PERBANDINGAN TAMPILAN PITA PENANDA DNA (DEOXYRIBONUCLEIC ACID) STANDAR DAN PENENTUAN PANJANG DNA KROMOSOM Y YANG DIISOLASI DARI DARAH MANUSIA PADA PEMISAHAN DENGAN MENGGUNAKAN MEDIA BERBEDA

Ni Luh Putu Manik Widiyanti [1a)], Siti Maryam [2)], I Putu Parwata [3)], Sanusi Mulyadiharja[1b)]

[1a)] Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja-Bali (manikwidiyanti@ymail.com**/manikwidiyanti@gmail.com)**
[2)] Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja-Bali (titik_maryam@yahoo.co.id**)**
[3)] Jurusan Analis Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja-Bali (iputuparwata@gmail.com**)**
[1b)] Jurusan Pendidikan Biologi , Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja-Bal (sanusimulyadiharja@yahoo.com**)**

Abstrak: Sebelum ahli biologi mengetahui struktur dari Deoxyribonucleic acid (DNA), mereka mengenal bahwa DNA diturunkan dan gen yang menentukan berasosiasi dengan kromosom. Sekarang diketahui bahwa DNA membawa informasi keturunan dari sel, dan fungsi sebagian besar komponen protein terkemas dan terkontrol sepanjang molekul DNA. Oleh karena itu, semua sel dari semua bagian tubuh akan memberikan profil DNA yang sama bila dilakukan analisis DNA untuk mengkaitkan hubungan kekerabatan seseorang dengan lainnya. Kromosom Y diturunkan dari ayah hanya ke anak laki-laki tidak ke anak perempuan, oleh karena itu pewarisan gen pada kromosom Y bersifat paternal, sedangkan DNA ekstra kromosomal yaitu DNA mitokondria diwariskan secara maternal yaitu dari ibu ke semua anaknya baik laki-laki maupun perempuan. Di dalam analisis DNA, media pemisahan sangat menentukan tampilan pita DNA marka dan pita DNA yang dianalisis. Media pemisahan DNA yang biasa digunakan adalah agarose. Dalam studi ini, menggunakan media pembanding yaitu *Sodium Dedocyl Sulfate Poliacrylamid Gel Electroforesis (SDS PAGE)* untuk membandingkan tampilan pita DNA penanda standar dan DNA kromosom Y yang diisolasi dari darah manusia. Hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa media *SDS PAGE* menampilkan pita DNA yang lebih jelas pada proses pemisahan untuk kedua DNA. Sedangkan pita DNA yang diisolasi dari darah sampel dengan panjang lebih dari 200 pasangan basa yaitu 225 pasangan basa, menggunakan agarose maupun *SDS PAGE*.

Kata-kata kunci : pita DNA, penentuan panjang molekul DNA, sampel darah, media pemisahan agarose dan *Sodium Dedocyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electroforesis*.

Abstract: Before biologist understood the structure of DNA, they had recognized that DNA is inherited traits and the genes that determine them were associated with the chromosomes. Now, the DNA carries the heredity information of the cell, and that the protein components of chromosomes function largest to package and control the long DNA molecule. So that, all of cells from all of part of body will take the same DNA profil if DNA analyzing have done for relationship inherited one person and another. Y chromosome is inherited from father to boys not woman, so that the inherited of gen in Y cromosome is paternality, while extrachromosomal DNA is mitochondria DNA is maternal inherited from mother to all of her children both boys or woman. In DNA analyzing, agarose medium is usually used for separate of DNA. In this study, used another medium for compare the agarose medium is Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electroforesis (SDS PAGE) for appear bands of standar marker DNA (DYS-19) and chromosome Y DNA were isolated from human blood. The result showed the SDS PAGE medium had more clear of appear DNA bands in separated process for both of DNA. While band of DNA were isolated from human blood have long more than 200 bp is 225 bp, both using agarose and SDS PAGE.

Keywords : bands of DNA, determine long of DNA molecule, human blood sample, separate medium are agarose and Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electroforesis.

PENDAHULUAN

DNA membawa informasi keturunan dari sel, dan fungsi sebagian besar komponen protein terkemas dan terkontrol sepanjang molekul DNA. Umumnya sel manusia adalah diploid yang membawa DNA yang identik. Komposisi DNA adalah nukleotida, phosphat, gula deoxyribosa dan 1 dari 4 basa nitrogen. Keempat terdapat pada molekul DNA adalah adenin, dan guanin (purina) dan timin dan sitosin (pirimidin).

Genom manusia terdiri dari lebih 3 milyar pasangan basa dan terorganisasi menjadi 23 kromosom. Gen adalah daerah pada DNA yang mengkode dan mengatur sintesis protein, dan ini meliputi hanya 1,5% dari genom.

Pada analisis DNA, ada bermacam-macam kemungkinan sumber dari bukti analisis DNA. Beberapa tipe bukti biologi yang umumnya digunakan untuk tujuan analisis DNA, antara lain darah, semen, cairan vagina, sekresi dari hidung, kulit dan akar rambut.

Diferensiasi seksual dari sel germinal mengikuti diferensiasi gonad, dimana ditentukan oleh ada atau tidaknya dari kromosom Y. Oogenesis dan spermatogenesis yang berada pada sel germinal dengan komposisi kromosom sex masing-masing XX dan XY. Pada perkembangan mamalia normal, ada atau tidaknya kromosom Y terdiferensiasi dari primordium gonadal menjadi testis atau ovarium. Konsekuensisnya, germ sel primordia yang bermigrasi ke gonad primordia secara sexual berdasarkan sex gonad. Pada germinal betina, kromosom X yang kedua adalah reaktivasi kromosom X sebelumnya pada meiosis dan yang lainnya aktive melalui oogenesis (Monk & McLaren, 1981). Pada germinal jantan, baik kromosom X dan Y terdapat di kompartemen yaitu XY atau badan sex, transkripsional ditahan selama prophase meitosis (Turner *et al*., 2000). Kehilangan produk gen yang dikode adalah kompensasi oleh aktivasi homologi autosomal atau stabilisasi dari prosuk gen (Handel & Eppig, 1998).

Berdasarkan penelitian Stone *et al* (1996), suatu metode untuk menentukan kerangka sex manusia yang telah dikembangkan menggunakan tekhnik genetika molekuler seperti Polymerase Chain Reaction (PCR) dikembangkan untuk kepentingan medik dan forensik. Ada atau tidaknya kromosom Y spesifik dari PCR untuk mengindikasi kromosom sex; seperti contohnya amplifikasi PCR dari pengulangan haploid ditemukan pada kromosom Y (Honda *et al*., 1990; Hummel and Herrmann, 1991, 1993). Penentuan daerah kromosom sex Y atau gen sudah diidentifikasi sebagai faktor penentuan sex pada manusia oleh methode kloning posisional (McLaren, 1990). Oleh sebab itu, urutan yang berhubungan dengan SRY dicatat sebagai rangkaian kromosom Y spesifik pada kebanyakan mammalia.

Jumlah bukti DNA didapatkan selama investigasi sering terlalu sedikit, sehingga untuk keberhasilan *profiling* DNA yang berasal dari pemanjangan DNA adalah ideal. Polimerase Chain Reaction (PCR) adalah tekhnik untuk amplifikasi secara eksponensial dari rata-rata pemanjangan fragmen DNA, sebuah kopi fragmen DNA dapat diamplifikasi dari panjang fragmen DNA sekitar 10,000 pasangan basa. Ini berarti, secara teori, kopi fragmen DNA tunggal dapat diamplifikasi menjadi berjuta-juta kopi dalam waktu singkat (beberapa jam). PCR adalah menguntuntungkan dalam amplifikasi dalam semenit atau mendegradasi sampel. Elektroforesis adalah tekhnik yang digunakan memisahkan molekul besar seperti protein dan asam nukleat berdasarkan ukurannya. Itu berdasarkan kenyataan atau pada prinsip dimana molekul lebih besar mengambil lebih panjang bermigrasi melalui medium berpori

dibandingkan molekul kecil. Agarosa gel elektroforesis adalah metode dari elektroforesis gel digunakan dalam biokimia, biologi molekuler dan kimia klinik untuk pemisahan campuran populasi DNA atau protein dalam matrik agarosa. Agarose gel electroforesis digunakan untuk analisis kualitas dari sampel DNA. Dengan menggunakan ukuran marker yang tepat, itu digunakan untuk menaksir integritas DNA and menghitung ukuran konsentrasi dari berbagai fragmen DNA. Penampakan pita DNA dari elektroforesis ditentukan oleh persentase gel agarosa yang digunakan dalam elektroforesis. Wilkipedia (2013), menyatakan bahwa kebanyakan gel agarosa yang digunakan antara 0,7-2% dilatrutkan dalam buffer elektroforesis. COC (2008) menggunakan 1% gel dengan alasan karena ukuran pori pemisahan yang bagus untuk ukuran dari kira-kira 200 bp sampai 10 kb.

Sodium Dodecyl Sulphat Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan metode dari gel electrophoresis untuk memeisahkan protein berdasarkan pada massanya. Protein yang terlarut dalam sodium dodecyl sulfate (SDS), detergent yang memecah interaksi diantara protein, dan elektroforisasi. Gel yang digunakan untuk SDS-PAGE dibuat dari akrilamid dimana berbentuk polimer cross-linked dari poliakrilamid (Wikimedia, 2013). Protein gels terkomposisi dari poliakrilamid (pada poliakrilamid gel electrophoresis, atau PAGE). Tidak seperti gel agarosa, dimana pemanasan untuk melarutkan agarosa dan kemudian pendinginan, polimerisasi dari akrilamid menjadi poliakrilamid adalah proses kimia yang dipicu oleh senyawa N,N,N',N'-tetraethylenediamine (TEMED). Gel berada diantara 2 lempengan pemisah yaitu spacer aand umumnya lebih tipis dibandingkan gel agarosa untuk isolasi DNA. Studi ini untuk membandingkan pita DNA penanda standar dan menentukan panjang molekul DNA pada kromosom Y yang telah diisolasi dari darah manusia dalam pemisahan menggunakan medium yang berbeda yaitu agarosa dan sodium dodecyl sufate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

METODE

Isolasi DNA dari darah

Dua ratus µl darah ditambah 200 µl *binding buffer* dan ditambahkan 40 µl proteinase K. Vortex supaya homogen. Inkubasi pada suhu 70^0C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 100 µl isopropanol dan vortex supaya homogen. Masukan ke spin colum dan sentrifugasi dengan kecepatan 8,000 selama 1 menit.

Tabung diganti dan tambahkan 500 µl inhibitor remover buffer. Sentrifugasi dengan 8,000 g selama 1 menit. Tabung diganti dan ditambahkan 500 µl washing buffer. Sentrifugasi pada kecepatan 8,000 g selama 1 menit. Tabung diganti dan tambahkan 500 µl washing buffer. Sentrifugasi dengan kecepatan 8,000 g selama 1 menit. Tabung 1.5 ml diganti. Sentrifugasi pada kecepatan 8.000 g selma 1 menit. Tabung diganti dan tambahkan 50 µl Ellution buffer (70^0C). Sentrifigasu dengan kecepatan 8,000 g selama 1 menit.

Polimerase Chain Reaction MIX (Go Taq® Green Master Mix (Promega)) untuk menentukan kromosom Y, dengan 3 siklus yaitu:

Siklus 1 (1 kali tahapan) yaitu tahap 1 : pemanasan dengan suhu 94^0C, selama 5 menit atau pre PCR.

Siklus 2 (35 kali) dengan 3 tahapan yaitu tahap 1 pemanasan pada suhu 94^0C selama 1 menit (mendegradasi ikatan hidrogen pada double helix DNA). tahap ke-2 penurunan suhu sampai 58^0C selama 1 menit (annealing). Tahap ke-3 suhu naik sampai 75^0C selama 1 menit untuk polimerisasi. Siklus ke 3 (1 tahapan) yaitu pada suhu 72^0C selama 1

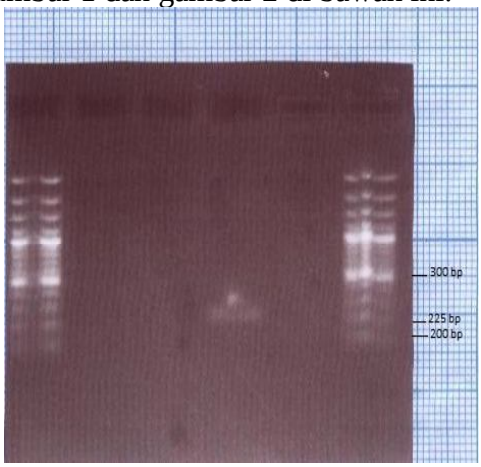
menit dan selanjutnya DNA disimpan pada suhu 4^0C.

Elektroforesis

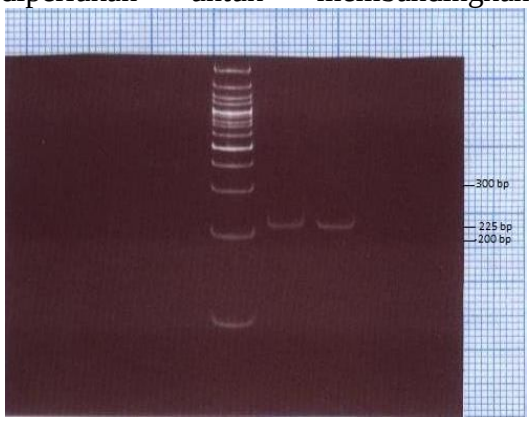
Dengan menggunakan gel agarosa. Campurkan DNA dengan loading buffer dalam tabung. Selanjutnya DNA ditempatkan pada gel agarosa dengan konsentrasi 1,5% dalam peralatan elektroforesis. Running selama 35 menit, 400 A, 60 volt. Elektroforesis dengan SDS PAGE dengan cara teteskan 2 µl Blue Juice loading buffer pada kertas parafilm. Tambahkan 5 µl DNA pada loading buffer sampai homogen. Dengan mikropippet, masukkan sampel ke lubang dari sisir elektroforesis dalam SDS PAGE. Running pemisahan dengan SDS PAGE.

HASIL DAN PEMBAHASAN

DNA berbasis sex kromosom yang dengan mendeteksi kromosom Y pada darah manusia. Metode ini diperlukan untuk membandingkan penampakan pita DNA marker standar pada pemisahan dengan agarosa dan SDS-PAGE dan menentukan panjang molekul DNA yang telah diisolasi dari darah manusia. Pada studi ini menunjukkan penampakkan pita DNA pada media SDS-PAGE lebih jelas dibandingkan agarosa pada elektroforesis, yang ditunjukkan pada gambar 1 dan gambar 2 di bawah ini.



Gambar 1. Elektroforesis menggunakan agarosa



Gambar 2. Elektroforesis menggunakan SDS-PAGE

Hasil ini menunjukkan, DNA yang telah diisolasi pada kromosom Y dengan panjang molekul 225 bp baik pada media agarosa dan SDS-PAGE. Pemisahan menggunakan agarosa dengan konsentrasi 1.5% nampak tidak jelas diantara jarak DNA 100 bp dan 200 bp, diantara 200 bp dan 300 bp dan diantara 300 bp dan 400 bp pada pita marker. Tidak seperti yang namapak pada media agarosa dengan konsentrasi 1.5%, penggunaan media SDS-PAGE dengan konsentrasi 6%, marker nampak jelas pada setiap jarak 100 bp. (Matsudara and Burgess, 1978) menjelaskan beberapa yang penting pada pemisahan dengan sistem SDS-PAGE yaitu (1) resolusi dan sensitivitas yang tinggi, (2) elektroforesis cepat, pewarnaan (staining) dan destaining; (3) reproducibility tinggi,dan (4) murah dalam konstruksi dan operasionalnya. Schâgger and von Jagow (1987) menyatakan penggunaan tricine sebagai ion penarik untuk memisahkan protein pada sistem SDS-PAGE, pemecahan protein kecil pada konsentrasi akrilamid yang lebih rendah dibandingkan sistem glycine-SDS-PAGE. Disamping pemisahan protein oleh SDS-PAGE untuk menentukan berat molekul protein, yaitu dengan mendenaturasi melalui pemanasan dan perlakuan dengan detergent (SDS or sodium dodecyl sulphate) dan perlakuan dengan agen reduksi dimana memisahkan ikatan disulphida (β-mercaptoethanol) (The

University Queensland), asam nukleat yang digunakan. Fraksi dengan berat molekul tinggi dari RNA menggunakan konsentrasi gel 2,2-2,6%. Pada konsentrasi gel 5% dan 7.5%, 4s dan 5s RNA dipisahkan dan ribosomal RNA dikeluarkan (Loening, 1966). Penelitian Moss dan Rosenblum (1972) mengidentifikasi berat molekul hydroxylapatite (Calsium phosphate) dengan metode pemisahan protein sub unit untuk menentukan berat molekul yang menggunakan 0,1% SDS PAGE.

Sebelum elektroforesis, Polimerase Chain Reaction (PCR) telah dilakukan. Tujuan metode ini adalah amplifikasi jumlah kecil DNA yang diisolasi. Untuk amplifiksi DNA dalam timer cycler machine selama 2 jam, dengan 34 siklus. Untuk mewarnai DNA menggunakan Ethidium Bromida (EtBr) pada media agarosa dan warna biru yang mengandung M Tris-HCL pada Blue Juice Loading Buffer pada media SDS-PAGE. Metoda ini berbeda dalam penambahan pewarna menyangkut tempat pewarnaan, yaitu menggunakan tabung pada media agarosa dan M parafilm dalam SDS PAGE .

DAFTAR PUSTAKA

Handel, M.A and Eppig, JJ. 1998. Sexual Dimorphism in the Regulation of Mammalian Meiosis. Current topics in Developmental Biology. 37 : 333-358

Honda, K., Harihara, S., Nakamura, T., Hirai, M., Misawa. 1990. Sex Identification by Analysis of DNA Extracted From Hard Tissue. Jpn. Forensics J. 44 (4) : 293-233

Hummel, S and Herrmann, B. 1991. Y-chromosome specific DNA amplified in ancient human bone. Naturwissenschaften. 78 : 266-267

Hummel, S and Herrmann, B. 1993. Y-chromosomal DNA from Ancient bones. In B Herrmann and S Hummel (eds): Ancient DNA. New York: Springer-Verlag. Pp205-210

Loening, U.E. 1966. The Fractionation of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. Biochem.J. (102) : 251-257

Matsudara, P.T & D.R. Burgess. 1978. SDS microlab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis

Mc Laren, A. 1990. What makes a man a man Nature. 346 : 216-217

Monk, M & McLaren, A. 1981. X Chromosome Activity in Foetal Germ Cells of the Mouse. J. Of Embryol and Experiment. Morphol. 63 : 75-84

Moss, B., Rosenblum, E.N. 1972. Hydroxylapatite Cromatography of Protein-Sodium Dodecyl Sulphate Complexes. J.Bio.Chem.247 : 16

Schâgger, H., von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Stone, A.C., Milner, G.C. 1996. Sex Determination of Ancient Human Skeletons Using DNA. American J. Of Physical Anthropol. 99 : 231-238

The University of Queensland. Without year. Agarose Gel Electrophoresis for DNA.

Turner, P.C., McLennan., Bates, A.D., and White, M.R.H. 2000. Molecular Biology. 2nd edition. Liverpool : BIOS

Wikipedia. 2013. Agarose gel electrophoresis. Wikipedia Foundation, Inc.