

Pengembangan teknik polymerase chain reaction (PCR) kuantitatif dengan standar internal untuk kuantitasi DNA mitokondria

Djumadi

Deskripsi Dokumen: <http://lib.ui.ac.id/opac/themes/libri2/detail.jsp?id=76941&lokasi=lokal>

Abstrak

Ruang Lingkup dan Metode Penelitian : Mitokondria mempunyai fungsi sangat penting dalam menyediakan energi yang diperlukan sel untuk fungsi normalnya. Energi sel yang berupa adenosine triphosphate (ATP) dibentuk melalui proses fosforilasi oksidatif. Di dalam organel ini terdapat DNA mitokondria (mtDNA) yang bertanggung jawab dalam proses fosforilasi oksidatif mtDNA per mitokondria pada dasarnya tetap dalam semua tipe sel, tetapi jumlah mtDNA dalam tiap sel somatik manusia sangat bervariasi pada sel yang berbeda. Dewasa ini analisis kuantitatif DNA mempunyai peranan penting dalam penelitian biologi dan aplikasi klinis. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan teknik PCR kuantitatif dengan standar internal yang dapat dipercaya, efektif, dan akurat, untuk kuantitasi jumlah salinan mtDNA pada berbagai jaringan manusia. Dalam metode penelitian ini, dilakukan konstruksi standar internal dengan mengamplifikasi fragmen DNA menggunakan primer L8655 dan H10952* (2298 pb). Juga dilakukan konstruksi standar normal dengan mengamplifikasi fragmen DNA pada daerah yang berada di dalam fragmen standar internal. Standar internal dan standar normal diklon di dalam bakteri *Escherichia coli*. Reliabilitas standar internal diuji dengan mengkoamplifikasi standar internal dan standar normal menggunakan primer L10348 dan H10943 pada daerah gen yang menyandi subunit tRNA^{Arg}, ND4L, dan ND4. Penelitian dilakukan pada sampel jaringan otopsi dari lima orang mayat dengan jumlah masing-masing 15 jaringan. Kuantitasi mtDNA berbagai jaringan dilakukan dengan mengkoamplifikasi cetakan standar internal di atas dan cetakan DNA target menggunakan primer L10348 dan H10943 (596 pb). Hasil amplifikasi didigesti dengan enzim restriksi Bgl I, selanjutnya dipisahkan secara elektroforesis, direkam pada foto hitam putih dan dianalisis menggunakan densitometer. Hasil analisis kuantitatif mtDNA dari berbagai jaringan manusia akan bermanfaat untuk mengetahui peranan variasi jumlah salinan mtDNA terhadap kapasitas jaringan dalam proses fosforilasi oksidatif dan akan memberikan referensi penting untuk penelitian lebih lanjut mengenai berbagai macam penyakit akibat mutasi mtDNA.

Hasil dan Kesimpulan : Hasil uji reliabilitas standar internal memberikan rata-rata hasil akhir sebesar 1,05 ng dari konsentrasi standar normal awal 1 ng (sebelum diamplifikasi). Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa teknik PCR kuantitatif dengan standar internal merupakan teknik yang akurat dan efisien. Dari hasil penelitian yang relatif awal menggunakan teknik PCR kuantitatif dengan standar internal menunjukkan indikasi bahwa jumlah salinan mtDNA pada jaringan ginjal, jantung, serebelum, hati, basal ganglia, dan korteks serebri lebih banyak dari jaringan yang lain. Hal ini sesuai dengan fungsi metabolisme energi yang tinggi dari jaringan tersebut.