

IDENTIFIKASI ALEL DAN KEKUATAN PEMBEDA EMPAT LOKUS DNA MIKROSATELIT KROMOSOM-Y PADA MASYARAKAT KLAN PANDE DI BALI UNTUK KEPENTINGAN FORENSIK

Allele Identification and Power of Discrimination of Four Microsatellite DNA Y-chromosomal Of Pande clan in Bali for Forensic Purposes

I Ketut Junitha¹ dan Made Sara Wijana

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Udayana

Kampus Bukit Jimbaran, Kuta Badung

¹)Alamat korespondensi, juneth@unud.ac.id

Abstract

This research was conducted to know alleles variation and power of discrimination of four pair of primer: DYS19, DYS390, DYS393 and DYS395 of male Pande clan. Epithelial cell mucus was collected from 59 male of Gainer, Klungkung, Badung regencies and Denpasar city. Phenol chloroform method was used to extraction DNA from epithel cells sample. Four primer pair was used to amplify DNA samples in PCR machine on 52-55oC annealing temperature. Amplicon were running on PAGE 10% and visualized with silver nitrate staining. The DNA typing were conducted to determinate of alleles size of amplicon with plotting migration distance of amplicon on semi-log pepper. Genetic diversity and power of discrimination was calculated used Microsoft Exell program. The result of this research showed that 29 alleles were found range of 6-9 with mean 7.25 per locus. The genetic diversity is high category (0.739 ± 0.003 , the highest diversity on DYS 390 locus is $0.809 \pm 0,004$ followed by DYS395, DYS393 are $0,793 \pm 0.004$ and $0,720 \pm 0.005$ and the small one is 0.633 ± 0.003 on DYS19 locus. The power of discrimination (PD) of all loci are high category with average value is 0.892, because of / for this reason all of loci usfulnes for forensic purpose on pande clan in Bali.

Key word: Pande clan, Alel type, microsatellite DNA, Y-chromosom, power of discrimination

Pendahuluan

Masyarakat Bali dewasa ini mengelompok ke dalam klan-klan yaitu organisasi geneologis berdasarkan garis keturunan laki-laki (patrilineal) yang pada masyarakat Bali dikenal dengan istilah Soroh. Masing-masing klan meyakini mereka merupakan keturunan dari leluhur yang sama dan memiliki satu satu pura tempat pemujaan leluhurnya yang disebut pura Kawitan mulai dari kelompok dengan

tempat pemujaan yang paling kecil yaitu sanggah kemudian paibon atau panti [2] dan yang paling utama adalah pura kawitan atau pura Pedarman yang ada di kawasan Pura Besakih [3],[4],[5]. Dengan demikian setiap orang Bali yang beragama Hindu tentu akan termasuk dalam salah satu klan yang ada dan setiap klan dapat dikatagorikan sebagai satu populasi tanpa batas wilayah. Dalam kepentingan penentuan frekuensi suatu gen atau alel klan atau soroh dapat menjadi suatu

unit populasi. Klan Pande merupakan salah satu klan pada masyarakat Bali yang memiliki struktur organisasi yang disebut Maha Semaya Warga Pande. Ada kecenderungan bagi warga Pande menikah dengan sesama warga Pande berkaitan dengan bisama leluhur yang diyakini. Adanya kecenderungan ini secara genetic akan menimbulkan terbentuknya struktur genetic yang berbeda diantara klan-klan yang dapat terlihat dari Ragam alel, keragaman genetic dan profil DNAny.

Analisis DNA merupakan metode yang paling baik digunakan untuk mengetahui identitas seseorang dari bagi jasad yang tidak dapat dikenali secara fisik. Dengan adanya metode amplifikasi DNA pada mesin PCR maka jumlah sel yang sangat sedikit masih dapat memberikan profil DNA yang baik untuk kepentingan forensic [6]. Dalam analisis DNA untuk kepentingan paternitas maupun forensic diperlukan adanya ketepatan penanda DNA yang digunakan. Untuk analisis DNA baik untuk tujuan forensic maupun paternitas biasanya digunakan penanda DNA *Short Tandem Repeat* (STR) yang disebut juga DNA mikrosatelit [7], [8], [9]. Perbedaan antar individu yang tidak berhubungan keluarga disebabkan oleh terjadinya mutasi slip pada saat replikasi yang menyebabkan berkurang atau bertambah satu motif yang disebut mutasi satu step dengan kecepatan $0-7 \times 10^{-3}$ per gamet per generasi dimana pada gamet laki-laki terjadi lima sampai enam kali dibandingkan pada gamet wanita [10]. Penanda DNA mikrosatelit terdapat di banyak lokus, ukuran DNA yang pendek-pendek dan memberikan profil yang sama dari seluruh bagian tubuh [11] sehingga sangat baik digunakan analisis DNA untuk kepentingan forensic. Lokus penanda DNA mikrosatelit terdapat pada autosom, kromosom X dan kromosom Y. Untuk DNA

mikrosatelit pada autosom seorang anak akan mendapat masing-masing satu alel dari ayah maupun ibunya, untuk kromosom X seorang anak bisa dapat dari ayah maupun ibunya untuk anak perempuan dan ahanya dari ibu untuk anak laki-laki, sedangkan untuk DNA pada kromosom Y yang disebut juga Y-spesifik dari ayah hanya kepada anak laki-laki saja.

Dalam test paternitas atau analisis DNA untuk Forensik ketepatan lokus yang digunakan berkaitan dengan populasinya. Lokus-lokus yang digunakan di Amerika berbeda dengan lokus yang digunakan di Inggris sebagai contohnya lokus FGA dan vWA digunakan baik di Amerika maupun di Inggris, lokus CSF1PO digunakan di Amerika tetapi tidak digunakan di Inggris demikian sebaliknya D2S441 digunakan di Inggris tidak digunakan di Amerika [12]. Ketepatan penggunaan lokus dalam analisis DNA di suatu wilayah berkaitan dengan kekuatan pembeda dari tiap lokus yang digunakan dimana kekuatan pembeda tersebut ditentukan oleh banyaknya ragam alel dan frekuensi masing-masing alel setiap lokus. Semakin besar kekuatan pembeda suatu lokus semakin baik digunakan untuk analisis DNA. Ragam dan frekuensi alel masing-masing lokus hanya bisa diketahui dari penelitian yang dilakukan pada masing-masing populasi atau masyarakat. Untuk lokus DNA mikrosatelit autosom pada masyarakat Bali menggunakan delapan lokus (D2S1338, D3S1358, D5S518, D7S820, D11S1984, D13S317, D16S539 dan D21S11) diperoleh nilai kekuatan pembeda paling kecil sebesar 0,014 pada lokus D5S518 dengan tiga ragam alel [13], menggunakan tiga lokus pada warga klan Pande di kabupaten Gianyar menggunakan tiga lokus (D2S1338, D13S317 dan D16S539 diperoleh 23 ragam alel dengan rata-rata 7,3 per lokus [14]. Penelitian

menggunakan enam lokus penanda DNA mikrosatelit autosom (D2S1338, D11S1984, D13S317, D16S539, vWA dan CSF1PO) pada suku Dayak di Kota Palangkaraya Kalimantan Tengah diperoleh rata-rata 11,5 alel per lokus dengan kekuatan pembeda sebesar 0,957 [15]. Demikian juga penelitian menggunakan penanda DNA mikrosatelit kromosom Y dilakukan untuk pembuatan database DNA klan-klan masyarakat Bali pada klan Catur Sanak Bali Mula, Brahmana Siwa dan Budha [16], [17],[18],[19]. Untuk test paternitas antara ayah dan anak laki-lakinya dimana ibunya sudah tidak ada sebagai pembanding digunakan penanda DNA mikrosatelit kromosom Y [20].

Penelitian ini menggunakan empat lokus DNA mikrosatelit kromosom Y yaitu ; DYS19, DYS390, DYS393 dan DYS395 untuk menentuka ragam alel dan kekuatan pembedanya pada klan Pande digunakan sebagai database DNA untuk kepentingan forensic.

Metode Penelitian

Dalam penelitian ini dikoleksi sel epitel mukasa mulut menggunakan cottonbud steril dari sebnaykan 60 orang (13 dari kabupaten Klungkung, 21 orang dari kabupaten Gianyar, masing-masing 13 orang dari kabupaten Badung dan Kota Denpasar) yang bersedia menjadi probandus setelah diberikan penjelasan yang memadai (*Informed consent*) tentang penelitian yang dilakukan. Sel epitel dimasukkan dalam larutan penyangga DPZ (10 mM NaCl, 100mM EDTA, 100mM Tris dan 4M Urea) dan DNA diekstraksi menggunakan metode

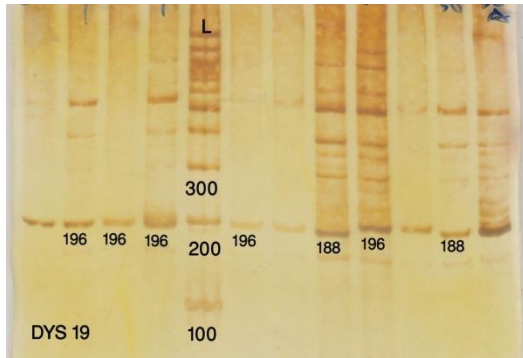
fenol kloroform dan presipitasi alkohol [16], [21]. DNA sampel diamplifikasi pada mesin PCR pada suhu annealing 52 -55°C. Amplikon dielektroforesis pada gel poliakrilamide (PAGE) 10% dan visualisasi dengan pewarnaan perak nitrat [22]. Penentuan ukuran alel dilakukan dengan memplot jarak migrasi DNA standar 100 bp ladder dan jarak migrasi amplikon pada kertas semilog[23]. Keragaman genetic dihitung dengan rumus Parra[24] dan Kekuatan pembeda dihitung dengan rumus dari Butler[25] menggunakan program microsoft Excel.

Hasil dan Pembahasan

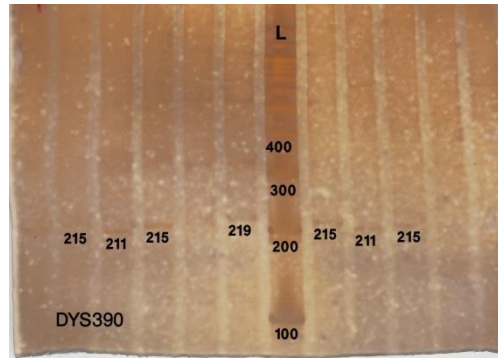
Dari 60 orang probandus yang digunakan dalam penelitian ini tidak semuanya teramplifikasi pada semua lokus yang digukan seperti yang disajikan pada table 1. Sampel paling banyak teramplifikasi pada lokus DYS390 sebanyak 56 sampel DNA diikuti oleh lokus DYS393 dan DYS395 masing-masing sebanyak 55 sampel dan paling sedikit pada lokus DYS19 sebanyak 51 sampel DNA. Tidak adanya ampikon yang dapat terlihat pada gel elektroporesis dapat disebabkan oleh adanya mutasi pada DNA sampel pada sisi penempelan primer sehingga proses amplifikasi tidak berlangsung dan hasilnya disebut nol alel [26] hal ini terjadi pada sampel yang tidak semua lokusnya gagal amplifikasi. Dari semua probandus terdapat 8 orang yang tidak diperoleh hasil ampikon sama sekali yang menunjukkan bahwa dari sampel sel epitel yang dikoleksi tidak berhasil dalam proses ekstraksi DNAny.

Tabel 1. Jumlah Probandus, teramplifikasi semua lokus dan jumlah haplotipe pada masing-masing kabupaten dan kota

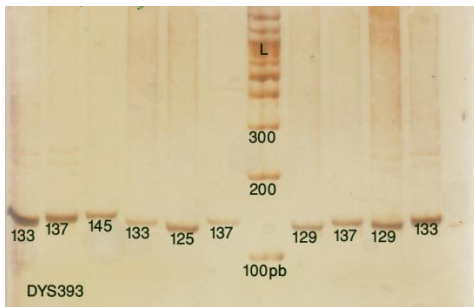
Kabupaten Kota	Badung	Denpasar	Gianyar	Klungkung	Jumlah
Probandus/sampel	13	13	21	13	60
Teramplifikasi semua lokus	9	10	18	8	45



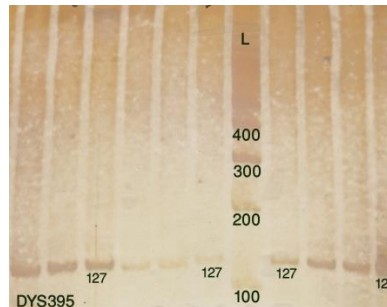
A



B



C



D

Gambar Elektrogram hasil PCR (amplikon) pada PAGE 10%

Keterangan: A, lokus DYS19 B, lokus DYS 390
 C, lokus DYS393 D, lokus DYS395

Hasil visualisasi amplikon pada gel elektroforesis (PAGE) 10% dengan ukuran alelnya dalam jumlah pasang basa (pb) pada masing-masing lokus DYS19, DYS390, DYS393 dan DYS395 disajikan pada gambar elektrogram A-D. Sebanyak 29 ragam alel ditemukan pada penelitian ini berkisar antara 6-9 (Tabel 2) dengan rata-rata 7,5 ragam alel per lokus. Penelitian

menggunakan lokus yang sama pada ragam alel jauh lebih rendah dengan rata-rata tiga alel pada masyarakat Terunyan, 2,5 alel pada klan Kayu Selem, masing-masing rata-rata 2 alel pada klan Celagi, Brahmna Siwa dan Brahmna Budha^(16;17; 18;19). Ragam alel 200pb dengan frekuensi tertinggi nomor 2 pada klan Pande merupakan ragam alel tertinggi pada

I Ketut Junitha dan Made Sara Wijana

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
 Universitas udayanaKampus Bukit Jimbaran, Kuta Badung

kebanyak klan-klan masyarakat Bali seperti masyarakat Tenganan Pegringsingan[27], klan Brahmana Siwa , Brahmana Budha, Kayu Selem dan Juga masyarakat Terunyan [16],[17],[18],[19]. Ragam Alel 200pb pada lokus DYS19 merupakan alel universal yang ditemukan dengan frekuensi tinggi di sebagian besar masyarakat Dunia [28], [29], [30]. Banyak ragam alel pada klan

Pande tidak ditemukan pada klan lainnya seperti ragam alel 176-192 pb tidak ditemukan pada klan lainnya 215-251pb pada lokus DYS390, 141 dan 145pb pada lokus DYS393 [16],[17],[18],[19]. Ragam alel 151 dan 155pb tidak ditemukan pada klan lainnya di Bali. Alel dengan ukuran 119 dan 123pb merupakan alel yang ditemukan masyarakat suku Jawa dan Batak [24].

Tabel 2.: Ragam Alel masing-masing lokus dan Frekuensinya

Lokus	DYS19		DYS390		DYS393		DYS395	
	Alel	Frek	Alel	Frek	Alel	Frek	Alel	Frek
1	176	0,03	203	0,14	121	0,01	115	0,03
2	188	0,09	207	0,19	125	0,05	119	0,13
3	192	0,03	211	0,16	129	0,26	123	0,36
4	196	0,56	215	0,28	133	0,31	127	0,14
5	200	0,23	219	0,12	137	0,22	131	0,01
6	204	0,03	231	0,08	141	0,01	135	0,07
7	208	0,03			145	0,01	147	0,16
8							151	0,05
9							155	0,01

Tabel 3. Keragaman genetik dan Kekuatan Pembeda (PD)

Lokus	Keragaman	Kekuatan Pembeda
DYS19	0,633 ± 0,003	0,825
DYS390	0,809 ± 0,004	0,937
DYS393	0,720 ± 0,005	0,873
DYS395	0,793 ± 0,004	0,933
Rata-rata	0,739 ± 0,003	0,892

Dari Tabel 3 dapat terlihat bahwa keragaman genetic maupun nilai kekuatan pembeda (PD) dari keempat lokus yang digunakan tinggi semuanya diatas 0,5. Tingginya nilai keragaman genetik ditentukan oleh banyaknya ragam alel pada setiap lokus maupun sebaran frekuensi alel pada masing-masing lokus yang diuji. Banyaknya Ragam alel dan tingginya nilai keragaman genetic pada klan Pande disebabkan oleh leluhur pembentuk klan Pande berasal dari berbagai sumber gen berkaitan dengan sejarah keberadaan warga Pande di Bali di telah dimulai dari zaman perunggu [31]. Semakin banyak ragam alel akan meningkatkan nilai keragaman

genetika masing-masing lokus demikian juga semakin merata frekuensi alel juga akan meningkatkan nilai keragamannya [13]. Nilai keragaman dan pembeda dengan rata-rata 0,87 dan 0,89 ditemukan pada penelitian menggunakan tiga lokus penanda DNA mikrosatelit autosom pada masyarakat warga klan Pande sekabupaten Gianyar[32]. Nilai pembeda yang tinggi akan memperkecil peluang dua orang yang tidak berhubungan keluarga memiliki profil DNA yang sama. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa lokus dari penanda mikrosatelit ini baik digunakan dalam test DNA baik untuk paternitas maupun forensic. Untuk kepentingan penghitungan nilai pembeda yang memerlukan data ragam alel dan frekuensinya dari masing-masing lokus maka penelitian lokus-lokus lainnya baik penanda DNA mikrosatelit kromosom Y lainnya maupun mikrosatelit autosom perlu diteliti. Penelitian juga dikembangkan pada klan-klan lainnya khususnya untuk penanda DNA mikrosatelit kromosom Y. Data ragam alel penanda DNA mikrosatelit kromosom Y disamping diperlukan untuk keperluan paternitas bagi anak laki-laki yang ibunya tidak ada [20] juga sangat diperlukan untuk melengkapi database sebagai alat penelusuran kawitan pada masyarakat Hindu di Bali.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ke empat lokus DYS19, DYS390, DYS393 dan DYS395 memiliki kekuatan pembeda yang tinggi pada klan Pande dan sangat baik digunakan dalam analisis DNA untuk keperluan paternitas

maupun forensic khususnya pada klan Pande.

Ucapan Terimakasih

Dengan ini kami menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Rektor dan Ketua LPPM Universitas Udayana yang telah mendanai penelitian ini dengan dana Penelitian DIPA PNBPN Universitas Udayana dengan kontrak kerja Nomor:246-21/UN14.2/PNL.01.03.00/2015, tanggal 21 April 2015 . Pengurus dan Warga Pande yang telah membantu penelitian ini. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Kepala UPT Forensik Unud yang telah mengizinkan penggunaan fasilitas Laboratorium DNA Forensik.

Daftar Pustaka

- [1] Junitha, I K. 2007. Penggunaan DNA Mikrosatelit Untuk Penelusuran Kawitan Pada Soroh-soroh Masyarakat Bali (Suatu Kajian Pustaka). *Jurnal Biologi* Vol. XI (2). Hal:50-54.
- [2] Soebandi, IK. 1981. Pura Kawitan/Pedharman dan Penyungsungan Jagat. CV. Kayumas. Denpasar.
- [3] Bagus I G. N. 1971. Kebudayaan Bali. Dalam Manusia dan Kebudayaan di Indonesia. Koentjaraningrat. Djambatan. 286-306.
- [4] Wiana I K. 2009. Pura Besakih Hulunya Pulau Bali. Paramita, Surabaya
- [5] Ananda P. M. J. P. 2010. Memuja Leluhur. Manik Geni. Denpasar
- [6] Shewale J.G. and R. H. Liu. 2014. Forensik DNA Analysis. CRC Press. New York
- [7] Butler, 2004. Short Tandem Repeat Analysis for Human Identity Testing. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 14: 14-18

- [8] Butler, 2006. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *J. Forensic Sci.* 51(2): 253-265.
- [9] Projic P., V. Skaro, I Samija, N. Pojskic, A. Dumic-Paslc, L. Kovacevic, N. Bakal, D. Primorac, D. Marjanovic. 2007. *Croat Med J.* 48:473-477.
- [10] Brinkmann B., M. Klintschar, F. Neuhuber, J. Huhne, and B. Rolf. 1998. Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the tandem Repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1408-1415.
- [11] Gun, A. 2009. Essential Forensic Biology. 2nd. Edition. Wiley-Blackwell. West Sussex UK.
- [12] Butler J.M. and C. R. Hill. 2012. Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Science Review.* Vol. 24 (1).16-26.
- [13] Junitha I K. dan I. B. Alit. 2011. Ragam Alel Mikrosatelit DNA Autosomal pada Masyarakat Bali Aga Desa Sembiran Kabupaten Buleleng Bali. *Biota* vol 16 (1): 63-69.
- [14] Arnila G.A.P., I K. Junitha dan M. Pharmawati, 2016. Variasi Genetik Masyarakat Soroh Pande di Kabupaten Gianyar Berdasarkan Tiga Locus DNA Mikrosatelit Autosom. *Jurnal Biologi.* Vol. 20(2):1-5.
- [15] Junitha I K. dan L. E. Octavia, 2016. Studi Pendahuluan Variasi Genetik Masyarakat Dayak di kota Palangkaraya Kalimantan Tengah Berdasarkan Enam Locus Mikrosatelit Autosom. Prosiding Seminar Nasional Biosain 2 Jurusan Biologi dan PS Magister Biologi Universitas Udayana Denpasar 19-20 Nopember 2015. ISBN 978-602-294-093-7. Terbeit Maret 2016. Hal: 242-247.
- [16] Junitha I K. dan S K Sudirga. 2007. Variasi DNA Mikrosatelit Kromosom Y Pada Masyarakat Bali Mula Terunyan. *HAYATI J. Biosci.* 14(2):59-64.
- [17] Junitha I K., S. K. Sidirga dan M. Sara Wijana., 2009. Berkala Penelitian HAYATI. Edisi Khusus No.3A. 39-43.
- [18] Junitha I K. and N. L. Watiniasih. 2014. Male Genetic Diversity of Siwa Brahmin Clan in Bali Based on Y-Chromosomal Microsatellites DNA. *JBAH.*4(1): 30-35.
- [19] Junitha I K. , N. L. Watiniasih dan I. A. M. Damayati. 2014. Struktur Genetik Brahmana Siwa dan Budha di Bali Berdasarkan DNA Mikrosatelit Kromosom-Y. Proseding Seminar Nasional Senastek I 2014. LPPM Universitas Udayana 2014.
- [20] Ayadi I., N Mahfoudh-Lakiani, H. Maleni, L. Ammar- Keskes, and A. Rebai, 2007. Combining Autosomal and Y-chromosomal Short Tandem Repeat Data in Paternity Testing with Male Child: Methode and Application. *J. Forensic Sci.* 52(5): 1068-1072.
- [21] Sambrook J. and W. Russel, 2001. *Molecular Cloning A Laboratory manual* 3rd Edition. Cold

- SpringHarbor Laboratory Press. New York.
- [22] Tegelestörm H., 1986. Mitochondrial DNA in Natural Population: an Improved Routine for Screening of Genetic Variation Based on Sensitive Silver Staining. *Electrophoresis* 7: 226-229.
- [23] Hutchinsohn F., 2001. DNA Band Size Semi-log Plotting . Cancer Research Center Science Education Partnership 06.21.01.
- [24] Parra E. MD Shrivvers., A. Soemantri, ST McGarvey., J. Hundrieser., N Saha., and R. Deka. 1999. Analysis of Five Microsatellites Loci in Asian and Pasific Populations. *A..J.Phy.Anthrop.*110:1-16
- [25] Butler J.M., 2005. Forensic DNA Typing 2nd Edition. Elsevier Academic Press. New York
- [26] Dankin E.E. and J.C. Avise. 2004. Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis. *Heredity*, 93: 505-509.
- [27] Junitha I K. 2004. Keragaman Genetik Masyarakat di Desa-desa Bali Aga Berdasarkan Analisis DNA dan Sidik Jari (Disertasi, Sekolah Pascasarjana IPB Bogor. Unpublish)
- [28] Hammer M.F. and S. Horai, 1995. Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. *Am. J. Hum. Genet* . 56: 951-962.
- [29] Ruiz-Linares A, K. Nayar, D.B. Golstein, J.M. Hebert, M.T. Seilstad, P.A. Underhill, A.A. linn, M.W. Felmen, and L.L. Cavalli-Sforza. 1996.
- [30] Hammer M.F., A.B. Spurdle, T. Karafet, M.R. Boner, E.T. Wood, A. Novelletto, P. Malaspina, R. Mitchel, S. Horai, T. Jenskin, and S.L. Zegura. 1997. The Geographic Distribution of Human Y Chromosome Variation. *Genetics.* 145: 787-805.
- [31] Darmada N.W., M.G. Utama dan J. Atmaja. 2007. Asal Usul Warga Pande di Bali: Dilengkapi dengan Dadia Warga Pande . Bali Media Adhiaksa. Bali.
- [32] Arnila G.A.P., I K. Junitha, dan M. Pharmawati. 2016. Variasi Genetik Masyarakat Soroh Pande di Kabupaten Gianyar Berdasarkan Tiga Locus DNA Mikrosatelit Autosom. *J. Biologi.* Vol. 20(1): 1-5.