

ANALISIS VARIASI NUKLEOTIDA DAERAH *D-LOOP* DNA MITOKONDRIA PADA SATU INDIVIDU SUKU BALI NORMAL

Ketut Ratnayani, I Nengah Wirajana, dan A. A. I. A. M. Laksmiwati

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

DNA mitokondria (mtDNA) manusia memiliki tingkat polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan DNA inti, terutama pada daerah *D-Loop* yang merupakan daerah *non coding* dan memiliki polimorfisme tertinggi dalam genom mitokondria. Analisis variasi urutan nukleotida daerah *D-Loop* dapat digunakan untuk menentukan identitas individu atau etnis tertentu serta hubungan kekerabatan maternal.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan varian nukleotida pada individu suku Bali yang nantinya dapat digunakan sebagai pijakan dalam menentukan pola genetik mtDNA suku Bali dalam skala yang lebih besar. Untuk tujuan tersebut maka telah dilakukan penentuan urutan nukleotida daerah *D-Loop* mtDNA satu individu suku Bali normal menggunakan sampel sel epitel rongga mulut. Dalam rangka penentuan urutan nukleotida tersebut, maka telah dilakukan serangkaian kegiatan sebagai berikut : 1). Isolasi DNA mitokondria sampel, 2). Amplifikasi daerah *D-Loop* mtDNA dengan teknik PCR, 3). Sekuensing dan analisis urutan nukleotida hasil sekuensing.

Penelitian ini telah berhasil melakukan amplifikasi PCR terhadap fragmen berukuran 443 pb daerah *D-Loop* mtDNA dan menentukan urutan nukleotida sebanyak 402 pb dari satu individu suku Bali normal tersebut. Penelitian ini juga berhasil menemukan varian atau morf yang berbeda dengan urutan Cambridge atau Anderson yaitu ditemukan 6 jenis varian normal pada posisi yang berbeda yaitu varian 16223C→T, 16249T→C, 16259C→T, 16278C→T, 16316A→G, 16375C→A, serta ditemukan delesi nukleotida T pada posisi 16362.

Kata Kunci : *DNA, mitokondria, D-Loop, Varian, Normal*

ABSTRACT

Human mitochondrial DNA (mtDNA) has higher polymorphism level than nucleus genome, especially in the *D-Loop* region, which is a non coding region and the most polymorphic region in the mitochondrial genome. The analysis of variation of nucleotide sequence of *D-Loop* region can be used to determine the individual or ethnic identity and also maternal familiar relationship. The research aims to determine nucleotide variant on Balinese individual, which can be used as data base in determination of mtDNA genetical profile of Balinese ethnic in a bigger scale.

To achieve the aims of the research, way the nucleotide sequence of one normal Balinese individual using the epithelia cells in the saliva. The methods were :1) the isolation of sample mtDNA, 2) the amplification of the *D-Loop* region of mtDNA by PCR, 3) sequencing and analysis of nucleotides sequence.

The 0,4 kb fragment of the *D-loop* region mtDNA of the sample were successfully amplified, and sequenced of 402 pb. The research found 6 new variants or morfe different from Cambridge or Anderson sequence : variant 16223C→T, 16249T→C, 16259C→T, 16278C→T, 16316A→G, 16375C→A. The research also found the deletion of T nucleotide on position 16362.

Keywords: *mitochondrial DNA, D-Loop, Varian, Norma*

PENDAHULUAN

DNA mitokondria (mtDNA) manusia memiliki sejumlah sifat genetik khas yang membedakannya dari genom inti. Pada mamalia DNA mitokondria hanya diturunkan lewat jalur ibu tanpa rekombinasi. MtDNA pada sel anak seluruhnya disumbangkan oleh ibu dan sperma sama sekali tidak berkontribusi (Campbell, 1996). Keunikan sistem penurunan yang menarik ini telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu penentuan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik (Wallace, 1997).

Keunikan lain dari mtDNA yaitu memiliki laju mutasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan DNA inti yaitu laju mutasi menetap gen-gen mtDNA 10-17 kali lebih cepat daripada yang terlibat dalam fosforilasi oksidatif yang dikode oleh DNA inti (Wallace, 1997). MtDNA berbeda dengan DNA inti pada lokasi, urutan, kuantitas dalam sel, dan cara pewarisannya (dari orang tua ke anak). Sel hanya memiliki satu inti sel yang mengandung 2 set kromosom, yaitu satu set paternal dan satu set maternal, yang mana masing-masing set terdiri dari 23 kromosom. Akan tetapi sel dapat mengandung ratusan hingga ribuan mitokondria dan masing-masing mitokondria dapat mengandung beberapa kopi mtDNA. DNA inti memiliki jumlah basa yang lebih banyak dibandingkan mtDNA, tetapi molekul mtDNA terdapat dalam jumlah kopi yang jauh lebih banyak daripada molekul DNA inti. Karakteristik mtDNA ini sangat berguna pada situasi di mana jumlah DNA dalam sampel ini sangat terbatas, seperti sampel-sampel yang diambil dari kasus kriminal yaitu rambut, tulang, gigi, cairan tubuh (air liur, air mani, darah) (Moore, 1999).

Publikasi urutan lengkap genom DNA mitokondria manusia yang berukuran 16.569 pb yang dikenal sebagai urutan Cambridge (Anderson, *et al.*, 1981) sampai saat ini telah menjadi urutan acuan dalam berbagai studi mtDNA manusia (Marzuki, *et al.*, 1991). Genom mitokondria yang terdiri atas gen-gen penyandi rRNA 12S dan 16S, 22 tRNA, dan 13 protein sub unit kompleks enzim rantai respirasi, juga memiliki urutan nukleotida non penyandi yang disebut dengan daerah *D-Loop*. Keunikan dari daerah *D-Loop* adalah memiliki tingkat polimorfisme yang tertinggi dalam mtDNA. Daerah *D-Loop* bersifat sangat variabel dan mempunyai laju evolusi lima kali lebih cepat dibandingkan daerah lain dalam genom mitokondria. Noer dkk pada tahun 1994 menemukan adanya polimorfisme pada daerah *D-Loop* mtDNA penduduk Indonesia, yaitu ditemukan tiga morf dari tiga famili yang berasal dari tiga daerah yang berbeda (Noer, *et al.*, 1994). Gaffar pada tahun 1998 telah menemukan 24 varian normal mtDNA daerah *D-Loop* dari 10 individu Indonesia.

Berdasarkan hal tersebut, sangat menarik melakukan penelitian guna menentukan adanya morf atau varian baru pada individu suku Bali normal (yang berbeda dengan urutan referensi yaitu urutan Cambridge atau Urutan Anderson) yang nantinya dapat digunakan sebagai pijakan dalam menentukan pola genetik mtDNA suku Bali dalam skala yang lebih besar. Untuk tujuan tersebut maka telah dilakukan penentuan urutan nukleotida daerah *D-Loop* mtDNA satu individu suku Bali normal menggunakan sampel sel epitel rongga mulut. Dalam rangka penentuan urutan nukleotida tersebut, maka akan dilakukan serangkaian kegiatan sebagai berikut : 1). Isolasi DNA mitokondria sampel, 2). Amplifikasi daerah *D-Loop* mtDNA dengan teknik PCR, 3). Sekuensing dan analisis urutan nukleotida hasil sekuensing.

MATERI DAN METODE

Strategi penelitian menerapkan amplifikasi PCR dan sekuensing terhadap fragmen berukuran 0,4 kb (443 pb) daerah *D-Loop* DNA mitokondria menggunakan sampel sel epitel rongga mulut dari satu individu suku Bali normal.

Karakteristik sampel

Untuk mencapai tujuan penelitian maka digunakan sampel sel epitel rongga mulut dari satu individu suku Bali dengan karakteristik seperti tampak pada Tabel 1.

Tabel 1. Data karakteristik sampel

Kode Sampel	A1
Daerah Asal	Buleleng, Bali
Jenis Kelamin	Laki-laki
Usia	44 Tahun

Penanganan Sampel

Tahap awal penelitian adalah penyiapan templat DNA untuk proses PCR. Templat DNA yang akan diamplifikasi berasal dari hasil lisis sel epitel rongga mulut manusia. Sel epitel rongga mulut diperoleh dengan cara berkumur selama 1 menit dengan 15 mL aquades steril dan diperoleh suspensi hasil kumur yang disimpan dalam botol steril. Suspensi tersebut dipekatkan dengan cara sentrifugasi dan disimpan dalam tabung eppendorf 1,5 mL pada suhu -20°C . Templat DNA dibuat dengan melisis 20 μL sampel hasil pemekatan dengan 20 μL buffer lisis 10x (50 mM Tris-Cl pH 8,5; 1 mM EDTA pH 8,5 dan 0,5%(v/v) Tween 20), 2 μL proteinase K (20 mg/mL), ditambah ddH₂O sampai total volume 200 μL . Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam dan diinaktivasi pada 95°C selama 3 menit. Hasil lisis kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimal

selama 30 detik, dan supernatannya digunakan sebagai templat PCR.

Amplifikasi PCR

Reaksi PCR menggunakan 10 μL templat, 1,25 unit enzim Taq DNA polymerase, 200 μmol campuran dNTP, primer M1 dan M2 (Noer, *et al.*, 1991) masing-masing 20 μmol , buffer amplifikasi 10x dan ddH₂O sampai volume total 50 μL . Proses PCR dilakukan dalam 30 siklus, setiap siklus terdiri atas tahap denaturasi suhu 95°C selama 1 menit, tahap annealing suhu 55°C selama 1 menit dan tahap polimerisasi suhu 72°C selama 3 menit. Proses PCR menggunakan alat *DNA Thermal Cycler* buatan Perkin Elmer.

Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 1%(b/v) menggunakan penanda DNA λ /*Hind*III dan plasmid pUC 19 yang dipotong dengan enzim restriksi *Hinf*I (pUC/*Hinf*I).

Sekuensing Dengan Metode Dideoksi Sanger

Proses sekuensing dilakukan menurut prosedur *ABI PRISM DNA Sequencing* (Perkin Elmer, 1995). Reaksi metoda *dye terminator* ini meliputi beberapa tahap, yaitu penyiapan templat DNA, proses PCR, pemurnian DNA menggunakan kolom sephadex G-50, elektroforesis gel akrilamid, pembacaan electroforegram dan analisis hasil sekuensing. Pembacaan hasil elektroforesis dilakukan secara otomatis oleh alat *ABI PRISM DNA Sequencer*.

Analisis Hasil Urutan Nukleotida

Hasil pembacaan sekuensing berupa elektroforegram hasil *scanner* terhadap fragmen-fragmen yang ada dalam gel poliakrilamid. Tiap nukleotida menghasilkan puncak dengan warna yang berbeda pada elektroforegram yaitu nukleotida A berwarna hijau, nukleotida G berwarna

hitam, nukleotida C berwarna hijau, dan nukleotida T berwarna merah. Analisis hasil urutan nukleotida untuk penentuan adanya varian atau morf baru dibandingkan dengan urutan Anderson atau urutan Cambridge dilakukan dengan menggunakan program *DNA-STAR*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil PCR

Tahap pertama dalam proses PCR adalah penyiapan templat PCR melalui proses lisis sel epitel rongga mulut menggunakan bufer lisis yang dimodifikasi. Proses lisis sederhana yang diterapkan ternyata mampu menghasilkan lisat sel yang siap untuk digunakan sebagai templat PCR tanpa melalui proses pemurnian dan dapat diperoleh hasil PCR yang reproduksibel. Untuk mengamplifikasi daerah *D-Loop* DNA mitokondria yang diharapkan maka dalam penelitian ini digunakan primer M₁ dan M₂ (Marzuki *et al.*, 1991) yang bersesuaian dengan nukleotida 15978 sampai dengan 16420 pada urutan Cambridge sehingga menghasilkan fragmen berukuran 443 pb.

Proses PCR menggunakan kedua primer tersebut berhasil memperoleh satu pita terang berukuran 443 pb seperti tampak pada Gambar 1. Munculnya satu pita ini menunjukkan bahwa pasangan primer yang digunakan bersifat spesifik hanya menempel pada posisi yang diharapkan (pada kondisi *annealing* yang digunakan).

Pada Gambar 1 terbukti bahwa pita 443 pb atau 0,4 kb produk PCR yang

dihasilkan terletak pada posisi di bawah pita 1 kb standar λ /HindIII.

1 2 3 4 5



Gambar 1. Elektroforegram hasil PCR pada kondisi *annealing* 48°C : (1) marker, (2) Kontrol Positif, dan (5) Kontrol Negatif.

Tidak munculnya pita pada kontrol negatif yang tidak mengandung templat mtDNA menunjukkan bahwa hasil PCR yang diperoleh bukan berasal dari kontaminan.

Sekuensing

Untuk penentuan urutan nukleotida produk PCR yang berukuran 443 pb maka dalam reaksi sekuensing digunakan primer M1, penelitian ini telah berhasil menentukan urutan nukleotida daerah *D-Loop* mtDNA dari individu tersebut sebanyak 402 pb seperti terlihat pada Tabel 2., sedangkan elektroforegram hasil sekuensing terlihat pada Gambar 2.

Hasil analisis homologi

Hasil analisis homologi urutan nukleotida kedua individu terhadap urutan Anderson atau Cambridge sebagai urutan referensi (Tabel 3.), menunjukkan bahwa ditemukan 6 jenis varian atau morf yang

berbeda dengan urutan Anderson yaitu varian 16223C→T, 16249T→C, 16259C→T, 16278C→T, 16375C→A, serta ditemukan delesi nukleotida T pada posisi 16362.(Tabel 4.)

Tabel 3. Analisis Homologi Urutan Nukleotida Sampel A1 Terhadap Urutan Anderson

Posisi	15998	16008	16018	16028	16038
Anderson	AAGATTCTAA	TTTAAACTAT	TCTCTGTTCT	TTCATGGGGA	AGCAGATTTG
A1	AAGATTCTAA	TTTAAACTAT	TCTCTGTTCT	TTCATGGGGA	AGCAGATTTG
	16048	16058	16068	16078	16088
Anderson	GGTACCACCC	AAGTATTGAC	TCACCCATCA	ACAACCGCTA	TGTATTTTCGT
A1	GGTACCACCC	AAGTATTGAC	TCACCCATCA	ACAACCGCTA	TGTATTTTCGT
	16098	16108	16118	16128	16138
Anderson	ACATTACTGC	CAGCCACCAT	GAATATTGTA	CGGTACCATA	AATACTTGAC
A1	ACATTACTGC	CAGCCACCAT	GAATATTGTA	CGGTACCATA	AATACTTGAC
	16148	16158	16168	16178	16188
Anderson	CACCTGTAGT	ACATAAAAAC	CCAATCCACA	TCAAAACCCC	CTCCCCATGC
A1	CACCTGTAGT	ACATAAAAAC	CCAATCCACA	TCAAAACCCC	CTCCCCATGC
	16198	16208	16218	16228	16238
Anderson	TTACAAGCAA	GTACAGCAAT	CAACCCTCAA	CTATCACACA	TCAACTGCAA
A1	TTACAAGCAA	GTACAGCAAT	CAACC <u>T</u> CAA	CTATCACACA	TCAACTGCAA
	16248	16258	16268	16278	16288
Anderson	CTCCAAAGCC	ACCCCTCACC	CACTAGGATA	CCAACAAACC	TACCCACCCT
A1	C CCAAAGCC	A T CCCTCACC	CACTAGGATA	T C AACAAACC	TACTCACCCCT
	16298	16308	16318	16328	16338
Anderson	TAAACAGTACA	TAGTACATAA	AGCCATTTAC	CGTACATAGC	ACATTACAGT
A1	TAAACAGTACA	TAGTACAT G A	AGCCATTTAC	CGTACATAGC	ACATTACAGT
	16348	16358	16368	16378	16388
Anderson	CAAATCCCTT	CTCGTCCCCA	TGGATGACCC	CCCTCAGATA	GGGGTCCCTT
A1	CAAATCCCTT	CTCG-CCCCA	TGGATGA A CC	CCCTCAGATA	GGGGTCCCTT
Anderson	16398				
A1	GAC				

Keterangan : Huruf dicetak tebal menunjukkan adanya varian nukleotida.

Tabel 4. Data varian normal daerah *D-Loop* mtDNA terhadap urutan Anderson yang ditemukan pada sampel A1

Posisi Nukleotida	1	1	1	1	1	1	1	
	6	6	6	6	6	6	6	
	2	2	2	2	3	3	3	
	2	4	5	7	1	6	7	
	3	9	9	8	6	2	5	
								d
Varian Nukleotida	C	T	C	C	A	e	C	
	↓	↓	↓	↓	↓	l	↓	
	T	C	T	T	G	e	A	
						s		
						i		
						T		
Urutan Cambridge	C	T	C	C	A	T	C	Total varian
								per sampel
Sampel A1	T	C	T	T	G	-	A	= 6

Dari keenam jenis varian yang ditemukan pada sampel, dua jenis varian yaitu varian 16223C→T dan 16278C→T sudah pernah ditemukan oleh peneliti lain pada manusia Indonesia dari suku atau daerah yang berbeda. Varian 16223 C→T ditemukan pada individu suku Sunda, Kalimantan selatan (Banjarmasin), Sulawesi Utara (Gorontalo) dan Maluku (Ternate) oleh Gaffar pada tahun 1998 dan Rachmayanti pada tahun 2000. Sedangkan varian 16278 C→T ditemukan pada suku Sunda oleh Rachmayanti pada tahun 2000.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Fragmen DNA berukuran 443 pb daerah *D-Loop* DNA mitokondria yang terletak pada daerah 15978-16420 mtDNA dari satu individu suku Bali telah berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer M₁ dan M₂.
2. Proses sekuensing dengan metoda dideoksi Sanger menggunakan primer M1 terhadap hasil PCR berhasil membaca urutan nukleotida sebanyak 402 pb.

3. Hasil studi homologi urutan nukleotida kedua individu dari satu individu suku Bali terhadap urutan Cambridge atau Anderson, menemukan 6 jenis varian nukleotida pada posisi yang berbeda yaitu varian 16223C→T, 16249T→C, 16259C→T, 16278C→T, 16375C→A, serta ditemukan delesi nukleotida T pada posisi 16362.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan apakah diantara keenam varian yang ditemukan ada yang merupakan varian spesifik untuk Suku Bali

UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang mendukung sehingga penelitian ini dapat berjalan sebagaimana mestinya, khususnya kepada Ibu Ati dan Bapak George dari Pusat Bioteknologi ITB atas bantuan dan kerjasamanya.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, S., et al, 1981, Sequence and organization of the human

mitochondrial genome, *Nature*, 290, 457-465.

Gaffar, S., 1998, Varian Normal Daerah D-Loop DNA mitokondria 10 Individu Indonesia, Tesis Magister, Program Magister Kimia ITB.

Marzuki, S., et al, 1991, Normal variant of human mitochondrial DNA and translations product : The building of a reference data base, *Human Genetics*, 88, 139-145.

Moore, J.M., Isenberg, A.R., 1999, Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory, Forensic Science Communication, Vol. I, Number 2.

Noer, A.S., dan Gustiananda, M., 1997, PCR tanpa isolasi DNA dari sel epitel rongga mulut, *JMS*, 2, No. 1., 35 – 45.

Noer, A.S., et al, 1994, Analisis variasi urutan nukleotida D-loop mtDNA manusia dari beberapa daerah Indonesia, Proc. 1st joint seminar on chemistry UKM-ITB, Malaysia,.

Rachmyanti, Y., 2000, Urutan Nukleotida 443 pb daerah D-Loop DNA mitokondria individu-individu segaris keturunan ibu, Tesis Magister, Program Magister Kimia, ITB.