

# ANALISIS PCR-RFLP ENZIM *HaeIII* SECARA *IN SILICO* PADA FRAGMENT D-Loop DNA MITOKONDRIA DEMI KEPENTINGAN FORENSIK

Ni Putu Senshi Septiasari<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Diploma IV Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Bali Internasional

e-Mail : senshiseptia@iikmpbali.ac.id

No Tlp WA : 087861850831

## Abstract

*DNA fingerprinting is the most accurate diagnostic tool in forensic cases. This method can be used to identify and differentiate between individuals. The D-loop region of mitochondrial DNA is a useful polymorphic fragment to study. The Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Long Polymorphism (PCR-RFLP) technique will be developed to support the analysis of DNA fingerprinting with mitochondrial DNA markers. The most important component of this technique is the determination of the restriction enzymes. This study aims to analyze in silico to detect restriction sites of mitochondrial D-loop DNA fragments, analyze the HaeIII enzyme by PCR-RFLP in silico and test the HaeIII enzyme by the PCR-RFLP in vitro method. In this study the determination of the human mitochondrial genome sequence from rCRS (revision of the Cambridge Reference Sequence) obtained from the NCBI reference sequence with accession number NC\_012920.1, analysis of enzyme types with FasPCR software, and in silico PCR-RFLP analysis of HaeIII enzymes on The Web Server as well as in vitro tests with HaeIII enzymes. The results of in silico PCR-RFLP analysis on the HaeIII enzyme showed that the enzyme has 2 restriction site positions at bases 16457 and 323. The restriction enzyme HaeIII cuts the mitochondrial D-Loop DNA fragment into 3 DNA fragments. These results have been tested in silico and in vitro which yielded lengths of 106 bp, 435 bp and 318 bp. The success of digestion process in mitochondrial DNA fragments with the HaeIII restriction enzyme is the first step in the DNA fingerprinting method to obtain a DNA profile of the Balinese people for forensic purposes.*

**Keywords:** DNA Fingerprinting, in silico, D-loop region, PCR

## Abstrak

*DNA fingerprinting merupakan alat diagnostik paling akurat dalam kasus forensik. Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan antar individu. Daerah D-loop DNA mitokondria merupakan fragmen polimorfis yang berpeluang untuk diteliti. Teknik Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) akan dikembangkan untuk menunjang analisis DNA fingerprinting dengan penanda DNA mitokondria. Komponen yang paling penting pada teknik ini adalah penentuan enzim restriksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui restriction site secara in silico fragmen D-loop DNA mitokondria. Prosedur pengerjaan dimulai dengan analisis secara in silico untuk mendeteksi restriction site fragmen D-loop DNA mitokondria, analisis enzim HaeIII secara PCR-RFLP in silico dan menguji enzim HaeIII tersebut dengan metode PCR-RFLP secara in vitro. Penentuan sekuen genom mitokondria manusia dari rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) yang diperoleh dari NCBI reference sequence dengan nomor aksesori NC\_012920.1, analisis jenis enzim dengan software FasPCR, dan*

analisis PCR-RFLP enzim *HaeIII* secara *in silico* pada laman *The Web Server* serta uji *in vitro* dengan enzim *HaeIII*. Hasil analisis PCR-RFLP secara *in silico* pada enzim *HaeIII* didapatkan enzim tersebut memiliki 2 posisi *restriction site* pada basa ke 16457 dan 323. Enzim restriksi *HaeIII* memotong fragmen D-Loop DNA mitokondria menjadi 3 fragmen DNA. Hasil ini telah diuji secara *in silico* dan *in vitro* yang menghasilkan panjang yaitu 106 bp, 435 bp, dan 318 bp. Keberhasilan pemotongan fragmen DNA mitokondria dengan enzim restriksi *HaeIII* merupakan Langkah awal metode DNA fingerprinting untuk mendapatkan profil DNA Masyarakat Bali untuk kepentingan forensik.

**Kata Kunci :** D-loop, PCR-RFLP, DNA *fingerprinting*, Enzim *HaeIII*, *in silico*

## PENDAHULUAN

Ilmu kedokteran forensik memiliki ruang lingkup yang luas bukan hanya tentang otopsi, tetapi juga berhubungan dengan kasus *clinical forensic* seperti identifikasi personal. Identifikasi personal dengan analisis DNA atau sering dikenal dengan istilah *DNA fingerprinting* merupakan alat diagnostik paling akurat dalam kasus forensik (Firliana & Daniati, 2014; Yudianto, 2020). *DNA fingerprinting* adalah salah satu metode identifikasi terbaik untuk hampir semua makhluk hidup. Metode ini didasarkan pada sekuen DNA unik yang menjadi ciri khas dari individu tersebut. Sehingga dengan menggunakan metode ini kita dapat mengidentifikasi dan membedakan antar individu. Identifikasi secara personal juga berguna dari aspek medis dalam hal pendonoran darah atau transplantasi organ (Virnarenata, 2018).

Fragmen DNA yang polimorfis merupakan sumber identifikasi genetik manusia (Yudianto, 2020). Fragmen tersebut salah satunya terdapat pada daerah D-Loop (*displacement loop*) DNA mitokondria (mtDNA) (Junitha, 2012; Septiasari, 2022b; Septiasari et al., 2023). Pada studi keragaman genetik mengatakan bahwa daerah D-loop mtDNA merupakan daerah *non coding* yang memiliki polimorfisme tertinggi dalam genom DNA. Penanda mtDNA memiliki kelebihan yaitu sifat pewarisan secara maternal maka penanda ini dapat diaplikasikan jika terdapat kasus yang tidak memiliki pembanding dari kedua orang tua (Siti et al., 2013).

Teknik analisis DNA fingerprinting telah dilaporkan secara umum

---

menggunakan *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs). Teknik ini memiliki tahapan yaitu (1) mengekstraksi DNA tubuh, (2) DNA didigesti dengan enzim restriksi, (3) fragmen di separasi dengan gel elektroforesis, (4) *single stranded* DNA yang diseparasi di *transfer* ke *nylon membrane*, (5) menggunakan DNA *probes radioactive* untuk menentukan fragmen yang komplemen (*Southern Blotting*) dan (6) *exposed* fragmen DNA yang telah dihibridisasi dengan *X-ray film* sehingga *band* DNA yang terhibridisasi akan berwarna gelap dan dapat dijadikan *DNA profile* (Garcia & Miño, 2017). Teknik ini memiliki kekurangan yaitu tahapan yang terlalu panjang serta banyak laboratorium yang tidak memiliki alat khusus untuk melakukan Teknik ini. Maka perlu dikembangkan Teknik lain yang sekiranya mampu dilakukan pada laboratorium dengan metode yang lebih cepat dan sederhana yaitu Teknik *Polymerase Chain Reaction-Restricted Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP).

Prinsip PCR-RFLP ini terdapat tiga tahapan penting yaitu (1) melakukan penggandaan DNA pada gen yang spesifik, (2) memotong untai DNA dalam pola tertentu dengan menggunakan enzim restriksi dan (3) visualisasi hasil pemotongan dengan elektroforesis yang akan menghasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda (Andrew, 2013). Teknik ini baik digunakan karena sampel DNA yang diperlukan sedikit namun dapat menghasilkan data yang akurat. (Budiarto, 2015; Yudianto, 2020). Komponen yang diperlukan pada tahapan ini yaitu: *template* DNA, primer, KIT PCR dan KIT enzim restriksi (Septiasari et al., 2023).

Enzim restriksi merupakan endonuklease yang dapat memotong molekul DNA dengan memutuskan ikatan fosfodiester antara nukleotida satu dengan nukleotida lainnya (Fatchiah et al., 2011). Setiap enzim memiliki *restriction site* atau tempat pemotongan yang spesifik. Pemilihan enzim merupakan tahapan yang sangat krusial karena enzim yang spesifik dapat mengenali urutan fragmen DNA sehingga akan menentukan keberhasilan proses digesti atau pemotongan enzim. Enzim *HaeIII* merupakan enzim restriksi yang sangat

---

komersial digunakan untuk deteksi mutasi pada analisis molekuler. Enzim ini juga dilaporkan dapat menganalisis polimorfisme dan mutasi dari berbagai gen dari beberapa organisme (Fathi et al., 2022; Mankai et al., 2020; Özdemir et al., 2020)

Analisis secara *in silico* diperlukan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui posisi *restriction site* dari enzim *HaeIII* dan perkiraan panjang fragmen yang dihasilkan setelah digesti/pemotongan. Penelitian *in silico* merupakan laboratorium kering yang melibatkan percobaan yang merujuk pada hasil fiktif namun pembuktiannya dapat diuji kembali pada laboratorium basah (*in vitro*), begitu juga hasil penelitian laboratorium basah ada pula yang melibatkan analisis data dari laboratorium kering. Jadi sebenarnya laboratorium kering dan basah sangat berkaitan erat untuk dapat menghasilkan suatu penelitian yang berkualitas dan terukur. Berdasarkan latar belakang tersebut maka diperlukan adanya studi tentang analisis PCR-RFLP enzim *HaeIII* secara *in silico* pada fragmen D-loop mtDNA dan menguji enzim *HaeIII* tersebut dengan metode PCR-RFLP secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui *Posisi Restriction site* enzim *HaeIII* dan perkiraan panjang fragmen hasil digesti sehingga dapat digunakan sebagai penelitian pendahuluan untuk mendapatkan profil DNA Masyarakat Bali demi kepentingan Forensik.

## BAHAN DAN METODE

### a. Deteksi *Restriction Site* Enzim *HaeIII* dengan Metode PCR-RFLP secara *In silico*

Sekuen genom MtDNA yang akan diujikan ditentukan dengan *software* NCBI dengan laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Reverensi yang digunakan adalah reverensi dari *rCRS (revised Cambridge Reference Sequence)* dengan nomor akses NC\_012920.1.

Fragmen daerah D-loop di mtDNA distimulasi dengan menganalisis secara *in silico* untuk menentukan penempelan primer, posisi *restriction site* enzim

---

*Haelll* dan perkiraan ukuran panjang fragmen hasil digesti/pemotongan pada *software* FastPCR (<http://primerdigital.com/tools/pcr.html>) dan Web server (*In silico simulation of molecular biology experiments*)

#### **b. Uji *In vitro* Fragmen D-Loop DNA Mitokondria dengan Enzim *Haelll***

Sampel penelitian berupa *swab* mukosa mulut dari 2 orang Masyarakat Bali yang diambil dengan metode *random sampling*. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi DNA dengan metode fenol-kloroform yang telah dimodifikasi (Junitha et al., 2012). DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan primer daerah D-loop mtDNA (Septiasari, 2022a). Hasil amplifikasi DNA divisualisasi dengan gel agarose 1% dengan tegangan listrik sebesar 50 *volt* selama 1 jam (Septiasari et al., 2017).

Produk PCR dipotong dengan enzim restriksi *Hae III* yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dan inaktifasi enzim pada suhu 80°C selama 20 menit. Hasil pemotongan enzim restriksi dielektroforesis menggunakan gel agarose 2% dengan tegangan listrik sebesar 50 *volt* selama 1 jam (Septiasari et al., 2017, 2023).

#### **c. Analisis Data**

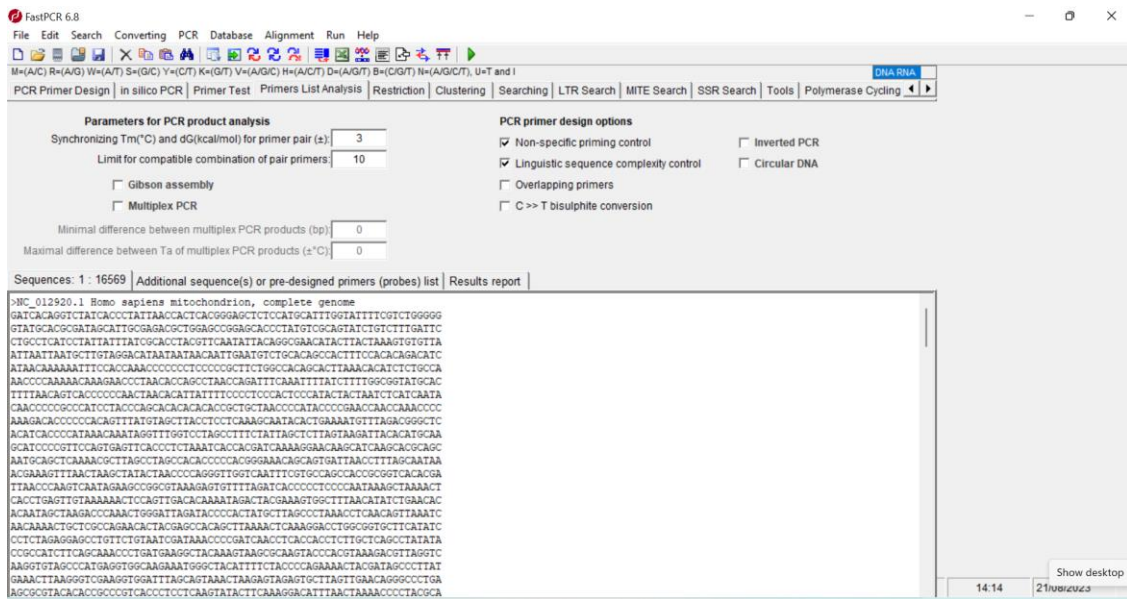
Data yang dihasilkan berupa ukuran panjang fragmen-fragmen DNA. Ukuran pita DNA yang didapatkan kemudian dihitung dengan menggunakan kertas semilog. Fragmen DNA ladder diukur jarak migrasinya, lalu diplot pada kertas semilog sebagai sumbu X sedangkan ukuran ladder DNA yang telah diketahui diplot pada sumbu Y lalu ditarik garis dan dibuat kurva standar. Ukuran DNA dapat diketahui dengan mengukur jarak migrasi DNA dan memasukkannya ke dalam plot kurva standar yang telah dibuat pada kertas semilog maka akan didapatkan perkiraan panjang fragmen/pita DNA dalam ukuran *base pair* (bp) (Septiasari et al., 2017). Ukuran Pita DNA yang didapatkan akan dikonfirmasi dengan akan dibandingkan dengan analisis *restriction site* pada tahapan *in silico*.

---

## HASIL

### a. Analisis Sekuen DNA Mitokondria secara *In silico*

Sekuen genom DNA mitokondria yang akan diujikan ditentukan dengan *software* NCBI dengan laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Referensi yang digunakan adalah referensi dari *rCRS (revised Cambridge Reference Sequence)* dengan nomor akses NC\_012920.1 dengan panjang sekuen sebanyak 16569 bp. Sekuen mtDNA yang didapatkan disimpan dalam bentuk *format* fasta dan di *input* pada *software* FastPCR. Berikut adalah gambaran *software* FastPCR yang telah ditambahkan sekuen mtDNA (Gambar 1).



Gambar 1. Software FastPCR yang telah diinput sekuen genom DNA mitokondria

Tahapan *in silico primer* dilakukan dengan menambahkan sekuen primer khusus untuk mengamplifikasi daerah D-Loop mtDNA. Pada tahapan ini, dapat diketahui perkiraan panjang DNA hasil amplifikasi secara *in silico* yaitu sebesar 859 bp (Gambar 2).

```

In silico Primer(s) search for: 1
r 5'-ctgttaaaagtgcataccgccca
Position: 148->169 100% Tm = 60,7°C

5-ctgttaaaagtgcataccgccca->
|||||
gactgttaaaagtgcataccgcccaaaag

f 5'-tacttgaccacctgtagtac
Position: 987<-1006 100% Tm = 56,4°C

<-catgatgtccaccagttcat-5
|||||
atgtactacagtggtcaagtattta

>r 148->169
5'-ctgttaaaagtgcataccgccca
>f 987<-1006
5'-tacttgaccacctgtagtac

Amplicon size: 859bp Ta=63°C

```

**Gambar 2.** Tahapan *in silico* Primer pada *software* FastPCR

*Restriction analysis* pada *software* FastPCR akan menentukan jenis enzim restriksi yang dapat memotong daerah D-Loop mtDNA. Pada hasil analisis didapatkan jenis enzim restriksi yang memiliki *restriction site* pada daerah D-Loop mtDNA sebanyak 48 jenis enzim dan jumlah enzim restriksi yang tidak memiliki *restriction site* pada daerah D-Loop MtDNA sebanyak 110 enzim.

Dari 48 jenis enzim yang memiliki *restriction site* pada daerah D-Loop mtDNA, maka dipilih satu jenis enzim yang digunakan untuk uji PCR-RFLP secara *in silico*, yaitu enzim *HaeIII*. Uji PCR-RFLP dilakukan pada *software* Web server (*In silico simulation of molecular biology experiments*). Berikut adalah hasil penelusuran enzim *HaeIII* secara PCR-RFLP *in silico* (Tabel 1) dan pada Gambar 3 akan ditampilkan ilustrasi posisi *restriction site* pada urutan basa D-Loop mtDNA.

**Tabel 1.** Hasil penelusuran PCR-RFLP secara *in silico* Enzim *HaeIII* pada *software* The Web server

Panjang Amplikon (bp)	Situs Pemotongan Enzim <i>HaeIII</i>	<i>Restriction Site</i>	Ukuran Fragmen Digesti (bp)
859	5` ...GG <sup>↓</sup> CC... 3`	16457	106 435 318
	3` ...CC <sub>↓</sub> GG... 5`	323	

```

16081 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccacatgaa tattgtacgg taccataaat
16141 acttgaccac ctgtagtada taaaaacca atccacatca aaaccccctc cccatgctta
16201 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caaagccacc
16261 cctcaccac taggatacca aaaaacctac ccacccttaa cagtacatag tacataaagc
16321 catttacgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccattgg atgaccccc
16381 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgtc
16441 actctcctcg ctccgggccc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat
16501 ctggttctca cttcagggtc ataaagccta aatagcccac acgttcccct taaataagac
16561 atcacgatg

  1 gatcacaggt ctatcacct attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggtatfff
  61 cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc acctatgtc
 121 gcagtatctg tctttgatcc ctgcctcacc ctattattta tcgcacctac gttcaatatt
 181 acaggcgaac ataacttacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata
 241 acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacacc ataacaaaaa atttcacca
 301 aacccccct ccccgccttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa
 361 acaagaacc ctaacaccag ctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtatgcac
 421 ttttaacagt

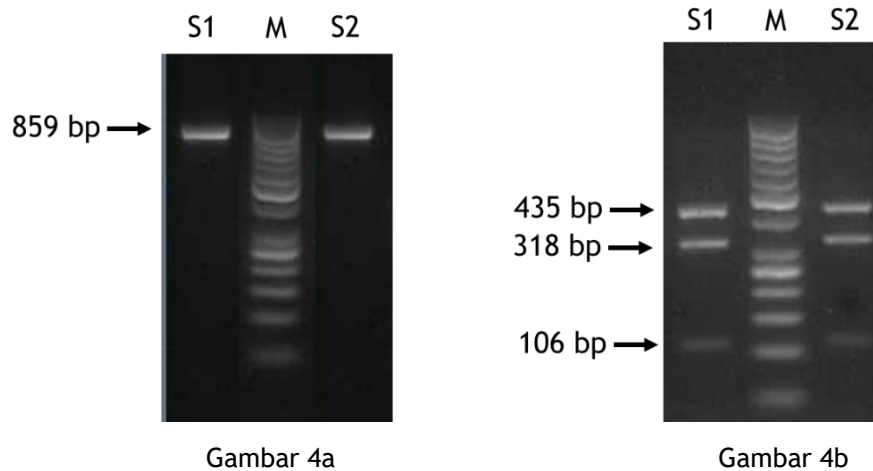
```

**Gambar 3.** Ilustrasi Posisi *Restriction Site* Enzim Hae III pada Sekuen Daerah D-Loop mtDNA

#### b. Uji PCR-RFLP secara *In Vitro*

Hasil analisis secara *in silico* diujikan langsung pada sampel di laboratorium. Berikut gambar elektroforesis hasil digesti dengan menggunakan enzim *HaeIII* (Gambar 4)





**Gambar 4.** a. Gambar Hasil Amplifikasi pada proses PCR; b. Gambar Hasil Digesti dengan pemotongan enzim *HaeIII* (Ket. M =Ladder DNA 50 bp; S1=Sampel No. 1; S2=Sampel No. 2)

Pada gambar diatas diketahui bahwa hasil produk PCR yang amplifikasi pada daerah DNA mitokondria memiliki panjang amplicon 859 bp (gambar 4a) dan telah sesuai dengan analisis *in silico* pemotongan enzim restriksi yaitu sebesar 859 bp (tabel 1). Sedangkan hasil digesti dengan enzim *HaeIII* mendapatkan panjang 435 bp, 318 bp dan 106 bp dan telah sesuai dengan analisis secara insilico baik pada sampel S1 dan sampel S2 (Tabel 1)

## DISKUSI

Analisis PCR-RFLP adalah salah satu teknik laboratorium penting yang digunakan dalam biologi molekuler, genetika dan diagnostik molekuler. Keberhasilan metode berbasis PCR-RFLP tergantung pada kebenaran penentuan DNA, primer dan enzim restriksi yang digunakan. Analisis secara *in silico* menentukan keberhasilan reaksi sebelum proses *in vitro* dilakukan. Disini peneliti melaporkan perkembangan dibidang bioinformatika berbasis web yang tersedia untuk uji secara *in silico*. Sebagian besar perhitungan PCR *in silico* yang dapat ditelusuri melalui web atau *software* bersifat heuristik dan sedikit diantaranya berdiri sendiri, yang berarti perlu banyak *software* dan web untuk menghubungkan tahapan-tahapan yang ingin dilakukan secara *in silico*.

*Software* yang baik untuk PCR *in silico* harus memiliki kemampuan cepat dalam memilih primer atau probe dari urutan target, dapat menghitung suhu TM (*Temperature Melting*) primer, memungkinkan untuk validasi primer dan dapat memprediksi ukuran produk PCR (Kalendar et al., 2017). Maka dari itu, penelitian ini menggunakan beberapa *software* untuk dapat menghasilkan analisis yang sesuai. Penentuan urutan sekuen basa DNA diperoleh dari GenBank NCBI, penentuan jenis enzim restriksi dilakukan pada *software* FastPCR dan uji PCR-RFLP secara *in silico* dilakukan pada *The web server*.

Analisis PCR-RFLP secara *in silico* pada daerah D-loop mtDNA pada penelitian ini terdiri dari 4 tahapan yaitu (1) penentuan sekuen DNA yang diperoleh dari laman NCBI dengan mencari penelusuran sekuen rCRS DNA mitokondria (Gambar 1); (2) melakukan uji primer dengan melakukan tahapan *in silico* primer dengan memasukkan data primer F dan R (Septiasari, 2022a) yang mampu mengamplifikasi daerah D-loop DNA mitokondria pada *software* FastPCR (Gambar 2); (3) mengetahui jenis-jenis enzim restriksi yang dapat memotong fragmen D-Loop DNA mitokondria dengan *software* FastPCR; (4) dan uji PCR-RFLP secara *in silico* dengan enzim *HaeIII* pada fragmen D-Loop DNA mitokondria dengan menggunakan *The Web Server* (Tabel 1).

Pada tahapan *Restriction analysis* pada *software* FastPCR didapatkan jenis-jenis enzim restriksi yang memiliki *restriction site* pada daerah D-Loop mtDNA yaitu sebanyak 48 jenis enzim pada *software* telah dianalisis juga mengenai spesifisitas enzim yang diuji dan posisi pemotongan enzimnya. Dari 48 jenis enzim yang memiliki *restriction site* pada daerah D-Loop mtDNA, maka dipilih enzim *HaeIII* untuk diuji lebih lanjut pada tahapan PCR-RFLP yang dilakukan pada *The Web server* (*In silico simulation of molecular biology experiments*). Tabel 1 dan gambar 3 menunjukkan posisi *restriction site* pada enzim *HaeIII* adalah basa nomor 16457 dan 323 dengan perkiraan hasil pemotongan enzim restriksi menjadi 3 fragmen DNA yaitu dengan ukuran 106 bp, 435 bp, dan 318 bp.

---

Enzim *HaeIII* merupakan enzim restriksi yang sangat mudah didapatkan secara komersial karena merupakan enzim umum yang digunakan untuk mendeteksi mutasi fragmen DNA. Enzim *HaeIII* dihasilkan oleh bakteri *Haemophylus aegyptius* dan mengenali sisi pemotongan pada sekuen GG↓CC dengan tipe pemotongan *blunt end*, yaitu tipe pemotongan yang menghasilkan sekuen dengan ujung tumpul karena pemotongannya bersifat simetris. Enzim ini bekerja dengan memotong-motong DNA pada lokasi-lokasi yang spesifik mengenali daerah atau urutan DNA pendek dalam molekul DNA dimana urutan DNA yang dikenali tersebut bersifat *palindrome* (Dimy Arta & Rahayu, 2013). Digesti dimulai dari pengikatan secara non spesifik dengan DNA makromolekuler, yang diikuti dengan perjalanan difusi acak suatu enzim restriksi menuju DNA. Pengenalan situs oleh enzim restriksi dapat mengaktifkan pusat katalik dan terjadilah pemotongan ikatan fosfodiester pada untai DNA dan menghasilkan dua untai potongan fragmen (Bandelt et al., 2014)

Uji *in vitro* dilakukan untuk mengetahui kebenaran penentuan enzim, posisi *restriction site* dan ukuran fragmen DNA hasil digesti. Pada Gambar 4a menunjukkan hasil amplifikasi primer daerah D-Loop mtDNA yang memiliki ukuran *amplicon* sepanjang ± 859 bp. Sedangkan Gambar 4b merupakan gambar hasil digesti dari pemotongan dengan enzim *HaeIII*. Hasil digesti diperkirakan memiliki ukuran 435 bp, 318 bp dan 106 bp. Hal ini sesuai dengan uji *in silico* PCR-RFLP dan dapat membuktikan bahwa fragmen D-Loop mtDNA yang didigesti oleh enzim *HaeIII* yang awalnya memiliki ukuran 859 bp, memiliki 2 situs pemotongan enzim pada urutan DNA (gg↓cc) sehingga terdapat 3 potongan fragmen yang ukurannya berbeda dari fragmen awal yaitu dengan ukuran 435 bp, 318 bp dan 106 bp. Enzim *HaeIII* dilaporkan digunakan juga untuk dapat melakukan digesti DNA spesifik untuk identifikasi isolat *Thermoactinomyces* dan *Staphylococcus aureus* (Fathi et al., 2022; Mankai et al., 2020) serta studi genetik tentang polimorfisme gen rs2067477 pada populasi masyarakat Turki (Özdemir et al., 2020). Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk

mendapatkan profil DNA Masyarakat Bali. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk menguji enzim ini ke lebih banyak sampel untuk dapat mewakili Masyarakat Bali, sehingga akan mendapatkan keanekaragaman alel/profil masyarakat Bali dengan menggunakan enzim *HaeIII*. Keanekaragaman DNA mitokondria ini dapat dijadikan sebagai *data base* untuk kepentingan Forensik.

## KESIMPULAN

Analisis PCR-RFLP secara *in silico* pada enzim *HaeIII* didapatkan enzim *HaeIII* memiliki tipe pemotongan GG<sup>↓</sup>CC dan memiliki 2 posisi *restriction site* pada basa ke 16457 dan 323. Enzim restriksi *HaeIII* memotong fragmen D-Loop DNA mitokondria menjadi 3 fragmen DNA. Hasil ini telah diuji secara *in silico* dan *in vitro* yang menghasilkan panjang yaitu 106 bp, 435 bp, dan 318 bp.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Drs. I Ketut Junitha, M.S., dan Dra. Ni Nyoman Wirasiti, M. Repro atas bantuan dan masukan selama penelitian ini dilakukan. Penulis juga berterimakasih kepada responden yang telah bersedia membantu peneliti dalam penyediaan sampel sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan baik.

## REFRENSI

- Andrew, N. M. (2013). *TITLE: Assignment of Haplotypes groups by Mitochondrial DNA in BTN323 Population using PCR-RFLP analysis.*
- Bandelt, H.-J., Kloss-Brandstätter, A., Richards, M. B., Yao, Y.-G., & Logan, I. (2014). The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *Journal of Human Genetics*, 59(2), 66-77. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.120>
- Budiarto, B. R. (2015). *POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) : PERKEMBANGAN DAN PERANNYA DALAM DIAGNOSTIK KESEHATAN.* <http://www.scienceguardian.com/blog/a->
- Dimy Arta, P., & Rahayu, S. (2013). ANALISIS POLIMORFISME GEN Growth

- Differentiation Factor 9 (GDF-9) dan HUBUNGANNYA DENGAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN pada SAPI PO. In *Jurnal Biotropika* | (Vol. 1, Issue 3).
- Fatchiah, E., Arumingtyas, L., Widyarti, S., & Rahayu, S. (2011). *Biologi Molekuler, Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga.
- Fathi, J., Hashemizadeh, Z., Javadi, K., & Hosseini-Nave, H. (2022). Evaluation of aminoglycoside modifying enzymes, SCCmec, coagulase gene and PCR-RFLP coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitals in Shiraz, southwest of Iran. *Heliyon*, 8(8).
- Firliana, R., & Daniati, E. (2014). IDENTIFIKASI PERSONAL BERDASARKAN 16 FITUR GEOMETRI TANGAN. *Nusantara of Engineering (NOE)*, 1(1).
- Garcia, D., & Miño, K. (2017). DNA fingerprinting. In *Bionatura* (Vol. 2, Issue 4, pp. 477-480). Centro de Biotecnología y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.12>
- Junitha, I. K. (2012). Peranan Analisis DNA dalam Penyelesaian Masalah Sosial di Masyarakat. In *Orasi Ilmiah*. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana.
- Junitha, I. K., Pharmawati, M., & Rosiana, W. (2012). Genetic Diversity of Soroh Celagi (Pasek Catur Sanak Clan) Base don Y-chromosomal Microsatellites DNA. *The 4th International Conferences on Biosciences and Biotechnology*, 239-243.
- Kalendar, R., Khassenov, B., Ramankulov, Y., Samuilova, O., & Ivanov, K. I. (2017). FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*, 109(3-4), 312-319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>
- Mankai, H., Wende, W., Slama, N., Ayed, A., Roberts, R. J., & Limam, F. (2020). Biochemical and molecular characterization of a restriction endonuclease Tvu2HI from *Thermoactinomyces vulgaris* 2H and study of its R-M system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3105-3113. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.151>
- Özdemir, F., Kir, Y., Tok, K. C., Baskak, B., & Süzen, H. S. (2020). A novel genotyping method for detection of the muscarinic receptor M1 gene rs2067477 polymorphism and its genotype/allele frequencies in a Turkish population. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(6), 653-658. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.46793>
- Septiasari, N. P. S. (2022a). Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Fragmen D-Loop DNA Mitokondria demi Kepentingan Tes DNA. *Kongres IV Satu Dasa Warsa AIPTLMI*, 310-321.
- Septiasari, N. P. S. (2022b). Optimasi PCR dengan Penanda Daerah D-loop DNA Mitokondria untuk Metode Tes DNA. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, 12(2), 76. <https://doi.org/10.24843/ijlfs.2022.v12.i02.p03>
- Septiasari, N. P. S., Junitha, I. K., & Wirasiti, N. N. (2023). Optimasi digesti

enzim restriksi untuk deteksi mutasi daerah D-loop DNA mitokondria dengan metode PCR-RFLP. *Jurnal Biologi Udayana*, 27(1), 65. <https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2023.v27.i01.p07>

Septiasari, N. P. S., Ketut Junitha, I., & Nyoman Wirasiti, N. (2017). RAGAM ALEL DNA MITOKONDRIA MASYARAKAT SOROH PANDE DI BALI DENGAN METODE PCR-RFLP ALLEL VARIATIONS OF MITOCHONDRIAL DNA (mtDNA) OF PANDE CLAN IN BALI WITH PCR-RFLP METHOD. 2, 210-217. <http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Siti, H. H., Gun Gumilar, G., Natalia, D., & Saifuddin Noer, A. (2013). *Variasi Urutan nukleotida Daerah D-Loop DNA Mitokondria Manusia pada Dua Populasi Asli Indonesia Tenggara*.

Yudianto, A. (2020). *Buku Referensi Pemeriksaan Forensik DNA Tulang dan Gigi* (M. Kurniati, Ed.).

---