



Optimasi PCR dengan Penanda Daerah D-loop DNA Mitokondria untuk Metode Tes DNA

Ni Putu Senshi Septiasari*¹, I Ketut Junitha², Ni Nyoman Wirasiti²

¹Program Studi Diploma IV Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Bali Internasional, Jl. Seroja Gg. Jeruk, Tonja, Kec. Denpasar Utara, Kota Denpasar, Bali 80239, Indonesia

²Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jl. Raya Kampus UNUD, Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali, Indonesia-80361

*Corresponding author e-mail: senshisepitia@iikmpbali.ac.id

Article History:

Received: 05-09-2022

Accepted: 02-12-2022

Published: 30-12-2022



Copyright: This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Abstrak

Tes DNA merupakan identifikasi personal secara molekuler yang dapat membedakan antar individu. Penanda yang digunakan untuk tes DNA salah satunya adalah penanda DNA mitokondria. DNA mitokondria dilaporkan memiliki lokus polimorfisme pada daerah D-loop mitokondria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode yang tepat untuk dapat mengamplifikasi DNA mitokondria daerah D-loop demi kepentingan tes DNA. Sampel sebanyak 65 orang diambil dengan metode *purposive sampling*. Sampel diekstraksi dengan fenol-kloroform dan di PCR dengan 2 jenis formula PCR yaitu formula A dan B serta suhu *annealing* yang digunakan adalah 48°C, 52°C dan 56°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi primer yang optimal agar proses amplifikasi berhasil adalah formula B dengan konsentrasi 0,4 µM dan variasi kondisi II dengan suhu *annealing* 52°C. Sebanyak 62 orang masyarakat Bali berhasil diamplifikasi dengan panjang *amplicon* 860 bp. Sampel yang tidak berhasil diamplifikasi dipengaruhi oleh jumlah sel epitel yang dikoleksi, keberhasilan proses ekstraksi DNA dan adanya *null allele*. Maka dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kondisi optimal penanda DNA dengan konsentrasi primer 0,4 µM dan kondisi suhu *annealing* 52°C berhasil mengamplifikasi daerah D-loop DNA Mitokondria.

Kata kunci:

PCR; Konsentrasi Primer; Suhu *Annealing*; Amplifikasi

Abstract

DNA testing is a molecular personal identification that can distinguish between individuals. One of the DNA markers used for PCR tests is mitochondrial DNA markers. Mitochondrial DNA is reported to have a polymorphic locus in the mitochondrial D-loop region. This study aims to determine the appropriate method to amplify mitochondrial DNA in the D-loop region for the DNA testing. A sample of 65 people was taken by purposive sampling method. Samples were extracted with phenol-chloroform and PCR with 2 types of PCR formulas, is formulas A and formulas B and the annealing temperatures used were 48°C, 52°C dan 56°C. The results showed that the optimal primary concentration for successful amplification was a Formulation B with primer concentration of 0,4 µM and condition variation II with annealing temperature of 52°C. A total of 62 Balinese people were successfully amplified with an amplicon length of 860 bp. Samples that are not successfully amplified are affected by the number of collected epithelial cells, the success of the DNA extraction process and null allele. So, from these results it can be concluded that the optimal conditions of DNA marker with a primer concentration of 0,4 µM and annealing temperature

conditions of 52°C succeeded in amplifying the D-loop region of mitochondrial DNA.

Keywords:

PCR; Primary Concentration; Annealing Temperature; Amplification

1. PENDAHULUAN

Keilmuan forensik mempelajari berbagai hal tentang organ manusia dan bagian tubuh manusia yang berkaitan dengan peristiwa kejahatan untuk kepentingan penegakan hukum dan pengadilan [1]. Perkembangan keilmuan forensik tidak hanya berhubungan dengan mengidentifikasi mayat atau bedah mayat (otopsi) tetapi juga berkaitan dengan orang hidup (*clinical forensic*) seperti pemeriksaan tempat kejadian perkara (TKP), korban luka, pemeriksaan barang bukti, memberikan kesaksian ahli dan berhubungan dengan identifikasi secara personal atau lebih dikenal dengan sidik jari DNA (tes DNA).

Tes DNA merupakan penegakan identifikasi melalui analisis molekuler untuk membedakan antar individu. Metode ini tepat digunakan untuk kasus identifikasi korban secara masal seperti terorisme, kecelakaan, kebakaran, pemerkosaan, identitas korban yang tidak diketahui sampai paternitas. Keunggulan identifikasi secara molekuler yaitu jumlah sampel yang sedikit tidak mempengaruhi hasil pemeriksaan, mampu mengidentifikasi dengan cepat dan akurat. Perbedaan profil DNA ditentukan dengan adanya lokus polimorfis sebagai sumber identifikasi genetik manusia [1] [2]. Lokus polimorfis yang dimaksud adalah lokus yang bersifat *individual specific* yaitu lokus yang spesifik berada pada masing-masing individu. Dilaporkan bahwa penanda DNA inti memiliki lokus polimorfis berulang-ulang yang tidak menyandi asam amino yang dinamakan lokus STR (*Short Tandem Repeat*) atau lebih dikenal dengan lokus *microsatellite*. Lokus tersebut dapat digunakan untuk tes DNA

dengan penanda DNA autosomal maupun DNA kromosom Y. Sedangkan DNA yang berada di luar inti sel seperti DNA mitokondria, lokus polimorfismenya ditemukan pada daerah D-loop mitokondria [1].

Tes DNA memiliki penanda khusus tergantung pada jenis sampel yang ditemukan di TKP dan pembanding DNA yang diduga saudara korban/tersangka. Jika sampel yang ditemukan berupa darah, anggota tubuh, cairan sperma dan pembanding kedua orang tua baik ayah maupun ibu masih ada, maka penanda DNA inti dapat digunakan. Namun jika pembanding kedua orang tua tidak ada atau salah satu yang tidak ada, maka penanda DNA kromosom Y atau DNA mitokondria dapat dilakukan. DNA kromosom Y hanya diwariskan oleh ayah ke anak laki-laki, sedangkan DNA mitokondria hanya diwariskan dari sisi maternal [3].

Penanda DNA autosomal ataupun kromosom Y telah banyak diteliti pada populasi masyarakat dengan menggunakan 46 jenis marker STR pada DNA autosomal [4] dan penggunaan sekuensing pada lokus STR untuk investigasi kasus genetika forensik [5]. Penelitian lain penanda autosomal dan kromosom Y telah publikasikan pada populasi masyarakat Maghreb dan Tunisia [6] serta beberapa klan pada masyarakat Bali [7][8]–[10]. Namun studi tentang penanda DNA mitokondria sangat jarang dilaporkan.

Studi tentang variasi genetik DNA mitokondria penting digunakan pada kasus sampel DNA korban yang tidak memiliki referensi antara kedua orang tua dan apabila sampel yang ditemukan pada TKP sedikit dan telah rusak. Kelebihan DNA

mitokondria adalah lebih stabil daripada DNA inti (autosomal atau kromosom Y). Kestabilan DNA mitokondria membuat sampel yang berumur tahunan bahkan puluhan tahun masih sangat memungkinkan untuk diuji. Sampel tersebut dapat berupa tulang dan rambut. Keuntungan lainnya yaitu jumlah salinan DNA mitokondria mencapai 1000-10000 *copy* dan tingkat mutasi 5-10 kali lebih cepat sehingga DNA mitokondria diharapkan memiliki polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan DNA inti [11].

Metode *Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism* atau disingkat PCR-RFLP merupakan salah satu metode yang dapat mendeteksi adanya mutasi dan polimorfisme dalam studi evolusi manusia [11][12]. Metode ini melakukan penggandaan DNA pada gen yang spesifik dan memotong untai DNA dalam pola tertentu dengan menggunakan enzim restriksi dan akan menghasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda [13].

Penelitian ini berujuan untuk melakukan optimasi PCR dengan menggunakan penanda DNA mitokondria terhadap populasi masyarakat Bali. Optimasi PCR diperlukan sebagai penelitian pendahuluan untuk mendapatkan metode yang tepat untuk mengamplifikasi DNA yang spesifik pada daerah D-loop DNA mitokondria untuk kepentingan tes DNA.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sel epitel mukosa mulut dari masyarakat Bali, masker, sarung tangan, *cotton bud* steril, *lysis buffer* DPZ (*Deutsche Primaten Zentrum*) yang terdiri dari 10mM NaCl, 100mM EDTA, 100mM Tris-Cl, Urea dan aquadest, *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) 10%, 1X STE (*Sodium Chloride-*

Tris-EDTA), fenol, *Chloroform Isoamyl Alcohol* (CIAA) 24 : 1, *etanol absolute*, etanol 70%, TE (*Tris-EDTA*), *Green Master Mix PCR* (Promega), *Primer D-Loop mtDNA*, *Thermo Scientific GeneRuler* 100 bp dan 50 bp *DNA Ladder*, *Gel Agarose* (*Thermo Scientific*), 10X *Tris-Boric acid-EDTA* (TBE) *buffer*, GelRed (Biotium) dan akuades.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung 1,5 ml, tabung 200 μ l, mikro pipet, tip mikro (10-1000 μ l), alat sentrifugasi (*Thermo Scientific*), freezer, *Thermal Cycle*/Mesin PCR (Veriti), GelDoc (Bio-Rad), alat sterilisasi (*autoclave*), mesin elektroforesis horisontal (Bio-Rad), *microwave*, gelas ukur, timbangan analitik, Erlenmeyer, spatula, gelas beker, inkubator, *waterbath*, kertas Semi-Log, penggaris, *millimeter block*, dan kamera.

2.2. Metode

Sampel diambil dengan cara *purposive sampling*. Sampel sebanyak 62 orang masyarakat di seluruh kabupaten/kota di Bali yang tidak memiliki hubungan kekerabatan dan 3 sampel masyarakat di luar Bali sebagai pembanding. Sampel di luar Bali diambil dari penelitian Oktavia (2015) [14]

Sampel diekstraksi dengan metode fenol-kloroform yang telah dimodifikasi [15]. Sampel tersebut diamplifikasi dengan primer daerah D-loop mtDNA L16159F (5'-TACTTGACCACCTGTAGTAC-3') dan H408R (5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3'). Komposisi mix PCR dirancang dengan 2 macam formula PCR dengan konsentrasi primer yang berbeda (0,2 μ M dan 0,4 μ M).

Proses PCR dilakukan dengan menggunakan mesin *Thermo cycle* Merk Veriti dengan program sebagai berikut: Predenaturasi dengan suhu 94°C selama 5

menit, kemudian dilakukan pengulangan program sebanyak 35x dengan suhu 94°C untuk denaturasi selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) dengan suhu yang digunakan adalah 48°C, 52°C dan 56°C selama 1 menit dan untuk pemanjangan (*extension*) dengan suhu 72°C selama 1 menit. Serta pemanjangan akhir dilakukan dengan suhu 72°C selama 10 menit. Hasil amplifikasi divisualisasi dengan metode elektroforesis pada gel *agarose* 1% dengan tegangan 50V selama 1jam.

Uji secara *in silico* juga dilakukan untuk mengetahui posisi penempelan primer dan kemungkinan panjang *amplicon* yang dihasilkan pada proses PCR dengan

menggunakan *Nucleotide Blast* pada laman NCBI nomor akses NC_012920.1

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil Optimasi Formula PCR dan Suhu *Annealing*

Formula A dan B digunakan untuk mengetahui perbedaan konsentrasi primer untuk menghasilkan amplifikasi DNA (Tabel 1). Sedangkan perbedaan suhu *annealing* bertujuan untuk mengetahui suhu penempelan primer yang tepat untuk dapat mengamplifikasi daerah target yang spesifik yaitu daerah d-loop DNA mitokondria (Tabel 2).

Tabel 1. Formula PCR untuk Amplifikasi Daerah D-loop mtDNA

Formula A		Formula B	
2X Green Master Mix	: 17,5 µl	2X Green Master Mix	: 17,5 µl
H ₂ O	: 11,9 µl	H ₂ O	: 11,9 µl
Primer F (0,2 µM)	: 1,4 µl	Primer F (0,4 µM)	: 1,4 µl
Primer R (0,2 µM)	: 1,4 µl	Primer R (0,4 µM)	: 1,4 µl
Template DNA	: 2,8 µl	Template DNA	: 2,8 µl
Total Volume	: 35 µl	Total Volume	: 35 µl

Tabel 2. Kondisi Program PCR untuk Amplifikasi Daerah D-loop mtDNA

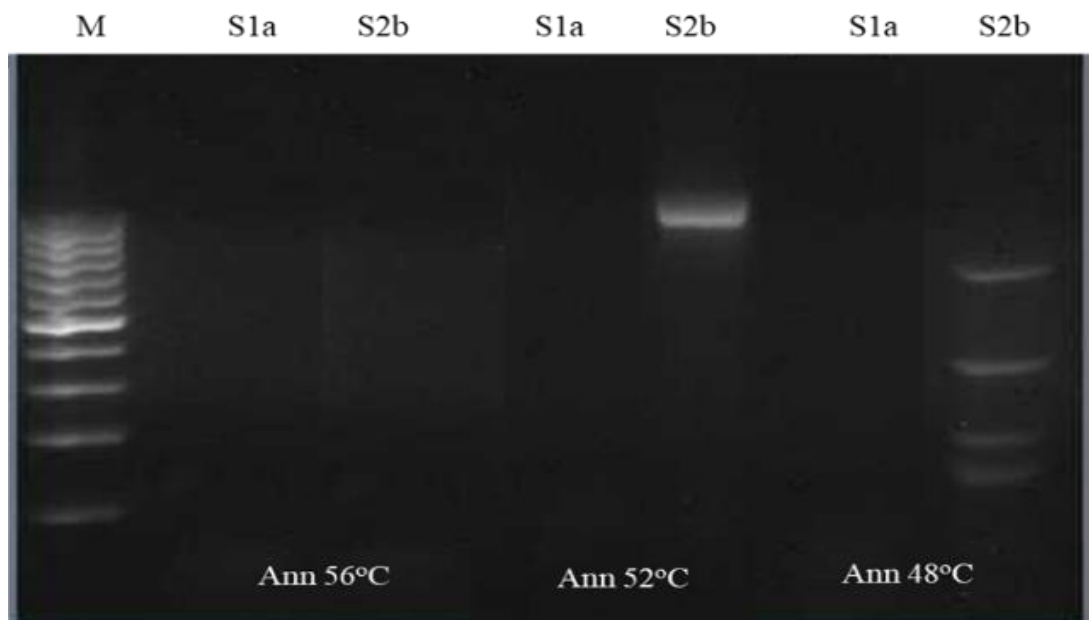
Tahapan PCR	Variasi Kondisi		
	I	II	III
Predenaturasi	94 °C	94 °C	94 °C
Siklus pengulangan	35x	35x	35x
a. Denaturasi	94 °C	94 °C	94 °C
b. <i>Annealing</i>	56 °C	52 °C	48 °C
c. Ekstensi	72 °C	72 °C	72 °C
Ekstensi akhir	72 °C	72 °C	72 °C

Pada Gambar 1 dapat dilihat kombinasi hasil formula dan kondisi suhu yang tepat adalah formula B dengan suhu 52°C. Konsentrasi primer pada proses PCR mempengaruhi proses amplifikasi jika konsentrasi primer sedikit, maka primer tidak mampu menempel pada *template* DNA tetapi jika berlebihan maka antar primer dapat saling menempel sehingga terbentuk *dimer* [16]. Pada Gambar 1 konsentrasi primer formula A tidak menghasilkan proses amplifikasi, maka kemungkinan primer dengan konsentrasi 0,2 µM tidak dapat mengamplifikasi DNA dengan ukuran sepanjang 860 bp.

Suhu penempelan primer juga mempengaruhi proses amplifikasi. Suhu *annealing* dipengaruhi oleh nilai T_m (*melting temperature*) primer yaitu waktu untai ganda DNA terpisah sebanyak 50%, nilai T_m optimal sekitar 50°C - 65 °C, jika suhu *annealing* terlalu rendah, maka primer

kemungkinan menempel pada daerah yang tidak spesifik, jika terlalu tinggi primer tidak mampu menempel pada *template* DNA dan mempengaruhi proses PCR [17]. Dapat dilihat pada Gambar 1, suhu *annealing* 48°C membentuk banyak pita DNA yang tidak spesifik.

Panjang *amplicon* yang dihasilkan dari primer ini adalah ±860 bp. Panjang tersebut didapatkan dengan menghitung jarak migrasi DNA dan diplot pada kertas semilog. Konfirmasi panjang *amplicon* dilakukan secara *in silico* dengan metode *nucleotide blast* primer D-loop DNA mitokondria pada laman NCBI. Aksesori nomor yang digunakan adalah NC_012920.1. Hasil yang didapatkan yaitu panjang *amplicon* sebesar 860 bp. Maka uji *in silico* sesuai dengan hasil gel pada tahap elektroforesis.



Gambar 1. Hasil Optimasi Formula PCR. Keterangan S1 dan S2 merupakan nama sampel yang digunakan untuk optimasi. Kode (a) merupakan formula A dan kode (b) merupakan formula B

3.2. Amplifikasi DNA dengan Formula B dan Suhu Annealing 52°C

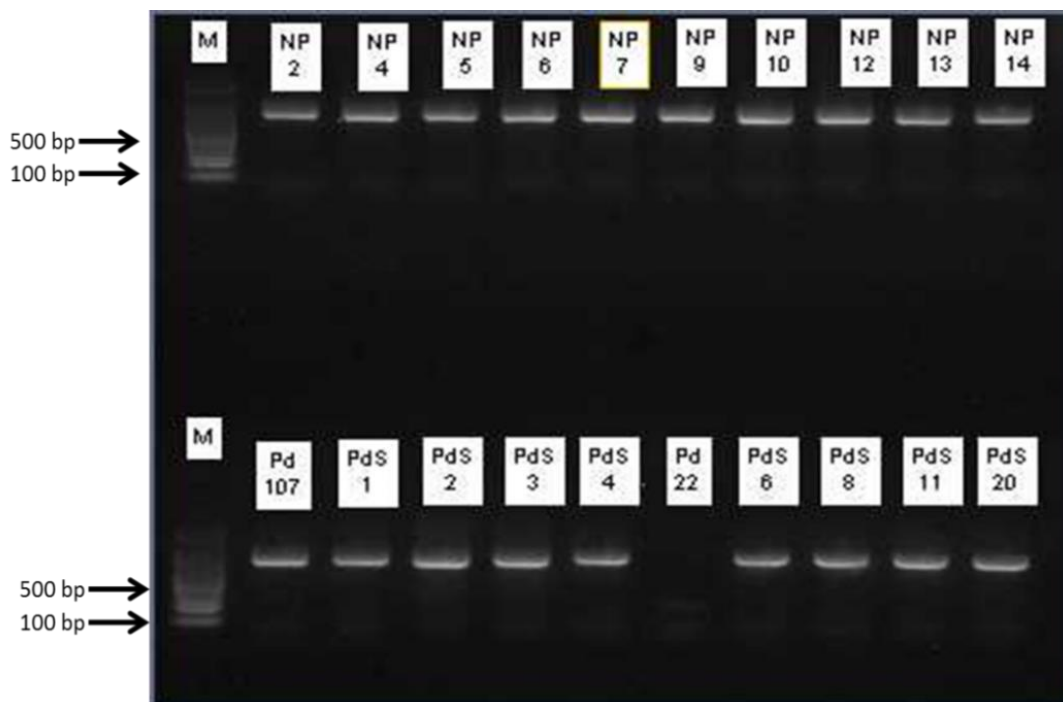
Sampel sebanyak 65 orang diamplifikasi dengan formula yang optimal

yaitu formula B dengan suhu 52°C diperoleh hasil sebagai berikut (Tabel 3 dan Gambar 2):

Tabel 3. Data Sampel Penelitian

Asal Daerah (Kabupaten Kota/Suku)	Jumlah Sampel (orang)	Jumlah Sampel Teramplifikasi (orang)	Keterangan*
Denpasar	8	7	-
Badung	8	8	-
Gianyar	8	7	-
Klungkung	8	7	-
Tabanan	6	6	-
Bangli	6	6	-
Karangasem	6	6	-
Buleleng	6	6	-
Jembrana	6	6	-
Flores	1	1	Oktavia (2015)
Dayak	2	2	Oktavia (2015)
TOTAL	65	62	

(*) Keterangan menunjukkan sampel diambil dari penelitian sebelumnya (Oktavia, 2015)



Gambar 2. Hasil PCR Sampel dengan Formula dan Suhu Optimal
Keterangan : M= 100 bp DNA Ladder

Jumlah sampel yang berhasil diamplifikasi sebanyak 62 orang dari total keseluruhan 65 sampel. Pada Gambar 2 terlihat bahwa sampel dengan kode Pd 22 tidak berhasil diamplifikasi. Hal tersebut diperkirakan karena jumlah DNA pada individu kode Pd 22 terlalu sedikit atau karena ketidakberhasilan proses ekstraksi

DNA. Kondisi pengambilan sampel dan karakter individu yang berbeda-beda, dapat mempengaruhi jumlah sel atau DNA yang didapatkan. Beberapa faktor yang mempengaruhi koleksi sel/DNA yang diambil yaitu kebiasaan probandus (merokok atau menyirih) dan kondisi

probandus pada saat pengambilan sel/DNA [14][18].

Faktor-faktor lain yang mempengaruhi jalannya proses amplifikasi diantaranya adalah kualitas *template* yang rendah yaitu masih terdapatnya protein atau bahan/senyawa lain pada *template* DNA sehingga mempengaruhi proses amplifikasi DNA [19][20]. Serta kemungkinan terjadinya *null allele*. *Null allele* adalah kondisi DNA *template* mengalami mutasi pada tempat menempelnya primer, sehingga primer tidak mengenali wilayah penempelan pada *template* DNA. Mutasi dapat berupa mutasi titik pada situs ujung 3` primer dimana proses ekstensi dimulai. Mutasi ini dapat mengganggu proses PCR dan tidak akan menghasilkan produk PCR [19].

4. KESIMPULAN

Formula *mix* PCR dan suhu *annealing* yang optimal untuk amplifikasi daerah D-loop DNA mitokondria adalah formula B dengan konsentrasi primer 0,4 μ M dan suhu 52°C. Panjang *amplicon* yang dihasilkan pada proses amplifikasi sekitar \pm 860 *bp*. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses amplifikasi terdiri dari jumlah sel epitel yang dikoleksi, keberhasilan proses ekstraksi DNA dan adanya *null allele*.

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Yudianto, *Buku Referensi Pemeriksaan Forensik DNA Tulang dan Gigi*. 2020.
- [2] I. K. Junitha, "Peranan Analisis DNA dalam Penyelesaian Masalah Sosial di Masyarakat," in *Orasi Ilmiah*, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, 2012.
- [3] A. Doosti and P. Ghasemi Dehkordi, "Genetic Polymorphisms of Mitochondrial Genome D-loop Region in Bakhtiarian Population by PCR-RFLP," *Int J Biol*, vol. 3, no. 4, Sep. 2011, doi: 10.5539/ijb.v3n4p41.
- [4] L. Li, Y. Lin, Y. Liu, R. Zhu, Z. Zhao, and T. Que, "A case of false mother included with 46 autosomal STR markers," *Investig Genet*, vol. 6, no. 1, Jun. 2015, doi: 10.1186/s13323-015-0026-y.
- [5] S. L. Fordyce *et al.*, "High-throughput sequencing of core STR loci for forensic genetic investigations using the Roche Genome Sequencer FLX platform," *Biotechniques*, vol. 51, no. 2, pp. 127–133, Aug. 2011, doi: 10.2144/000113721.
- [6] A. Mili *et al.*, "Molecular and biochemical characterization of Tunisian patients with glycogen storage disease type III," *J Hum Genet*, vol. 57, no. 3, pp. 170–175, 2012, doi: 10.1038/jhg.2011.122.
- [7] I. K. Junitha and N. L. Watiniasih, "Male Genetic Diversity of Siwa Brahmin Clan in Bali Based on Y-Chromosomal Microsatellite DNA," *Jurnal of Biology, Agriculture and Healthcare.*, vol. 4, no. 1, 2014.
- [8] I. K. Junitha, M. Pharmawati, and W. Rosiana, "Genetic Diversity of Soroh Celagi (Pasek Catur Sanak Clan) Base don Y-chromosomal Microsatellites DNA," in *The 4th International Conferences on Biosciences and Biotechnology*, Sep. 2012, pp. 239–243.
- [9] N. P. Putri. Wulandari, I. K. Junitha, and N. Wirasiti, "Penelitian Pendahuluan Variasi Genetik Masyarakat Soroh Pande Berdasarkan Penanda Dna Mikrosatelit Kromosom Y: Masyarakat Soroh Pande Desa Abiansemal, Badung," *J Biol*

- (Denpasar), vol. XVIII(1), pp. 5–9, 2014.
- [10] M. L. P. R. Puspitha, “Variasi Genetik Masyarakat Soroh Pasek Kayuan di Desa Siakin dan Blandingan Kecamatan Kintamani, Kabupaten Bangli Berdasarkan Penanda Mikrosatelit DNA Kromosom Y,” Skripsi, Universitas Udayana, Badung, 2012.
- [11] H. H. Siti, G. Gun Gumilar, D. Natalia, and A. Saifuddin Noer, “Variasi Urutan nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara,” 2013.
- [12] D. v. Nesheva, “Aspects of ancient mitochondrial dna analysis in different populations for understanding human evolution,” *Balkan Journal of Medical Genetics*, vol. 17, no. 1. Walter de Gruyter GmbH, pp. 5–14, Nov. 20, 2014. doi: 10.2478/bjmg-2014-0019.
- [13] N. M. Andrew, “TITLE: Assignment of Haplotypes groups by Mitochondrial DNA in BTN323 Population using PCR-RFLP analysis,” 2013.
- [14] E. L. Octavia, “Identifikasi Alel pada Tiga Lokus DNA Mikrosatelit Autosom Masyarakat Dayak Kaharingan di Kota Palangkaraya,” Skripsi, Universitas Udayana, Badung, Bali, 2015.
- [15] N. P. S. Septiasari, I. Ketut Junitha, and N. Nyoman Wirasiti, “Ragam Alel DNA Mitokondria Masyarakat Soroh Pande di Bali dengan Metode PCR-RFLP,” no. 2, pp. 210–217, 2017, [Online]. Available: <http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>
- [16] D. Bunga Purwakasih and A. Achyar, “Primer Design and in Silico PCR for Detection Shigella Sp. on Refilled Water Samples Desain Primer dan PCR In Silico untuk Deteksi Shigella Sp. pada Sampel Air Minum Isi Ulang,” 2021. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [17] D. G. Pradnyaniti and S. Yowani, “Desain Primer secara in silico untuk Amplifikasi Fragmen Gen rpoB Mycobacterium tuberculosis dengan Polymerase Chain Reaction (PCR),” 2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [18] I. G. A. A. Putri, “Identifikasi Ragam Alel pada Tiga Lokus DNA Mikrosatelit Autosom Masyarakat Soroh Pande di Kabupaten Gianyar untuk Kepentingan Forensik,” Skripsi, Universitas Udayana, Badung, Bali, 2016.
- [19] E. E. Dakin and J. C. Avise, “Microsatellite null alleles in parentage analysis,” *Heredity*, vol. 93, no. 5. pp. 504–509, Nov. 2004. doi: 10.1038/sj.hdy.6800545.
- [20] W. Chandramila, “Variasi Genetik Populasi Betawi Berdasarkan Polimorfisme DNA Mitokondria,” Tesis, Institut Pertanian Bpgor, Bogor, 2002.