

ULAS BALIK

Peran DNA Mitokondria (mtDNA) dalam Studi Keragaman Genetik dan Biologi populasi pada Hewan

DEDY DURYADI SOLIHIN

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jl. Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 18 Mei 1994/Disetujui 18 Juni 1994

PENDAHULUAN

Pengkajian keragaman genetik telah banyak dilakukan melalui studi protein dan isoenzim. Namun demikian terdapat masalah yang umum bahwa keragaman genetik yang dapat diungkapkan tidak maksimum. Rendahnya polimorfisme protein disebabkan beberapa hal yaitu: (i) Adanya perbedaan pada sekuen DNA yang mengkode asam-asam amino yang bermuatan netral tidak akan mempengaruhi mobilitas elektroforesi protein yang dihasilkan; (ii) Substitusi asam amino yang bermuatan sama tidak akan banyak mempengaruhi mobilitas protein; (iii) Substitusi nukleotida pada basa ketiga dari suatu kodon tidak selalu membawa perubahan asam amino yang dihasilkan (Kode Wobble); (iv) Adanya sekuen-sekuen DNA yang tidak mengkode protein (seperti pada sekuen intron atau daerah sisi pengapit lainnya (*spacer*) tidak akan mempengaruhi produk proteinnya, padahal ini merupakan daerah *hypervariable* untuk penanda DNA.

Untuk mengatasi hal tersebut banyak peneliti mengalihkan perhatiannya pada pengkajian keragaman genetik melalui studi DNA. Hasil yang didapat telah menunjukkan pengkajian DNA mampu mengungkapkan perbedaan yang lebih teliti dalam membedakan intra dan interspesies yaitu menyangkut tentang struktur, komposisi, dan organisasi genom pada tingkat DNA (Avis *et al.*, 1979; Botstein *et al.*, 1980; Jeffreys *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987; Burke *et al.*, 1991; Hadrys *et al.*, 1992).

Queller *et al.* (1993) menandakan sumbangan yang sangat berarti dari penggunaan penanda DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Minisatellite*, dan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)) di dalam studi keragaman hayati maupun berbagai aspek yang menyangkut pemahaman genom berbagai organisme. Material DNA yang digunakan kebanyakan adalah DNA inti atau DNA total. Padahal sumber DNA untuk organisme eukariot tidak hanya dari DNA inti tetapi juga didapat dari organel-organel sitoplasmiknya seperti mitokondria dan kloroplas.

Beberapa peneliti seperti Avis dan Lansman (1983), Brown (1983), dan Boursot (1985) mengungkapkan peran yang besar dari DNA mitokondria (mtDNA) dalam studi keragaman genetik dan biologi populasi. Hal ini ditunjukkan dari derajat polimorfismenya yang tinggi, hubungan yang jelas antara polimorfisme dengan substitusi basa-basa penyusun genomnya, dan lain-lain.

Di dalam tulisan ini akan diungkapkan apa, bagaimana, dan mengapa DNA mitokondria memberikan banyak manfaat, serta hubungannya dengan kajian keragaman genetik dan pemecahan masalah di dalam studi biologi populasi. Di dalam penelaahan dan pembahasan kali ini lebih

banyak diungkapkan mengenai mitokondria hewan. Peran mitokondria tumbuhan dapat ditelaah lebih dalam dengan merujuk pada artikel yang disitasi.

ORGANISASI MOLEKULER GENOM MITOKONDRIA

Mitokondria adalah organel yang bertanggung jawab di dalam metabolisme aerobik pada sel-sel eukariot. Mitokondria memiliki molekul DNA tersendiri dengan ukuran kecil yang susunannya berbeda dengan DNA inti. Setiap sel mengandung satu sampai ratusan mitokondria. DNA mitokondria merupakan DNA utas ganda yang berbentuk sirkuler. Ukuran dan sekuen DNA dari genom mitokondria telah diungkapkan, misalnya pada mencit (Bibb *et al.*, 1981), manusia (Anderson *et al.*, 1981), dan sapi (Anderson *et al.*, 1982).

Ukuran Genom. Ukuran genom mitokondria hewan berkisar dari 14,000-39,000 pasangan basa (Tabel 1). Terlihat bahwa ukuran genom mitokondria minimum untuk berfungsi mitokondria hewan multiseluler adalah 14,000 pasangan basa. Ukuran genom mitokondria relatif sangat kecil bila dibandingkan dengan ukuran genom intinya. Karena ukuran genomnya yang relatif kecil ini maka genom ini dapat dipelajari secara menyeluruh sebagai suatu unit tersendiri. Genom mitokondria tumbuhan jauh lebih besar dan bahkan sampai puluhan kali ukuran genom mitokondria hewan, 117-2.400 kb (Newton, 1988; Narayanan *et al.*, 1993).

Macam dan Susunan Gen Mitokondria. DNA mitokondria hewan secara umum memiliki jumlah dan jenis gen yang sama yaitu 13 daerah yang mengkode protein (URF1, URF2, URF3, URF4, URF5, URF6, URFA6L, URF4L, *Cytochrome Oxidase* unit I, *Cytochrome Oxidase* unit II, *Cytochrome Oxidase* unit III, *Cytochrome b* dan ATPase 6); 2 gen pengkode rRNA yaitu 12S rRNA dan 16S rRNA; 22 gen pengkode tRNA. Sebagai contoh disajikan susunan DNA mitokondria mencit (*Mus spp.*) (Gambar 1).

PURIFIKASI DNA MITOKONDRIA

Prinsip dari ekstraksi DNA mitokondria ialah memisahkan sitoplasma dari intinya dengan sentrifugasi rendah sehingga hanya didapatkan mitokondria. Untuk menghindari kontaminasi dari DNA inti dilakukan penambahan DNAase sebelum mitokondria dilisis. Mitokondria tersebut dilisis dengan larutan tertentu (misalnya detergen), dan proteinnya dihilangkan dengan fenol dan kloroform, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan tinggi.

Teknik purifikasi yang lain dilakukan dengan penggunaan larutan garam yang sangat pekat (konsentrasi tinggi)

Tabel 1. Ukuran DNA Mitokondria Berbagai Jenis Hewan (Brown, 1983; Smith, 1991)

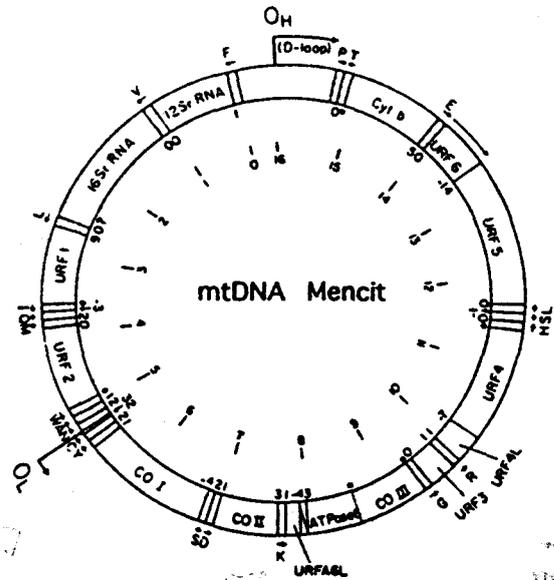
Spesies	Ukuran (pasangan basa)
Vertebrata	
Manusia	16,569
<i>Green Monkey (Cercopithecus aethiops)</i>	16,400
<i>Wolly Monkey (Lagothrix)</i>	16,300
<i>Bush Baby (Galago)</i>	16,500
Mencit (<i>Mus</i>)	16,295
<i>Golden Hamster (Mesocricetus auratus)</i>	16,300
Sapi	16,338
Kelinci	17,300
Kadal (<i>Cnemidophorus</i>)	17,500
<i>Xenopus</i> (2 spesies)	17,700
Landak laut	
<i>Strongylocentrotus</i> (3 spesies)	15,700
<i>Lytechinus pictus</i>	15,700
Kerang laut	
<i>Placopecten magellanicus</i>	39,000
<i>Drosophila neohydei</i>	15,700
<i>D. melanogaster</i> (ORE-R)	19,500
<i>D. melanogaster</i> (Jepang)	18,700
Kumbang (<i>Pissodes</i>)	32,000
Kalajengking	
<i>Hadrurus arizonensis</i>	14,000
Nematoda	
<i>Ascaris suum</i>	14,284

seperti CsCl. Teknik yang kedua ini dapat memisahkan molekul-molekul RNA, DNA inti, dan DNA mitokondria dalam lapisan yang berbeda. Beberapa metode yang dikerjakan oleh Lansman *et al.* (1981) dan Boursot (1985) memberikan hasil yang baik untuk analisis genom mitokondria hewan.

ANALISIS DNA MITOKONDRIA

Beberapa teknik eksplorasi dapat dimanfaatkan oleh para biologiwana untuk menggali informasi yang terkandung dalam genom mitokondria. Teknik eksplorasi yang pertama didasarkan pada sekuen basa-basa penyusun genom mitokondria. Hal ini memberikan informasi yang sangat lengkap mengenai urutan basa-basanya, namun cara ini membutuhkan tenaga dan biaya yang sangat besar. Beberapa jenis makhluk telah diketahui secara lengkap susunan basa-basanya (Tabel 1). Alternatif lain yang lebih efisien dari teknik pertama tadi ialah analisis hanya bagian tertentu dari genom mitokondria. Berkat penemuan Saiki *et al.* (1985, 1988) mengenai amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), analisis genom mitokondria secara partial dapat dilakukan dengan mudah.

Teknik eksplorasi yang kedua didasarkan pada penggunaan enzim restriksi (*restriction endonucleases*) untuk membandingkan genom mitokondria antar individu maupun takson. Pemotongan dengan enzim restriksi yang berbeda akan menghasilkan potongan DNA yang berbeda dari DNA yang sama. Perbedaan genom mitokondria dapat dibandingkan hanya dengan perbandingan jumlah

Gambar 1. Macam dan Susunan DNA Mitokondria Mencit (*Mus spp.*) (Bibb *et al.*, 1981)

dan ukuran fragmen-fragmen yang dipotong oleh enzim restriksi tersebut. Variasi yang dihasilkan oleh perbedaan panjang fragmen yang dipotong oleh enzim restriksi ini dikenal sebagai *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Pendekatan ini relatif sederhana dan mampu memberikan informasi dari semua bagian genom mitokondria. Setiap situs restriksi dapat dipetakan pada molekul DNA mitokondria sehingga menghasilkan peta situs restriksi DNA mitokondria.

PEMILIHAN SEBAGAI PENANDA GENETIK

Beberapa hal yang mendukung penggunaan mtDNA sebagai penanda dalam studi keragaman genetik dan studi biologi populasi pada hewan yaitu: (i) DNA mitokondria terdapat dalam jumlah kopi yang tinggi. Jumlah kopi yang tinggi ini menjadikannya mudah diisolasi dan dipurifikasi untuk berbagai keperluan analisis genom; (ii) Ukuran DNA mitokondria relatif kecil (14-39 kb) sehingga dapat dipelajari sebagai satu kesatuan yang utuh; (iii) Bagian-bagian dari genom mitokondria berevolusi dengan kecepatan yang berbeda. Diketahui bahwa tingkat evolusi dari suatu gen atau bagian dari DNA merupakan faktor penting yang menentukan penggunaan penanda DNA dalam studi sistematika dan biogeografi. Gen-gen yang terkonservasi dengan baik dapat dijadikan sebagai dasar penelusuran kesamaan asal muasal (*ancient taxa*), sedangkan gen-gen yang tak terkonservasi dengan baik yaitu gen-gen yang berevolusi dengan cepat dapat digunakan untuk perbandingan galur-galur baru. Simon (1991) membahas kecepatan relatif dari evolusi setiap gen di dalam genom mitokondria. Daerah *non-coding* yang kaya akan A+T pada DNA mitokondria hewan invertebrata dan daerah *D-Loop* pada hewan vertebrata, termasuk manusia, berevolusi cepat, sedangkan gen-gen yang mengkode rRNA yang berukuran besar dan kecil, gen-gen *cytochrome oxidase* subunit I dan II (COI dan COII) berevolusi sangat lambat. Daerah *D-Loop* adalah daerah *non-coding* yang terletak antara tRNA^{Pro} dan tRNA^{Phe}.

besarnya kurang lebih 900 pasangan basa yang berisi awal replikasi dari utas berat (O_H) DNA mitokondria. Secara umum evolusi sekuen DNA mitokondria lebih cepat 5 sampai 10 kali dari genom inti (Brown *et al.*, 1979) dan bahkan gen tRNA seratus kali lebih cepat dari DNA inti (Brown *et al.*, 1982); (iv) DNA mitokondria hewan tidak memiliki *intron* ataupun *spacer* yang berukuran besar antar gennya. Hal inilah yang menyebabkan ukuran genom mitokondria hewan lebih kecil dibandingkan dengan genom mitokondria tanaman; (v) DNA mitokondria bersifat khusus karena diturunkan melalui induk betinanya tanpa mengalami rekombinasi (*strict maternal inheritance*). Akibatnya afinitas genetik yang diatur oleh genom mitokondria merupakan refleksi dari *Phylogeni matriarcale*; (vi) DNA mitokondria sangat polimorf, baik untuk intrapopulasi maupun untuk interspesies.

Manfaat Penggunaan mtDNA

Penggunaan DNA mitokondria sebagai penanda genetik dalam studi variabilitas genetik intraspesifik (interpopulasi) telah memberikan informasi secara kualitatif maupun kuantitatif. Penggunaan penanda mtDNA pada tikus jenis *Peromyscus maniculatus* menunjukkan strukturisasi geografik dan polimorfisme yang besar dari populasinya (Avis *et al.*, 1979; Lansman *et al.*, 1981). Penggunaan penanda yang sama mencit jenis *Mus spretus* di daerah Afrika Utara, Spanyol, dan Perancis Selatan menunjukkan adanya diferensiasi geografik untuk genom mitokondria (Boursot, 1985).

Oleh karena mtDNA berevolusi sangat cepat maka dapat digunakan untuk melacak kejadian yang relatif baru seperti pada studi hibridisasi alami antara dua subspecies. Pada mencit Eropa (*Mus musculus domesticus* dan *Mus musculus musculus*), introgresi alel-alel dari grup satu terhadap lainnya menunjukkan hal yang lebih menonjol untuk genom mitokondria dibandingkan untuk genom inti (Boursot *et al.*, 1984). Hal yang sama terlihat pada afrikanisasi lebah-lebah di Benua Amerika yaitu adanya introgresi gen dari lebah afrika, *Apis mellifera scutellata*, terhadap lebah eropa, *Apis mellifera mellifera* (Smith *et al.*, 1989).

DNA mitokondria bersifat khusus yaitu diturunkan melalui induk betina tanpa mengalami rekombinasi. Adanya sifat tersebut dapat digunakan untuk suatu rekonstitusi historik dari genealogi matrilineer suatu spesies maupun antar populasi yang ada. Pada lebah, semua keturunan dari ratu yang sama membawa DNA mitokondria yang sama sehingga individu-individu hibrid yang ada tidak membawa campuran mtDNA parental. Hibrid tersebut hanya mengandung mtDNA dari induk betinanya. Keadaan tersebut sangat berguna untuk mempelajari dan mengamati asal muasal dan biologi populasi suatu hibrid.

Studi keragaman genetik interspesifik berdasarkan perbedaan dan persamaan mtDNA dapat menghasilkan rekonstruksi filogenik dari beberapa spesies yang saling berdekatan. Dengan demikian, berdasarkan penanda serta proses terjadinya pemecahan dari spesies yang satu terhadap lainnya.

Dengan demikian dapat disimpulkan DNA mitokondria memiliki banyak sifat khusus dan positif yang dapat dijadikan sebagai penanda genetik sehingga sangat besar sekali manfaatnya untuk studi keragaman genetik dan biologi populasi. Karena genom mitokondria hewan relatif beru-

kurang kecil dan terdapat dalam jumlah banyak maka eksplorasi dan penelaahannya lebih mudah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, S., A.T. Bankier, B. G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden, and I.G. Young. 1981. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 290:457-465.
- Anderson, S., M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, I.C. Eperon, F. Sanger, and I.G. Young. 1982. Complete Sequence of Bovine Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 156:683-717.
- Avis, J.C. and R.A. Lansman. 1983. Polymorphism of Mitochondrial DNA in Populations of Higher Animals. p. 147-164. In M. Nei and R.K. Koehn (ed.), *Evolution of Genes and Proteins*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Avis, J.C., R.A. Lansman, and R.O. Shade. 1979. The Use Endonuclease to Measure Mitochondrial DNA Sequence Relatedness in Natural Populations. I. Population Structure and Evolution in Genus *Peromyscus*. *Genetics* 92:279-295.
- Bibb, M.J., R.A. van Etten, C.T. Wright, M.W. Walberg, and D.A. Clayton. 1981. Sequence and Gene Organization of Mouse Mitochondrial DNA. *Cell* 26:167-180.
- Botstein, D.R., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Gen.* 32:314-331.
- Boursot, P. 1985. Variabilite de l'ADN Mitochondrial et du Chromosome Y: Application a l'etude de la Structuration Genetique et de l'hybridation Naturelle chez Une espece et Deux Semi-especies de Souris (*Mus*). These de Docteur-Ingenieur. Montpellier, France: Universite Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc.
- Boursot, P., F. Bonhomme, J. Britton-Davidian, J. Catalan, H. Yonekawa, P. Orsini, S. Guerasimov, et L. Thaler. 1984. Introgression Differentielle des Genomes Nucleaires et Mitochondriaux chez Deux Semi-especies de Souris. *C.R.Acad.Sci.*, 299, Serie III (9):365-370.
- Brown, W.M. 1983. Evolution of Animal Mitochondrial DNA. p. 62-88. In M. Nei and R.K. Koehn (ed.), *Evolution of Genes and Proteins*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Brown, W.M., M. George, and A.C. Wilson. 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(4):1967-1971.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang, and A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution. *J. Mol. Evol.* 18:225-239.
- Burke, T., G. Dolf, A.J. Jeffreys, and R. Wolff. 1991. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Basel: Birkhauser.
- Hadrys, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. *Mol. Ecology* 1:55-63.

- Jeffreys, A.J., V. Wilson, and S.L. Thein. 1985. Hypervariable "Minisatellite" Regions in Human DNA. *Nature* 314:67-73.
- Lansman, R.A., R.O. Shade, J.F. Shapira, and J.C. Avise. 1981. The Use of Restriction Endonucleases to Measure Mitochondrial Sequence Relatedness in Natural Population. *J.Mol.Evol.* 17:214-226.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and R. White. 1987. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science* 235:1616-1622.
- Narayanan, K.K., C.P. Andre, J. Yang, and V. Walbot. 1993. Organization of 117 kb Circular Mitochondrial Chromosome in IR 36 Rice. *Curr.Genet.* 23:248-254.
- Newton, K.J. 1988. Plant Mitochondrial Genomes: Organization, Expression, and Variation. *Annu.Rev. Plant Physiol.Plant.Mol.Biol* 39: 503-532.
- Queller, D.C., J.E. Strassmann, and C.R. Hughes. 1993. Microsatellites and Kinship. *Tree* 8:285-288.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higushi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Simon, C. 1991. Molecular Systematics at the Species Boundary: Exploiting Conserved and Variable Regions of the Mitochondrial Genome of Animals Via Direct Sequencing from Amplified DNA. p. 33-73. In G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston, and J.P.W. Young (ed.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. Nato Advanced Studies Institute, series H: *Cell Biology*, vol. 57. Berlin:Springer Verlag.
- Smith, D.R. 1991. Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography. p. 131-176. In D.R. Smith (ed.), *Diversity in the Genus Apis*. Boulder Co, USA: Westview Press.
- Smith, D.R., O.R. Taylor, and W.M. Brown. 1989. Neotropical Africanized Honey Bee Have African Mitochondria DNA. *Nature* 339:213-215.