

IDENTIFIKASI FRAGMEN DNA MITOKONDRIA PADA SATU GARIS KETURUNAN IBU DARI SEL EPITEL RONGGA MULUT DAN SEL FOLIKEL AKAR RAMBUT

Rina Budi Satiyarti¹, Nurmilah², Tina Dewi Rosahdi²

¹UIN Raden Intan Lampung Jalan Letkol H. Endro Suratmin Bandar Lampung

²UIN Sunan Gunung Jati Bandung Jalan A.H. Nasution No. 105 Kota Bandung

Email : rinabudi07@gmail.com

Diterima: 22 Mei 2017. Disetujui : 19 Juni 2017. Dipublikasikan: 29 Juni 2017

Abstrak: DNA mitokondria (mtDNA) manusia memiliki sejumlah sifat genetik khas yang membedakannya dari genom inti yang dimanfaatkan dalam identifikasi penurunan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik. DNA mitokondria (mtDNA) manusia memiliki laju mutasi yang lebih cepat dibandingkan dengan DNA inti sehingga dapat dimanfaatkan untuk pemeriksaan sampel yang terbatas seperti untuk kepentingan visum. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi fragmen DNA mitokondria dari lisis sel epitel rongga mulut menggunakan primer M1 dan HV2R, dan sel folikel akar rambut menggunakan primer M1 dan M2 dengan teknik PCR dan elektroforesis agarosa. Sampel sel epitel mulut dan akar rambut yang diambil dari satu garis keturunan dilisis terlebih dahulu dan dilakukan ekstraksi sel secara kimiawi dan enzimatis sehingga DNA total dapat keluar dari inti sel dan mitokondria. Setelah itu dilakukan amplifikasi fragmen D-loop mtDNA secara in vitro dengan dua jenis primer yang berbeda menggunakan teknik PCR dan proses terakhir yaitu dilakukan analisis hasil PCR menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa amplifikasi fragmen DNA mitokondria menggunakan primer M1 dan HV2R dari sel epitel rongga mulut menghasilkan fragmen berukuran 1 kb. Pada hasil amplifikasi fragmen DNA mitokondria dari sel folikel akar rambut menggunakan primer M1 dan M2, fragmen yang didapatkan berukuran 0,4-0,5 kb. Dengan demikian, fragmen DNA mitokondria dapat diamplifikasi menggunakan dua primer balik M2 dan HV2R yang dirancang pada ujung daerah D-LOOP mitokondria.

Kata Kunci: mtDNA, PCR, epitel, folikel, fragmen, primer.

PENDAHULUAN

DNA mitokondria (mtDNA) manusia memiliki sejumlah sifat genetik khas yang membedakannya dari genom inti. Pada mamalia, DNA mitokondria hanya diturunkan melalui jalur ibu tanpa rekombinasi. mtDNA pada sel anak seluruhnya disumbangkan oleh ibu dan sperma sama sekali tidak berkontribusi.^[1] Keunikan sistem penurunan yang menarik ini telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang yaitu penurunan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan migrasi global manusia modern, bidang forensik dan identifikasi penyakit genetik.^[2]

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.^[2] 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, 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 ketika jumlah DNA dalam sampel sangat terbatas, seperti sampel-sampel yang diambil dari kasus kriminal yaitu rambut, tulang, gigi, cairan tubuh (air liur, air mani, darah).^[3]

Metode *Polymerase chain reaction* (PCR) digunakan untuk membuat jutaan kopi DNA dari sampel biologis. Amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR hanya membutuhkan sedikit sampel dan dapat diperoleh dari sampel yang halus seperti rambut. Kemampuan PCR untuk mengamplifikasi sejumlah kecil DNA memungkinkan untuk menganalisis sampel yang sudah terdegradasi sekalipun. Namun, tetap saja harus dicegah kontaminasi dengan materi biologis yang lain selama melakukan identifikasi, dan menyiapkan sampelnya.^[4] Tes DNA dilakukan dengan cara mengambil DNA dari kromosom sel tubuh (autosom) yang mengandung area STR (*short tandem repeats*), suatu area ini tidak memberi kode untuk melakukan sesuatu. STR inilah yang bersifat unik karena berbeda pada setiap orang. Perbedaannya terletak pada urutan pasang basa yang dihasilkan dan urutan pengulangan STR. Pola STR ini diwariskan dari orang tua.

Metode elektroforesis gel didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyanggah matriks stabil dibawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan adalah gel agarosa atau poliakrilamid. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal, sedangkan elektroforesis akrilamid dapat memisahkan 1 bp dan dijalankan secara vertikal. Manfaat elektroforesis gel yaitu untuk mengetahui ukuran fragmen DNA dari produk PCR.

Penelitian ini merupakan bagian dari upaya mendapatkan ukuran fragmen mtDNA manusia pada satu garis keturunan ibu menggunakan 2 jenis primer, dimana sampel sel epitel rongga mulut menggunakan primer M1 dan HV2R dan sampel sel folikel akar rambut menggunakan primer M1 dan M2. Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk melakukan amplifikasi ukuran fragmen 0,4 kb (443pb) pada sampel akar rambut pada satu garis keturunan ibu dan amplifikasi ukuran fragmen 1 kb (1000pb) pada sampel sel epitel rongga mulut pada satu garis keturunan ibu.

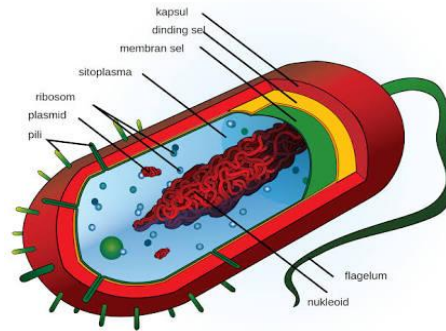
Tubuh manusia tersusun atas sel yang membentuk jaringan, organ, hingga sistem organ. Sel mengandung materi genetik yang terdiri dari DNA dan RNA. Molekul DNA merupakan rantai polinukleotida berbentuk heliks ganda yang mempunyai beberapa jenis basa purin dan pirimidin.^[6]

Sel

Sel merupakan unit struktural dan fungsional organisme hidup. Organisme terkecil terdiri dari sel tunggal, sebaliknya tubuh manusia mengandung sedikit 10^{14} sel. Terdapat berbagai jenis sel, yang amat bervariasi dalam ukuran, bentuk dan fungsi khususnya. Tiap sel dikelilingi oleh membran tipis yang membuatnya terpisah dan mencukupi diri sendiri. Membran sel disebut juga membran plasma atau membran sitoplasma yang bersifat permeable. Didalam tiap sel terdapat sitoplasma, tempat berlangsungnya hampir semua reaksi enzimatik dari metabolisme sel. Dalam sitoplasma, energi kimia digunakan oleh sel untuk membangun dan mempertahankan strukturnya. Didalam sitoplasma sel juga terdapat ribosom, suatu granula kecil yang berdiameter 18 sampai 22 nm, yang berfungsi mensintesis protein. Dan semua sel hidup dilengkapi dengan inti

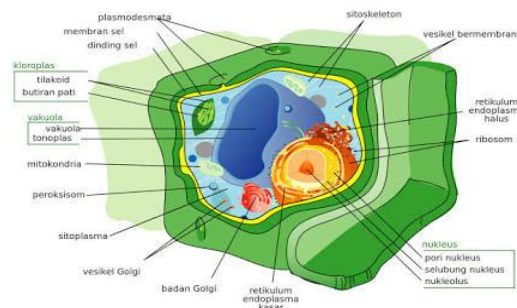
sel dimana tempat terjadinya replikasi senyawa genetik dan penyimpanan dalam bentuk asam deoksiribonukleat (DNA).^[7]

Organisme yang hidup saat ini dibagi dalam dua kelompok besar, yaitu *prokariot* dan *eukariot*. Sel *prokariot* merupakan sel terkecil yang paling sederhana. Berikut gambar sel *prokariot* dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Sel *prokariot*.^[8]

Sel *prokariot* kira-kira terdiri dari 3000 spesies bakteri, termasuk organisme yang disebut ganggang hijau-biru. Sel *prokariot* memiliki struktur yang sederhana, pertumbuhan sel nya sangat cepat, mekanisme sederhana dan transmisi informasi genetik. Sedangkan sel *eukariot* berukuran lebih besar dibandingkan dengan sel *prokariot*. Sel *eukariot* dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Sel *eukariot*.^[9]

Sel *eukariot* dapat membelah diri secara asexual, proses pembelahan dirinya secara mitosis. Sel benih organisme *eukariot* dapat juga melangsungkan konjugasi seksual yang kompleks. Berikut perbandingan antara sel *prokariot* dan *eukariot* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

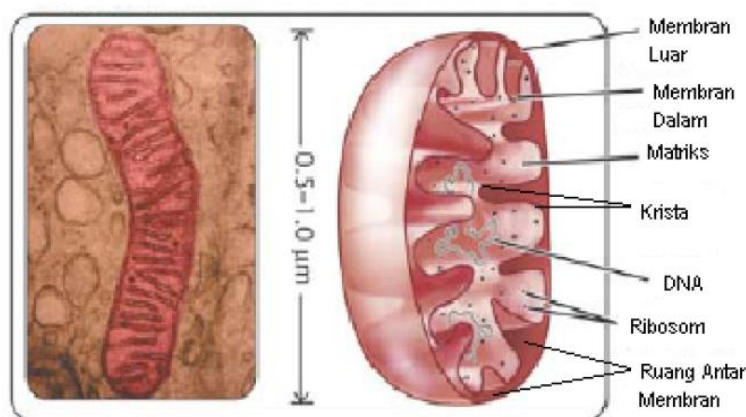
Tabel 1. perbedaan antara sel *prokariot* dan *eukariot*

Karakteristik	Sel <i>prokariot</i>	Sel <i>eukariot</i>
Bentuk organisasi	Bersel satu	Bersel satu atau banyak
Organel, sitoskelet, alat pembelahan sel	Ada	Ada namun rumit
DNA	Mudah, didalam sitoplasma	Rumit, dalam inti sel
Protein, sintesis dan pematangan	Sederhana, terangkai dengan sintesis RNA	Rumit, dalam sitoplasma dan retikulum endoplasma berbintil
Metabolisme	Anaerobik atau aerobik, sangat mampu menyesuaikan diri	Kebanyakan aerobik

Endositosis dan eksositosis	Tidak	Ya
-----------------------------	-------	----

Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang diselubungi oleh membran dan ditemukan dalam semua sel eukariot. Berdasarkan hipotesis, endosimbiosis mitokondria berasal dari sel eukariot yang bersimbiosis dengan prokariot (bakteri) sehingga membentuk organel sel.^[10] Adanya DNA pada mitokondria menunjukkan bahwa dahulu mitokondria merupakan entitas yang terpisah dari sel inangnya dan hipotesis ini ditunjang oleh beberapa kemiripan mitokondria dengan bakteri. Mitokondria ini menyerupai bakteri mulai dari bereproduksi dengan cara membelah diri menjadi dua; memiliki sistem genetik sendiri; dan memiliki ribosom. Ribosom mitokondria lebih mirip dengan bakteri dibandingkan dengan ribosom yang dikode oleh inti sel eukariot.^[11] Struktur mitokondria ditunjukkan pada **Gambar 3**.



Gambar 3 struktur mitokondria^[12]

Gambar 3 adalah struktur mitokondria yang merupakan organel sel penting dalam sel eukariot, berbentuk elips, dan memiliki empat bagian penting yaitu: (1) membran luar, (2) ruang antar-membran, (3) membran dalam, dan (4) matriks. Membran luar bersifat permeable; ruang antar membran tempat dihasilkannya nukleotida kinase; membran dalam yang berlekuk-lekuk. Mitokondria pada eukariot berjumlah sangat banyak dan esensial karena tanpa mitokondria maka sel-sel akan mengandalkan proses anaerob untuk menghasilkan ATP.

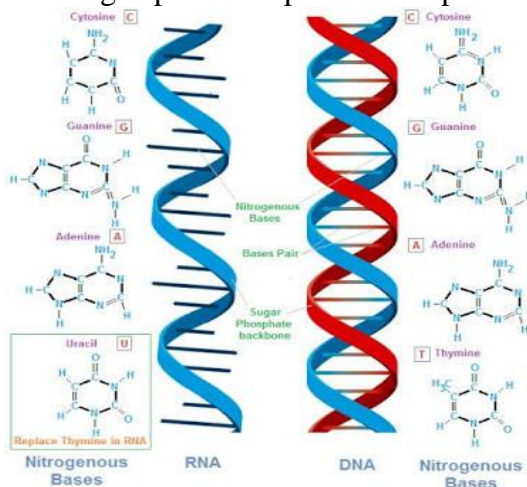
Mitokondria memiliki berbagai sifat yang unik dibandingkan dengan organel sel lainnya, salah satunya adalah jumlahnya yang berbeda-beda disetiap jaringan.^[13] Semakin tinggi kebutuhan jaringan akan energi, maka jumlah mitokondria yang dapat ditemukan juga semakin tinggi. Selain itu, mitokondria juga ditemukan dalam jumlah banyak pada bagian ekor sperma, sel otot jantung, dan sel-sel yang aktif membelah seperti sel epitel, sel folikel akar rambut dan sel epidermis. Hal ini erat kaitannya dengan proses oksidasi zat-zat makanan yang menghasilkan energi dalam bentuk adenosin triposfat (ATP) yang merupakan sumber energi kimia sel.^[6]

DNA

Struktur dan Sifat Kimia DNA

DNA dan RNA merupakan polimer linear (polinukleotida) yang tersusun dari subunit dan monomer nukleotida. Komponen penyusun nukleotida terdiri dari tiga jenis molekul, yaitu gula

pentosa (deoksiribosa pada DNA atau ribosa pada RNA), basa nitrogen, dan gugus fosfat. Basa nitrogen yang terdapat pada nukleotida adalah basa purin (adenin=A, guanin=G) dan basa pirimidin (sitosin=C, timin=T, urasil=U). Timin terutama terdapat pada DNA sedangkan urasil hanya terdapat pada RNA. Monomer nukleotida mempunyai gugus hidroksil pada posisi karbon 3', gugus fosfat pada posisi karbon 5' dan basa pada posisi karbon 1' molekul gula. Nukleotida satu dengan yang lainnya berikatan melalui ikatan fosfodiester antara gugus 5' fosfat dengan 3' hidroksil.^[14] Berikut struktur basa nitrogen purin dan pirimidin dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Struktur DNA, basa nitrogen purin dan pirimidin.^[15]

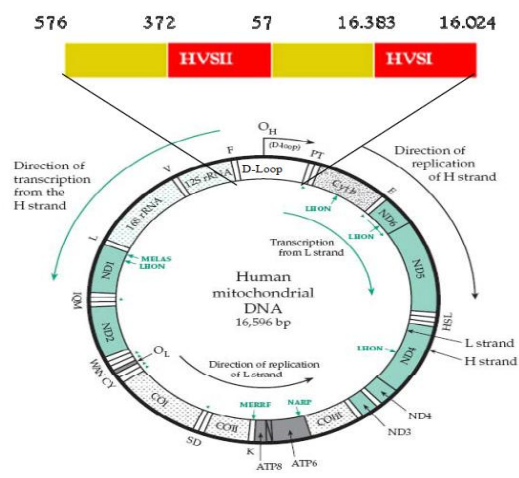
Fungsi DNA

DNA adalah dasar kimiawi hereditas dan penyusun gen yang menjadi unit fundamental informasi genetik. Informasi genetik yang disimpan dalam nukleotida berfungsi untuk memenuhi dua tujuan, yaitu sumber informasi bagi sintesis semua molekul protein pada sel serta organisme dan memberikan informasi yang diwariskan kepada anak atau generasi berikutnya.^[18]

DNA Mitokondria

DNA mitokondria (mtDNA) manusia terletak di dalam matriks mitokondria. mtDNA manusia berupa untai ganda berbentuk sirkuler yang memiliki urutan lengkap nukleotida sepanjang 16.569 pasang basa (pb). Molekul mtDNA terdiri dari untai *heavy* (H) dan untai *light* (L).^[4] Untai H ini memiliki basa G lebih banyak dan untai L yang memiliki basa C lebih banyak.^[2] DNA mitokondria manusia (**Gambar5**) tidak memiliki intron dan semua gen pengode terletak berdampingan.^[4] Urutan lengkapnya pertama kali ditentukan pada tahun 1981 oleh Aderson *et al.* dan dikenal dengan sebutan *Cambriage Reference Sequence* (CRS).

DNA mitokondria pada CRS mengandung 16.569 pasang basa dengan 37 gen pengode (*coding redion*) yaitu 13 protein, 22 tRNA, 2rRNA dan daerah yang tidak mengode (*non coding region*) atau daerah pengontrol yang mengandung D-loop. D-loop ini terdiri atas dua daerah dengan variasi tinggi, yaitu *hypervariable segment I* (HVSI) dan *hypervariable segment II* (HVSII).^[4] Gambar struktur DNA mitokondria dapat dilihat pada **Gambar5**.



Gambar 5. Struktur DNA mitokondria^[21]

Secara umum, mtDNA terdiri atas daerah pengode dan daerah non-pengode. Daerah non-pengode memiliki ukuran sepanjang 1122 pb. Daerah non-pengode ini mengandung bagian yang memiliki variasi tinggi pada tiap individu yang disebut dengan *displacement loop* (D-loop) sehingga seringkali digunakan untuk keperluan filogenetik. D-loop merupakan daerah beruntai tiga (*triple stranded*), dan untai ketiga ini lebih dikenal dengan nama 7S DNA. Terlihat pada **Gambar 5** bahwa D-loop ini memiliki dua daerah yaitu HVSI pada posisi 16024-16265 dan HVSII pada posisi 57-732. Selain D-loop juga terdapat daerah pengontrol *non-coding region* yang mengandung *origin of replication* (ORI) untuk untai (O_H) dan promotor untuk untai H dan L (P_L dan P_H). Selain mengandung daerah dengan variasi tinggi, daerah *non coding* juga memiliki tiga daerah yang lestari, yang disebut dengan *Conserved Sequence Block* (CSB) I, II, III. Daerah yang lestari ini diduga memegang peranan penting dalam replikasi DNA. Berbeda halnya dengan DNA inti, DNA mitokondria diwariskan melalui garis keturunan ibu.^[22] Hal ini terjadi karena hampir tidak adanya rekombinasi DNA mitokondria dari ayah dan DNA mitokondria dari ibu saat pembuahan sel telur oleh sperma. Saat terjadi pembuahan, bagian ekor sperma dilepaskan sehingga hampir tidak ada DNA mitokondria dari ayah yang masuk ke dalam sel telur. Selain itu, jumlah kopi mtDNA sel sperma sangat rendah (100-500) sedangkan sel telur memiliki jumlah kopi mtDNA yang tinggi (≥ 100000).^[23] Oleh karena itu, mtDNA bersifat haploid yaitu karena diturunkan dari ibu ke seluruh keturunannya.

2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR merupakan teknik *in vitro* untuk DNA yang dibatasi oleh sepasang primer (oligonukleotida pendek) menggunakan enzim DNA polimerase dan dNTP sebagai monomernya.^[25] Pada umumnya proses PCR berlangsung dalam tiga tahap yaitu: (1). Denaturasi, yaitu pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal karena terjadi pemutusan ikatan hidrogen basa-basanya pada suhu tinggi (94-96 °C). (2). *Annealing*, yaitu tahap penempelan primer pada template DNA. Suhu annealing dapat dihitung berdasarkan nilai *melting temperature* TM dari primer-primer yang digunakan. (3). *Extension*, yaitu tahap reaksipolimerisasi oleh enzim DNA polimerase menggunakan dNTP sebagai monomernya dan dimulai dari ujung 3' primer sepanjang DNA tampletnya hingga berbentuk untai DNA baru. Tahap ini berlangsung pada temperatur saat DNA polimerase bekerja optimal. Waktu yang dibutuhkan pada tahap ekstensi tergantung pada

panjang fragmen yang diamplifikasi dan kecepatan reaksi (*processity*) dari enzim DNA polimerase yang digunakan. Ketiga tahap tersebut merupakan siklus yang berlangsung secara terus menerus. Untuk menghasilkan produk yang banyak dibutuhkan sekitar 25-30 siklus. Secara teori jumlah fragmen DNA yang dihasilkan selama n siklus PCR dirumuskan dengan $(2^n - 2n)x$, dimana n = jumlah siklus, dan x = jumlah templat DNA.^[24] Bahan-bahan yang dibutuhkan agar reaksi amplifikasi dapat berjalan adalah: DNA templat, diperoleh dari sampel yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan untuk diperbanyak atau diamplifikasi, Taq buffer (buffer PCR), sebagai penyedia dan penjaga suasana kimia dalam larutan agar enzim polimerase dapat berfungsi dengan baik, Primer, yang digunakan terdiri dari primer *forward* (maju) dan *reverse* (balik) yang urutannya merupakan komplemen dari masing-masing untai DNA, dan dNTP, sebagai sumber nukleotida untuk memperpanjang rantai DNA primer yang menjadi daerah awal berjalannya proses perbanyakan.

Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis adalah teknik pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik bergantung pada muatan, bentuk dan ukuran molekul. Elektroforesis gel biasanya digunakan untuk tujuan analisis, namun dapat pula digunakan untuk separasi makromolekul dan juga sebagai teknik preparatif untuk memurnikan molekul sebelum digunakan dalam metode lain seperti sekuensing, posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, ataupun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer.^[27]

METODE PENELITIAN

Metode yang akan dilakukan dalam penelitian ini terdiri dari pengumpulan sampel; lisis dari sampel mtDNA yang diperoleh; amplifikasi daerah D-loop mtDNA sampel dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*); pendeteksian hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa; sekuensing hasil PCR dengan metode dideoksi sanger; serta analisis urutan nukleotida menggunakan program *SeqManTM* versi 4.00 *DNASTAR*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik sampel epitel rongga mulut

Tahapan awal dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel dari satu garis keturunan ibu di daerah Sukabumi. Karakteristik dari masing-masing sampel secara rinci ditunjukkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Data Sampel mtDNA Manusia

Kode Sampel	Jenis Kelamin
K	Perempuan
KK	Perempuan

Sampel yang diperoleh dengan cara berkumur merupakan campuran yang sangat kompleks, karena selain sel epitel dan senyawa-senyawa yang telah disebutkan di atas, di dalamnya terdapat pula *debris* sel. Karena ukurannya yang relatif jauh lebih besar dari sel, *debris*

dengan mudah dapat dipisahkan dari campuran. Sementara zat-zat organik, anorganik, dan makromolekul terlarut hasil sekresi kelenjar saliva tidak dapat dipisahkan dari campuran. Keberadaan zat-zat tersebut dalam sampel tidak mengganggu reaksi PCR, terbukti dengan berhasilnya amplifikasi yang dilakukan pada penelitian ini.

Banyaknya sel epitel yang dapat terambil dengan cara berkumur tergantung pada jumlah air kumur dan waktu kumur. Makin lama waktu kumur akan makin banyak sel yang terambil. Waktu kumur 1 menit merupakan waktu yang ideal untuk berkumur menggunakan 15 μL aquades steril. Makin banyak jumlah air yang digunakan untuk berkumur akan makin encer suspensi yang dihasilkan.^[30]

Karakteristik sampel folikel akar rambut

Sampel yang diambil dari satu garis keturunan ibu ini juga diambil dari akar rambut. Hal ini dikarenakan akar rambut dikelilingi folikel. Folikel merupakan pusat tumbuh rambut yang mengandung keratin yang berasal dari invaginasi epitel epidermis, sehingga terdapat lebih banyak mtDNA dibandingkan dengan bagian pangkalnya.^[31] Beberapa alasan yang menyebabkan rambut digunakan sebagai sumber mtDNA pada penelitian ini adalah: rambut mengalami pertumbuhan yang relatif cepat, proses pengambilan sampel rambut lebih mudah dibandingkan sel-sel sumber mtDNA lainnya seperti darah, dan penyimpanannya lebih mudah.

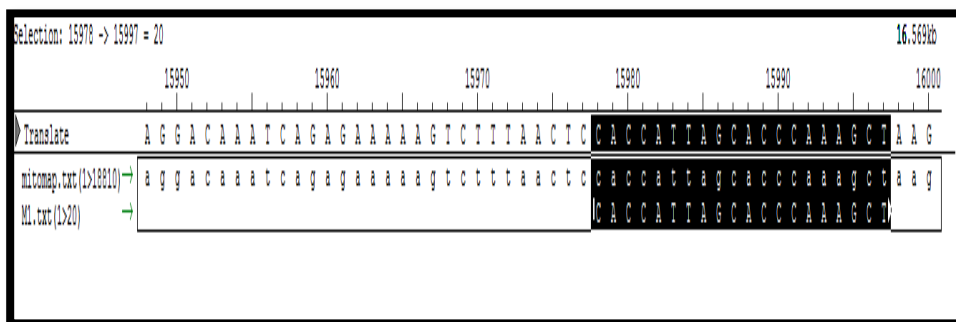
Hasil Lisis Sampel

Pada proses lisis sampel diperoleh fragmen mtDNA yang digunakan sebagai template. Prinsip metode lisis adalah perusakan membran sel tanpa harus merusak DNA yang diinginkan.^[32] Templat ini merupakan hasil lisis dari sel epitel rongga mulut dan hasil lisis dari akar rambut yang ditambahkan buffer lisis, proteinase K dan ddH₂O. Buffer lisis yang digunakan merupakan campuran dari Tris-HCl 500 μL pH 8; EDTA 20 μL pH 8; dan Tween-20 5%. Tris-HCl berfungsi untuk menjaga pH optimum pada aktivasi enzim proteinase K. Pada buffer lisis, larutan EDTA (*Ethylendiamine tetraacetic acid*) berfungsi sebagai pembentuk kompleks kelat dengan ion logam, seperti Mg²⁺ yang merupakan kofaktor DNA polimerase III. Pembentuk kompleks ini menyebabkan DNA polimerase III menjadi tidak aktif sehingga DNA polimerase III tidak memecah molekul DNA.^[31] Tween-20 berperan sebagai detergen atau pengemulsi. Proteinase-K yang ditambahkan dalam larutan lisis berfungsi untuk menghancurkan atau mendegradasi protein penyusun komponen sel.

Dalam tahap lisis dilakukan inkubasi pada suhu 50 °C selama 60 menit. Inkubasi ini berperan untuk mengoptimalkan kerja enzim proteinase-K dalam mendegradasi protein serta mengoptimalkan reaksi lisis membran sel oleh Tris-HCl, EDTA, dan Twen 20. Proteinase K dalam mtDNA dideaktifasi dengan pemanasan pada suhu 95 °C agar tidak merusak molekul-molekul proteinnya. Dengan demikian diperoleh templat mtDNA hasil lisis yang terlarut pada supernatannya dan sudah terpisah dari debrisnya. Templat mtDNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20 °C untuk menjaga kondisi fisiologis mtDNA.

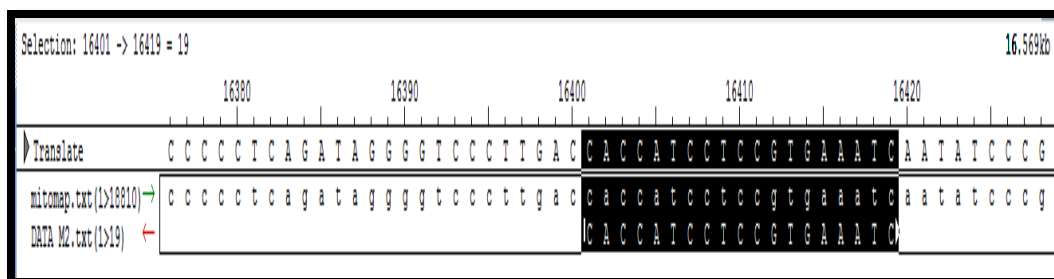
Primer-primer dirancang menggunakan program *seqman* DNA star. Rancangan primer dibuat dengan memasukan urutan D-loop mtDNA yang diperoleh dari NCBI. *Database* yang diperoleh dari NCBI dimasukkan kedalam program *seqman* DNA star kemudian primer yang digunakan dimasukkan kedalam program *seqman* DNA star. Perancang primer yang baik harus mempertimbangkan beberapa peraturan, yakni memeperlihatkan besarnya ampikon, panjang

primer, titik leleh, dan tidak membentuk struktur sekunder. Berikut **Gambar 6** rancangan primer majuM1 menggunakan program *seqman* DNA star.^[29]



Gambar 6 Primer majuM1 menggunakan program *seqman* DNA star

Primer yang didapatkan dengan menggunakan program *seqman* DNA star merupakan primer universal untuk mengidentifikasi daerah D-loop mtDNA. Primer maju dimulai dari 15.978-15997 pb. Panjang primer maju20pb hal ini sesuai dengan persyaratan panjang primer yang baik adalah 18-22pb. Suhu *annealing* untuk primer ini adalah 50°C hal ini sesuai dengan persyaratan primer yang baik yaitu sekitar 50-58°C. Berikut **Gambar 7** rancangan primer balikM2 menggunakan program *seqman* DNA star.^[29]



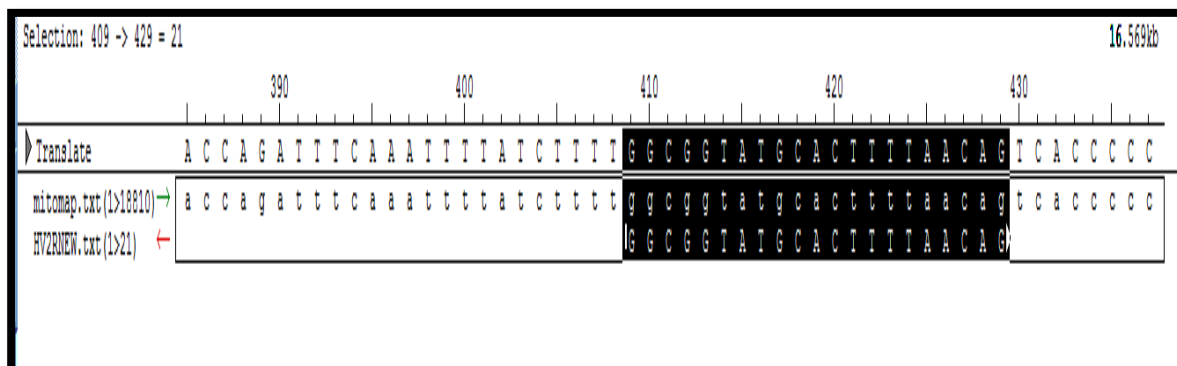
Gambar 7 PrimerbalikM2 menggunakan program *seqman* DNA star.

Primerbalik dimulai pada panjang basa 16.401-16.419pb. panjang primer balik 19pb, hal ini sesuai dengan persyaratan panjang primer yang baik yaitu 18-22pb. Suhu *annealing* untuk primer ini adalah 50°C hal ini sesuai dengan persyaratan primer yang baik 50-58°C. Berikut **Gambar 8** rancangan primer balikHV2R menggunakan program *seqman* DNA star.^[29] Primerbalik dimulai pada panjang basa 409-429pb. panjang primer balik 21pb, hal ini sesuai dengan persyaratan panjang primer yang baik yaitu 18-22pb. Suhu *annealing* untuk primer ini adalah 50°C hal ini sesuai dengan persyaratan primer yang baik 50-58°C.^[22]

Analisis Hasil PCR

Hasil PCR kemudian dianalisis menggunakan metode elektroforesis gel agarosa dan visualisasi dapat dilihat di bawah sinar UV. Metode ini mampu memperlihatkan ukuran fragmen hasil PCR yang diperoleh dalam penelitian. Untuk menentukan ukuran hasil PCR digunakan penanda (*marker*) DNA ladder KAPA Universal, dan 1 kb ladder (fermentas) dengan ukuran

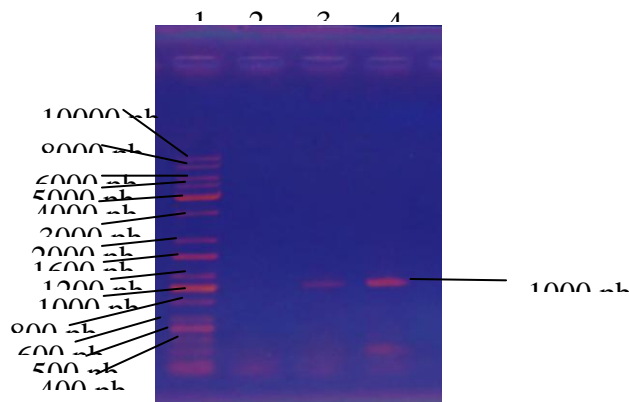
pasang basa tertentu. Keberhasilan amplifikasi diidentifikasi dengan cara membandingkan posisi fragmen sampel dengan *marker* DNA yang sudah diketahui ukurannya dan meyakinkan bahwa mtDNA yang diamplifikasi merupakan mtDNA target bukan asing.



Gambar 8.Primer balikHV2R menggunakan program *seqman* DNA star

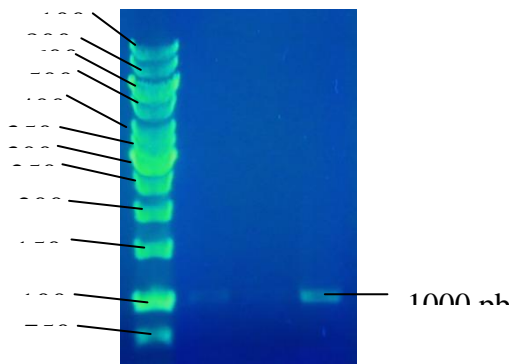
Pada proses elektroforesis gel agarosa digunakan DNA ladder KAPA Universal dan 1 kb ladder fermentas sebagai *marker*. DNA ladder KAPA Universal menghasilkan delapan belas fragmen dan 1 kb ladder fermentas menghasilkan empat belas fragmen. Hasil deteksi produk PCR dengan teknik elektroforesis gel agarosa 1% pada sampel sel epitel rongga mulut menggunakan primer M1 dan HV2R dapat dilihat pada **Gambar 9**, **Gambar 10**, dan pada sampel sel folikel akar rambut menggunakan primer M1 dan M2 dapat dilihat pada **Gambar 12**.

Hasil produk PCR sampel sel epitel rongga mulut pada **Gambar 9** menunjukkan adanya pita fragmen yang sejajar dengan sampel positif K terletak pada ukuran 1000 pb, primer yang digunakan adalah primer M1 dan HV2R. Hasil PCR tersebut merupakan fragmen D-loop mtDNA manusia yang dimulai dari nukleotida 15.978 hingga nukleotida 16.420.^[11] dan pita marker yang dihasilkan cukup sempurna karena pada saat penyimpanan *marker* suhu ruang cukup lama sekitar 3-4 jam.



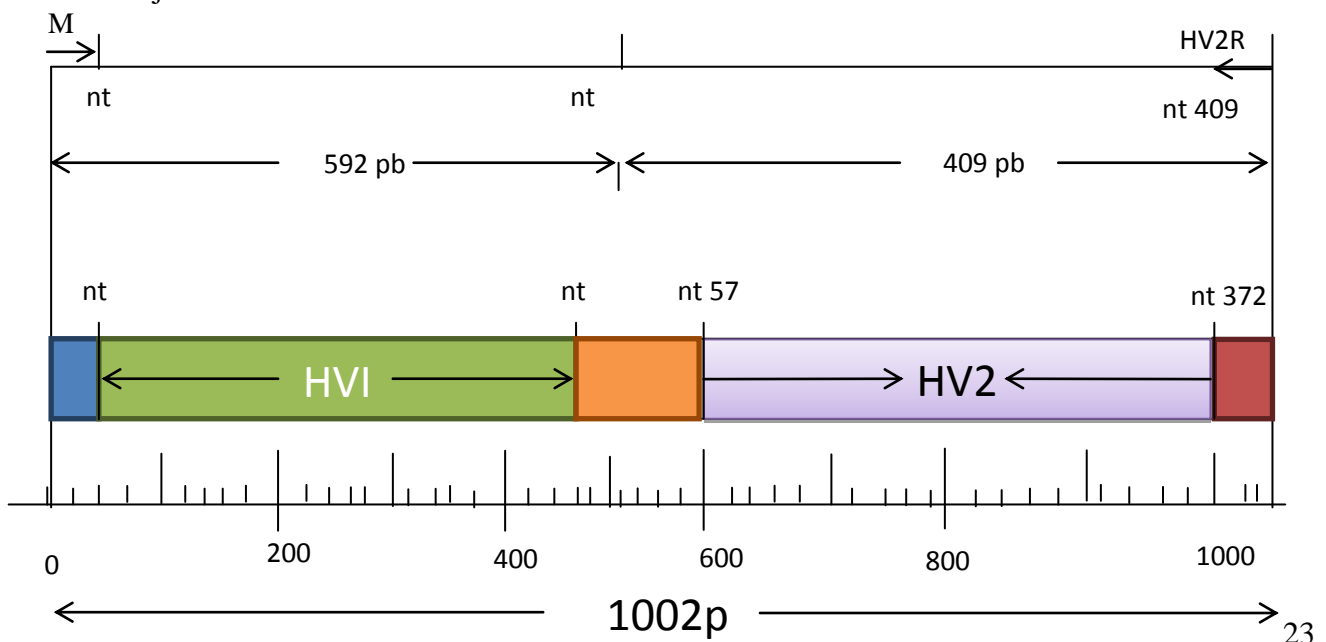
Gambar 9.Hasil deteksi produk PCR sampel sel epitel rongga mulut dengan elektroforesis gel agarosa. Lajur 1 menunjukkan marker DNA ladder KAPA Universal; lajur 2 menunjukkan kontrol negatif ; lajur 3 sampel positif K dan 4 sampel KK

Amplifikasi PCR berhasil diamati dengan bantuan gel agarosa sebagai pita tunggal DNA yang diperkirakan berukuran 1000 pb (**Gambar 10**). proses PCR dikontrol oleh kontrol positif yang mengandung templat DNA yang telah pernah berhasil diamplifikasi. Seperti terlihat pada lajur 2, kontrol positif menghasilkan satu pita fragmen berukuran 1000 pb. Hasil ini menunjukkan bahwa proses PCR yang dilakukan berhasil.



Gambar10. lajur 1 menunjukkan marker 1 kb ladder fermentas; lajur 2 menunjukkan kontrol positif ; lajur 3 sampel positif K dan 4 sampel KK.

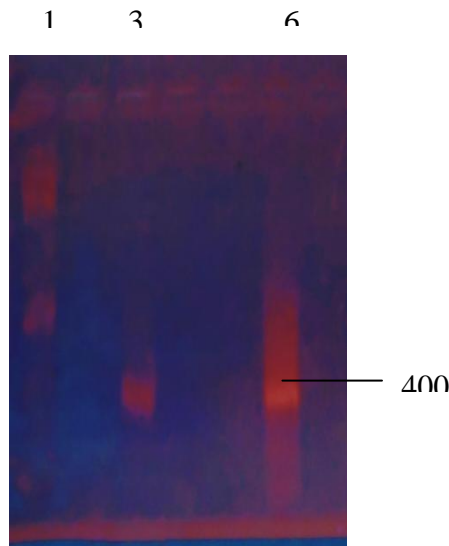
Ukuran fragmen PCR dapat dihitung berdasarkan selisih total pasang basa dalam mtDNA (16569) dengan posisi awal primer M1 (L15978) dan posisi akhir HV2R (H409) + 1. Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh ukuran fragmen hasil PCR adalah 1002 pasang basa. Posisi ukuran fragmen tersebut berada di daerah D-Loop yang digambarkan dalam bentuk diagram dapat dilihat pada **Gambar 11**. Gambar tersebut menunjukkan pada posisi ukuran fragmen hasil PCR pada daerah D-loop, fragmen 592 menunjukkan selisih total pasangan basa dalam mtDNA (16569pb) dengan posisi awal primer M1 (L15978), fragmen 409 pb merupakan posisi akhir HV2R (H409). Fragmen 1002 pb menunjukkan ukuran fragmen hasil PCR. Primer M1 ditunjukkan dengan warna biru, primer HV2R ditunjukkan dengan warna merah. Daerah HV1 ditunjukkan dengan warna hijau, daerah HV2 ditunjukkan dengan warna ungu. Warna orange menunjukkan daerah antara HV1 dan HV2.



Gambar 11. posisi ukuran fragmen hasil PCR pada daerah D-Loop

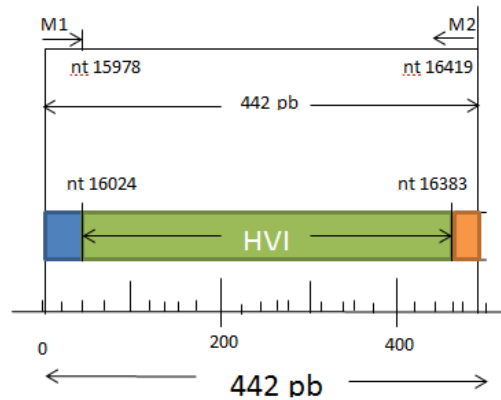
Hasil PCR dari dua sampel (k, kk) dipeoleh fragmen mtDNA berukuran sekitar 400 pb (0,4 kb), ditunjukkan oleh pita yang berada pada laju 3 dan 6 pada marker DNA ladder KAPA universal, seperti terlihat pada **Gambar 12**. Hasil ini sesuai prediksi, yaitu fragmen 442 pb daerah D-loop mtDNA pada posisi 15.978-16419.^[11]

Ukuran fragmen PCR dapat dihitung berdasarkan selisih total pasang basa dalam mtDNA (16569) dengan posisi awal primer M1 (L15978) dan posisi akhir M2 (H16419). Berdasarkan perhitungan tersebut diperoleh ukuran fragmen hasil PCR adalah 442 pasang basa. Posisi ukuran fragmen tersebut berada di daerah D-Loop yang digambarkan dalam bentuk diagram dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 12. Hasil deteksi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa sampel produk PCR folikel akar rambut dengan primer M1 M2. Lajur 1 menunjukkan marker DNA ladder KAPA Universal; lajur 2 menunjukkan kontrol negatif; lajur 3 menunjukkan sampel positif K; lajur 6 menunjukkan sampel KK.

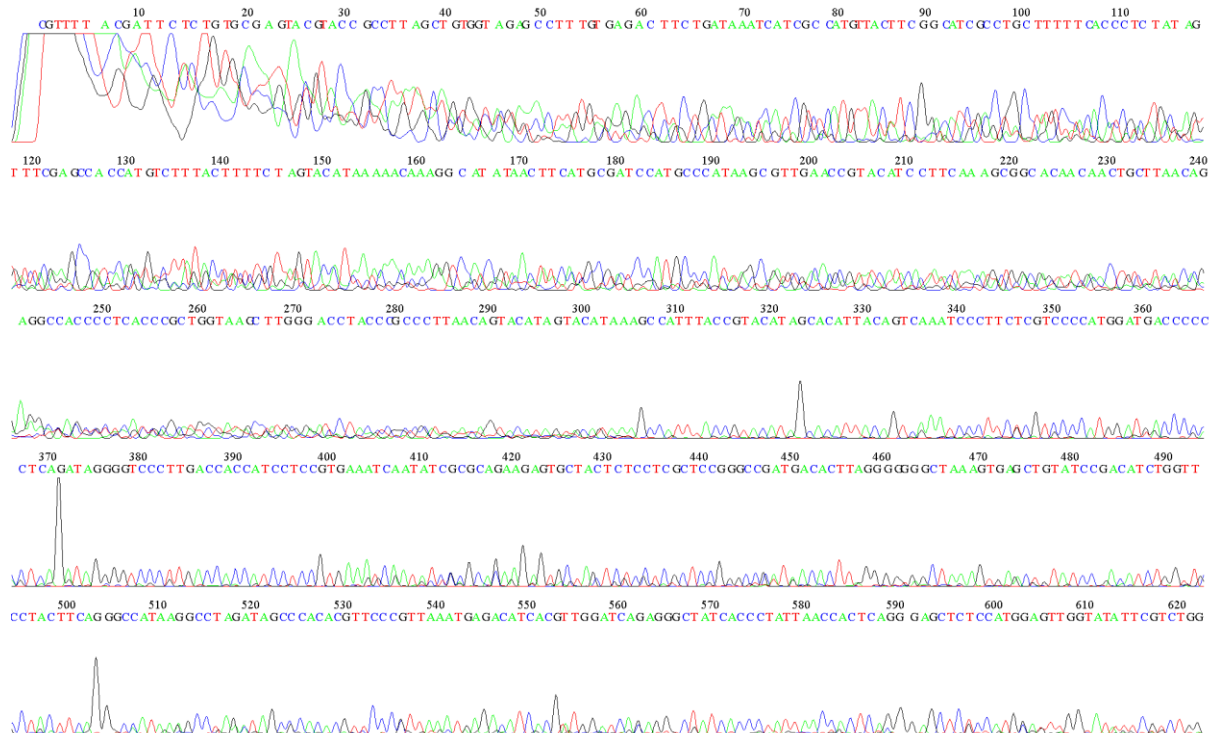
Pada **Gambar 12** posisi ukuran fragmen hasil PCR pada daerah D-loop, fragmen 442 menunjukkan selisih total pasangan basa dalam mtDNA (16569pb) dengan posisi awal primer M1 (L15978), fragmen 16219 pb merupakan posisi akhir M2 (H16419). Fragmen 442 pb menunjukkan ukuran fragmen hasil PCR. Primer M1 ditunjukkan dengan warna biru, primer M2 ditunjukkan dengan warna oranye.



Gambar 13. posisi ukuran fragmen hasil PCR pada daerah D-Loop

Hasil Sekuensing

Setelah berhasil dilakukan amplifikasi atau perbanyakkan sampel satu garis keturunan ibu dan divisualisasika melalui elektroforesis gel agarosa yang mengindikasi bahwa sampel hasil PCR berhasil mengamplifikasi fragmen DNA pada sel epitel rongga mulut berukuran 1 kb dan pada sel folikel akar rambut berukuran 0,4kb, maka hasil sampel PCR tersebut kemudian diproses dengan sekuensing. Proses sekuensing ini bertujuan untuk menganalisis urutan nukleotida sampel satu garis keturunan ibu. Berikut gambar hasilsekuensingsampel satu garis keturunan ibu dapat dilihat pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Tampilan sekuensing sampel satu garis keturunan ibu

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa amplifikasi fragmen DNA mitokondria menggunakan primer M1 dan HV2R dari sel epitel rongga mulut menghasilkan fragmen berukuran 1 kb. Pada hasil amplifikasi fragmen DNA mitokondria dari sel folikel akar rambut menggunakan primer M1 dan M2, fragmen yang didapatkan berukuran 0,4-0,5 kb. Dengan demikian, fragmen DNA mitokondria dapat diamplifikasi menggunakan dua primer balik M2 dan HV2R yang dirancang pada ujung daerah D-LOOP mitokondria.

Akan tetapi hasil sekuensing yang dilakukan tidak dianalisis urutan nukleotidanya karena hasil sekuensing yang didapat tidak sempurna sehingga tidak bisa menentukan terjadi mutasi atau tidak terjadinya mutasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Cambell, dkk., 2002. *Biologi (Edisi Kelima)*. Jakarta: Erlangga.
- Wallace, D.C., 1997: *Mitochondrial DNA in Aging Disease*. Scientific American. 22-29
- Moore, J.M., Insenberg, A.R., 1999, *Mitochondrial DNA Analysis at the FBI Laboratory*, Forensic Science Communicatioj, vol. I, Number 2.
- Marks, D.B., Marks, A.D, Smith,C.M. 1996. *Basic Medical Biochemistry*. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Poedjiadi, Anna dan Supriyanti F.M.T. 2006. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Universitas Indonesia Press).
- Marguillis, L., 1981. *Symbiosis In Cell Evolution*. New York: W.H. Freeman .
- Lehninger, Albert L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Andrey.2004.*Biopsikologi*. [Online]. Tersedia: <https://Andreyagheanayaa.blogspot.co.id/2004/10/biopsikologi.html>. [05 Maret 2016]
- Perpustakaan.2012.*StrukturSelEukariot*. [Online] Tersedia: <https://Perpustakaanacyber.blogspot.co.id/2012/11/struktur-sel-eukariot-fungsi.html>. [05 Maret 2016]
- Lynn, Stephen, et al. 2002. Defining the Importance of mitochondrial Gene Defects in Maternally Inherited diabetes by sequencing the Entire Mitochondrial Genome. *Diabetes* 5, 2317-2320.
- Anderson, S., et al, 1981, *Sequence and Organization of the human mitochondrial genome*, *Nature*, 290,457-465.
- Fabio,fuady.2008.[Online]*GenomMitokondria*. Tersedia: <https://fuadyfabiousode.wordpress.com/2008/09/genom-mitokondria-manusia.html>. [22 Desember 2015]
- 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. Vol* (18:225-239).
- Gaffar, Shabrani, M.Si. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung: FMIPA Universitas Padjajaran.
- Biotechimylife.2011.[Online] Tersedia: <https://biotechismylife.blogspot.co.id/2011/09/struktur.DNA.html>. [05 Maret 2016].
- Muladno, 2010. *Teknologi Rekayasa Genetik Edisi Keda*. Bogor : IPB Press.
- Watson, James D., John tooze, & David T. Kurtz, 1988. *DNA Rekombinan*, alih bahasa: Wisnu Gunarno. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Granner, D.K. *Biokimia Harper edisi ke-24* :alih bahasa, Andry Hartono; editor. Alexander H. Santoso. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.

- Saiyed. Z.M., C.N. Ramchand. 2007 *Extrction of Genomic DNA Using Magnetic Nanoparticle (Fe_3O_4) as Solid-Phase Support*. American Journal of Infectious Disease 3 (4): 225-229, 2007.
- Promega. 2007. *Technical Manual Maxwell 16 DNA Purification Kits*. Tersedia: <http://www.roche-applied-science.com>.
- Chen *et al*, 2004. *Maternally Inherited Diabetes and Deafness (MIDD) Syndrome:a Clinical and Molecular Genetikc Study of a Taiwanse Family*. Chang Gung Med Journal 27,(1), 66-72.
- Wallace, D.C., 1992: *Diseases of the mitochondrial DNA*, *Annu Rev Biochem*, 61, 1175-1212.
- Faatih, M. 2009: Isolasi dan Digesti DNA Kromosomal. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 10(1): 61-67.
- Sundaland.2012.[Online].Tersedia:<https://Sundaland.gunungtoba.blogspot.co.id/2015/05/mengupas-pewarisan-tes-DNA.html>. [22 Desember 2015].
- Sutikno. 2009. *Elektroforesis*.<http://sutikno.blog.uns.ac.id/2009/06/19/elektroforesis/>. [13 Januari 2014].
- Gumilar, G., Supriyanti, F. M. T., Siti, H. H. 2008. *Bioteknologi*. Bandung: Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI.
- A. Saifuddin Noer dan Marisa Gustiananda., 1997. *PCR Tanpa Isolasi DNA dari Sel Epitel Rongga Mulut*. Bandung: Jurusan Kimia FMIPA ITB. Vol 2 No. 1, hal, 35-48.
- Purnomo, Sudjiono, T. Joko, dan S. Hadisusanto. 2009. *Biologi Kelas XI untuk SMA dan MA*. Jakarta : Pusat Perbukuan, Departemen Pendidikan Nasional.
- Purnamasari, Yunita., 2013. *Varian Genetika Daerah Hipervariabel I (HVI) DNA Mitokondria pada 4 Generasi DEngan Riwayat Diabetes Melitus Tipe 2*. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Qiagen. 2006. *Genomic DNA Purification*. [Online]. Tersedia. <http://www.qiagen.com/literature/brochurs/index>. [24 September 2015].
- Aris. T. W.,. 2000. *Inverse Polumerase Chain Reaction*. *Jurnal Hayati*. Vol 7 (4): 121-123.
- Innis. M.A., Gelfand D H, Srinsky. J.J, White. T. J. 1990. *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc.
- Madej, R. 1991. *Polymerase Chain Reaction :Application to The Clinical Laboratory. Laboratory Roche Diagnostic Research*, p. 23-32, 45-49.
- Sambrook, J. Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratoty Manual* 3rd edition. New York (USA): Cold Spring Harbor.