

**AMPLIFIKASI FRAGMENT 0,4 KB DAERAH D-LOOP DNA MITOKONDRIA
LIMA INDIVIDU SUKU BALI TANPA HUBUNGAN KEKERABATAN
DENGAN METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

K. Ratnayani, Sagung Chandra Yowani, dan Liangky Syane S.

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

DNA mitokondria (mtDNA) manusia mempunyai tingkat polimorfisme yang lebih tinggi dibandingkan DNA inti. DNA mitokondria diturunkan secara maternal. D-Loop merupakan daerah non penyandi pada mtDNA manusia yang mempunyai polimorfisme tertinggi. Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar variasi nukleotida mtDNA daerah D-Loop sesama individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan. Untuk tujuan tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menentukan urutan nukleotida daerah D-Loop mtDNA pada lima individu suku Bali normal dari lima keluarga berbeda, yang tidak saling memiliki hubungan kekerabatan. Sementara tujuan khusus penelitian ini adalah melakukan amplifikasi fragmen 0,4 kb dari daerah D-Loop mtDNA pada lima individu suku Bali tersebut dengan metode PCR. Dalam proses PCR dilakukan optimasi terhadap suhu penempelan primer dan berat mtDNA cetakan. Serangkaian kegiatan yang dilakukan adalah: 1). Lisis sel epitel rongga mulut; 2). Kuantitasi DNA hasil lisis; 3). Reaksi PCR; 4). Deteksi hasil PCR dengan metode elektroforesis gel agarosa.

Penelitian ini telah berhasil melakukan amplifikasi terhadap fragmen berukuran 0,4 kb daerah D-Loop mtDNA dengan metode PCR. Penelitian ini juga berhasil menentukan suhu penempelan primer yang optimum yaitu 55⁰C dan berat mtDNA estakan yang optimum yaitu $\pm 0,688 \mu\text{g}$.

Kata kunci : DNA mitokondria, D-Loop, amplifikasi, kuantitasi, optimasi

ABSTRACT

The human mitochondrial DNA (mtDNA) has higher polymorphism level than nucleous genom, and it is maternally transmitted. D-Loop is a non-sense region in human mtDNA that has the highest polymorphism. Generally, the aim of this research is to find out the variation in D-Loop region of mtDNA in some Balinese without family correlation. For that reason, this research was brought out to determine the sequences of nucleotide of D-Loop region in five normal Balinese from different families without correlation. The specific aim of this research is to amplify the 0,4 kb fragment of mtDNA D-Loop region in five Balinese above, using the PCR method. In conducting the PCR, the temperature of annealing of primer and the weight of template of mtDNA were optimized. Several phases that have been conducted : 1). Lysis of the cavum oris epithelium; 2). Quantation of DNA; 3). Reaction PCR; 4). Result of PCR detection with agarosa gel electroforesis

The result of this research is the amplification of 0,4 kb fragment of D-Loop region in mtDNA by PCR. This research also found the optimum temperature annealing, which was 55⁰C, and the optimum weight of template of DNA which was $\pm 0,688 \mu\text{g}$.

Keywords: DNA mitochondrial, D-Loop, amplification, quantitation, optimization

PENDAHULUAN

DNA mitokondria (mtDNA) merupakan penanda forensik yang cukup penting. MtDNA memiliki sifat genetik khas yang membedakannya dari DNA inti. MtDNA diturunkan secara maternal tanpa rekombinasi dan laju mutasinya lebih tinggi dibandingkan DNA inti. D-Loop merupakan daerah non penyandi yang memiliki polimorfisme tertinggi dalam mtDNA. Analisis variasi urutan nukleotida daerah D-Loop dapat digunakan untuk menentukan identitas manusia serta hubungan kekerabatan antar individu secara maternal (Suryadi, *et al.*, 2003).

Berdasarkan hal tersebut, ingin diketahui seberapa besar variasi nukleotida mtDNA daerah D-Loop sesama individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan. Untuk tujuan tersebut, maka akan dilakukan penelitian untuk menentukan urutan nukleotida daerah D-Loop mtDNA pada lima individu suku Bali normal dari lima keluarga berbeda, yang masing-masing tidak memiliki hubungan kekerabatan. Dalam rangka penentuan urutan nukleotida tersebut, maka akan dilakukan serangkaian kegiatan yang diawali dengan lisis sampel sel epitel rongga mulut. Hasil lisis sel selanjutnya akan digunakan sebagai DNA cetakan dalam reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Sedangkan fragmen mtDNA hasil PCR akan digunakan dalam reaksi sekuensing untuk penentuan urutan nukleotidanya (Watson, *et al.*, 1987).

Reaksi berantai polimerase atau *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu metode enzimatik untuk mengamplifikasi secara eksponensial suatu urutan nukleotida tertentu secara *in vitro*. Proses PCR untuk mengamplifikasi DNA membutuhkan DNA cetakan yang mengandung urutan DNA target yang akan diamplifikasi, sepasang primer, enzim DNA polimerase, *buffer*, dan campuran monomer nukleosida trifosfat (dNTP). PCR melibatkan serangkaian siklus suhu yang berulang dan masing-masing siklus terdiri atas 3 tahapan : denaturasi pada suhu 94-96°C, penempelan primer pada suhu 45-60°C (*annealing*) dan perpanjangan primer pada suhu 72°C. Metode ini sekarang telah banyak diaplikasikan dalam bidang riset yang

menunjang ilmu dasar dan untuk aplikasi di bidang kriminologi, antropologi, dan kedokteran karena metode PCR sangat sensitif dan dapat mengamplifikasi segmen DNA hanya dengan menggunakan sejumlah kecil sampel biologis (Wallace, 1989).

Suhu penempelan primer merupakan peubah kunci dalam menentukan kekhasan reaksi PCR. Penggunaan suhu penempelan primer yang sesuai, memungkinkan masing-masing primer dapat menempel pada kedua ujung DNA cetakan. Suhu penempelan primer dapat dihitung berdasarkan urutan nukleotida primer yang digunakan. Umumnya suhu penempelan primer optimum berkisar $\pm 5^{\circ}\text{C}$ dari suhu perhitungan penempelan primer. Jika suhu penempelan primer terlalu tinggi dari suhu optimum, menyebabkan primer tidak menempel dengan DNA cetakan. Sedangkan, jika suhu penempelan primer terlalu rendah dari suhu penempelan primer optimum menyebabkan *mispriming*, yaitu penempelan primer pada tempat yang salah pada DNA cetakan sehingga dihasilkan produk non spesifik. Oleh karena itu dilakukan optimasi terhadap suhu penempelan primer (Yuwono, 2006; Newton, 1997).

Selain suhu penempelan primer perlu juga dilakukan optimasi terhadap berat DNA cetakan yang digunakan dalam reaksi PCR. Ketersediaan DNA cetakan yang cukup diperlukan agar dapat dilakukan visualisasi hasil PCR dengan etidium bromida (bahan yang dapat berfluoresensi dengan sinar UV) sehingga dapat diperoleh pita DNA yang jelas dalam metode elektroforesis. Adanya pita DNA yang jelas menunjukkan bahwa proses PCR telah berhasil mengamplifikasi fragmen DNA cetakan. Disamping itu, penggunaan DNA cetakan yang terlalu banyak juga dapat menurunkan efisiensi PCR, akibat dari meningkatnya kemungkinan kontaminasi dalam penyiapan DNA (Wikipedia Indonesia, 2006).

Penelitian ini secara khusus bertujuan untuk melakukan amplifikasi (pelipatgandaan) fragmen sebesar 0,4 kb (443 pb) dari daerah D-Loop mtDNA pada lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan dengan metode PCR. Fragmen 0,4 kb tersebut terletak pada daerah D-Loop mtDNA di antara urutan primer M₁ dan M₂ yang bersesuaian dengan nukleotida

16.042 sampai dengan 16.388 pada urutan Anderson.

MATERI DAN METODE

Bahan

Untuk mencapai tujuan penelitian maka digunakan sampel sel epitel rongga mulut dari lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan seperti ditampilkan dalam Tabel 1, buffer lisis kit (50 mM Tris-Cl pH 8,5 ; 1mM

EDTA pH 8,0 dan 0,5 % Tween-20); proteinase K 20 mg/mL, dan aquabides steril.

Peralatan

Alat-alat yang diperlukan adalah alat gelas, elektroforesis, dan UV transiluminator

Cara Kerja

Karakteristik Sampel

Sampel diambil sebanyak 5 (lima) individu yang bersuku Bali seperti ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data karakteristik sampel lima individu suku Bali

No	Sampel	Daerah Asal	Jenis Kelamin	Usia
1	A ₁	Buleleng, Bali	Laki-laki	44 th
2	A ₂	Mengwi, Bali	Perempuan	43 th
3	A ₃	Gianyar, Bali	Laki-laki	39 th
4	A ₄	Pererenan, Badung, Bali	Perempuan	43 th
5	A ₅	Karangasem, Bali	Laki-laki	36 th

Penyediaan sampel

Penyediaan sampel sel epitel rongga mulut dilakukan dengan cara berkumur-kumur menggunakan 15 mL aquabides steril selama 1 menit dan ditampung dalam botol steril. Air kumur kemudian diendapkan dengan cara sentrifugasi dalam tabung mikro 1,5 mL menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 3.000 rpm selama 3 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang sehingga sel epitel dalam endapan basah siap untuk dilisis. Sisa sampel yang tidak dilisis dapat disimpan pada suhu -20°C.

buffer lisis kit (50 mM *Tris-Cl* pH 8,5 ; 1mM EDTA pH 8,0 dan 0,5 % *Tween-20*); 2,00 µL proteinase K 20 mg/mL, dan aquabides steril. Inkubasi dilakukan pada suhu 50°C selama satu jam, dilanjutkan dengan suhu 95°C selama 5 menit dalam inkubator. Campuran ekstrak sel kemudian disentrifugasi menggunakan mikrosentrifuga dengan kecepatan 3.000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji kuantitas DNA untuk memastikan bahwa berat DNA sampel hasil lisis cukup memadai untuk dilakukan amplifikasi dengan metode PCR.

Penyiapan mtDNA cetakan dengan metode lisis sel

DNA cetakan disiapkan dengan menggunakan metode lisis sel. Lisis sel dilakukan dengan menginkubasi 10,00 µL sampel sel epitel (hasil kerja 3.3.1) dalam 200 µL campuran reaksi yang terdiri dari 20,00 µL

Kuantitasi DNA hasil lisis

Uji kuantitasi DNA hasil lisis dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm. Diawali dengan pengukuran tingkat kemurnian DNA dengan pengukuran rasio pembacaan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (A_{260}/A_{280}). Untuk mengurangi

hadirnya kontaminasi dalam sampel, maka sebelum dilakukan kuantitasi DNA, terlebih dahulu DNA hasil lisis dimurnikan dengan presipitasi etanol. Selanjutnya sampel DNA hasil pemurnian yang diperoleh diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm. Menurut formula yang digunakan dalam perhitungan menggunakan alat *RNA/DNA calculator* menyatakan bahwa absorbansi λ_{260} 1,0 sesuai untuk 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA murni untai ganda, maka kadar DNA sampel dapat dicari melalui perhitungan berikut :

$$X (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{\lambda_{260}} \cdot 50 \mu\text{g} / \text{mL}}{1,0}$$

Keterangan :

- X : kadar DNA yang dicari
 A_{260} : absorbansi sampel DNA pada panjang gelombang 260 nm

Pemurnian DNA hasil lisis

Fragmen DNA hasil lisis dimurnikan dengan pengendapan etanol. Larutan fragmen DNA hasil lisis sebanyak 200 μL ditambahkan dengan 2x volume etanol p.a. dan 0,1 x volume natrium asetat. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam, dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 30 menit pada 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dibuang dan pelletnya ditambah dengan 5 x volume etanol 70% dingin, lalu disentrifugasi selama 10 menit pada 4°C , 12.000 rpm. Pellet dikeringkan selama satu sampai dua menit, kemudian diresuspensikan dalam 100 μL aquabides steril.

Reaksi PCR

Setelah dilakukan uji kuantitasi DNA hasil lisis, dilanjutkan dengan reaksi PCR untuk mengamplifikasi fragmen 0,4 kb mtDNA. Fragmen 0,4 kb tersebut terletak pada D-Loop mtDNA di antara primer M_1 dan M_2 yang

bersesuaian dengan nukleotida 16.042 sampai dengan 16.388 pada urutan Anderson. Reaksi PCR dilakukan dalam tabung mikro 0,5 mL yang berisi 50,00 μL campuran reaksi yang terdiri atas 1,25 unit enzim *Taq DNA polymerase*; supernatan hasil lisis (hasil kerja 3.3.2); 20 pmol masing-masing primer M_1 dan M_2 ; 5,00 μL *buffer* PCR 10x (10mM *Tris-Cl* pH 9 ; 50mM KCl dan 1,5 mM MgCl_2); campuran dNTP 200 μM dan aquabides steril. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus, masing-masing siklus terdiri atas tahap denaturasi DNA cetakan pada suhu 95°C selama 1 menit, tahap penempelan primer (*annealing*) selama 1 menit, dan tahap perpanjangan primer (*extention*) pada suhu 72°C selama 1 menit. Dalam penelitian ini, dilakukan proses PCR dengan melakukan variasi pada suhu penempelan primer dan jumlah DNA cetakan (supernatan hasil lisis) yang digunakan. Variasi suhu penempelan primer dilakukan pada suhu 45 sampai 55°C , sedangkan variasi berat DNA cetakan dilakukan dengan menggunakan variasi terhadap volume DNA hasil lisis yang digunakan sebagai DNA cetakan yaitu sebesar 5 μL , 10 μL , dan 15 μL .

Deteksi hasil PCR dengan metode elektroforesis gel agarosa

a. Pembuatan gel agarosa

Hasil PCR dianalisis dengan cara elektroforesis pada gel agarosa 1% (b/v) yang dibuat dengan melarutkan 0,4 gram agarosa dalam 40 mL *buffer* TAE 1x. Lalu dipanaskan hingga agarosa larut sempurna, dan didinginkan hingga suhu berkisar ($50-60$) $^{\circ}\text{C}$ dan ditambahkan 2 μL larutan etidium bromida 10 $\mu\text{g/mL}$. Campuran agarosa yang telah mengandung etidium bromida dikocok sampai homogen kemudian dituang ke dalam cetakan gel yang telah dilengkapi sisir untuk mencetak sumur gel. Gel yang masih berupa cairan dibiarkan hingga membeku sempurna. Gel yang telah membeku siap digunakan untuk elektroforesis.

b. Pemisahan DNA dengan elektroforesis

Sebanyak 10,00 μL sampel hasil PCR dicampur dengan 2,00 μL *loading buffer*. Campuran dihomogenkan dan dimasukkan ke

dalam salah satu sumur gel agarosa 1% (b/v) kemudian dielektroforesis. Bersama-sama dengan sampel hasil PCR, juga dilakukan elektroforesis terhadap DNA standar pada sumur lainnya yang paralel. DNA plasmid pUC 19 yang dipotong dengan enzim restriksi *Hinf I*, dan DNA plasmid λ yang dipotong dengan enzim restriksi *Hind III* sebagai DNA standarnya. DNA standar pUC19/*Hinf I* ini mempunyai pita-pita DNA yang berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, 75 pb, dan 65 pb; sedangkan DNA standar λ mempunyai pita-pita berukuran di atas 1 kb, yaitu 2311 pb, 1887 pb, 4361 pb, dan 6557 pb. Sehingga diharapkan hasil PCR terletak di antara pita 517 pb dan pita 396 pb DNA standar pUC 19/*Hinf I* dan terletak di bawah pita 1 kb DNA standar λ /*Hind III*. Elektroforesis dilakukan menggunakan *buffer* TAE 1x sebagai media penghantar arus. Arus

dialirkan pada tegangan 80 volt selama 30 menit. Pita mtDNA yang diperoleh dilihat dengan bantuan sinar ultra violet, dan didokumentasikan dengan cara pemotretan menggunakan UV transiluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kuantitasi DNA Hasil Lisis

Penentuan berat DNA hasil lisis merupakan langkah yang diperlukan untuk mengetahui bahwa berat DNA hasil lisis cukup memadai untuk dapat diamplifikasi pada metode PCR. Pengukuran kadar DNA dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm. Dalam penelitian ini menggunakan alat *RNA/DNA calculator*.

Tabel 2. Nilai absorbansi dengan menggunakan alat *RNA/DNA calculator*

No	Sampel	Absorbansi		Rasio	% Kemurnian
		A ₂₆₀	A ₂₈₀		
1	A ₃ (tanpa pemurnian)	0,917	0,718	1,3	71
2	A ₃ (pemurnian)	0,043	0,025	1,7	80

Hasil pengukuran rasio A_{260}/A_{280} terhadap DNA hasil lisis tanpa pemurnian adalah 1,3; dengan nilai absorbansi λ_{260} 0,917 dan kadar DNA diperoleh 137,6 $\mu\text{g/mL}$. Menurut alat *RNA/DNA calculator*, menyatakan bahwa DNA murni untai ganda mempunyai nilai rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,8; sedangkan nilai rasio A_{260}/A_{280} yang diperoleh dalam penelitian ini jauh lebih rendah daripada nilai rasio 1,8; sehingga dapat disimpulkan sampel DNA hasil lisis ini belum murni; hal ini didukung dengan diperolehnya persen kemurnian sebesar 71%. Persen kemurnian ini menunjukkan perbandingan rasio A_{260}/A_{280} yang diharapkan (1,8) terhadap rasio A_{260}/A_{280} yang diperoleh dari hasil pengukuran.

Nilai absorbansi DNA yang diperoleh setelah dilakukan pemurnian terhadap sampel DNA hasil lisis sebesar 0,043; dengan rasio A_{260}/A_{280} 1,7; kadar DNA 1,1 $\mu\text{g/mL}$; dan persen kemurnian 80%. Nilai rasio sampel DNA hasil

lisis setelah pemurnian tersebut diperoleh mendekati 1,8; namun nilai absorbansi yang terukur sangat kecil dan sangat jauh di bawah nilai absorbansi yang memenuhi Hukum Lambert Beer; yaitu yang terletak pada rentang 0,2 sampai dengan 1,0. Sehingga hasil yang diperoleh dengan cara ini menjadi lebih tidak akurat. Dengan demikian, kadar DNA yang kami gunakan adalah kadar DNA yang diukur langsung dari sampel DNA hasil lisis tanpa pemurnian yaitu 137,6 $\mu\text{g/mL}$.

Penentuan Kondisi Optimum PCR (Suhu Penempelan Primer dan Berat mtDNA Cetakan)

Hasil amplifikasi PCR dengan variasi suhu penempelan primer dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan Tabel 3, dapat dilihat bahwa suhu penempelan primer yang optimum adalah pada suhu 55^oC. Hal ini berarti suhu penempelan primer yang optimum sesuai dengan

suhu penempelan primer berdasarkan perhitungan secara teoritis.

Selain suhu penempelan primer juga dilakukan optimasi terhadap berat DNA cetakan yang digunakan dalam reaksi PCR. Optimasi berat DNA cetakan dilakukan dengan menggunakan DNA hasil lisis sebagai DNA cetakan dengan volume bervariasi : 5 μ L, 10 μ L, dan 15 μ L. Hasil pengukuran kuantitasi DNA hasil lisis yaitu 137,6 μ g/mL; sehingga variasi berat DNA cetakan yang digunakan menjadi 0,688 μ g; 1,375 μ g; dan 2,064 μ g.

Hasil amplifikasi PCR dengan variasi berat DNA cetakan dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan protokol *Fermentas* yang digunakan, menyatakan bahwa berat DNA cetakan yang baik berada pada rentang 10 pg sampai dengan 1 μ g, maka pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa berat DNA cetakan yang optimum adalah \pm 0,688 μ g, sedangkan berat DNA cetakan 1,377 μ g, dan 2,064 μ g kurang efisien karena terdapat kelebihan DNA cetakan

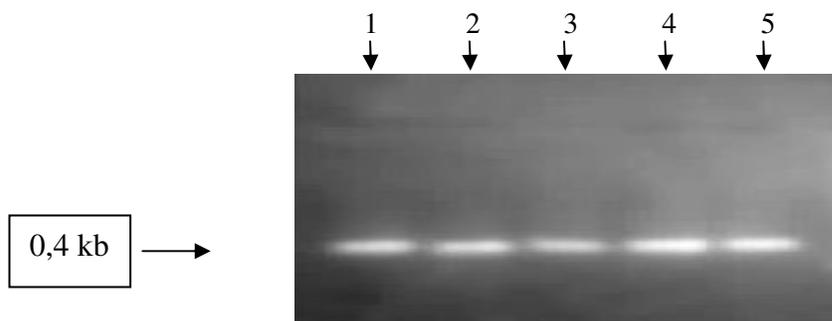
yang akan terbuang, meskipun tidak mengganggu proses amplifikasi PCR.

Tabel 3. Hasil amplifikasi PCR dengan variasi suhu penempelan primer dan berat DNA cetakan

Variasi		Suhu Penempelan Primer		
		45 ⁰ C	50 ⁰ C	55 ⁰ C
Berat DNA Cetakan	0,688 μ g	Tidak berhasil	Tidak berhasil	Berhasil
	1,377 μ g	Tidak berhasil	Tidak berhasil	Berhasil
	2,064 μ g	Tidak berhasil	Tidak berhasil	Berhasil

Deteksi Hasil PCR dengan Metode Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil PCR dianalisis dengan metode elektroforesis gel agarosa 1 % (b/v) pada tegangan 80 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis kelima sampel dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Hasil elektroforesis kelima sampel. (1) sampel A₁, (2) sampel A₂, (3) sampel A₃, (4) sampel A₄, (5) sampel A₅

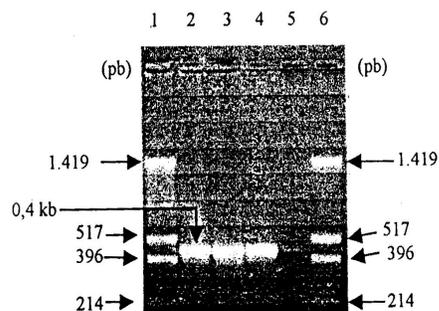
Pada hasil elektroforesis dalam Gambar 1 memperlihatkan adanya pita terang dan tebal sejajar satu sama lain. Munculnya satu pita tersebut menunjukkan bahwa pasangan primer yang digunakan bersifat spesifik hanya menempel pada posisi yang diharapkan (pada suhu penempelan primer optimum yang digunakan).

Pita tebal yang ditunjukkan dalam Gambar 1, menyatakan banyaknya jumlah DNA cetakan yang teramplifikasi. Makin tebal pita, maka jumlah DNA cetakan yang teramplifikasi makin banyak. Jadi dapat disimpulkan, dengan

diperolehnya satu pita DNA dan tebal dalam penelitian ini berarti amplifikasi yang terjadi cukup kuat.

Untuk mengetahui apakah pita DNA hasil elektroforesis sesuai dengan target penelitian yaitu 0,4 kb, maka harus dilakukan elektroforesis bersama-sama dengan DNA standar yang telah diketahui ukurannya. Sebagai standar ukuran dengan rentang tersebut, digunakan DNA plasmid pUC 19 yang dipotong dengan enzim restriksi *Hinf* I. Gambar 2 menunjukkan data elektroforesis cuplikan hasil PCR sebagian sampel, yaitu pada gel agarosa

diperoleh satu pita yang terletak diantara pita 517 pb dan pita 396 pb DNA standar pUC 19/*Hinf*I. Hal ini menunjukkan bahwa hasil PCR memang benar berukuran sekitar 0,4 kb sesuai dengan yang diharapkan.



Gambar 2. Hasil elektroforesis dengan DNA Standar pUC 19/*Hinf* I; (1) DNA standar pUC 19/*Hinf* I, (2) sampel A₂, (3) sampel A₃, (4) sampel A₄, (5) kontrol negatif, (6) DNA Standar pUC 19/*Hinf* I.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Fragmen DNA berukuran 0,4 kb daerah D-Loop mtDNA dari lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan telah berhasil diamplifikasi dengan menggunakan primer M₁ dan M₂
2. Suhu penempelan primer yang optimum dalam metode PCR agar terjadi proses amplifikasi fragmen 0,4 kb daerah D-Loop mtDNA lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan adalah 55^oC
3. Berat DNA cetakan yang optimum dalam metode PCR agar dapat terjadi proses amplifikasi fragmen 0,4 kb daerah D-Loop mtDNA lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan adalah ± 0,688 µg.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut :

1. Perlu ditentukan urutan nukleotida terhadap sampel lima individu suku Bali tanpa hubungan kekerabatan hasil PCR untuk mengetahui variasi nukleotidanya.
2. Perlu dikembangkan variasi individu suku Bali yang digunakan sebagai sampel penelitian, supaya dapat mencakup seluruh strata masyarakat Bali dan seluruh daerah Bali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak Drs. Made Arsa, Dra Ni Wayan Bogoriani, M.Si., dan Ir. Wahyu Dwijani Sulihningtyas, M.Kes. serta pihak-pihak yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Newton, C. R., and Graham, A., 1997, *PCR Introduction to Biotechnology*, 2nd ed, Bios Scientific Publisher Ltd, Oxford
- Suryadi, H., Malik, S. G., Gustiananda, M., Sudoyo, H., 2003, *Polimorfisme DNA Mitokondria dan Kedokteran Forensik*, dalam *Mitochondrial Medicine*, Lembaga Biologi molekuler Eijkman, Jakarta, p. 53-56
- Wallace, D. C., 1989, *Mitochondrial DNA Mutation and Neuromocular Disease*, Hum. Genet. Disease, p. 9-13
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steith, J. A., and Weiner, A. M., 1987, *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed, The Benjamin Cumming Publishing Company .Inc, MenloPark, California, p. 45-47
- Wikipedia Indonesia, 2006, *Keterkaitan dengan Ilmu Hayati"Skala Molekul" lainnya*, www.wikipedia.org, 4 Desember 2006, p. 1-3
- Yuwono, T., 2006, *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*, Penerbit Andi, Yogyakarta, p. 1-3; 18-21