotida yang mengandung basa purin (adenin dan guanin) dan primidin (sitosin dan urasil).
- **rRNA** : RNA yang bersama-sama protein menyusun ribosom sebagai mesin pembuat protein.
- **Replikasi** : proses penggandaan DNA dengan enzim DNA polimerase.
- **Resesif** : sifat tidak memiliki pengaruh yang menentukan.
- **Respirasi** : pernapasan, metabolisme aerobik yang melibatkan adanya oksidasi substrat dengan oksigen.
- **Restriction Fragment length Polymorphism** : variasi dalam ukuran fragmen bila DNA genomik dari individu-individu yang berbeda dipotong dengan enzim restriksi yang sama. Variasi ukuran fragmen merupakan hasil polimorfisme antara sampel-sampel DNA. RFLP dapat juga digunakan untuk pola mutasi suatu penyakit.

- **Retinitis pigmentosa** : degenerasi fotoreseptor yang bersifat kronik, bilateral dengan gambaran fundus yang khas, yaitu penggumpalan pigmen (pembentukan *bone spicule*), pengecilan pembuluh darah, dan diskus optikus yang pucat, seperti lilin.
- **ANDO** : *sensory ataxia, neuropathy, dysarthria, and ophtalmoplegia*, kumpulan gejala ataksia, neuropati, disartria, dan optalmoplegia.
- **Seizure** : kejang.
- **Sekuensing** : metode penentuan urutan nukleotida suatu DNA.
- **Sekresi** : proses pengeluaran hasil kelenjar atau sel secara aktif.
- **Sel  $\beta$  pankreas** : sel pembentuk insulin.
- **Sel epitelium** : sel pembentuk lapisan penutup permukaan yang terbuka dan kelenjar-kelenjar.
- **Sindrom** : kumpulan gejala.
- **Southern blot** : DNA hasil pemisahan elektroforesis ditransfer ke nilon atau nitroselulosa dalam keadaan terdenaturasi untuk hibridisasi.
- **Stres oksidatif** : terjadi ketidakseimbangan reaksi reduksi-oksidasi dalam sel.
- **Transkripsi** : produksi molekul RNA yang disintesis oleh RNA polimerase.
- **Translasi** : produksi suatu protein dengan perubahan informasi yang terkandung dalam molekul mRNA ke bentuk urutan asam amino dalam protein yang dihasilkan.
- **Transfer elektron** : proses serah terima elektron melalui reaksi redoks dari hasil oksidasi substrat ke beberapa kompleks enzim respirasi dan terakhir mereduksi oksigen menjadi air.

- **tRNA** : molekul RNA pembawa antikodon dan asam amino yang sesuai dengan kodon yang dibawa oleh mRNA.
- **tRNA<sup>Leu</sup>** : molekul tRNA yang membawa asam amino leusin.
- **Urin** : kemih, kencing.
- **Wild type** : alel normal pada suatu gen.
- **Wobble position** : Basa pertama pada antikodon yang dapat berubah sehingga antikodon dapat mengode lebih dari satu asam amino.

# INDEKS

## A

- ANDO (*sensory ataxia, neuropathy, dysarthria, and ophthalmoplegia*) 158  
antikodon 73, 28, 57, 159  
antioksidan 10, 11, 12, 43, 44, 147  
apoptosis 6, 42, 128, 133  
Asidosis laktat 149  
ataksia 26, 132, 158  
ATP 4, 119, 122, 123, 124, 126, 130, 133, 149, 151, 154, 155  
Autosomal 49, 149

## B

- Biologi molekul 149  
Biopsi 33, 150  
blebbing 12

## C

- CPEO 22, 30, 31, 37, 46, 48, 49, 50, 54, 37, 64, 72, 88, 150, 154, 157

## D

- deafness* 22, 49, 50, 64, 65, 133, 137, 141, 155  
demensia 26, 32, 36, 34  
denaturasi 93, 101, 93, 101, 156  
diabetes melitus 21, 26, 29, 33, 41, 19, 21, 22, 14, 18, 95, 135, 140, 141, 142, 150, 155, 157  
diagnosis prenatal 53, 115  
disartria 158  
DM tipe 2 40, 150  
DNA *fingerprinting* 150  
DNA kloroplas 131, 151  
DNA kromosom 149, 151

- DNA mitokondria 3, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 163, 128, 129, 130, 131, 135, 151, 152, 153

- DNA mitokondria manusia 130  
*Dysphagia* 51, 151

## E

- Ensefalopati 151  
epilepsi 34, 154

## F

- fenotipe 21, 30, 31, 33, 38, 43, 62, 64, 65, 70, 71, 93, 83, 111, 142, 157  
Fisiologi 151  
fisiologis 75, 8, 127  
fosforilasi oksidatif 5, 157

## G

- gastrointestinal 22, 26, 42, 45, 72  
gen 15, 16, 17, 19, 20, 22, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 49, 54, 57, 36, 39, 61, 62, 63, 64, 65, 70, 72, 74, 75, 79, 80, 72, 73, 83, 87, 89, 90, 100, 101, 112, 118, 119, 121, 124, 128, 131, 152, 153, 154, 155, 159, 118

- Genetika 87, 152  
genom 15, 14, 90, 102, 103, 102, 113, 127, 131, 150, 151, 152, 157

- Genom mitokondria manusia 15, 152

- Genotipe 152

## H

- haemostatis 6  
Haploid 152

- Haplotype 152  
 heteroplasmy 22, 52, 113, 115, 118, 119  
 Heterozygote 152  
 Hipertrophy 153  
 Histone 87, 153  
 histone 19  
 homolog 108  
 homoplasmy 22, 113  
 Homozygote 153
- I**  
 insulin 38, 39, 40, 41, 39, 80, 150, 159  
 intron 19  
*in vitro* 56, 69, 116, 117, 153
- K**  
 kardiomiopathy 133  
 kataract 27, 19, 77, 78, 79  
 Kilo base (kb) 154  
 kodon 18, 25, 61, 119, 123, 149, 159  
 Kodon awal 153  
 kodon terminasi 19  
 kompleks enzim respiration 15, 151, 152, 159  
 KSS (*Kearns-Sayre syndrome*) 22, 154
- L**  
 leg paresthesia 40, 42  
 lens 4, 27, 153  
 LHON (*Leber's hereditary optic atrophy/neuropathy*) 22, 29, 31, 35, 43, 46, 50, 54, 35, 64, 65, 87, 113, 143, 154  
 lokus 65, 66, 152, 153, 155
- M**  
 maternal 30, 32, 34, 40, 36, 37, 113, 114, 136, 140, 155  
 MELAS 22, 29, 31, 32, 33, 42, 43, 46, 47, 50, 54, 32, 42, 64, 70, 72, 79, 83, 86, 87, 88, 111, 113, 114, 133, 135, 136, 138, 139, 140, 142, 146, 154, 112
- MERRF (*myoclonic epilepsy and ragged red fibres*) 29, 31, 34, 43, 47, 50, 54, 34, 42, 72, 87, 89, 111, 113, 114, 136, 138, 139, 145, 147, 154, 112
- metabolism 3, 6, 2, 8, 19, 25, 36, 38, 57, 69, 80, 69, 116, 153, 155, 158
- metabolite 4, 28
- MIDD (*maternally inherited diabetes and deafness*) 22, 31, 37, 38, 39, 42, 50, 37, 39, 42, 70, 93, 142, 155
- MILS (*maternally inherited Leigh syndrome*) 29, 155
- Mioklonus 155
- miopathy 25, 26, 117
- mitochondria 3, 18, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 45, 46, 52, 54, 35, 36, 39, 61, 62, 63, 64, 65, 60, 61, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78, 79, 80, 72, 83, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 108, 83, 87, 92, 93, 95, 97, 100, 102, 110, 111, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 135, 151, 152, 153, 156, 157, 163
- Mutagen 155
- mutation 18, 69, 70, 92, 93, 97, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 121, 125, 129, 132, 133, 155, 157, 158
- Mutational delesions 155
- mutant allele 20, 113, 115
- mutation 20, 111, 112, 113, 115, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 144, 145, 147
- Myoglobinuria 155

## N

- NARP (*neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa*) 29, 31, 35, 36, 43, 47, 50, 54, 35, 36, 118, 119, 121, 145, 155  
Neuromuskular 156  
neuropati 99, 158  
nukleotida 8, 144, 149, 152, 153, 156, 157, 158

## O

- oligosymptomatic syndromes* 29  
optalmoplegia 42, 158  
*Optic atrophy* 46, 50, 51, 55, 156  
organel 3, 25, 151, 155

## P

- Pasang basa 156  
pascamitosis 22, 111  
pascatranskripsi 72, 73  
Patogenis 156  
PCR (*Polymerase Chain reaction*) 87, 25, 6, 7, 120, 142, 156  
penyakit mitokondria 19, 31, 98, 16, 17, 20, 110, 111, 116, 118, 131, 132, 118  
PEO (*progressive external ophthalmoplegia*) 31, 97, 157  
Polidipsia 157  
polimorfisme 18, 43, 44, 158  
poliuria 25  
*Presymptomatic* 112, 157  
prognosis 112  
prokariot 4  
*proofreading* 19  
protein 4, 126, 131, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 159  
protein prematur 75  
ptosis 42

## R

- Radikal bebas ROS (*reactive oxygen species*) 157  
replikasi 16, 4, 7, 9, 10, 11, 2, 116, 117, 133  
Resesif 158  
respirasi 3, 29, 40, 49, 61, 64, 65, 66, 71, 120, 132, 133, 151, 152, 154, 159

*Restriction Fragment length Polymorphism* 158

- Retinitis pigmentosa 55, 158  
rRNA 15, 158

## S

- seizure* 32, 154, 155  
sekresi 38, 39, 40, 41, 39, 80, 150  
Sekuensing 158  
sel epithelium 4  
sel  $\beta$  pankreas 26, 46, 49, 50  
Sindrom 44, 57, 159  
*Southern blot* 159  
Stres oksidatif 10, 159

## T

- transfer elektron 7, 9, 10, 6, 19, 56, 154, 157  
Transkripsi 17, 159  
Translasi 159  
tRNA 15, 33, 37, 40, 47, 48, 49, 39, 62, 65, 72, 73, 74, 75, 77, 140, 145, 147, 148, 159  
tRNA<sup>Leu</sup> 16, 77, 72, 73, 83, 100, 101, 137, 138, 144, 159

## U

- urin 85, 150, 155

## W

- wild type* 75, 118, 119  
*Wobble position* 159

# TENTANG PENULIS



Dr. Iman Permana Maksum, M.Si., lahir di Garut pada 13 Juli 1971 adalah dosen Departemen Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran (Unpad) Bandung. Ia lulus sarjana Kimia Unpad (1995), magister di Jurusan Kimia Institut Teknologi Bandung ITB (2003), dan meraih doktor Bidang Ilmu Kimia di Unpad (2010).

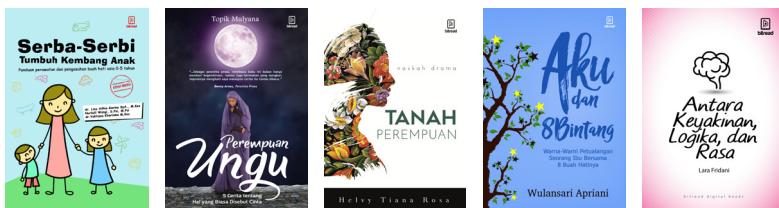
Dalam perjalanan karier akademisnya, selain aktif mengajar, menguji, dan membimbing, ia juga aktif dalam penelitian di bidang biologi molekular, terutama berkaitan dengan DNA mitokondria. Penelitian tersebut telah didukung oleh dana bantuan penelitian dari Penelitian Unggulan Strategi Nasional, Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Peneliti Muda, Hibah Bersaing, QUE *Project*, dan I-MHERE *Project*. Penulisan buku ini didanai oleh Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2018, No. 1127/UN6.D/LT/2018.



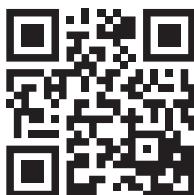
## Tentang Bitread

Bitread telah aktif mengkampanyekan gerakan literasi dan penerbitan sejak tahun 2014. Sejalan dengan misi tersebut, Bitread Publishing lahir untuk memberikan kemudahan sekaligus kesempatan seluas-luasnya bagi para penulis untuk menerbitkan buku. Siapapun bisa menerbitkan buku di Bitread dengan estimasi waktu 1-2 bulan sejak naskah dikirimkan kepada tim redaksi.

Dengan kemudahan dan kecepatan proses penerbitan buku di Bitread, penulis memiliki porsi besar dalam mempersiapkan buku yang akan diterbitkannya. Tim redaksi Bitread akan melakukan asistensi bersama penulis untuk mempersiapkan naskah hingga layak diterbitkan. Bitread juga memberikan treatment kepada para penulis berupa pembuatan desain cover serta program marketing dan promosi bersama penulis.



Nikmati cara seru menerbitkan  
buku, hanya di:



Bitread\_ID BitreadID [www.bitread.id](http://www.bitread.id)

# PATOGENETIKA, INVESTIGASI & TERAPI PENYAKIT MITOKONDRIA

*Patogenetika, Investigasi dan Terapi Penyakit Mitokondria* akan menjelaskan persoalan penyakit mitokondria yang diketahui berkaitan dengan atau disebabkan oleh mutasi pada gen mitokondria dan inti yang berpengaruh terhadap reaksi fosforilasi oksidatif, biogenesis mitokondria, dan jalur metabolisme lainnya. Penyakit mitokondria terjadi karena adanya penghambatan proses respirasi dalam pembentukan ATP yang diperlukan dalam berbagai jaringan, terutama dalam sistem neuromuskular. Produksi radikal bebas, seperti radikal superokida, juga dapat menyebabkan terjadinya penurunan fungsi mitokondria dan akan meningkatkan stres oksidatif di berbagai jaringan.

Selain itu, akan dijabarkan pula perihal mutasi mtDNA yang diketahui berperan penting dalam penyakit mitokondria. Mutasi mtDNA meliputi mutasi titik (substitusi), delesi, dan insersi. Mutasi ini terjadi pada gen pengode protein, tRNA, dan rRNA. Ekspresi klinis dari mutasi substitusi sangat banyak, antara lain MELAS MERRF, MILS, dan MIDD.

