

ENDOGAMY MARRIAGE MITOCHONDRIAL DNA VARIATION OF NORTH CIGINTUNG GARUT ISOLATES

¹Rina Budi Satiyarti, Rindu Anggita²

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

² Universitas Jenderal Achmad Yani Cimahi, Jalan Terusan Jenderal Sudirman Cimahi
email: rinabudi07@gmail.com

Diterima : 07 Maret 2018. Disetujui: 15 Mei 2018. Dipublikasikan: 29 Juni 2018

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) has an unique genetic sequences which made its different from nuclear DNA. MtDNA is maternally inherited without recombination, and it has higher mutation rate rather than nuclear DNA. D-loop is an noncoding area in mtDNA which has highest polymorphism among mtDNA. The objective of this research is to study about nucleotide variation in D-Loop area from people who has endogamy marriage. The subject is four generation of maternally inherited. The research steps are sample collection, DNA template preparation, mtDNA amplification, agarose gel electrophoresis, sequencing analysis and homology analysis. The amplification of D-Loop fragment has 0,9 kb in size. Homology analysis showed fifty varians nucleotides.

Key words : Mitochondrial DNA (mtDNA), D-loop, nucleotides variation.

PENDAHULUAN

Genom mitokondria terdiri dari dua daerah yaitu daerah yang mengkode gen yang terdiri atas gen penyandi rRNA yaitu 12S dan 16S, 22 gen penyandi tRNA, dan 13 protein sub unit kompleks enzim rantai respirasi, dan daerah yang tidak mengkode gen yang disebut dengan daerah D-Loop. D-loop memiliki tiga daerah hipervariabel (HV), yaitu HV1 pada urutan 16024-16383, HVII pada urutan 57-732, dan HVIII pada urutan 438-594 (Anderson, *et.al.*, 1981; Hiroaki, *et.al.*, 2006). Keunikan dari daerah D-Loop adalah memiliki tingkat polimorfisme yang tertinggi dalam mtDNA (Ratnayani, dkk., 2007). Tingkat polimorfisme yang tinggi tersebut ditandai dengan laju mutasi yang tinggi, yaitu sekitar 10-17 kali DNA inti (Wallace, *et al.*, 1997). Tingginya laju mutasi dapat mengakibatkan adanya heteroplasmis. Heteroplasmis terdeteksi dalam bentuk perbedaan urutan mtDNA, baik berupa substitusi basa pada

satu titik atau delesi dan insersi yang akan menyebabkan variasi panjang mtDNA. Pola panjang heteroplasmi mirip untuk individu-individu segaris keturunan ibu tetapi bervariasi untuk individu yang tidak segaris keturunan ibu (Malik,dkk., 2002).

Beberapa penelitian yang dilakukan di daerah D-loop pada individu segaris ibu sudah pernah dilakukan para peneliti. Lim,*et al.* (2010) menemukan pewarisan maternal pada daerah Hipervariabel I (HVI) terhadap suku asli di Malaysia yaitu adanya delesi 9 pasang basa (pb). Hal ini dapat dipengaruhi oleh faktor geografi (Lim, *et al.*, 2010). Penelitian lainnya oleh Maksum pada tahun 2003 yang menemukan urutan nukleotida 387 pb daerah D-loop pada tujuh generasi segaris keturunan ibu. Analisis homologi menunjukkan enam mutasi substitusi terhadap urutan Cambridge, tiga merupakan mutasi spesifik untuk keluarga yang diteliti. D-loop signifikan untuk menentukan identitas seseorang sampai tujuh generasi atas dasar hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa urutan nukleotida D-loop tujuh generasi masih lestari (Maksum, 2003). Kemudian pada tahun 2012 oleh Yudianto dan Indah telah diteliti variasi nukleotida lokus 126 pb daerah D-loop mtDNA pada individu segaris ibu di pulau Madura. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya 10 varian nukleotida yang ditemukan pada 3 keluarga segaris ibu suku madura (Yudianto dan Indah, 2012).

Indonesia merupakan negara yang sebagian daerahnya masih menganut pola perkawinan endogami. Perkawinan endogami adalah suatu perkawinan antara etnis, klan, suku, atau kekerabatan dalam lingkungan yang sama. Dalam sistem endogami, seseorang diharuskan untuk mencari jodoh di lingkungan sosialnya sendiri, misal di lingkungan kekerabatan, klan, lingkungan kelas sosial, atau lingkungan tempat tinggal (Sunarto, 2004).Kampung Cigintung Kaler merupakan salah satu daerah pelosok di Garut yang sebagian masyarakatnya masih menganut pola perkawinan endogami. Perkawinan endogami dilihat dari sudut pandang genetik akan meningkatkan frekuensigenotip homosigot. Homosigot terdiri dari dua jenis yaitu, homosigot dominan jika alelnya bersifat dominan, dan homosigot resesif jika alelnya bersifat resesif. Peningkatan homogenitas genetik ini akan muncul jika perkawinan endogami terjadi terus menerus antar generasi hingga sampai pada satu titik dimana terjadi semua alel homosigot dalam satu lokus atau bahkan pada semua lokus (Syukriani, 2012).

METODE PENELITIAN

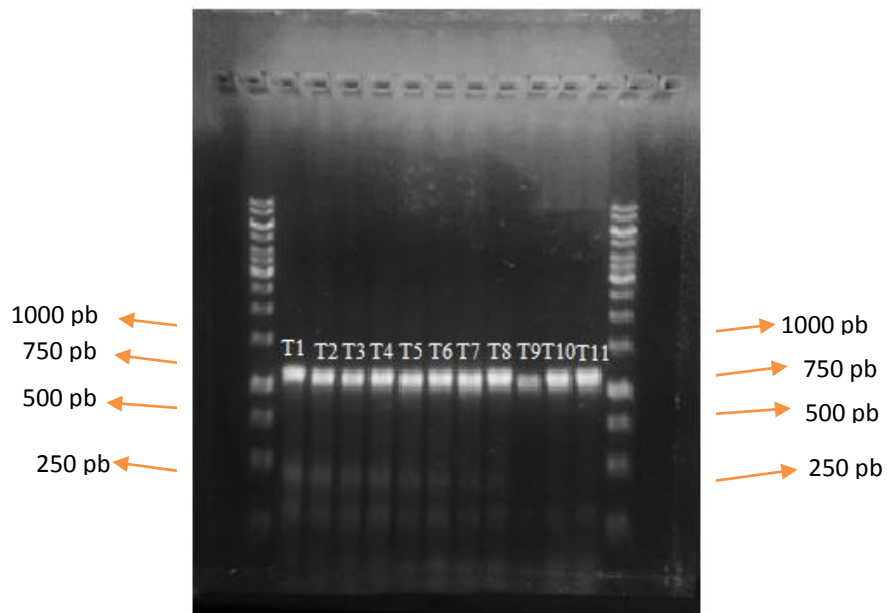
Pengambilan sampel dari empat individu dengan cara melakukan pembicaraan selama 20 menit, selanjutnya subjek diminta untuk berkumur menggunakan 30 mL aquades steril selama 1 menit, dan meludahkannya ke dalam *container steril*. *Container steril* yang berisi sampel dimasukkan ke dalam *cooler box*.

Lisis sel epitel untuk memperoleh DNA mitokondria dengan cara sampel diinkubasi dalam 200 μ L campuran reaksi yang terdiri dari 20 μ L bufer lisis, 10 μ L proteinase-K (200 μ g/mL) dan 170 μ L ddH₂O steril. Sampel diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 95°C selama 5 menit. Kemudian hasil lisis disentrifuga dengan kecepatan 12.000 rpm menggunakan sentrifuga mikro selama 3 menit. Supernatan yang diperoleh telah siap sebagai templat dan dapat langsung diamplifikasi. Penyimpanan sampel epitel yang telah dilisis disimpan dalam tabung mikro pada suhu -20°C.

Proses perbanyakan (amplifikasi) dilakukan secara *in vitro* dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan adalah primer maju M1 5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3', dan primer balik HV2R 5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCC-3'. Pada penelitian ini penentuan urutan nukleotida dilakukan menggunakan metoda dideoksi sanger. Analisis homologi dilakukan menggunakan program DNA STAR.

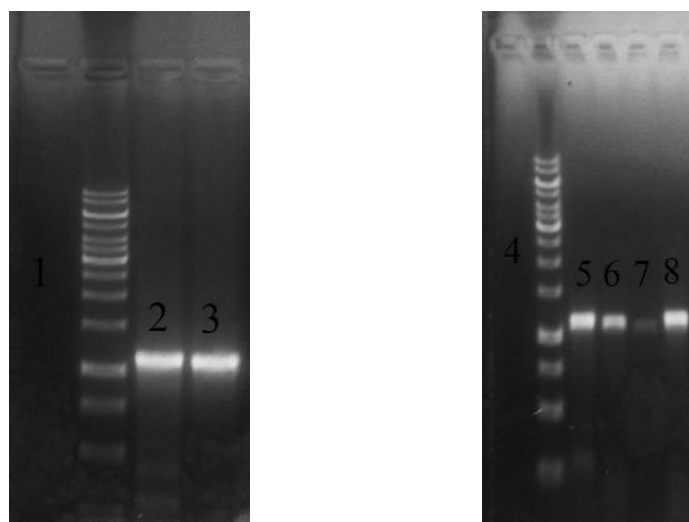
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, daerah mtDNA yang dijadikan fokus penelitian adalah daerah hipervariabel 1 (HV1) dan hipervariabel II (HVII) yang terdapat di daerah D-loop, karena daerah ini memiliki laju mutasi yang tinggi. Proses perbanyakan DNA atau amplifikasi secara *in vitro* dalam penelitian ini dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Suhu optimum *annealing* pada penelitian ini adalah 49,7°C (Gambar 1).



Gambar 1. Optimasi suhu penempelan template (*annealing*)

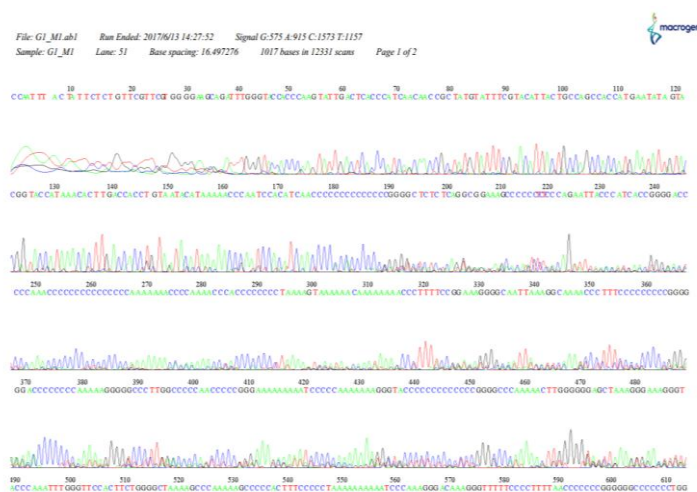
Proses amplifikasi melalui proses PCR berhasil dengan munculnya satu pita pada daerah 0,9 kb (Gambar 2).



Gambar 2 Elektroforesis amplifikasi fragmen 0,9 kb

Keterangan : 1 & 4 = kontrol (-) 6 = generasi 3
2 = generasi 1 7 = generasi 4
3 = generasi 2 8 = kontrol
5 = kontrol (+)

Sekuensing ini dilakukan oleh *Macrogen Inc.* Dan hasil yang diperoleh berupa elektroforegram. Dapat dilihat bahwa terdapat puncak-puncak dengan warna yang berbeda. Warna- warna tersebut tergantung jenis basanya. Puncak berwarna merah menunjukkan basa timin (T), puncak berwarna hijau menunjukkan basa adenin (A), puncak berwarna hitam menunjukkan basa guanin (G), dan puncak berwarna biru menunjukkan basa sitosin (C). Selain itu, dapat dilihat bahwa puncak untuk setiap nukleotida tingginya berbeda-beda karena jumlah DNA mitokondria yang sangat banyak dalam satu sel. Puncak yang rendah menunjukkan nukleotida dengan jumlah yang sedikit atau minoritas, sedangkan puncak yang tinggi menunjukkan nukleotida dengan jumlah yang banyak atau mayoritas (Gambar 3).



Gambar 3. Elektroforegram hasil penentuan urutan nukleotida

Pada penelitian ini akan dilihat apakah terdapat variasi urutan nukleotida pada sampel. Untuk mengetahui adanya variasi urutan nukleotida pada sampel dilakukan perbandingan dengan urutan nukleotida dan elektroforegram sampel terhadap kontrol yaitu penduduk Kp. Cigintung Kaler yang tidak menganut perkawinan endogami menggunakan program komputer Seqman (DNASTAR). Hasil pensejajaran urutan

nukleotida dari generasi ketiga dan generasi keempat dengan individu yang tidak melakukan endogami menunjukkan adanya 50 varian nukleotida (Tabel 1).

| No | Variasi Nukleotida |
|----|--------------------|
| 1 | A16194C |
| 2 | G16208T |
| 3 | T16217C |
| 4 | T16224C |
| 5 | T16226C |
| 6 | C16241A |
| 7 | A16243C |
| 8 | C16244T |
| 9 | G16277A |
| 10 | G16258C |
| 11 | A16261C |
| 12 | T16266C |
| 13 | A16268C |
| 14 | T16275A |
| 15 | T16280A |
| 16 | A16281C |
| 17 | C16286A |
| 18 | A16289C |
| 19 | A16293C |
| 20 | C16300T |
| 21 | C16305A |
| 22 | A16317C |
| 23 | C16318A |
| 24 | A16326C |
| 25 | G16333C |

| No | Variasi |
|----|---------|
| 26 | A16340G |
| 27 | C16341G |
| 28 | T16356A |
| 29 | C16365T |
| 30 | A97T |
| 31 | A106T |
| 32 | A108T |
| 33 | C109T |
| 34 | C110T |
| 35 | G112T |
| 36 | G125C |
| 37 | A129C |
| 38 | C156T |
| 39 | A167G |
| 40 | A168G |
| 41 | T176A |
| 42 | T178C |
| 43 | C182A |
| 44 | G211A |
| 45 | C215A |
| 46 | T216A |
| 47 | A254C |
| 48 | A258G |
| 49 | C283A |
| 50 | G336T |

Dalam penelitian ini sampel/sukarelawan yakni mereka yang asli kelahiran Kp.Cigintung Kaler, Garut serta pola perkawinannya endogami. Dari hasil analisis sekuensing dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan urutan nukleotida yang cukup

banyak antara sampel dengan kontrol. Hal ini disebabkan karena daerah D-loop mempunyai tingkat polimorfisme yang paling tinggi di dalam rantai mtDNA, dimana derajat keragaman daerah tersebut di antara individu-individu yang tidak mempunyai hubungan kekerabatan secara maternal cukup tinggi.

Perbedaan urutan basa yang ditemukan pada sekelompok individu dalam suatu spesies disebut dengan '*genetic marker*' (penanda gen). Dua individu yang memiliki *genetic marker* pada posisi yang sama mengindikasikan hubungan kekerabatan. Dari sinilah kita bisa menelusuri leluhur kita sesungguhnya dan darimana mereka berasal. Semakin banyak *genetic marker* khas yang terdapat dalam suatu ras atau spesies, makin beragam karakteristik individu penyusunnya (Yudianto dan Indah, 2012).



Gambar 4. Tampilan program Seqman untuk analisis sampel generasi ketiga dan generasi keempat

Hasil analisis pada sampel menunjukkan bahwa adanya variasi nukleotida pada C16241A, A16243C, C16244T, G16258C, A16261C, T16266C, dan A16268C. Terdapat empat mekanisme utama yang dapat merubah frekuensi gen dan genotip dalam populasi yaitu mutasi, seleksi, *gene flow* dan *genetic drift*. Mutasi dan *gene flow* akan menaikkan variasi dalam populasi. *Gene flow* adalah pertukaran material

genetik antar populasi yang disebabkan oleh proses migrasi dan perkawinan (Stinson S., *et.al*, 2000). *Genetic drift* terjadi pada populasi di daerah yang tertutup atau terisolasi atau sedikit menerima *migrant* dari daerah lain. Terdapat dua keadaan yang dapat memicu *genetic drift*, yakni *bottleneck* dimana ukuran populasi berkurang pada suatu saat tertentudan *founder effect* dimana semua individu dalam suatu populasi setelah ditelusuri ternyata kembali ke sejumlah kecil individu asalnya (Bodmer WF. and Cavalli-Sforza LL, 1976).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa hasil analisis homologi urutan nukleotida pada daerah HVI dan HVII generasi ketiga dan generasi keempat dengan kontrol didapatkan 50 jenis varian nukleotida.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrel, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., and Young, I.G. 1981. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature*. 290, 457-465.
- Andrews, R.M., Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers R.N., Turnbull D.M., and Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 23: 147.
- Barnes, M.W. 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates, *proc. Natl. Acad.Sci.USA*, 91, 2216-2220
- Bodmer, WF., Cavalli-Sforza LL, 1976. *Genetics, Evolution and Man*. San Francisco; WH Freeman and Company
- Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., Schon, E.A. 1995. Rearranged Mitochondrial Genomes are Present in Human Oocytes. *Am. J. Hum. Genet*. 57, 239-247.

- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, M.W., and Higuchi, R. 1994. Effective amplification of long target from cloned inserts and human genomic DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5695-5699
- Cheng, S., Kolmodulin, L.A. 1997. XL PCR amplification of long targets from genomic DNA, *Methods in Molecular Biology : PCR Cloning Protocols*, edited by Bruce A. White, 67, Humana Press, Totowa, New Jersey, 17-29
- Clayton, D.A. 1991. Nuclear godgets in Mitochondrial DNA Replication and Transcription. *Foends. Biol. Sci.* 16: 107-111
- Cole, A.S., Eastol, J.E. 1978. *Biochemistry and oral biology*. Toppan Co. Ltd.. Singapore.
- Czarnecka, A.M., Golik, P., and Bartnik, E. 2006. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet.* 47, (1), 67-78.
- Grzybowski, T. 2000. Extremely High Levels of Human Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Single Hair Roots. *Electrophoresis*. 2f, 548-553
- Gumilar, G., Ridha, I.L., dan Heli, S.M. 2013. Profil Genetik Daerah Hipervariabel I (HVI) DNA Mitokondria pada Populasi Dataran Tinggi. *Jurnal Sains dan Teknologi Kimia*. Vol. 4 No. 2. Hal. 184-191. ISSN 2087-7412.
- Handt, O., S. Meyer, A. Von H. 1998. Compilation of Human mtDNA Control Region Sequences. *Nucleic Acids Research*. 26, (1), 126-129.
- Hiroaki, N., et. al. 2006. Hypervariable region structure and polymorphism of mtDNA. *Journal of Oral Science*. 48 . (3) , 145-152
- Klug, W. S., Cummings, M. R. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood cliffs.
- Koolman, J., Klaus-Heinrich, R. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. Edisi Kelima. Germany: Georg Thieme Verlag.
- Lim, S.L., Mah, M., Khai, A., Badrul, and M. Md. Z. 2010. Mitochondrial DNA Polymorphism and Phylogenetic Relationships of Proto Malays in Peninsular Malaysia. *Journal of Biological Sciences*. 10(2), 71-83.
- Maksum, I. P. 2003. *Tiga Mutasi Substitusi Spesifik Daerah D-loop DNA Mitokondria yang Lestari Pada Tujuh Generasi Segaris Keturunan Ibu Manusia Indonesia*. Perpustakaan digital ITB (online). <http://digilib.itb.ac.id/> diakses tanggal 20 Oktober 2016.
- Malik, S., Sudoyo H, Pramoongjago P, Sukarna T, Darwis D, dan Marzuki S. 2002. Evidence For The De Novo Regeneration of The Pattern of The Length Heteroplasmy Associated With The T16189C Variant In The Control (D-Loop) Region Of Mitochondrial DNA. *J Hum Genet* 47: 122-130.
- Newton, C.R. and Graham, A. 1997. *PCR*. 2nd edition. BIOS Scientific Publishers Limited. England.

- Ngili, Y. 2003. *Mengenal DNA Mitokondria dan Aplikasinya*. Kompas. 4 November 2003.
- Noer, A.S., Martasih, F., Mulyani, S., Muktiningsih, Wirahadikusumah. 1994. *Analisis Variasi Urutan Nukleotida D-loop MtDNA Manusia dari Beberapa Daerah di Indonesia*. Prosiding Seminar Bersama Universitas Kebangsaan Malaysia-ITB Pertama. Bandung. 201-214.
- Noer, A.S. dan Gustiananda, M. 1997. *PCR Tanpa Isolasi DNA dari Sel Epitel Rongga Mulut*. JMS Vol. 2 No. 1, hal. 35 – 45.
- Palit, E. I. Y., dan Yohanis N. 2016. *Kuantifikasi dan Filogenetika Mutasi DNA*. Innosain. Yogyakarta.
- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, F. M. T. 2005. *Dasar-Dasar Biokimia (edisi revisi)*. Jakarta: UI Press
- Puspitawati Ria. 2003. Struktur Makroskopik dan Mikroskopik Jaringan Lunak Mulut. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia;10 (Edisi Khusus) : 462-467*.
- Ratnayani, K., I Nengah Wirajana, dan A.A.I.A.M Laksmiwati. 2007. Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-loop DNA Mitokondria Pada Satu Individu Suku Bali Normal. *Jurnal Kimia 1 (1)*. Hal. 7-14. ISSN 1907-9850.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467.
- Shadel, G.S. and D.A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrata. *Annual Review of Biochemistry* 66: 409-435.
- Siti, H. H., Gun, G.G., Dessy, N., dan Achmad, S.N. 2007. *Variasi Urutan Nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara*. Makalah pada Seminar Nasional Kimia Universitas Negeri Surabaya. Surabaya.
- Stanfield, W. D., Jaime S. C., Raul J. C. 1996. *Molecular and Cell Biology*. McGraw-Hill, New York
- Stinson S, Bogin B, Hush-Ashmore R, O'Rourke D, 2000. *Human Biology, An Evolutionary and Biocultural Perspective*. New York : Willey-Liss, pp. 4-7
- Sunarto, K. 2004. *Pengantar Sosiologi*. Jakarta: Penerbit Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia.
- Suryadi, H., Malik, S. G., Gustiananda, M., Sudoyo, H., 2003. *Polimorfisme DNA Mitokondria dan Kedokteran Forensik, dalam Mithochondrial Medicine. Lembaga Biologi molekuler Eijkman*. Jakarta. p. 53-56.
- Syukriani, Y. 2012. *DNA Forensik*. PT Sagung Jakarta.
- Thompson, R. & B. Fritchman. *Illustrated guide to home biology experiments: All lab, no lecture*. California, O'Reilly Media Inc. : xv + 358 hlm

- Tully, L. A., Steighner, R. J., Parsons, T. J., Holland, M. M., Prenger, V. L., Marino, M. A. 1999. A High Incidence of Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Hypervariable I in Normal Human Tissues: Implications for Forensic Casework. **16**, 561-565
- Wallace DC, Stugard C, Murdock D, Schurr T, and Brown MD. 1997. Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(26):14900–14905.
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., and Weiner, A. M. 1987. *Molecular Biology of the Gene. fourth edition. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, California.*
- Wilson, B., Teslow, J., and Osman-Jourchoux, R. 1995. *The impact of constructivism (and postmodernism) on instructional design fundamentals*. In Seels, B. B. (Ed.), *Instructional Design Fundamentals – A review and reconsideration*, New Jersey: Educational Technology Publications, 137-157.
- Yudianto, A., dan Indah N. M. 2012. Variasi Nukleotida Lokus 126 pb Daerah D-loop DNA Mitokondria (mtDNA) pada Individu Segaris Keturunan Ibu. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Science* 2012; 2 (3): 61-65.
- Yuwono, T., 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. p. 1-3; 18-21
- Zyskind, J. W. and S. I. Bernstain. 1992. *Recombinant DNA Manual. Academic Press, Inc. California*